



UNIVERSIDAD DE SEVILA
GRADO DE BIOLOGÍA
Departamento de Biología Celular

**CONTROL DEL TAMAÑO CELULAR EN
CÉLULAS EUCARIOTAS:**

**PAPEL DE LAS CERAMIDAS EN EL TAMAÑO CELULAR Y LA
ACTIVIDAD DEL COMPLEJO TORC2**

Autor de la memoria:

José Ignacio Quesada Márquez

Tutor:

Rafael Lucena Hernández

Sevilla, septiembre 2022

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
<i>-Generalidades sobre el tamaño celular.....</i>	<i>3</i>
<i>-La ruta de señalización TOR; Regulación metabólica de TORC1 y TORC2.....</i>	<i>4</i>
<i>-TORC2 y la regulación de la síntesis de esfingolípidos.....</i>	<i>7</i>
OBJETIVOS.....	10
RESULTADOS.....	11
<i>- Los mutantes de ceramidas cortas (C18) tienen defectos en el tamaño celular.....</i>	<i>11</i>
<i>-La modulación del tamaño en respuesta a nutrientes no está afectada en mutantes de ceramidas cortas (C18)</i>	<i>12</i>
<i>- La señalización de la ruta TORC2 se ve afectada en mutantes con ceramidas cortas (C18)</i>	<i>14</i>
<i>- Los mutantes con ceramida sintasa de humanos presentan defectos en el tamaño celular y en la actividad de TORC2.....</i>	<i>15</i>
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	19
<i>- El tamaño de las ceramidas regula el tamaño celular.....</i>	<i>19</i>
<i>-El tamaño de las ceramidas regula la actividad de TORC2 sobre Ypk1.....</i>	<i>20</i>
PROYECCIONES FUTURAS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
<i>-Estirpes de levaduras y condiciones de cultivo.....</i>	<i>22</i>
<i>-Medición del tamaño celular.....</i>	<i>22</i>
<i>-Western Blotting.....</i>	<i>23</i>
BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

Los mecanismos que controlan el tamaño celular en diferentes especies están altamente conservados y son de crucial importancia para la vida de organismos eucariotas, pero están aún por determinar. En este proyecto se ha estudiado que influencia tienen los lípidos de membrana en el control del tamaño celular utilizando como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En concreto, se ha estudiado cuál es el efecto que tienen las ceramidas en el tamaño celular y la actividad del complejo TORC2, un regulador universal del metabolismo y el crecimiento celular. Los resultados obtenidos apuntan a que el tamaño de las ceramidas supone un factor limitante sobre la actividad del complejo TORC2. Este cambio de actividad se refleja en una disminución del tamaño celular, lo que sitúa a las ceramidas como componentes principales en la ruta de señalización que controla el crecimiento y el tamaño celular en organismos eucariotas.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre el tamaño celular

Una de las preguntas más importantes cuando nos aproximamos al término de tamaño celular es ¿Cómo saben las células cuál es su propio tamaño? Es evidente que lo saben por como las poblaciones celulares mantienen un tamaño similar. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos que subyacen y controlan este aspecto están aún por determinar (Rhind, 2021).

El tamaño puede variar en función de la especie hasta catorce órdenes de magnitud, y dentro de una misma especie suele haber hasta un 10% de varianza en el tamaño entre células. Existen múltiples factores que pueden afectar a esta variable, desde externos, como los nutrientes disponibles en el medio, hasta internos, como el estadio del ciclo celular. Esto, y múltiples experimentos clásicos realizados desde inicios del siglo XX, evidencian que las células presentan mecanismos para controlar y contrastar estos factores y obtener así, un tamaño definido (Rhind, 2021).

Así mismo, no están implicados los mismos mecanismos de control en todos los seres vivos. En los organismos multicelulares, algunas células se dividen constantemente y otras, como la mayoría de las neuronas, mantienen un estado quiescente sin dividirse durante toda la

vida del individuo. En organismos unicelulares, como las levaduras, el crecimiento de la población se mantiene constante, aunque existen variaciones a nivel individual. Por tanto, deben existir ciertas diferencias en el control del tamaño y la tasa de división, aunque el eje central del control parece que está conservado como se verá más adelante (Rhind, 2021).

Existen dos factores clave que definen el tamaño celular observable en una población de células. El primero se basa en el equilibrio entre la tasa de crecimiento celular y la tasa de división, lo que determina el tamaño final de las células que alcanzan antes de dividirse en dos células hijas. El segundo, determina cómo las células mantienen la homeostasis en torno a ese tamaño determinado. Existen modelos conceptuales que explican los mecanismos de control homeostático celular (Facchetti, Chang and Howard, 2017) y cada vez hay más bibliografía respecto al tema, pero este proyecto se centra en el primer factor nombrado, en el que tiene una gran contribución la ruta de señalización TOR.

El estudio de esta ruta de señalización es fundamental, ya que una de las características más comunes en procesos tumorales es la pérdida de control del tamaño celular (Li *et al.*, 2015). Por ello, se sabe que las mutaciones que afectan a estos mecanismos provocan cáncer. Es por esto que su conocimiento detallado es la base para la creación de terapias contra esta enfermedad tan extendida en la población.

Existe un gran consenso sobre la conservación de los mecanismos que controlan el tamaño celular entre diferentes especies. Por tanto, su estudio en organismos eucariotas como las levaduras puede dar lugar a conclusiones extrapolables y válidas para otros organismos de mayor complejidad.

La ruta de señalización TOR; Regulación metabólica de TORC1 y TORC2

El estudio de diferentes compuestos bacterianos ha sido de vital importancia para el descubrimiento de nuevas rutas de señalización en organismos eucariotas. Un caso particular es el referente a la rapamicina, un metabolito secundario producido por una bacteria de suelo de la Isla de Pascua que dio lugar al descubrimiento de TOR (Target Of Rapamycin). Inicialmente descubierto en levaduras (Heitman *et al.*, 1991; Cafferkey *et al.*, 1993; Kunz *et al.* 1993; Helliwell *et al.*, 1994), y posteriormente en mamíferos (Brown *et al.*, 1994; Chiu *et al.*, 1994, Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995), TOR se postuló como uno de los componentes principales en el crecimiento celular (Schmelzle and Hall, 2000). Posteriormente se descubrió que TOR estaba formado por dos complejos estructural y funcionalmente distintos: TORC1 y

TORC2 conservados desde levaduras a humanos. Durante años, el complejo TOR se ha ligado a enfermedades como la diabetes, el cáncer o desórdenes neurológicos, lo que lo sitúa como un complejo de gran importancia tanto en biología fundamental como clínica (Loewith and Hall, 2011; De Virgilio and Loewith, 2006). En mamíferos, mTOR es la diana de fármacos que contribuyen a mejorar la respuesta del organismo ante los trasplantes, actuando como inmunosupresores, o en tratamiento contra el cáncer inhibiendo el crecimiento celular (Riggi, Kusmider and Loewith, 2020).

