



Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

Title in Spanish: *La proteína tuberina: diana terapéutica para activar autofagia y mitofagia evitando la progresión a la diabetes tipo 2*

Ana García Aguilar^{1,*}, Carlos Guillén Viejo¹, Manuel Benito de las Heras¹

¹Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

ABSTRACT: Cytoplasmic quality control is essential in maintaining cell viability, and particularly, β pancreatic cells, due to its huge protein synthesis capacity. In this context, it is important the activation of a physiological process called autophagy, in order to eliminate protein aggregates and damaged organelles, resulting in a reduction in the reticulum cell stress. The complex formed by hamartin and tuberin (TSC1-TSC2) has emerged as a central signal, energy status and nutrient-integrating node within the cell. This complex negatively regulates the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), and activates autophagy. In this project we aimed to further investigate new molecular mechanisms of TSC2 regulation, as well as cytoplasmic quality control, autophagy and mitophagy ones. We propose that the TSC2 acetylation status, mediated by the deacetylation activity of sirtuin1 (SIRT1), modulates its stability and protein activity, affecting cell homeostasis.

RESUMEN: El control de calidad citoplasmático es esencial en el mantenimiento de la viabilidad celular, y particularmente, de las células β pancreáticas, debido a su gran capacidad de síntesis proteica. En este contexto, juega un papel esencial la activación de un proceso fisiológico denominado autofagia, conduciendo a la eliminación de agregados proteicos y/o orgánulos, induciendo la atenuación del estrés de retículo celular. El complejo formado por las proteínas hamartina y tuberina (TSC1-TSC2) ha emergido como un núcleo de integración de la señalización de factores de crecimiento y del estado energético celular. Este complejo funciona como un inhibidor de la actividad de la vía del complejo mecanicístico diana de la rapamicina (mTORC1) y un activador de la autofagia. En este proyecto queremos profundizar en el estudio de nuevos mecanismos moleculares de regulación de TSC2, así como sobre dichos mecanismos de control de calidad citoplasmático, autofagia y mitofagia. Proponemos que el estado de acetilación en lisinas de TSC2, mediado por la actividad desacetilasa de la sirtuina1 (SIRT1), modula la estabilidad y actividad de la misma afectando a la homeostasis celular.

*Corresponding Author: ana.garcia.aguilar@ucm.es

Received: October 28, 2016 Accepted: February 13, 2017

Premio "Real Academia Nacional de Farmacia" del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 424-442

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes tipo 2 y papel de la célula β pancreática en la homeostasis metabólica

1.1.a. La diabetes en la actualidad

La diabetes mellitus (DM) constituye uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad ya que ha alcanzado proporción epidémica, y actualmente afecta a 415 millones de personas en todo el mundo. De acuerdo con predicciones de la OMS, se prevé que sean 642 millones en 2040, lo cual supondría un aumento de la prevalencia desde el 9,1% en 2015 al 10% en 2040. La mitad de los pacientes con diabetes no están diagnosticados (1).

1.1.b. Etiología y fisiopatología de la diabetes tipo 2

La DM es una enfermedad caracterizada por un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa tanto en ayuno como en estados postabsortivos, y está asociada a numerosas complicaciones, principalmente cardiovasculares, que conducen al desarrollo de patologías si no se recibe el tratamiento adecuado. Es una enfermedad de carácter poligénico y se da principalmente en adultos. La DM 2 se caracteriza por una disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Este fenómeno se conoce con el nombre de resistencia a insulina.

Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

Aunque se desconocen las causas exactas del desarrollo de DM 2, hay numerosos factores de riesgo que están asociados a esta enfermedad, los más importantes son la obesidad, inactividad física, factores genéticos, y el envejecimiento.

Estudios epidemiológicos indican que la diabetes tipo 2 progresa a lo largo de un continuo empeoramiento en la respuesta a insulina, comenzando por una resistencia periférica a la acción de la misma y terminando con la pérdida de secreción por parte de las células β del páncreas (Figura 1).

Las células β pancreáticas son fundamentales en la regulación de la homeostasis metabólica, y en los primeros

estadios presentan mecanismos compensatorios como aumento de la masa celular (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) para suplir la alta demanda de insulina, generando un estado de hiperinsulinemia compensada, lo que contribuye a largo plazo a agravar este desorden metabólico.

El exceso prolongado de insulina circulante hace que las células β no puedan mantener el mecanismo de compensación y fallan a la hora de responder apropiadamente a la glucosa, lo cual desemboca en el desarrollo de intolerancia a la glucosa y la aparición de una diabetes manifiesta (Figura 2).

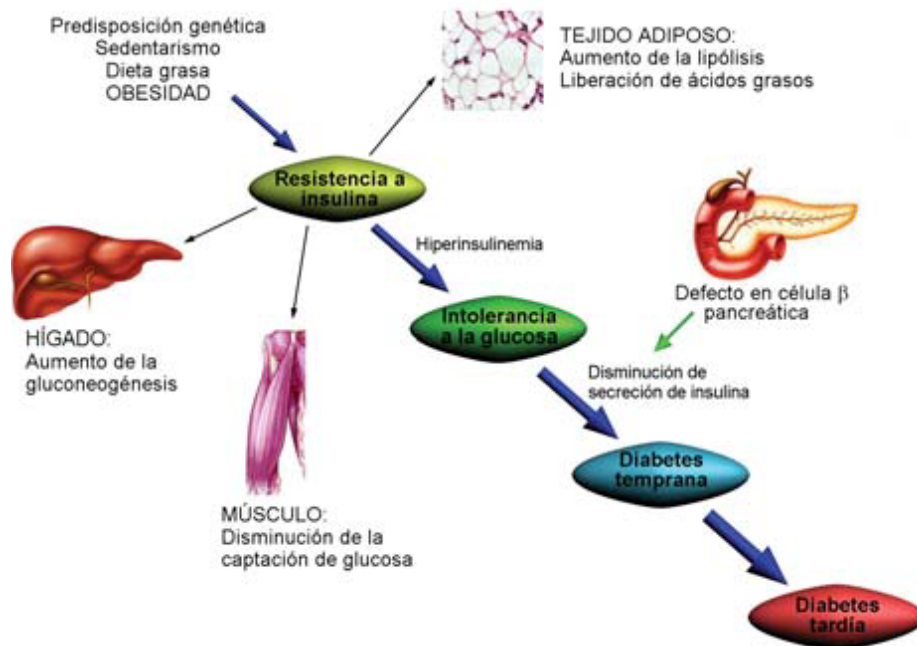


Figura 1. Etapas en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Figura del capítulo Resistencia a insulina en el músculo esquelético: ejercicio y activación de receptores nucleares como estrategias terapéuticas. Redes de señalización y estrategias terapéuticas (2).

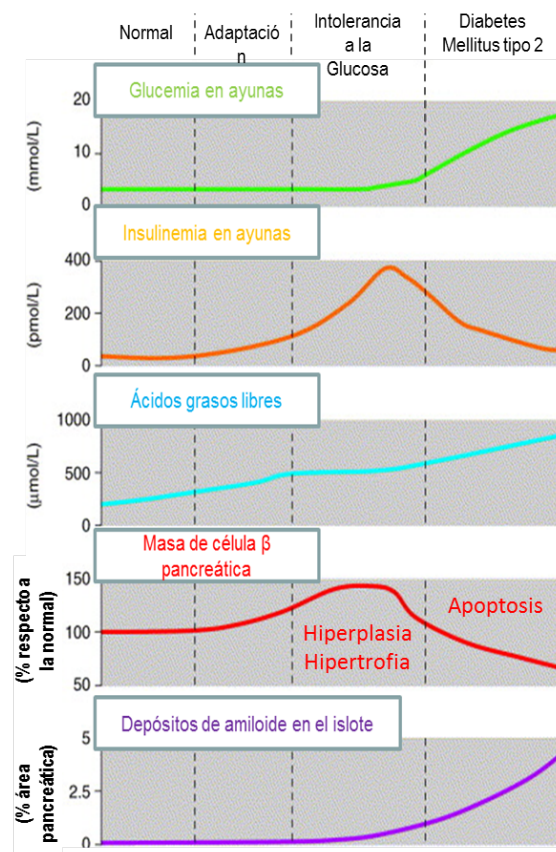


Figura 2. Progresión a la diabetes tipo 2. Se representan los niveles de glicemia en ayunas, insulinemia en ayunas, ácidos grasos libres, masa de célula β pancreática y depósitos de amiloide en cada una de las fases de la progresión a la diabetes tipo 2. El punto de inflexión lo representa el fracaso de la célula β , lo que conlleva una disminución de la insulina circulante y la manifestación de la diabetes. Figura adaptada de (3).

1.2. Papel de la restricción calórica en la homeostasis de las células β pancreáticas

Se sabe que la esperanza de vida de muchos organismos aumenta al ser sometidos a dietas restringidas en calorías, pero dentro de los parámetros saludables (4). En 1935, McCay et al. publican el primer trabajo donde someten ratas a una restricción calórica (RC) y observan que se extiende su esperanza media de vida (5). Estudios posteriores en otros organismos (levadura, moscas, gusanos y peces) demostraron que la RC retarda el envejecimiento y atenúa la aparición de algunas enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y enfermedades vasculares (6). La RC activa la quinasa de la adenina mononucleótido (AMPK), la cual aumenta los niveles de NAD^+ y activa a SIRT1 (7). Además, se ha sugerido que SIRT1 aumenta la longevidad de los organismos y protege frente al cáncer (8). Por otro lado, SIRT1 inhibe la proliferación ya que regula negativamente a mTORC1 (9).