TOR es miembro de la familia de las quinasas atípicas relativas al fosfatidilinositol (PIKK). Aunque relacionadas con las PI quinasas, no posee actividad quinasa sobre lípidos, sino sobre residuos de serina/treonina. Como ya se ha descrito, esta proteína quinasa constituye dos complejos multiproteicos altamente conservados conocidos como TORC1 y TORC2. Es fundamental para el control del metabolismo celular y el crecimiento, y está modulada por la cantidad de nutrientes en el medio. En *S. cerevisiae*, existen dos proteínas con un 67% de homología de secuencia llamadas Tor1 (sensible a la rapamicina) y Tor2 (resistente a la rapamicina) y que a su vez son ortólogas de mTOR en mamíferos (Loewith and Hall, 2011).

Por una parte, TORC1 es el complejo más estudiado y con más información respecto a su función, localización y estructura. Localiza en la membrana de la vacuola, donde se encarga de integrar señales de nutrientes, factores de crecimiento y energía celular para promover el anabolismo y el crecimiento e inhibir los procesos catabólicos (De Virgilio and Loewith, 2006; Berchtold and Walther, 2009). Además, se encarga de mediar la respuesta ante determinadas situaciones de estrés, como el estrés salino, especies reactivas de oxígeno o la temperatura. Por otra parte, son importantes reguladores de la biogénesis de los ribosomas y la traducción de proteínas, censando señales intracelulares como la concentración de ciertos aminoácidos (Loewith and Hall, 2011). El complejo TORC1 es además diana de la rapamicina, macrólido con importante actividad inmunosupresora y anticancerígena (Loewith and Hall, 2011), lo que lo convierte, además, en un complejo con interés biomédico.

En cuanto a TORC2, que es el complejo estudiado en este proyecto, localiza en la membrana plasmática en dominios conocidos como MCTs (Membrane Compartments of TORC2) (Berchtold and Walther, 2009). Es el menos estudiado de los dos complejos, aunque estudios recientes han esclarecido algunas de sus funciones más importantes. Por ejemplo, se ha descrito que el complejo TORC2 participa en el mantenimiento de la homeostasis de la membrana plasmática en respuesta a la tensión. Participa en la osmorregulación, endocitosis y

tráfico de membranas en general, así como el mantenimiento de la asimetría de la membrana plasmática (Riggi, Kusmider and Loewith, 2020) y anteriormente se ha relacionado con el establecimiento de la polaridad de la actina del citoesqueleto determinando la polaridad celular (De Virgilio and Loewith, 2006). Por último, la función más importante que atañe a este trabajo es la regulación que ejerce sobre la síntesis de ceramidas y su control del crecimiento y el tamaño celular (Aronova *et al.*, 2008; Lucena *et al.*, 2018).

En cuanto a su estructura tridimensional, TORC2 tiene forma de romboedro, de manera similar a TORC1, aunque presentan ciertas diferencias en cuanto a las proteínas que lo conforman. TORC2 presenta un núcleo central formado por un dímero de Tor2-Lst8 que forma una cavidad central de función todavía desconocida, ya que no constituye el sitio catalítico. Tor2 no se une a la rapamicina, haciendo al complejo TORC2 insensible a esta droga. Avo3 (RICTOR en mamíferos), es la subunidad que define al complejo TORC2 ya que, en su lugar, TORC1 presenta Kog1 (RAPTOR en mamíferos). A su vez, Avo3 presenta la función de mantener la estructura del complejo, ya que su ausencia provoca que este mismo se desensamble y también contribuye a su localización en la membrana plasmática (Marshall *et al.*, 2019). Avo3 se une físicamente con los dominios HEAT que presenta la proteína Tor2, permitiendo la dimerización del núcleo del complejo. Por último, Avo1 se ha visto que es fundamental para el anclaje a la membrana plasmática al presentar un dominio de homología de pleckstrina (dominio PH) que permite establecer uniones con fosfolípidos de membrana (PI(4,5)P2 o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato en concreto) con su extremo C-terminal. Cabe destacar que se ha determinado que la correcta localización de TORC2 en la membrana plasmática es fundamental para la viabilidad celular ya que determina su especificidad de acción sobre diferentes sustratos en diferentes situaciones. (Berchtold and Walther, 2009; Riggi, Kusmider and Loewith, 2020) (Tabla 1).

Existen otras proteínas asociadas al complejo TORC2 que participan en su regulación. Un ejemplo son las proteínas asociadas a membrana Slm1/2. Estudios previos han demostrado que Slm1/2 son sustratos de TORC2 además de asociarse físicamente. Además, la actividad de Slm1/2 está correlacionada con los cambios en la polarización de actina y el metabolismo de esfingolípidos, lo que sugiere una correlación cercana entre esas proteínas y TORC2 (Audhya *et al.*, 2004; Brunet *et al.*, 2004; Mulet *et al.*, 2006).

Tabla 1: Conservación de la estructura de TORC2 en diferentes organismos eucariotas.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Mammals
TOR2	TOR/let-363	TOR	mTOR
Avo1	sinh-1	Sin1	mSIN1
Avo2	—	—	—
Avo3/Tsc11	rict-1	Rictor	Rictor
Lst8	lst-8	CG3004	mLST8
Bit61	—	—	PRR5/Protor
—	—	—	DEPTOR

Tabla 1: Conservación de la estructura del complejo TORC2. Los guiones indican que no hay ortólogos encontrados para dicha subunidad en dicho organismo. Los ortólogos mostrados pertenecen a *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y mamíferos respectivamente (Modificado de Loewith and Hall, 2011).

TORC2 y la regulación de la síntesis de esfingolípidos

TORC2 fosforila y activa entre sus muchas dianas a dos quinasas denominadas Ypk1 y Ypk2. Este par de quinasas son homologas a las quinasas SGK que presentan los vertebrados. Para que la actividad de Ypk1/2 se active por completo requieren a su vez de otras dos quinasas, Pkh1 y Pkh2, homologas de PDK1 en vertebrados (Casamayor *et al.*, 1999).

El primer hallazgo relevante para poner en contexto este proyecto fue el descubrimiento de que la activación de TORC2 está relacionada con la síntesis de esfingolípidos. De esta forma, la inhibición de su actividad está relacionado con una inhibición de la síntesis de estos lípidos fundamentales para la fisiología celular (Aronova *et al.*, 2008). La ruta de síntesis de esfingolípidos (SLs) se inicia con la acción de la serina palmitoiltransferasa (SPT). Esta enzima, une un ácido graso de cadena larga a una serina para crear una base de cadena larga (o esfingosina) que constituye el eje principal de su estructura. En levaduras suele ser la dihidroesfingosina (DHS) o la fitoesfingosina (PHS) (Körner and Fröhlich, 2022) (Figura 1).

A partir de este precursor se forman ceramidas por la acción de la ceramida sintasa, que se encarga de unir un ácido graso a esta estructura de un tamaño de cadena hidrocarbonada específico según la especie. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, se añaden ácidos grasos de 26

carbonos de longitud. Las ceramidas se sintetizan en el retículo endoplásmico y están formadas por dos ácidos grasos unidos a una cabeza polar. Esta cabeza polar puede ser modificada en el aparato de Golgi, donde llegan por vesículas de transporte para la formación de esfingolípidos complejos (cSLs), que en el caso de levaduras se forman uniendo grupos inositol y manitol. Estos son, inositol-fosfoceramida (IPC), manosil-inositol-fosfoceramida (MIPC) y manosil-diinositol-fosfoceramida (M(IP)₂C) (Körner and Fröhlich, 2022).

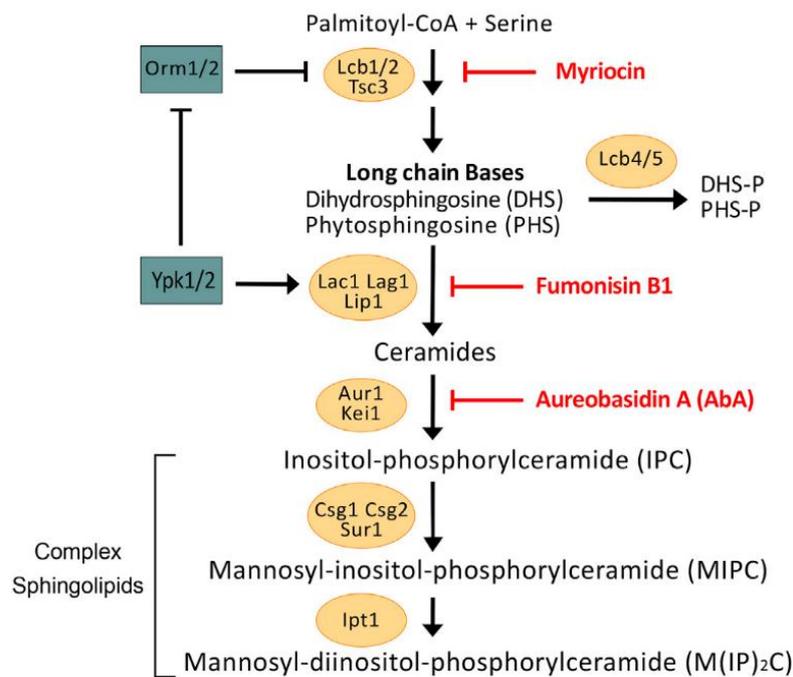


Figura 1. Resumen de la ruta de síntesis de los esfingolípidos. En los círculos amarillos, las enzimas que codifican cada paso de la ruta, y en rojo, las drogas empleadas para inhibir cada enzima (Lucena *et al.*, 2018).

Los esfingolípidos constituyen el 10% de los lípidos de la célula, y se ha demostrado que su función es fundamental, no solo para el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana plasmática, sino como moléculas de señalización que pueden controlar diferentes aspectos fisiológicos celulares. Por ejemplo, el contenido en esfingolípidos regula la homeostasis de las membranas plasmáticas y recientemente, se ha descubierto que presentan un papel importante en el control del tamaño celular y la tasa de crecimiento (Lucena *et al.*, 2018).

Algunos estudios apuntan a que el tamaño de la cadena hidrocarbonada que da lugar a las ceramidas, es fundamental para la correcta localización de proteínas de membrana en dominios o compartimentos celulares determinados (Aguilera-Romero and Muñiz, 2021).

La utilización de inhibidores de la síntesis de esfingolípidos, han puesto de manifiesto la interconexión entre la ruta de síntesis de esfingolípidos y la ruta TORC2. Datos preliminares apuntaban a que fenómenos de estrés de membrana, ya sea por estrés mecánico con el uso de Palmitoilearnitina (PalmC), o por inhibidores de la síntesis de esfingolípidos como la Miriocina (Myr) y Aureobasidina A (Aba A), eran capaces de modificar la actividad de TORC2. Esto se producía por una señalización mediada por la relocalización de las proteínas Slm1/2 en la membrana plasmática hacia los dominios MCT. Estas situaciones de estrés se observó que aumentaban la actividad de TORC2 y se potenciaba la síntesis de esfingolípidos para alcanzar la homeostasis de membrana plasmática (Berchtold *et al.*, 2012; Riggi *et al.*, 2019)

En este punto, no se conocía cual era el paso que unía la actividad del complejo TORC2 con la síntesis de esfingolípidos, hasta que se determinó que el eslabón intermedio se encontraba en uno de los sustratos sobre los que actuaba TORC2, en concreto, la quinasa Ypk1. Se ha demostrado que la fosforilación de Ypk1/2 por parte de TORC2 y las quinasas Pkh1/2, promovía su actividad quinasa sobre las enzimas ceramidas sintasas Lac1 y Lag1, promoviendo su actividad y aumentando la síntesis de ceramidas, el paso previo a la síntesis de esfingolípidos más complejos (Muir *et al.*, 2014) (Figura 2).

Los últimos descubrimientos de esta ruta de señalización se centran en como TORC2 está regulado por el tipo de nutrientes en el medio y como, a su vez, las ceramidas, ejercen un bucle de retroalimentación negativo sobre TORC2 (Lucena *et al.*, 2018). Esto implica que niveles altos de ceramidas inhiben su propia síntesis, mientras que, en condiciones de escasez de ceramidas, se activa TORC2 para activar su propia síntesis y alcanzar la homeostasis en cuanto a los niveles de ceramidas en la célula (Figura 2).