1.2.a. La vía AMPK y su papel en la célula β pancreática

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es

muy importante en el mantenimiento de la homeostasis energética celular. Se activa cuando existen niveles bajos de ATP, en situaciones de bajos niveles de glucosa, hipoxia, isquemia, o choque térmico. La vía de la AMPK regula positivamente procesos catabólicos como la autofagia o la oxidación de ácidos grasos, para la obtención de ATP. AMPK juega un relevante papel en la fisiología de la célula β pancreática, y es considerada como una diana terapéutica prometedora en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

1.2.b. Las sirtuinas y la regulación del metabolismo

Las sirtuinas o desacetilasas de histonas de clase III, cuyo nombre proviene del ortólogo en levaduras *Sir2*, constituyen una familia de enzimas altamente conservadas en la evolución. Las sirtuinas catalizan la desacetilación de proteínas con lisinas ϵ -amino-acetiladas, utilizando como cosustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD^+). Se conocen siete sirtuinas en mamíferos (SIRT1-7) cuyas características se encuentran resumidas en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución subcelular y papel fisiológico de los siete isotipos de sirtuinas.

Isotipo	Localización subcelular	Expresión en tejidos	Funciones	Actividad enzimática
SIRT1	Nuclear y citosólica	Cerebro, músculo esquelético, corazón, riñón, y útero	Supervivencia, longevidad, regulación del metabolismo, inflamación, respuesta a estrés oxidativo	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT2	Citosólica y nuclear	Cerebro	Regulación del ciclo celular, desarrollo del sistema nervioso.	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT3	Mitocondrial, nuclear y citosólica	Cerebro, corazón, hígado, riñón, tejido adiposo marrón	Regulación del metabolismo mitocondrial	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT4	Mitocondrial	Células β pancreáticas, hígado, riñón, corazón, cerebro	Regulación del metabolismo mitocondrial y apoptosis	ADP-ribosiltransferasa
SIRT5	Mitocondrial	Cerebro, corazón, músculo.	Apoptosis	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente
SIRT6	Núcleo, asociado a heterocromatina	Músculo, cerebro, corazón, ovario y hueso	Estabilidad genómica, reparación del DNA	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente, ADP-ribosiltransferasa
SIRT7	Nucleolo	Sangre	Regulación de la transcripción y del ciclo celular	Desacetilasa NAD ⁺ dependiente

De los siete isotipos de sirtuinas en mamíferos, es SIRT1 la proteína más estudiada de la familia. Aunque SIRT1 se encuentra predominantemente en el núcleo, también puede localizarse en el citoplasma en determinadas situaciones gracias a que en su estructura proteica presenta secuencias de localización y de exclusión nuclear (11).

En relación con el metabolismo, son numerosas las dianas que se regulan por acetilación/desacetilación, muchas de ellas están implicadas en la vía de la señalización de la insulina. Una de ellas, es PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B), proteína implicada en la defosforilación del IR, IRS1 o 2, disminuyendo la vía de señalización de la insulina. PTP1B es regulado negativamente, entre otros, por desacetilación mediada por SIRT1, por lo que la activación de SIRT1 favorece la señalización de insulina en ratones con un fenotipo diabético (*Irs2^{-/-}*) (12). Por otro lado, el ratón que sobreexpresa SIRT1 en la célula β pancreática (BESTO) muestra una mejora de la tolerancia a la glucosa y un aumento de la secreción de insulina debido a que SIRT1 desacetila e inactiva UCP2, provocando un aumento en la síntesis de ATP, y ello favorece la secreción de insulina (13).

Otra diana activada por desacetilación mediada por SIRT1 es PGC-1 α . En el músculo y en el tejido adiposo marrón produce activación de la termogénesis, lo cual protege frente a la aparición de obesidad y disfunción metabólica (14).

Como conclusión, se plantea la idea del uso de activadores de SIRT1 como el resveratrol en el tratamiento de la diabetes tipo 2, ya que son capaces de disminuir la resistencia a la insulina y favorecen la supervivencia de la

célula β pancreática.

1.3. El complejo *tsc1-tsc2* como nexo de integración de señales y activación de la autofagia

1.3.a. Complejo de esclerosis tuberosa (TSC)

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es una enfermedad genética hereditaria de carácter autosómico dominante. Alrededor del 85% de los casos de TSC se debe a mutaciones en el gen *TSC1* (gen 1 de la esclerosis tuberosa) o en *TSC2* (gen 2 de la TSC). *TSC1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34) (15), y *TSC2* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) (16). El resultado de estas mutaciones conduce a la proteína truncada con pérdida de su función. Debido a estas investigaciones, los genes *TSC1* y *TSC2* se clasifican como genes supresores de tumores.

1.3.b. Complejo *TSC1-TSC2*: Estructura proteica y funciones

Los genes *TSC1* y *TSC2* dan lugar a las proteínas TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina) respectivamente, sin homología entre ellas y muy poca con otras proteínas. Ambas proteínas se asocian formando un complejo heterodimérico denominado TSC1-TSC2.

TSC1 es una proteína de expresión ubicua y está compuesta por 1164 aminoácidos (130 kDa). TSC1 se une y estabiliza a TSC2, bien previniéndolo de su degradación mediada por ubiquitinación. La proteína TSC2 está formada por 1807 aminoácidos (200 kDa), y presenta una región muy conservada y con homología con las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) rap1GAP y mSPA1 (17) (Figura 3).

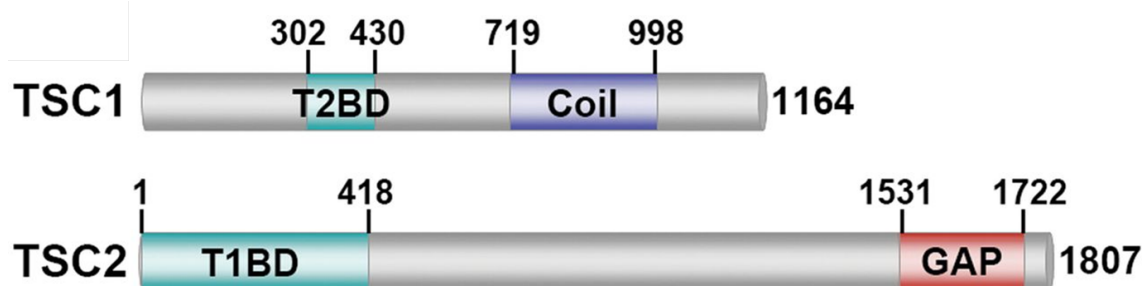


Figura 3. Estructura y dominios de las proteínas TSC1 y TSC2. T2BD (dominio de unión para TSC2), T1BD (dominio de unión para TSC1). Figura tomada de (18).

El complejo TSC1-TSC2 regula importantes vías de señalización en función del estado nutricional y energético celular, inhibiendo al complejo 1 de mamífero diana de la rapamicina (mTORC1). Bajos niveles de nutrientes y energía inducen la función GAP del TSC2 sobre Rheb

(homólogo de Ras enriquecido en cerebro), lo que favorece su actividad GTPásica aumentando la conversión de Rheb-GTP a Rheb-GDP, e inactivando a mTORC1 (18) (Figura 4).

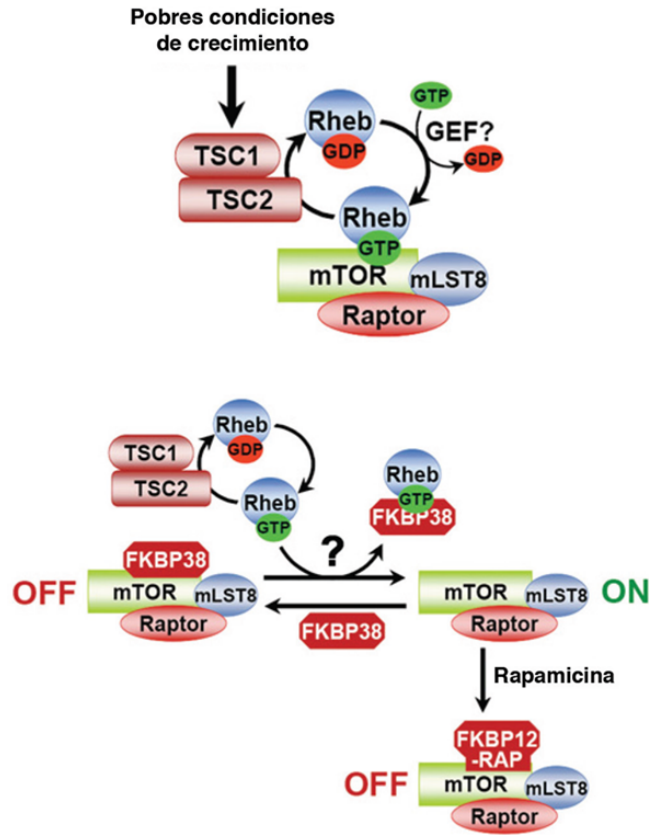


Figura 4. Regulación de mTORC1 mediada por la actividad GAP de TSC2. Figura tomada de (18).

1.4. La vía de mtorc1 y sus funciones

La diana de rapamicina de mamífero (mTOR) es una proteína serina/treonina quinasa de 230 kDa, y es el componente principal de dos complejos multiproteicos mTORC1 y mTORC2. Ambos complejos tienen en común a mLST8 (proteína letal en mamíferos) y DEPTOR (proteína de interacción con mTOR con dominio DEP), ésta última es un inhibidor de mTOR.

Ambos complejos tienen una proteína característica esencial para el ensamblaje de todo el complejo y sus interacciones con otras proteínas reguladoras. En el caso

de mTORC1 es Raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) (19). Además mTORC1 contiene otras proteínas reguladoras como es el sustrato de Akt de 40 kDa rico en prolina (PRAS40), cuya activación inhibe a mTOR (Figura 5).