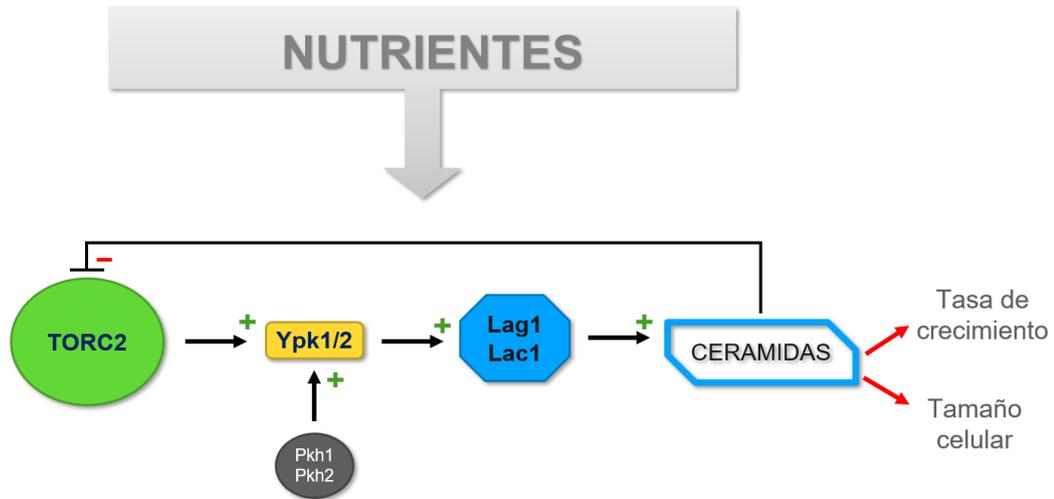


Figura 2. Modelo simplificado sobre como la actividad de la ruta de señalización TORC2 modulada por el nivel de nutrientes en el medio podría controlar la síntesis de ceramidas y con ello la tasa de crecimiento y tamaño celular (Simplificación de Lucena et al., 2018).

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es determinar el papel de las ceramidas en la regulación del tamaño celular y la tasa de crecimiento empleando *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

Por una parte, se pretende estudiar el efecto que tiene la síntesis de ceramidas de diferente longitud en el tamaño celular en respuesta a nutrientes. Para ello, se comparan los tamaños de diferentes estirpes de *S. cerevisiae* que producen ceramidas con cadenas de ácidos grasos de diferente longitud en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono. Además, se ha estudiado el efecto que tienen las ceramidas sintasas de mamíferos en la levadura.

Por otro lado, investigar qué diferencias tienen los diferentes mutantes citados anteriormente en la actividad del complejo TORC2, en concreto sobre la proteína Ypk1 que a su vez regula la actividad de la ceramida sintasa celular.

RESULTADOS

Los mutantes de ceramidas cortas (C18) tienen defectos en el tamaño celular.

Previamente se había observado cómo la inhibición de la síntesis de esfingolípidos afecta al tamaño celular. Esto se determinó mediante el uso de inhibidores específicos de su ruta de síntesis o mediante la delección de los genes correspondientes a las dos ceramidas sintetas *Lag1* y *Lac1*. En ambos casos, se observó que defectos en la síntesis de esfingolípidos causaban un menor crecimiento y tamaño celular final (Lucena *et al.*, 2018).

En cepas silvestres, las levaduras poseen esfingolípidos complejos formados por ceramidas de cadena larga de 26 carbonos. Estudios previos han demostrado que el tamaño de ceramida afecta a otros factores de la fisiología celular como la correcta localización de proteínas en diferentes orgánulos o “*protein sorting*” (Aguilera-Romero and Muñiz, 2021). Para determinar si los defectos en tamaño celular y crecimiento eran debido exclusivamente a la falta de ceramidas empleó una cepa mutante que produce ceramidas con un ácido graso con un tamaño de 18 carbonos de longitud (Epstein *et al.*, 2012).

Para ello, se crecieron en medio rico (2% glucosa) una cepa silvestre como control positivo y un mutante que produce ceramidas cortas (desde ahora, C18). Como control negativo, se ha utilizado una cepa delecionada para las dos ceramidas sintetas (*lac1Δ lag1Δ*) descrita anteriormente (Lucena *et al.*, 2018). Después de alcanzar una fase logarítmica temprana de crecimiento, se recogieron el mismo número de células de los cultivos y se procesaron para su análisis de tamaño celular mediante un contador Coulter.

Como se muestra en la Figura 3, los mutantes *lac1Δ lag1Δ* presentaron una reducción drástica en el tamaño celular, con un valor medio de 41.78 ± 0.08 fL comparado con los 62.93 ± 3.715 encontrados en un silvestre. En cambio, la cepa mutante C18 redujo su tamaño de forma intermedia, hasta llegar hasta los 55.47 ± 4.771 fL.

Este resultado indica que los cambios en la longitud de las ceramidas son suficientes para disparar una señal que regule el tamaño celular en la población.

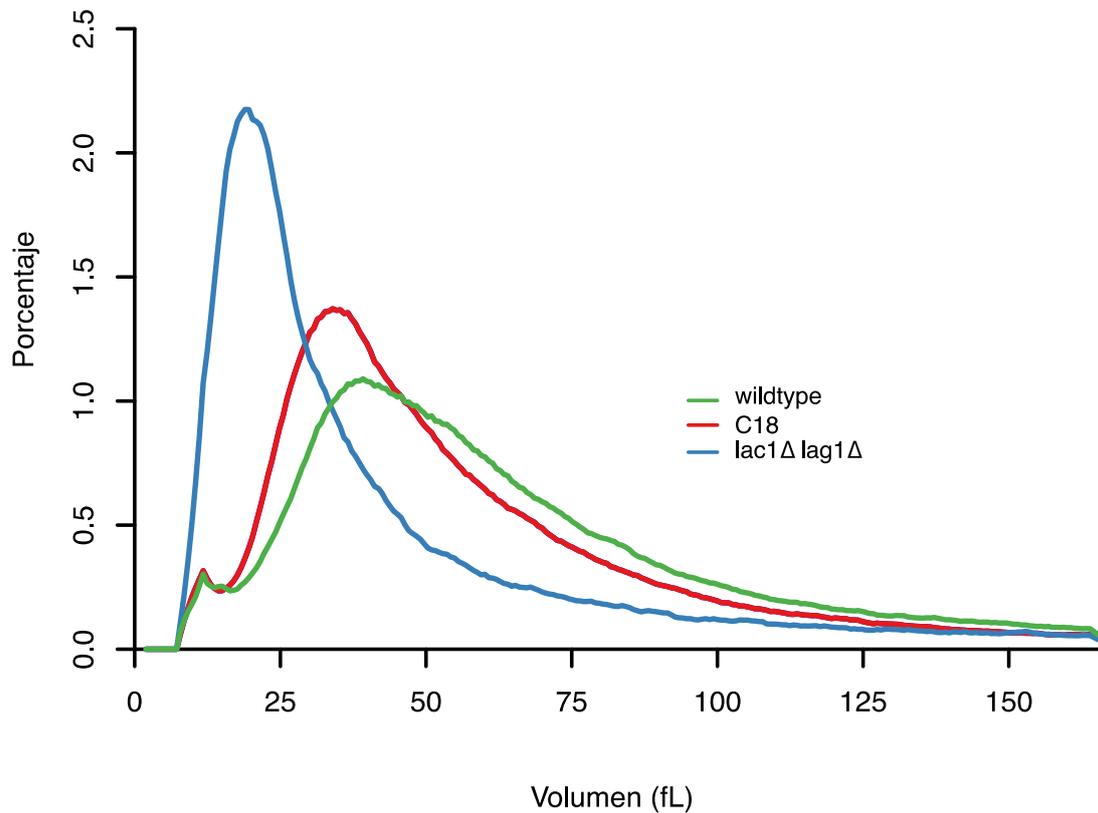


Figura 3. Las cepas indicadas en la figura se crecieron a 25°C hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en medio rico YPD. La gráfica representa el porcentaje de células con un volumen determinado (fL). Cada curva es la media de cuatro medidas independientes.

La modulación del tamaño en respuesta a nutrientes no está afectada en mutantes de ceramidas cortas (C18).

Todos los organismos regulan su tamaño celular en respuesta a cambios en los nutrientes del medio. En levaduras, es conocido que los mutantes en ceramidas sintasas tienen alterado dicho control, encontrando células con el mismo tamaño independientemente del medio de cultivo (Lucena *et al.*, 2018).

Ya que los mutantes de ceramidas cortas C18 parecían estar afectados en la regulación del tamaño celular, la siguiente pregunta fue analizar la respuesta a nutrientes. En este caso se creció una cepa silvestre, un mutante C18 y un doble mutante *lac1Δ lag1Δ* en medio con 2% glicerol/etanol (G/E) como fuente de carbono y se comparó el resultado con el tamaño en medio rico (2% glucosa) en las mismas cepas.

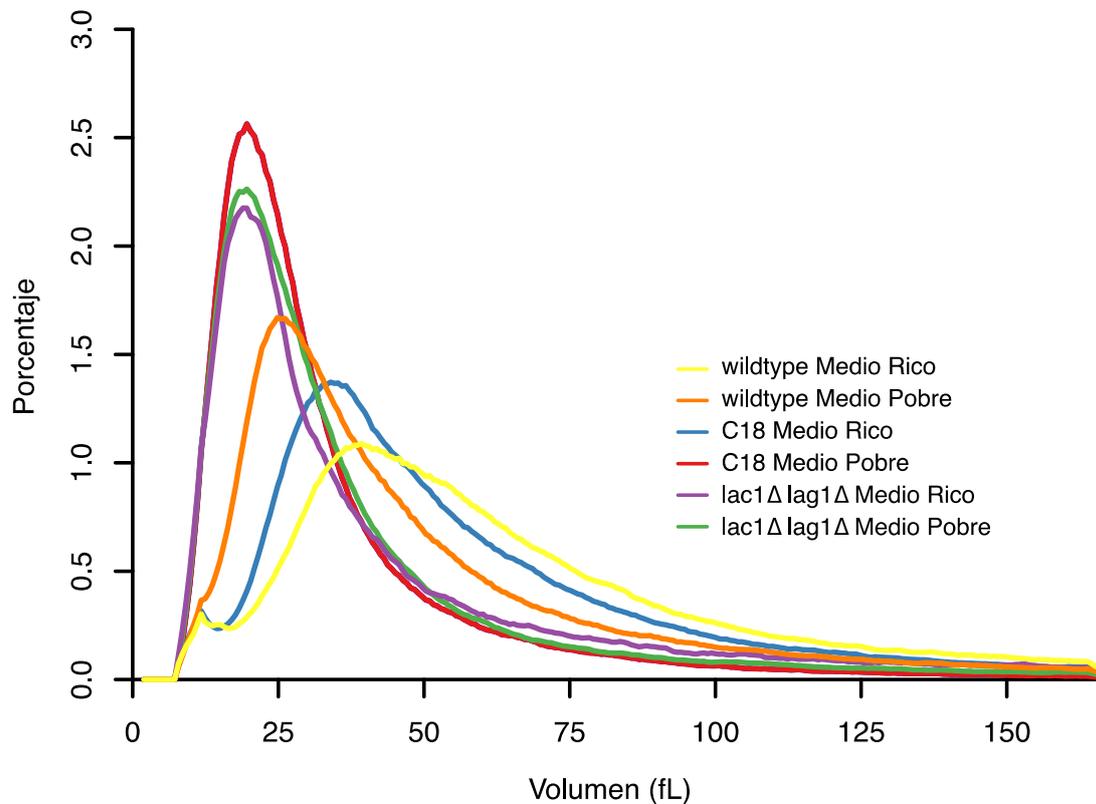


Figura 4. Las cepas indicadas en la figura se crecieron a 25°C hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en medio rico YPD o en medio pobre G/E. La gráfica representa el porcentaje de células con un volumen determinado (fL). Cada curva es la media de cuatro medidas independientes.

Como se puede observar en la Figura 4, el mutante C18 crecido en medio pobre presenta una importante reducción del tamaño comparable a la del doble mutante *lac1Δ lag1Δ*, el cual presenta un tamaño similar en medio pobre y medio rico. La estirpe silvestre presenta también una reducción del tamaño en medio pobre pero no tan significativa como C18.

En vista a este resultado se puede concluir que la estirpe con ceramida sintasa de algodón puede seguir modulando su tamaño en función de la cantidad de nutrientes disponibles en el medio y no pierden dicha regulación como si ocurre en el doble mutante *lac1Δ lag1Δ*. De manera que la síntesis de ceramidas cortas no afecta negativamente a la regulación del tamaño en función de la presencia de nutrientes en el medio.

La señalización de la ruta TORC2 se ve afectada en mutantes con ceramidas cortas (C18).

Anteriormente se ha observado como una inhibición de la síntesis de esfingolípidos en mutantes sin ceramida sintasa (*lac1Δ lag1Δ*) se relaciona con una mayor actividad de TORC2 sobre la proteína Ypk1. Esto supondría un incremento de la actividad de las ceramidas sintasas, con el objetivo de paliar la escasez de ceramidas aumentando el nivel de su síntesis. Esto sugiere que el nivel de ceramidas ejerce un control por bucles de retroalimentación sobre las proteínas que controlan su propia síntesis como es TORC2 (Lucena *et al.*, 2018) (Figura 2).

Tras ver como en el mutante con ceramidas cortas C18 se ve afectado el tamaño celular y como es capaz de modular su tamaño en función de la cantidad de nutrientes en el medio, en base a los antecedentes se planteó la duda de si el tamaño de ceramida también podría ejercer un efecto retroactivo sobre la actividad de TORC2.