Una de las características fundamentales que diferencian a los complejos de mTOR es su dispar sensibilidad al compuesto que, paradójicamente, les da nombre; la rapamicina. Mientras que mTORC1 es inhibible por rapamicina, mTORC2 es rapamicina-insensible.

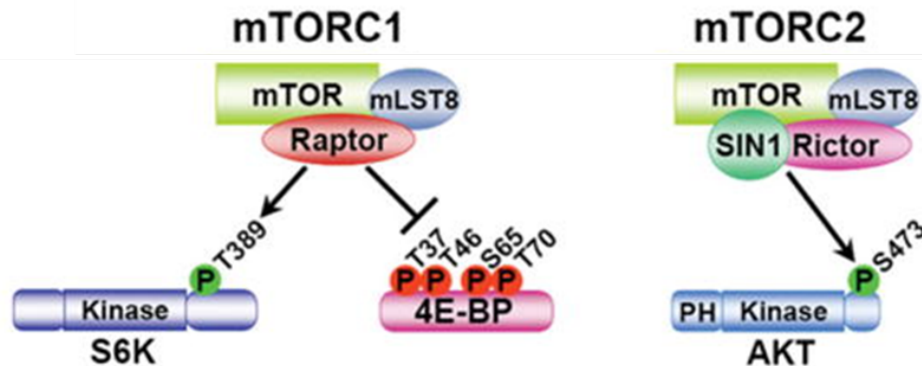


Figura 5. Complejos de mTOR (mTORC1 y mTORC2). Figura tomada (19).

mTORC1 es el regulador principal del crecimiento celular; sensa e integra la disponibilidad de diversos

factores nutricionales y medioambientales: factores de crecimiento, aminoácidos, nivel energético (ATP) y

factores de estrés celular. Sus funciones son acoplar estas señales a una respuesta de crecimiento celular, favoreciendo procesos anabólicos mediante fosforilaciones de diversas dianas, como sería por ejemplo la síntesis lipídica o la traducción (síntesis de proteínas) y limitando algunos procesos catabólicos como la autofagia (20).

En relación con el metabolismo, diferentes estudios han demostrado que la hiperactivación de la ruta mTORC1 se traduce en una desensibilización de la respuesta a la insulina por un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que la p70S6K (diana de mTORC1) fosforila en serina (307) a IRS-1, y esta fosforilación impide que los IRS sean fosforilados por el IR en respuesta a la insulina (21).

1.4.a. Importancia de la vía TSC2 / mTORC1 en célula β

Prueba del gran interés que despertó el papel del complejo TSC1-TSC2 en célula β fue la aparición independiente de 4 modelos animales tejido-específicos en poco más de un año. Existen dos modelos de ratón knock-out de TSC2 específico de célula β (β Tsc2^{-/-}). Shigeyama y colaboradores describen la hiperactivación de mTORC1 y un aumento temprano de la masa de célula β por hipertrofia celular, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia, además de función secretora aumentada. Sin embargo a partir de las 35 semanas, la masa de célula β disminuye y los animales desarrollan diabetes severa. El tratamiento con rapamicina (inductor de la autofagia) en animales β Tsc2^{-/-} impide el fracaso de la masa de célula β (22).

1.5. El sistema ubiquitín-proteasoma, autofagia y mitofagia en el control de calidad citoplásmico

La regulación de la expresión génica ocurre a distintos niveles, desde el control de la transcripción hasta las modificaciones postraduccionales (PTM) que sufren las proteínas. Existe una gran variedad de PTM, algunas de las más importantes son la metilación, la acetilación, la fosforilación, la sumoilación y la ubiquitinación. Es necesario para la supervivencia celular el mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas.

En la célula existen dos sistemas de degradación principales, los cuales tienen como funciones la eliminación de productos que no son útiles para la célula en determinadas situaciones, o cuya acumulación puede ser tóxica; además, los productos de esta degradación son reutilizados para la síntesis de nuevas moléculas o son metabolizados para la obtención de energía. Estos sistemas de degradación son el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) y la autofagia.

1.5.a. El sistema ubiquitín-proteasoma (UPS)

La ubiquitinación es un proceso enzimático postraduccionales de las células eucariotas que fue descubierto en el año 1975 por el grupo del Dr. Ciechanover, y consiste en la unión covalente de la ubiquitina (Ub) a otra proteína, lo cual la marcará para su envío al proteasoma 26S, donde será posteriormente degradada.

1.5.b. Autofagia

La autofagia es un proceso fisiológico mediante el cual proteínas u orgánulos citoplasmáticos son conducidos a los lisosomas para su degradación, confiriendo a la célula eucariota una vía de degradación alternativa al sistema ubiquitín-proteasoma.

La primera función de la autofagia que se describió fue la de adaptación al ayuno, sin embargo, es muy importante también en el control de calidad citoplásmico, eliminando proteínas mal plegadas o defectuosas, orgánulos dañados o microorganismos infecciosos; atenuando el estrés de RE (23). Además, favorece la supervivencia celular en situaciones de estrés, ya que permite la obtención de nutrientes y energía a través de la degradación de componentes citosólicos (24).

Existen tres tipos de autofagia fundamentales:

-Macroautofagia (en adelante referida como autofagia): Este proceso comienza con la formación de novo de una cisterna membranosa (proveniente del RE, y otros compartimentos como la membrana externa mitocondrial, membrana plásmica o el aparato de Golgi), que crece en longitud y es denominada fagóforo hasta formar el autofagosoma. El autofagosoma puede recibir vesículas desde los endosomas lo que va provocando la acidificación del fagosoma. Al compartimento resultante se le denomina anfisoma. Como último paso, el anfisoma se fusiona con los lisosomas dando lugar a los autolisosomas, en los que por la acción de las proteasas o catepsinas lisosomales se degrada el material encerrado.

-Microautofagia: En este caso la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, donde son degradadas. En estas invaginaciones se incorpora material citosólico.

-Autofagia mediada por chaperonas (CMA): Mediante este proceso, la chaperona citosólica (hsc70) reconoce una secuencia específica en las proteínas citosólicas (KFERQ) y las lleva a la membrana lisosomal, donde se introducen en el interior del lisosoma gracias a un transportador localizado en la membrana del lisosoma (LAMP-2A).

Se han identificado hasta ahora 34 proteínas Atg en levaduras algunas de las cuales han sido identificadas sus funciones (25). Modelos animales con autofagia deficiente por delección de un gen crítico, *Atg7*, de forma específica en célula β , muestran una disminución de la masa de célula β , así como del reciclaje basal de orgánulos y proteínas, demostrando su papel clave en el mantenimiento de la masa y la función de la célula β (26). Otros trabajos y resultados previos del grupo demuestran el papel protector de la autofagia en las células β frente a estrés de RE (27).

Se puede considerar que el proceso de la autofagia consta de varias etapas: 1) Fase de nucleación o ensamblaje; 2) Elongación y formación de las vesículas; 3) Fusión de vesículas (autofagosomas); 4) Degradación del contenido (autofagolisosomas). En mamíferos, existen 6 homólogos de *Atg8*, que se pueden subdividir en la familia de la proteína 1 de la cadena ligera 3 (LC3A, LC3B y

LC3C) y la de la proteína asociada al receptor gamma-ácido amino butírico (GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2) (28). Existen dos formas de LC3, LC3-I es la forma no lipidada y que se encuentra libre en el citoplasma; y LC3-II es la forma lipidada (conjugada con fosfatidiletanolamina) esencial para el proceso de la autofagia y localizada en la membrana de los autofagosomas. La conversión de LC3 es un método muy común para la evaluación experimental de la activación del flujo autofágico. Otras proteínas, entre ellas p62/SQSTM1 (secuestrosoma 1), contienen secuencias que interaccionan con LC3 y sirven como adaptadoras entre estructuras proteínas ubiquitinadas y orgánulos dañados y la maquinaria autofágica.

Debido a que una autofagia defectiva contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica), se propone a las moléculas activadoras de autofagia o la restricción calórica como potenciales estrategias terapéuticas para atenuar la progresión de dichas enfermedades (29).

1.5.c. Autofagia específica de mitocondrias (mitofagia)

Las mitocondrias juegan un papel esencial en numerosos procesos bioenergéticos en las células eucariotas, proveyendo de energía que se genera a través de la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias constituyen una red interconectada de alta plasticidad y dinámica, con un número relativamente constante de las mismas mantenido por un balance entre eventos opuestos de biogénesis mitocondrial y mitofagia. Frente a un daño mitocondrial, se pierde el potencial de membrana mitocondrial y se induce el proceso denominado mitofagia. Las mitocondrias dañadas acumulan una proteína en la membrana externa mitocondrial denominada PINK1 (quinasa 1 inducida por PTEN), la cual recluta a una ubiquitina-proteína ligasa E3 citosólica denominada PARK2/Parkin, que media la ubiquitinación de proteínas mitocondriales. Estas son reconocidas por otras proteínas adaptadoras (p62 y HDAC6) las cuales unen LC3 unido a PE (forma lipidada), iniciando la degradación (30). Este proceso es selectivo, y no ocurre en mitocondrias “sanas”, ya que éstas son capaces de importar PINK1 y degradarlo por la proteasa PARL (proteína romboidea asociada a presenilinas), de una forma dependiente de potencial de membrana, inhibiendo así el proceso de mitofagia (31).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Se usó la línea de células β pancreáticas MIN6 originaria de insulinoma murino (Miyazaki *et al.*, 1990), cultivada en DMEM (glucosa 4,5 g/l) y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% y 2-mercaptoetanol 50 μ M (como agente protector frente al daño oxidativo). Además, a partir de ésta, se generaron otras dos líneas de forma estable MIN6-Scrambled-shRNA y MIN6-

TSC2shRNA mediante infección lentiviral y selección con genética.

También, fueron usadas las células embrionarias de riñón humanas (HEK 293T) y fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), cultivados en DMEM (4,5 g/l) y suplementados con FBS 10% y HEPES. Las células MEF Tsc2 -/- así como sus controles MEF Tsc2 +/- fueron generosamente proporcionadas por Dr. Kwiatkowski (Harvard Medical School, Boston, EE.UU.). Por último, las células MEF Sirt1 -/- así como sus controles MEF Sirt1 +/- procedían del cultivo primario y fueron generosamente proporcionadas por la Dra. María Monsalve (IIB, CSIC, Madrid).

2.2. Técnicas de ADN recombinante

2.2.a. Cultivo de bacterias

Para la producción de ADN plasmídico recombinante se utilizaron bacterias ultracompetentes E.coli XL2-Blue. Las bacterias fueron crecidas en placas Petri con agar bacteriológico 1.5% (p/v) en medio LB, Luria Bertoni: NaCl (10 g/l), triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l). El medio fue autoclavado, y enfriado hasta 55°C para la adición de antibióticos: ampicilina (100 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml). Entre 20-25 ml fueron vertidos por placa Petri, sobre la cual, una vez solidificado el medio, se sembraron las bacterias por estrías con un asa de Kollé.

Todas las inoculaciones para amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar con antibiótico.

2.2.b. Purificación de plásmidos

Los plásmidos fueron purificados de cultivos bacterianos por el método de la lisis alcalina. Para ello, se utilizó el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando las soluciones incluidas para obtener de una forma rápida y sencilla y con un alto rendimiento un DNA de gran calidad.

Finalmente, el DNA purificado se deja secar al aire libre durante 5-10 minutos para que se evapore el etanol, y se resuspende en agua destilada, donde se mantiene a 4°C de manera estable hasta su uso.

2.2.c. Experimentos de transfección y co-transfección transitoria

Las células fueron sembradas de manera semi-confluyente, y al día siguiente fueron transitoriamente transfectadas y/o co-transfectadas con diferentes plásmidos usando tres métodos diferentes:

- Lipofección.
- Electroporación.
- Poliaminas.

2.3. Análisis de la expresión de proteínas

2.3.a. Western-blot

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con tampón de lisis. El lisado se pasó a tubos eppendorf y tras 5-10 minutos en

hielo y tras agitación fueron centrifugados (15 min, 15,000 × g, 4°C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico. A continuación, se valoraron las proteínas por el método de Bradford.

Las muestras son desnaturalizadas (3 min, 95°C) y cargados 15-30 µg por muestra en geles de poli(acrilamida). Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1% (p/v) pH 8.3, a un voltaje constante de 100-140 v durante 1.5-2 horas. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) previamente activadas con metanol.

El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicina, metanol 20% (v/v). La electrotransferencia fue llevada a cabo con un voltaje constante de 100 v, durante una hora y diez y en frío. Finalizada la transferencia, se bloquearon las membranas en TTBS suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave.

Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS hasta el día siguiente, en una cámara fría a 4°C, con agitación suave. La lista con todos los anticuerpos primarios y sus diluciones se encuentra en la sección materiales.

Al día siguiente, la membrana se lavó 3-5 veces con TTBS durante una hora en agitación fuerte, tras la cual se incubó con una solución en TTBS de anticuerpo secundario frente a la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se volvió a lavar con TTBS otras 3-5 veces durante aproximadamente una hora, en agitación fuerte.

Para la detección de los anticuerpos se usó el método de quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron con ECL Plus Western Blotting Detection durante 5 minutos, y se revelaron en el ChemiDoc por detección de quimioluminiscencia.

2.3.b. Inmunoprecipitación

De los extractos proteicos de cultivos celulares se preparan muestras con una cantidad de proteína uniforme (150-400 µg de proteína) en un volumen final de 500 µl ajustado con tampón de lisis, se añadió el anticuerpo de interés para inmunoprecipitar (1-2 µg de anticuerpo), y se mantuvo toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente, para quedarse con toda la proteína que se ha unido al anticuerpo, se añadió el extracto proteico 20-30 µl de una mezcla de proteína A al 50% (Roche) con tampón de lisis (1:1, previamente lavada varias veces con el tampón) y se incubaron de 1 a 2 horas a 4°C.

La fase sedimentada (con la proteína A conjugada con la agarosa) se lavó varias veces con 500 µl de tampón de lisis, dejando en un último paso el precipitado lo más seco posible. Después, se añadió el mismo volumen de tampón de Laemmli 2X que el ocupado por la fracción de agarosa. Las muestras se cargan en geles de electroforesis para su detección por western-blot.

2.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Se utilizó one-way ANOVA para comparación múltiple (Bonferroni's post-test), o bien, para análisis comparativo de dos datos, el t test (unpaired). Como valor de discriminación de diferencias estadísticamente significativas se utiliza $p \leq 0.05$.

2.5. Materiales

2.5.a. Listado de anticuerpos primarios

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución (Uso)
P-ACC (S79)	Cell Signaling (#3661)	IgG rabbit	1:1000 (WB)
Acetylated-Lysine	Cell Signaling (# 9441)	IgG rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
β-actina (AC-74)	Sigma-Aldrich (A5316)	mAbIgG1 mouse	1:5000 (WB)
Flag	Sigma-Aldrich (F1804)	mAb IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
GFP (B-2)	Santa Cruz Biotechnology (sc-9996)	mAb IgG Mouse	1:1000 (WB)
HA	Sigma-Aldrich (H6908)	IgG Rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
LC3B	Cell Signaling (#4108)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Nitrotirosina	Merck Millipore (#06-284)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
p62/SQSTM1	Progen (GP62)	IgG Guinea pig	1:1000 (WB)
p70S6K	Cell Signaling (#9202)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PGC-1α (3GS)	Cell Signaling (#2178)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)

Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

P-p70S6K (Thr-389)	Cell Signaling (#9205)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PINK1	Novus Biologicals (BC100-494)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
S6 (5G10)	Cell Signaling (#2217)	mAb Rabbit IgG	1:1000 (WB)
P-S6 (S235/236)	Cell Signaling (#2211)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
SIRT1 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology (sc-15404)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
α -Tubulina	Sigma-Aldrich (T6199)	mAb Mouse IgG1	1:5000 (WB)
TSC2	Cell Signaling (#3612)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
TSC2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology (sc-892)	IgG Rabbit	1:100 (IP)
TSC2 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology (sc-893)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Ubiquitina (FK2-H)*	Enzo Life Sci (BML-PW0150)	mAb Mouse IgG1	1:1000 (WB)
V5	Life Technologies (R960-25)	mAb Mouse IgG2	1:1000 (WB)

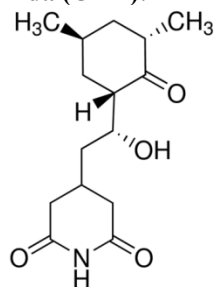
2.5.b. Listado de anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Conjugado	Dilución (Uso)
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:5000 (WB)
Sheep anti-mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:3000 (WB)
Rabbit anti-guinea pig	Abcam (ab-6771)	HRP	1:7000 (WB)

2.5.c. Reactivos

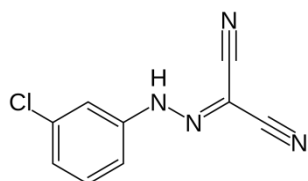
Los agentes farmacológicos usados fueron:

- Cicloheximida (CHX):**



Es un inhibidor de la síntesis proteica en los eucariotas.
Solubilidad: Agua. Concentración 6-100 μ g/ml.

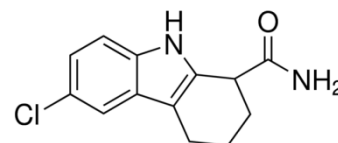
- Carbonilcianuro m-clorofenil hidrazona**



(CCCP)

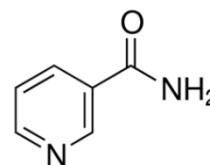
Es un inhibidor químico de la fosforilación oxidativa.
Solubilidad: DMSO. Concentración 5-20 μ g/ml.

- EX-527**



Es un potente y selectivo inhibidor de SIRT1
Solubilidad en DMSO.
Concentración de uso: 100 nM.

- Nicotinamida**



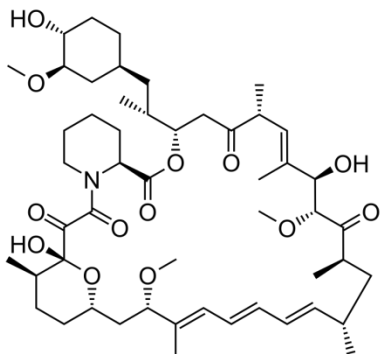
Es un inhibidor alostérico de la actividad de SIRT1 a

altas concentraciones (5mM).

Solubilidad en agua.

Concentración 5 mM.

• **Rapamicina-Sirolimus:**

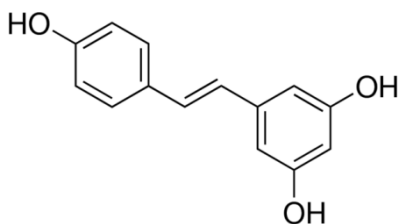


La rapamicina actúa inhibiendo a mTORC1.

Solubilidad en DMSO.

Concentración 20-40 nM.

• **Resveratrol:**



Es un potente activador de SIRT1 y presenta numerosos efectos intracelulares (antioxidante, antiinflamatorio, antienvjecimiento, antitumoral...).