Para determinarlo, se analizó la actividad quinasa del complejo proteico TORC2 sobre la proteína Ypk1 mediante Western Blotting. Se ha empleado un anticuerpo T662 fosfoespecífico que no solo detecta la actividad sobre Ypk1 sino también sobre Ypk2, aunque esta última no tiene relevancia para el análisis de los resultados. De manera paralela, se ha empleado un anticuerpo específico para la proteína Ypk1 con la idea de medir el nivel total de proteína a modo de control y poder compararlo con la señal detectada por el anticuerpo T662 y así, determinar si la actividad de TORC2 es superior o inferior en los diferentes mutantes en comparación con la estirpe silvestre. Con la señal detectada con el anticuerpo Ypk1 se puede detectar diferentes niveles de fosforilación de la proteína total, observando dos bandas diferentes; la superior corresponde al estado más fosforilado y la banda inferior, con el estado menos fosforilado (Figura 5).

Como se observa en la Figura 5, en el mutante C18 el nivel de actividad de TORC2 es superior al de la estirpe silvestre tanto en células crecidas en medio rico (2% glucosa) como en medio pobre (2% glicerol/etanol). Hay que resaltar que en el mutante C18, la proteína Ypk1 permanece totalmente defosforilada, lo que indica según resultados previos que está en un estado de mayor actividad (Roelants *et al.*, 2010).

Se puede concluir que la presencia de ceramidas cortas supone un cambio de la actividad de TORC2, aceptando así, la hipótesis inicial.

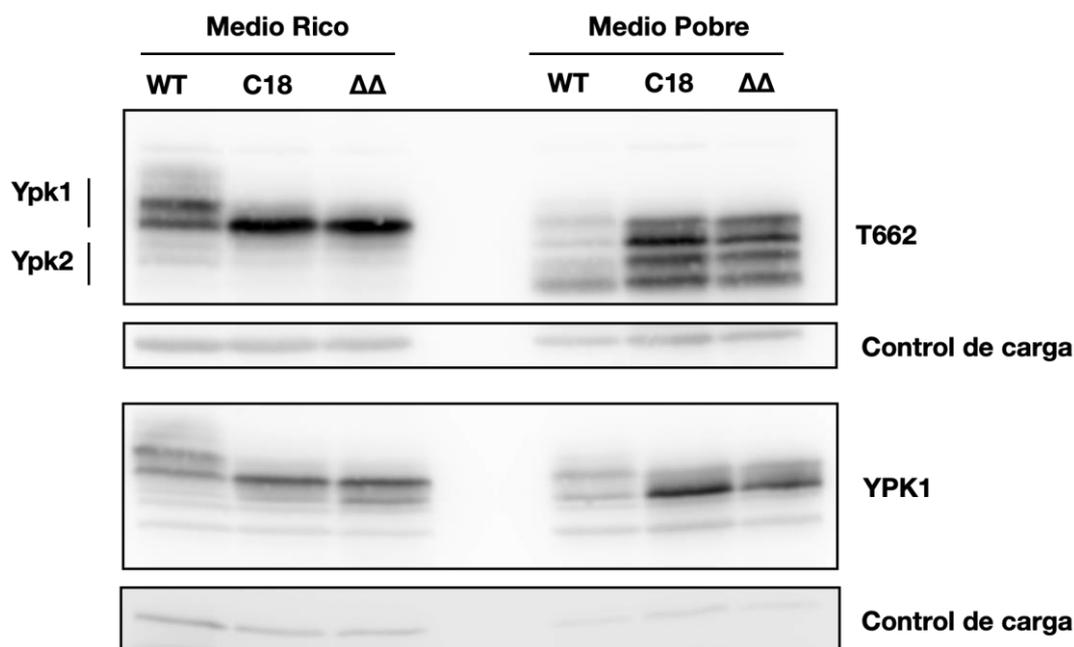
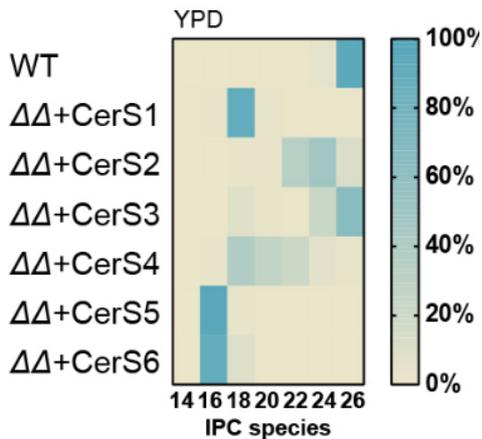


Figura 5. Células silvestres (WT), estirpe con ceramida sintasa de algodón, *G. hirsutum* (C18) y estirpe sin ceramida sintasa *lac1Δ lag1Δ* ($\Delta\Delta$) crecidas a 25°C hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en medio rico (2% glucosa) y medio pobre (2% glicerol/etanol). El anticuerpo T662 detecta la fosforilación específica de TORC2 sobre las proteínas Ypk1/Ypk2. El nivel total de Ypk1 se detecta empleando un anticuerpo anti-Ypk1 (YPK1). Como controles de carga se utilizaron bandas inespecíficas de cada anticuerpo.

Los mutantes con ceramida sintasa de humanos presentan defectos en el tamaño celular y en la actividad de TORC2.

En humanos existen 6 tipos diferentes de ceramidas sintasas. La peculiaridad de estas ceramidas sintasas reside en que cada una es capaz de unir ácidos grasos de diferente tamaño para formar las ceramidas (Hannich *et al.*, 2019). Para determinar la importancia que tiene la cadena de carbonos que componen las ceramidas a la hora de determinar el tamaño celular, se emplearon cepas de levaduras que contenían diferentes ceramidas sintasas presentes en mamíferos (CerS1-S4). Dos de las cepas obtenidas (CerS5 y S6) contenían otras mutaciones sin identificar, por lo que se quedaron fuera de estudio (datos no mostrados).



*Figura 6. Representación del tamaño de ácido graso añadido por la ceramida sintasa para formar los esfingolípidos complejos (IPC, Inositol Fosfoceramida). Las ceramidas sintasas de mamífero CerS1-S6 están integradas en cepas delecionadas para *Lac1* y *Lag1* ($\Delta\Delta$). Se aprecia según la intensidad del color azul el porcentaje de las diferentes especies de IPC en cada estirpe (Hannich et al., 2019).*

Según nuestra hipótesis, ceramidas de diferente longitud podrían ser determinantes para controlar el tamaño celular, de manera que cuanto más se alejase el tamaño de este lípido del tamaño que presenta en una cepa silvestre (26 carbonos), se reflejaría en un menor tamaño celular.

Para ello, se crecieron en medio rico una cepa silvestre (WT) como control positivo y cuatro mutantes con diferentes ceramidas sintasas de mamíferos (CerS1, CerS2, CerS3, CerS4). Se recogieron muestras con el mismo número de células de cultivos en la fase de crecimiento exponencial temprana y se analizó el tamaño celular mediante un contador Coulter.