Solubilidad en DMSO. Concentración 25 µM-100 µM (50 µM).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 modula la vía de mTORC1 y la autofagia

El grupo de Ghosh demostró la interacción de las proteínas SIRT1 y TSC2 en células HeLa, y la modulación de la ruta de mTORC1 (9). Sin embargo, no demuestran

ninguna evidencia de que la proteína TSC2 se acetile, pero sugieren que probablemente ésta pueda sufrir acetilaciones en lisinas, en condiciones de crecimiento y altos niveles de energía, y que esto regule su actividad.

Para elucidar el papel de las sirtuinas en la regulación de mTORC1 vía TSC2, usamos la línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293T) y estimulamos con dos moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1, la NAM (inhibidor alostérico) y el RESV (activador) durante 2 y 4 horas. A continuación, recogimos el experimento y realizamos un WB para ver la activación de la ruta de mTORC1, y una IP de las lisinas acetiladas y WB frente a TSC2.

En primer lugar, observamos que la estimulación con NAM (5 mM) aumentó la acetilación en lisinas de TSC2 a todas las horas, e incrementó la fosforilación de la treonina 389 de la p70 (diana de mTORC1), lo cual indica una activación de la ruta de mTORC1. Por otro lado, el tratamiento con RESV (50 µM) mantuvo el estado de acetilación de TSC2, y disminuyó la actividad de mTORC1 (Figura 6). Algunos autores defienden que el resveratrol inhibe la ruta mTORC1 debido a que promueve la asociación entre mTOR y DEPTOR (componente inhibitorio de mTOR) e inhibe como consecuencia a mTORC1 (32). Asimismo, RESV activa a la AMPK inhibiendo la vía de mTORC1 por una vía independiente de TSC2, mediante fosforilaciones en la proteína Raptor (Ser 722 y 792), disminuyendo la activación de mTORC1 (33). La asociación física de TSC2 y SIRT1 se demostró mediante inmunoprecipitación de TSC2 y WB frente a SIRT1. Además, encontramos que dicha interacción se vió incrementada en respuesta a RESV (Figura 6).

En el trabajo de Kuo identificaron que la acetil transferasa N-terminal ARD1 interacciona con TSC2, promoviendo su estabilización, conduciendo a una disminución en la señalización de mTORC1 y esto está relacionado con una inhibición del crecimiento de líneas celulares de tumores humanos de mama (34). Esta observación parece que va en contra de nuestros resultados obtenidos, sin embargo, son modificaciones diferentes de TSC2, ya que en el paper de Kuo, ARD1 no afecta al estado de acetilación en lisinas de TSC2.

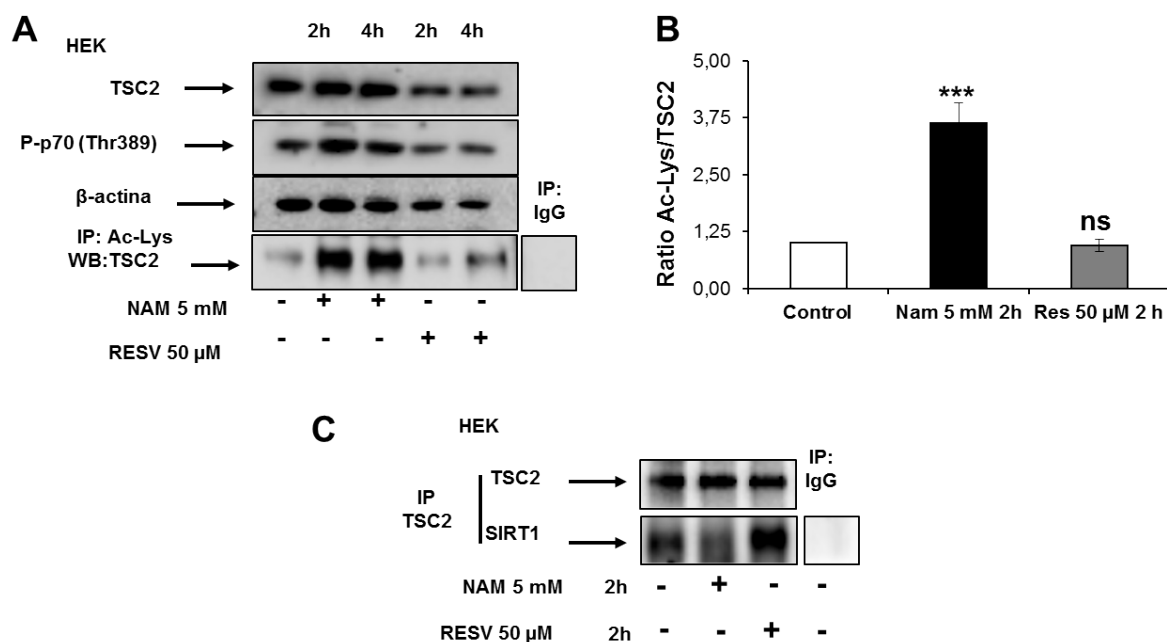


Figura 6. Modulación del estado de acetilación en lisinas de TSC2 y la regulación de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV. (A) Inmunoprecipitación (IP) de las lisinas acetiladas (Ac-Lys) endógenas procedentes de células HEK 293T estimuladas o no con NAM y RESV durante 2 y 4 h, y WB con el anticuerpo de anti-TSC2. Asimismo, se realizaron WB frente a las proteínas P-p70 (T389), TSC2 y β-actina. (B) Cuantificación del ratio de lisinas acetiladas de TSC2 en respuesta a NAM o RESV, representados como la media ± la desviación estándar (SD). *** P<0.001; n.s. sin diferencia significativa. (C) IP del TSC2 endógeno de células HEK 293T en respuesta a NAM y RESV (2h), y WB frente a SIRT1 y TSC2 para ver su asociación física.

Se ha descrito que SIRT1 es una proteína que se encuentra fundamentalmente en el núcleo, aunque presenta un transporte núcleo-citoplasma, gracias al cual puede localizarse también en el citoplasma en respuesta a diferentes estímulos. En su estructura se localizan secuencias de localización nuclear (NLS) y de exclusión nuclear (NES) (11). Sin embargo, TSC2 es una proteína fundamentalmente citoplasmática. Para corroborar estos datos obtenidos con proteínas endógenas, hicimos experimentos de co-transfección de manera transitoria con las proteínas recombinantes HA-TSC2, Flag-SIRT1-WT, SIRT1-WT-GFP, SIRT1-NL2-GFP (de localización exclusivamente citoplasmática) y SIRT1-NES-GFP (de

localización exclusivamente nuclear).

El análisis reveló que la NAM estimuló la vía de mTORC1, no potenció la respuesta autofágica, e incrementó la acetilación en las lisinas de TSC2 en todos los casos. Por otro lado, el resveratrol, inhibió la vía de mTORC1, y evitó (en los casos de SIRT1-WT y SIRT1-NES2) o disminuyó (SIRT1-NLS2) la acetilación de TSC2. Asimismo, RESV indujo la respuesta autofágica en todos los casos, aunque en menor medida en el caso en el que SIRT1 se localizaba predominantemente en el núcleo. Aquí, como control de que el resveratrol había funcionado se realizó una inmunoprecipitación de las lisinas acetiladas y WB frente a PGC1α (diana de SIRT1) (Figura 7).

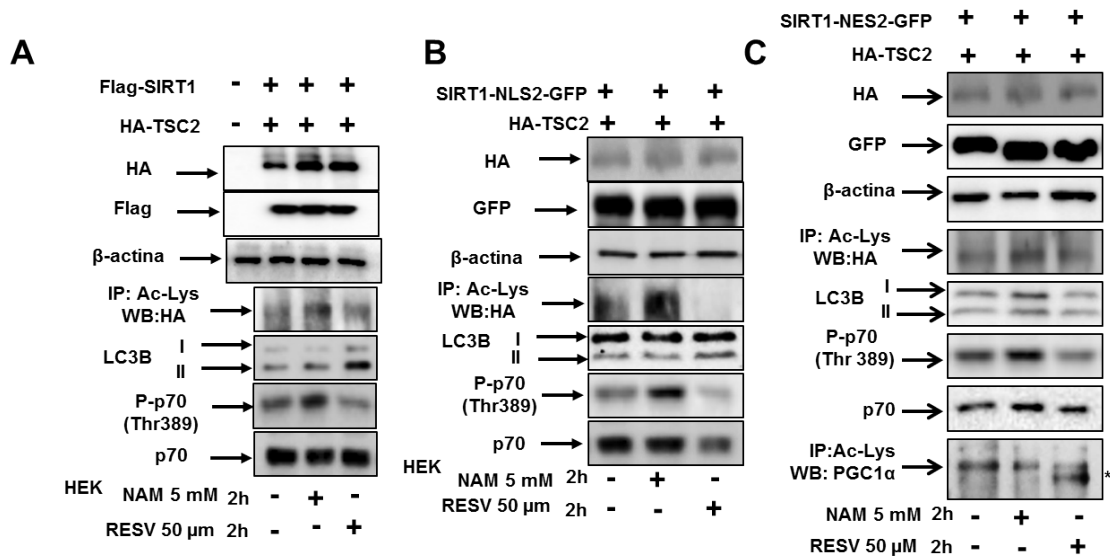


Figura 7. Efectos de la NAM y el RESV sobre el estado de acetilación en lisinas de TSC2, la ruta mTORC1, y la autofagia. Un día después de la transfección con las proteínas recombinantes HA-TSC2 y Flag-SIRT1 (A), o SIRT1-NLS2-GFP (B), o SIRT1-NES2-GFP (C), las células se cambiaron de medio y fueron sometidas a tratamientos con NAM y RESV durante 2 h. * Banda inespecífica.