Como se observa en la Figura 7, los diferentes mutantes con ceramida sintasas de mamíferos presentan tamaños diferentes al de la cepa silvestre, siendo la cepa con la ceramida sintasa CerS2 la que presenta un menor tamaño. En cambio, la cepa CerS1 presenta un tamaño similar al de la estirpe silvestre. Por otro lado, CerS3 y CerS4 presentan un tamaño intermedio entre las dos anteriores.

Si bien no se correlaciona el tamaño de ceramida con el tamaño celular de manera lineal, se puede concluir diciendo que el tamaño de ceramida es una señal suficiente para disparar una respuesta que repercute en el tamaño celular final.

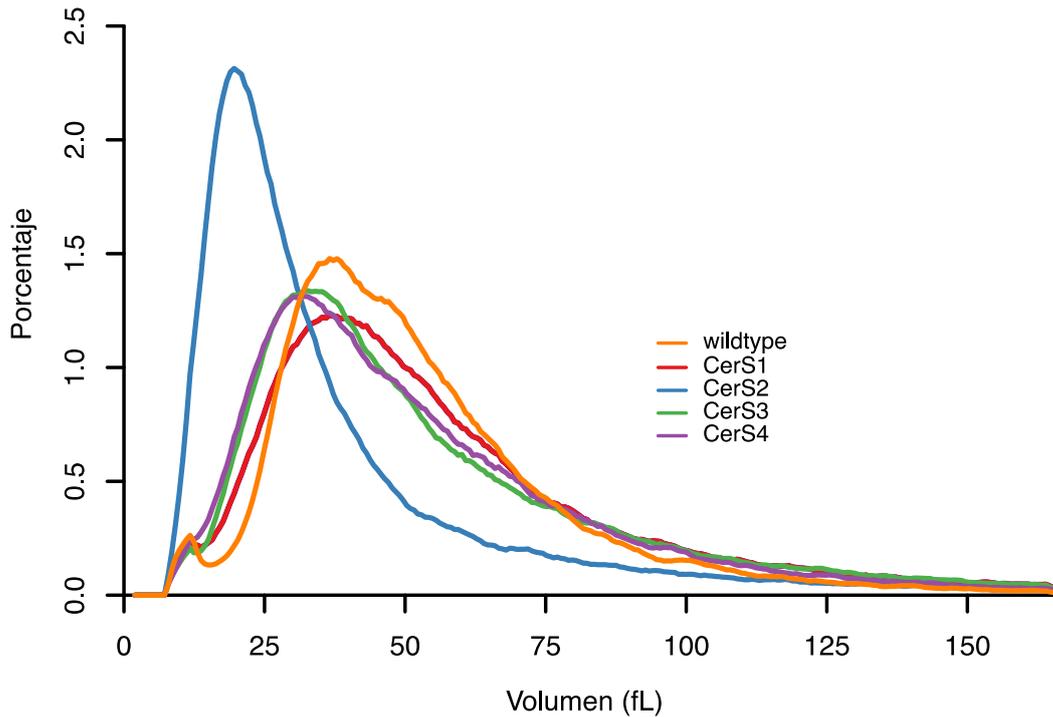


Figura 7. Células silvestres (WT) y estirpes con diferentes ceramidas sintasas de mamíferos (S1-S4) crecidas a 25°C hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en medio rico (2% glucosa). Se observa la distribución del tamaño celular medido con contador Coulter. La gráfica representa el porcentaje de células analizadas (eje y) con un volumen celular en fL (eje x). Cada curva es la media de tres medidas independientes.

Con el objetivo de caracterizar los mutantes de ceramidas sintasas de mamíferos e intentar correlacionar la actividad del complejo TORC2 sobre Ypk1 con el tamaño de ceramida, se analizó por western blotting los diferentes mutantes CerS1-S4, junto a la estirpe silvestre como control positivo. Los anticuerpos empleados son similares anteriormente (Figura 5) y las muestras se recogieron al inicio de la fase exponencial temprana, tomando el mismo número de células de cada una para que los resultados sean comparables entre sí.

Como se observa en la Figura 8, los diferentes mutantes presentan diferentes actividades del complejo TORC2, pero todos ellos presentan mayor actividad que la estirpe silvestre (WT). Además, la proteína Ypk1 parece estar en su estado defosforilado, similar al observado en los mutantes C18 y $\Delta\Delta$, lo que indica una mayor actividad. En conclusión, estos resultados sugieren que la presencia de ceramidas que difieren en longitud, son capaces de modificar la señal que afecta a la actividad de TORC2 sobre Ypk1 y modificar el tamaño celular en algunos casos.

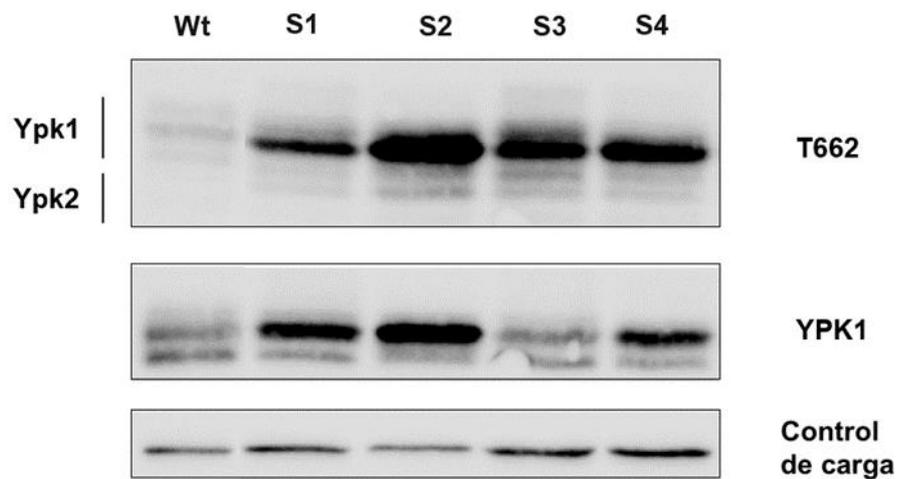


Figura 8. Células silvestres (WT) y estirpes con diferentes ceramidas sintasas de mamíferos (S1-S4) crecidas a 25°C hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en medio rico (2% glucosa). Se observa el Western Blotting empleando un anticuerpo fosfoespecífico para detectar la fosforilación de TORC2 sobre Ypk1 (parte superior) y Ypk2 (parte inferior) (T662). El nivel total de Ypk1 se detecta empleando un anticuerpo anti-Ypk1 (YPK1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El tamaño de las ceramidas regula el tamaño celular.