Para confirmar el papel de SIRT1 en el control del estado de acetilación de TSC2, usamos células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-. En los MEF Sirt1 +/+ la NAM estimuló la vía de mTORC1 y aumentó la acetilación de TSC2, mientras que el RESV disminuyó la actividad de mTORC1 y mantuvo el estado de acetilación de TSC2. Por otro lado, se observó que el estado de acetilación de TSC2 y la

actividad de mTORC1 estaba significativamente aumentada en las células MEF Sirt1 -/-. Por el contrario, los efectos de NAM y RESV sobre la acetilación de TSC2 y la vía de mTORC1 se vieron abolidos en los MEF Sirt1 -/-, así como tras la estimulación con el inhibidor químico de la actividad desacetilasa de SIRT1, el Ex-527 en las células MIN6 (Figura 8).

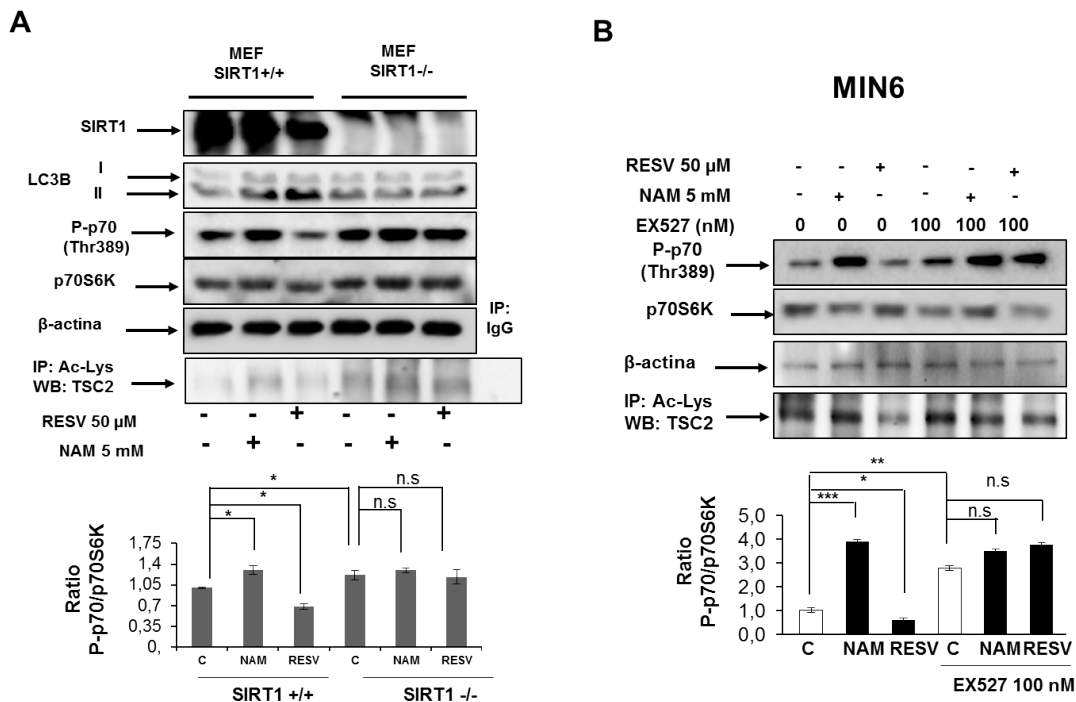


Figura 8. La modulación del estado de acetilación de TSC2 y la actividad de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV es dependiente de SIRT1. (A) Las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/- fueron estimuladas con NAM y RESV durante 2 h. (B) Las células MIN6 sin y con un pretratamiento de 30 minutos del Ex-527 (100 nM), y a continuación estimuladas con NAM y RESV durante 2 h. Histogramas que representan el ratio P-p70 (T389)/p70total expresados como la media de tres experimentos diferentes ± SD. *P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001; n.s. sin diferencia significativa.

Lo que nos propusimos a continuación fue determinar la zona de interacción entre SIRT1 y TSC2. Para ello, co-transfectamos las células HEK 293T con las proteínas recombinantes Flag-SIRT1, y diversos constructos recombinantes de TSC2 que contenían diferentes regiones de la proteína fusionados con la etiqueta V5. Al día siguiente se cambió el medio por medio completo, y un día después las células se estimularon con NAM y RESV durante 2h. Se realizaron IP de las lisinas acetiladas seguido por un análisis por WB. Por un lado, la NAM

incrementó, y el RESV disminuyó la acetilación de TSC2 en el constructo completo de TSC2 (TSC2V5), así como en aquellos constructos parciales que contenían la región N-terminal (A1153V5, F904V5 y A614V5). Sin embargo, no observamos cambios en el estado de acetilación de TSC2 en respuesta a NAM y a RESV en el constructo parcial que contenía el dominio GAP y perdía su región N-terminal (Figura 9).

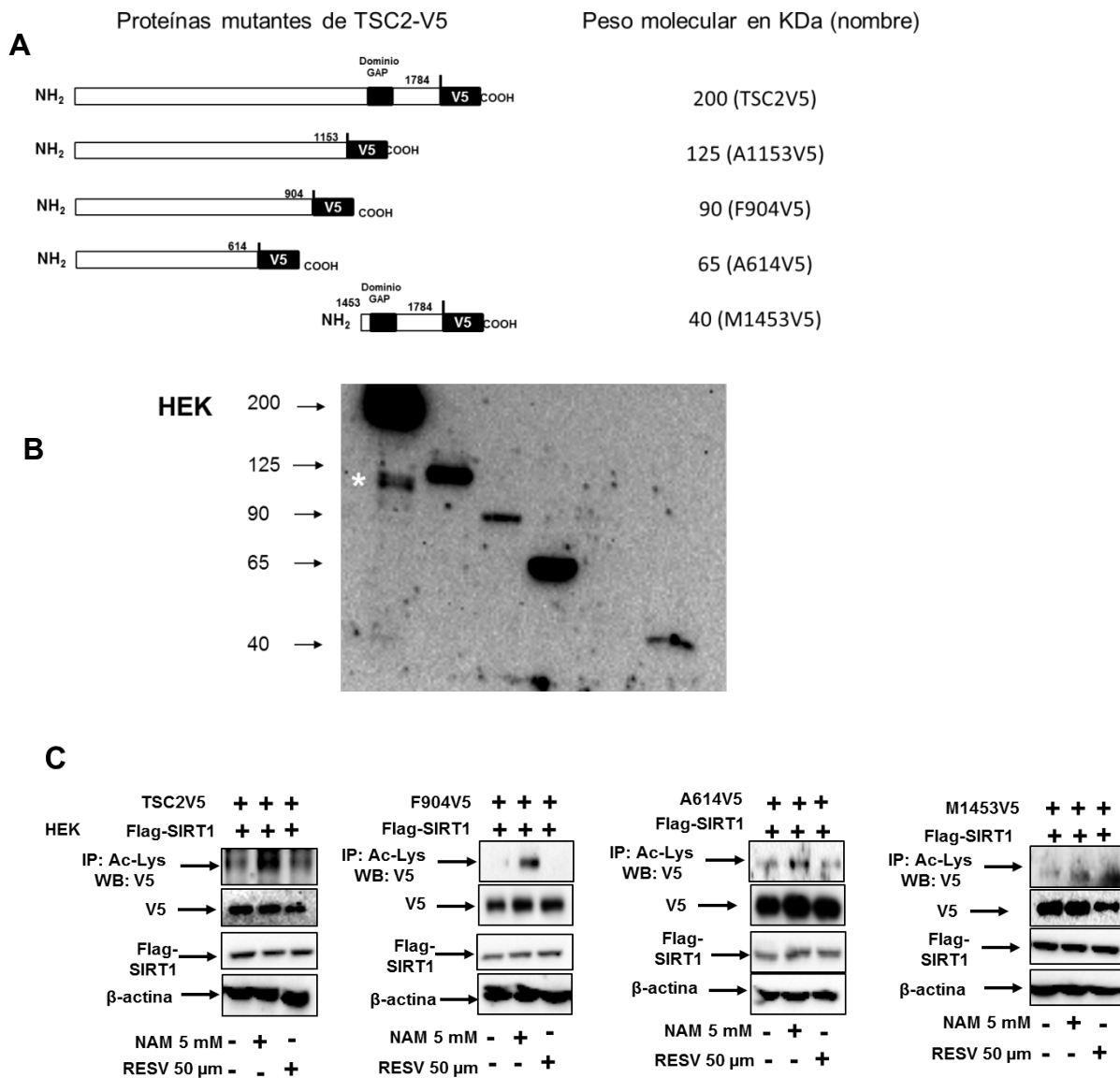


Figura 9. SIRT1 desacetila a TSC2 por su región N-terminal. (A) Esquema representativo de los diferentes mutantes de TSC2 unidos a V5, con su respectivo tamaño molecular y su nombre. (B) WB de V5 de todos los mutantes a su correspondiente altura. (C) Las células HEK 293T fueron co-transfectadas y al día siguiente, las células fueron tratadas con NAM o RESV durante 2h. * Banda inespecífica.

3.2. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 está relacionado con su estado de ubiquitinación

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la acetilación en lisinas de TSC2 jugaba un papel en la estabilidad de esta proteína y en el control de la ruta de mTORC1.

Observamos que los niveles de la proteína TSC2 estaban disminuidos en las células MEF *Sirt1*^{-/-} (hiperacetilación de TSC2), en comparación con sus controles (MEF *Sirt1*^{+/+}). Además, encontramos un aumento en el grado de unión de ubiquitina con la proteína TSC2 mediante una inmunoprecipitación de la proteína ubiquitina (FK2, que

reconoce las proteínas mono- y poli-ubiquitinadas, pero no la ubiquitina libre), y *western blot* con el anticuerpo que reconoce TSC2 (Figura 10).

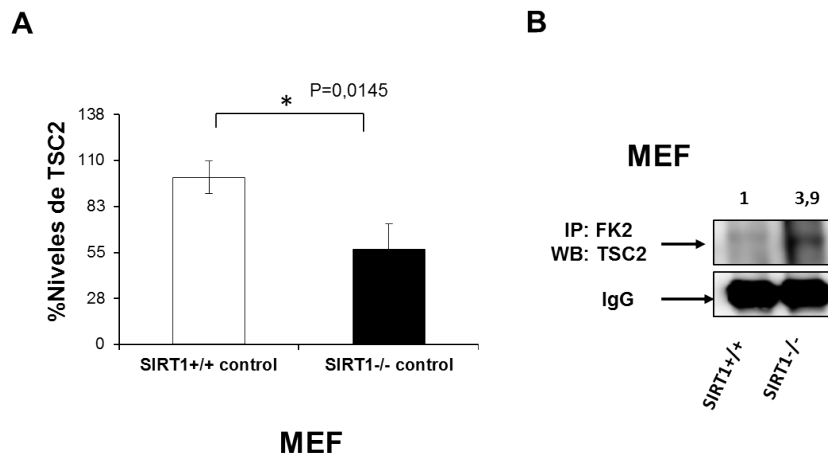


Figura 10. Menor estabilidad de la proteína TSC2 en las células MEF Sirt1 -/-. (A) Cuantificación de los niveles de la proteína TSC2 procedente de blots correspondientes a las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-, representados como la media de tres experimentos diferentes \pm la desviación estándar (SD). * $P < 0.05$. (B) Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FK2, y WB frente a TSC2 de las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-.

Además, sometimos a las células HEK 293T a una estimulación con NAM o RESV. A continuación, analizamos el estado de ubiquitinación de TSC2 mediante un análisis por IP de TSC2 y WB con el anticuerpo anti-FK2. En respuesta a NAM, se incrementó la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, favoreciendo su degradación por el sistema ubiquitina- proteasoma. Por el contrario, el tratamiento con RESV redujo la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, incrementando la estabilidad de la proteína (Figura 11).

En este contexto, cuando corregimos con la proteína frente a la cual inmunoprecipitamos (TSC2) detectamos una cantidad menor de TSC2 en las células tratadas con NAM, así como unos mayores niveles de TSC2 en los tratamientos con RESV. Estos datos parecen indicar que estos tratamientos afectan a la vida media de TSC2. Para

corroborar esta hipótesis, sometimos a las células HEK 293T a un pretratamiento con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), y a continuación, estimulamos con NAM o RESV durante 4 horas. El análisis reveló que los niveles de TSC2 en respuesta a RESV (80-90% a las 4 horas) eran similares a las células control, y significativamente mayores en comparación con NAM (40% a las 2h y 20% a las 4 horas), lo cual indica una correlación directa entre la acetilación de TSC2 y la disminución de la estabilidad o la degradación de la proteína (Figura 11). Es importante tener en cuenta que la vía de mTORC1 debe estar activada en condiciones de crecimiento, y el RESV (mimético de restricción calórica) bloquea la acetilación de TSC2, favoreciendo su estabilización e inhibiendo la vía de mTORC1.

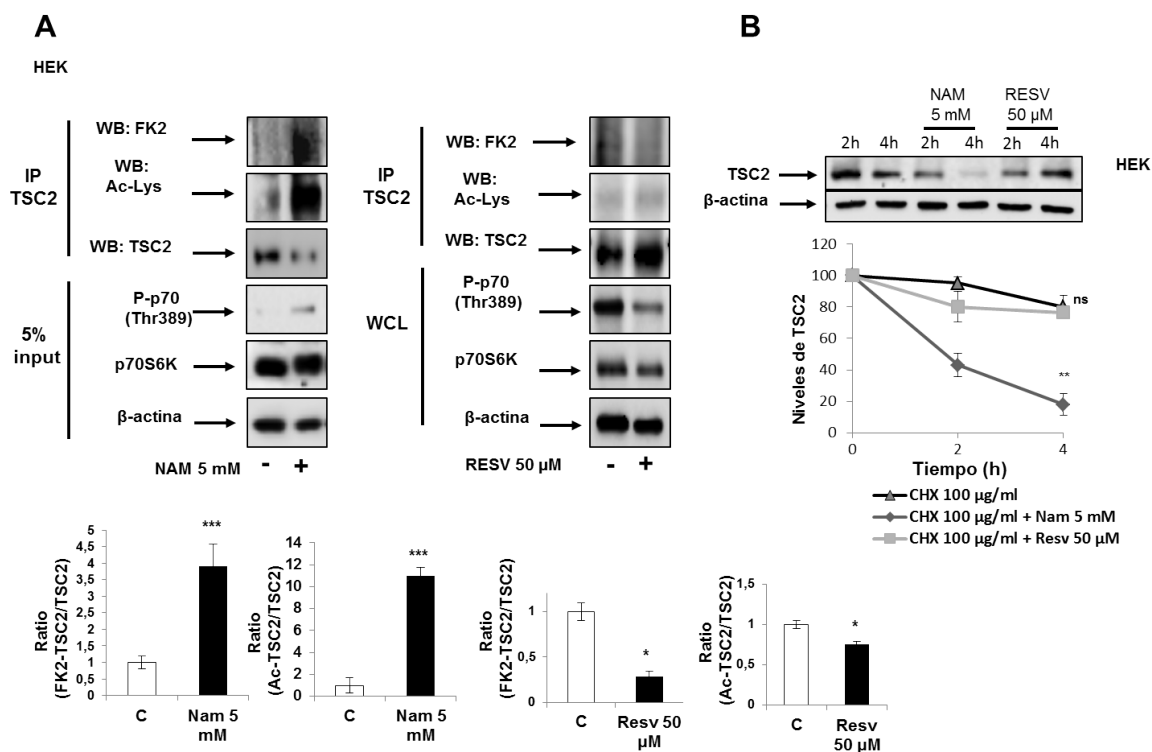


Figura 11. La acetilación de TSC2 está correlacionada con una mayor ubiquitinación y degradación de la proteína. (A) Las células HEK 293T fueron sometidas a un tratamiento con NAM o RESV (2h), seguido de una IP de TSC2 y análisis por WB de FK2 y Ac-Lys. Todos los blots son representativos de al menos tres experimentos diferentes, y los correspondientes ratios (FK2/TSC2 y Ac-Lys-TSC2) están representados en los histogramas de barras expresados con la media ± S.D. *P<0.05; *** P<0.001. (B) Las células HEK 293T fueron estimuladas con cicloheximida (CHX, 100 μg/ml) durante 30 minutos, y después, tratadas con NAM o RESV (4h). ** P<0.01. n.s. sin diferencia significativa.

3.3. Papel de TSC2 sobre la activación de la mitofagia en respuesta a un daño oxidativo

A continuación, nos propusimos profundizar en el papel de la ruta TSC2/mTORC1 específicamente en la activación del proceso de mitofagia. Como ya sabemos, las mitocondrias desacopladas son rápidamente marcadas por proteínas de la maquinaria autofágica y degradadas en los autolisosomas. Otro trabajo, esta vez de nuestro grupo (22), evidenció que este modelo (β TSC2^{-/-}) presentaba una menor degradación mediada por autofagia de las mitocondrias (mitofagia) en la célula β . Todos estos datos in vivo sugerían que el modelo animal β TSC2^{-/-} presentaba un flujo autofágico y mitofágico alterado. Por lo que nos propusimos profundizar en la causa de por qué estaban fallando estos procesos, mediante su análisis in vitro. Para lograr este objetivo, usamos el agente inductor de mitofagia (CCCP) en los MEF TSC2^{+/+} y TSC2^{-/-}.

En las células MEF TSC2^{+/+} en respuesta a CCCP, observamos una respuesta esperada de disminución en la

actividad de la ruta mTORC1 y un aumento en la activación de la macroautofagia. Asimismo, estas células eran capaces de acumular PINK1 en respuesta a CCCP. Sin embargo, las células MEF TSC2^{-/-} además de presentar un mantenimiento en la actividad de mTORC1 y un impedimento en la activación de la macroautofagia tras un tratamiento con CCCP, también presentaban una incapacidad en la acumulación de la proteína PINK1 tras estimulaciones a diferentes tiempos con CCCP. Curiosamente, el tratamiento con rapamicina en estas células TSC2^{-/-} no fue capaz de revertir la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial, pero si encontrábamos activación de la macroautofagia (aumento de la lipidación de LC3B). Estos resultados sugieren que TSC2 presenta un papel regulador positivo de la expresión génica de Pink1, y que las células deficientes de TSC2 muestran un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1 (Figura 12).

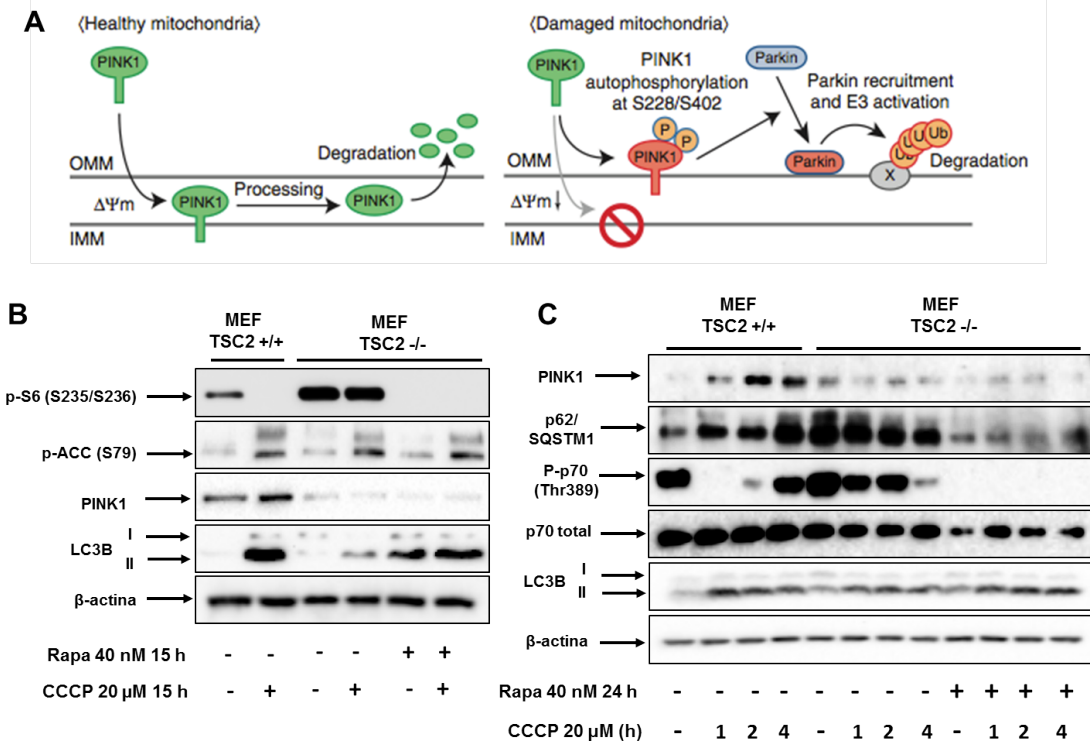


Figura 12. Defecto en la acumulación de PINK1 en la membrana externa mitocondrial tras la pérdida de potencial mitocondrial en respuesta a CCCP, en los MEF TSC2-/-. (A) Esquema del modelo de reclutamiento de Parkin tras un daño mitocondrial propuesto en el trabajo de (35) (B-D) Las células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- fueron estimuladas con CCCP (20 μM) a tiempos largos (B) y cortos (C), así como la rapamicina (40 nM) en los TSC2-/- . Los blots son representativos de tres experimentos diferentes.

Por último, para recuperar la acumulación de PINK1 se reintrodujo la proteína TSC2 en las células MEF TSC2-/- . Como esperábamos, las células MEF TSC2+/+ en respuesta a CCCP, eran capaces de acumular PINK1, inhibir mTORC1 y activar la autofagia. Por el contrario, se confirmó que el CCCP en las células MEF TSC2-/- no indujo una acumulación de PINK1, ni tampoco inhibió la

ruta de mTORC1, ni provocó una activación de la autofagia. Sin embargo, todos estos efectos se revirtieron al reintroducir la proteína TSC2. Estos resultados nos afirmaron que TSC2 presenta un papel esencial en la acumulación de PINK1, y por lo tanto, en la inducción de la mitofagia dependiente de PINK1 (Figura 13).

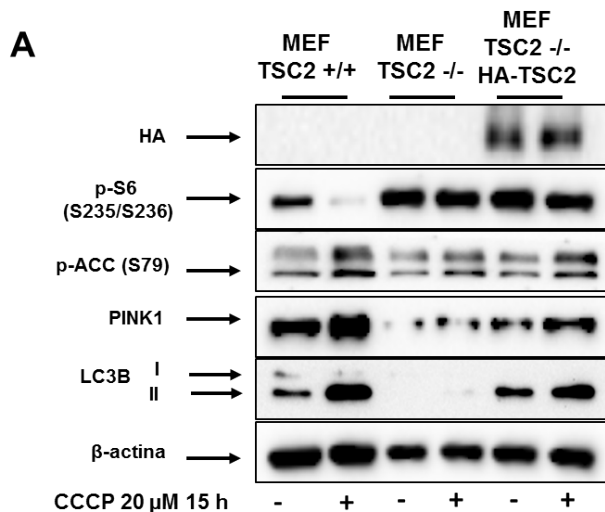


Figura 13. Reacumulación de PINK1 en las células MEF TSC2-/- en las que se ha reintroducido la proteína TSC2. (A) Análisis de la expresión de la proteína PINK1 tras la reintroducción del plásmido HA-TSC2 en las células MEF TSC2-/- , en condiciones basales y tras un tratamiento con CCCP.

4. CONCLUSIONES

1. La NAM aumenta y el RESV previene de la acetilación en lisinas de TSC2. La acetilación de TSC2 está relacionada con una disminución en la estabilidad de la proteína, favoreciendo la actividad de mTORC1 y la inhibición de la autofagia. De manera contraria, un estado menos acetilado de TSC2 previene de la degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma, inhibiendo la vía mTORC1, y activando la autofagia.

2. SIRT1 interacciona por la región N-terminal de TSC2, modulando su estado de acetilación.

3. Los efectos observados por NAM o RESV sobre la modulación de la vía mTORC1 y autofagia son dependientes de TSC2.

4. La hiperacetilación de TSC2, causada por una delección de SIRT1 o una inhibición química de la actividad desacetilasa, conduce a una disminución en la estabilidad de la proteína mediada por un aumento en la ubiquitinación de la misma, y a una hiperactivación de mTORC1.

5. La hiperactivación de la ruta mTORC1 causada por la eliminación de TSC2, resulta en un impedimento en la respuesta autofágica y mitofágica mediada por un daño oxidativo.

6. Las células MEF *Tsc2*^{-/-} presentan un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1 en respuesta a CCCP.

7. La reintroducción de la proteína TSC2 en las células carentes de TSC2, produce un aumento en la expresión de la proteína PINK1, y activa la autofagia.

Conclusión final:

La hiperactivación crónica de la vía mTORC1 está implicada en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, diabetes tipo 2 y cáncer. Por ello, es esencial profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes que regulan la actividad de esta vía, para el desarrollo de futuras dianas terapéuticas dirigidas a la estimulación de los mecanismos de defensa ante situaciones de estrés celular. En este contexto, se ha demostrado que la proteína TSC2 juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular: regulación de la vía mTORC1, y activación de la autofagia y mitofagia.

5. ABREVIATURAS

AMPK: Quinasa activada por AMP

IP: Inmunoprecipitación

mTORC1: Complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos

NAM: Nicotinamida

OMS: Organización mundial de la salud

PINK1: Quinasa 1 inducida por PTEN

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

RAPA: Rapamicina

RESV: Resveratrol

TSC1: Proteína 1 del complejo de esclerosis tuberosa o hamartina

TSC2: Proteína 2 del complejo de esclerosis tuberosa o tuberina

WB: *Western blot*

6. REFERENCIAS

1. International Diabetes Federation. Disponible en: (international diabetes federation 2015. www.idf.org/diabetesatlas).
2. Lorenzo, M. Resistencia a insulina en el músculo esquelético: ejercicio y activación de receptores nucleares como estrategias terapéuticas. En: Ortiz Melón, J.M., Casales Angosto, M. Redes de señalización y estrategias terapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia 2009, pp. 279-308.
3. Lingohr, M.K. Pancreatic beta-cell growth and survival—a role in obesity-linked type 2 diabetes? Trends in Molecular Medicine 2006; 8: 375-384.
4. Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev 2005; 126: 913-22.
5. McCay, C.M. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. J Nutr 1935; 10: 63-79.
6. Omodei, D. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. FEBS Lett 2011; 585: 1537-42.
7. Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? Physiology 2011; 26: 214-224.
8. Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? Nat Rev Cancer 2009; 9: 123-128.
9. Ghosh HS, *et al.* SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. Plos One 2010; 5: e9199.
10. Cantó C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. Nature 2009; 458: 1056-60.
11. Tanno M, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. J Biol Chem 2007; 282: 6823-32.
12. González-Rodríguez Á, *et al.* Resveratrol treatment restores peripheral insulin sensitivity in diabetic mice in a sirt1-independent manner. Mol Nutr Food Res 2015; 59: 1431-42.
13. Bordone L, *et al.* Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. PLoS Biol 2006; 4: e31.
14. Lagouge M, *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell 2006; 127: 1109-22.
15. van Slegtenhorst M, *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. Science 1997; 277:805-8.
16. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. Cell 1993;

- 75: 1305-15.
17. van Slegtenhorst M, *et al.* Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998; 7 : 1053-7.
 18. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 2008; 412: 179-90.
 19. Kim DH, *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 26: 163-75.
 20. Kim J, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 132-41.
 21. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 2004; 14: 1650-6.
 22. Bartolomé A *et al.* Pancreatic β -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*. 2014; 63:2996-3008.
 23. Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8:105-37.
 24. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 931-7.
 25. Shpilka T, *et al.* Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*. 2011; 12: 226.
 26. Ebato C, *et al.* Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*. 2008 ; 8: 352-32.
 27. Bartolome A, Guillen C, Benito M. Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy*. 2012; 8: 1757-68.
 28. Wild, P. The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science* 2014; 127: 3-9.
 29. Ghavami S, *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2014; 112:24-49.
 30. Vives-Bauza C, Przedborski S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 2011; 17: 158-65.
 31. Jin SM, *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*. 2010 ;191: 933-42.
 32. Liu M, Liu F. Resveratrol inhibits mTOR signaling by targeting DEPTOR. *Commun Integr Biol*. 2011; 4: 382-4.
 33. Gwinn DM, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214-26.
 34. Kuo HP, *et al.* ARD1 stabilization of TSC2 suppresses tumorigenesis through the mTOR signaling pathway. *Sci Signal* 2010; 3: ra9.
 35. Okatsu K, *et al.* PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun*. 2012; 3:1016.