Controlar el tamaño y el crecimiento celular es de vital importancia para todos los organismos. Estudios previos habían sugerido que la síntesis de ceramidas, regulada por el complejo TORC2, es un mecanismo principal en el control del tamaño celular y el crecimiento.

Nuestro trabajo ha pretendido profundizar en dichos resultados. Así, según los datos obtenidos sobre el mutante C18 (Figura 3), se observa como un menor tamaño de ceramida supondría una reducción del tamaño celular, por lo que si se comporta según lo esperado. A la hora de analizar los datos sobre los mutantes CerS1-S4 (Figura 7), se aprecia cierta disparidad en cuanto a esta correlación. Por un lado, el mutante CerS1 que produce ceramidas de 18 carbonos (Figura 6), presenta un tamaño similar al de la estirpe silvestre. CerS2 presenta ceramidas de 24 carbonos, muy cercano al silvestre que presenta 26 carbonos de longitud, y, aun así, presenta una reducción drástica del tamaño como se observa en el doble mutante (*lac1Δ lag1Δ*). Cabe resaltar que CerS3 produce un tamaño de ceramida de 26 carbonos de manera mayoritaria y a pesar de eso presenta un tamaño menor al de la cepa silvestre. Es posible que las diferentes ceramidas sintetas estén sintetizando ceramidas de diferente composición en levaduras, ya que disponen de precursores diferentes a los encontrados en mamíferos.

Resultados previos obtenidos con cepas que carecen de ceramidas sintasa (*lac1Δ lag1Δ*) sugerían que una falta de ceramidas disparaba una señal para modificar el tamaño celular. Los resultados obtenidos en este proyecto apuntan a una modificación en la cadena de ceramidas es suficiente para activar esa señalización.

Por otro lado, se puede afirmar que la presencia de ceramidas es fundamental para que las células sean capaces de modular su tamaño en respuesta a nutrientes. Datos previos apuntaban a que mutantes que carecían de ceramidas sintetas pierden esta regulación y en cambio, como se ha visto en este proyecto, los mutantes de ceramidas cortas son capaces de realizar esta modulación (Figura 4).

Nuestra hipótesis es que las ceramidas, al ser fundamentales para la síntesis de los esfingolípidos complejos de la membrana plasmática estarían interaccionando con diferentes proteínas ancladas a ella. Las diferentes longitudes de las ceramidas afectarían a la unión de

dichas proteínas con la membrana plasmática, activando o inactivando diferentes rutas celulares para controlar el tamaño celular y el crecimiento en respuesta a nutrientes.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las ceramidas constituyen señales intracelulares fundamentales que median el proceso de selección de tamaño celular por un mecanismo todavía desconocido.

El tamaño de las ceramidas regula la actividad de TORC2 sobre Ypk1.

Nuestros resultados sugieren que la síntesis de ceramidas de menor tamaño (C18) producen una hiperactivación del complejo TORC2 tanto en medio rico como en medio pobre. Esta activación se traduce, al menos, en una mayor actividad de la quinasa Ypk1, que a su vez actúa sobre la ceramida sintasa para estimular la síntesis de ceramidas (Figura 5). Este resultado es similar al encontrado en mutantes *lac1Δ lag1Δ*, donde la ruta TORC2 está hiperactivada. En cambio, los mutantes C18 son capaces de regular su tamaño en respuesta a nutrientes (Figura 4), algo que no ocurre en las cepas *lac1Δ lag1Δ*. Esto sugiere que cambios en la longitud de las ceramidas son suficientes para disparar la señalización de TORC2. A diferencia de *lac1Δ lag1Δ*, los mutantes C18 siguen disponiendo de ceramidas, lo que podría explicar la posibilidad de ajustar su tamaño en respuesta a diferentes nutrientes en el medio.

En cuanto a los datos de levaduras mutantes con ceramidas sintasas de mamíferos, los datos vuelven a ser dispares con respecto a la actividad de TORC2 (Figura 8). A pesar de ello, es cierto que todos los mutantes presentan una hiperactivación de la ruta similar a la del mutante C18. Estos resultados refuerzan la idea de que la presencia de ceramidas de diferente tamaño debe desencadenar una cascada de señalización que aumentara la actividad de TORC2 sobre Ypk1.

Por otro lado, como se puede observar en los resultados de tamaño celular (Figura 7), esta hiperactivación de TORC2 para estimular la síntesis de ceramidas permite que el tamaño sea superior que en el doble mutante, permitiendo revertir el efecto que causa la ausencia de ceramidas, excepto en el mutante CerS2. En este último, a pesar de presentar ceramidas con un tamaño cercano al silvestre, presenta un tamaño muy similar al doble mutante. Esto puede deberse a que en levaduras no se utilizan los mismos precursores metabólicos que en levaduras para la síntesis de ceramidas, pudiendo ser esta la causa de esta disparidad.

La compleja regulación de las ceramidas sintasas de mamíferos hace que la interpretación de los resultados no sea simple. Por ejemplo, la síntesis de ceramidas en

mamíferos está regulada por la formación de complejos entre las diferentes ceramidas sintasas (Laviad *et al.*, 2012). Por ello, no es totalmente extrapolable analizar el efecto individual que presentan en el tamaño celular, así como en la actividad de TORC2.

Como conclusión, la red de señalización que determina el tamaño celular, en el que tiene una gran contribución el complejo proteico TORC2, está fuertemente afectado por la síntesis de ceramidas y una variación en dicha variable puede afectar a la actividad de los componentes de esta ruta y así, al tamaño celular final, con el objetivo de alcanzar la homeostasis.

PROYECCIONES FUTURAS

En este proyecto se ha demostrado que las ceramidas son unas moléculas lipídicas fundamentales para la fisiología celular y que regulan aspectos fundamentales del funcionamiento celular, como la ruta de señalización TORC2 y el tamaño celular.

De manera paralela a la realización de los experimentos mostrados en este trabajo de fin de grado, durante el curso académico en el que he estado colaborando con el equipo de investigación liderado por Rafael Lucena en el departamento de Biología Celular, se han realizado más experimentos no mostrados en este proyecto debido a fallos metodológicos que han conducido a que los resultados obtenidos no sean concluyentes ni extrapolables.

Entre los experimentos que conforman las proyecciones futuras de este proyecto, se encuentran la elaboración de estirpes de levaduras marcadas con epítomos fluorescentes en las diferentes subunidades más conservadas de TORC2 como son Avo1, Avo3 y Lst8. Este marcaje se llevaría a cabo en la estirpe silvestre (WT) y en la estirpe con ceramida sintasa de algodón (C18) y se analizarían mediante microscopía de fluorescencia. Con ello se determinaría si la síntesis de ceramidas de diferente tamaño podría influenciar a una localización diferencial de las diferentes subunidades de TORC2, lo cual es fundamental para determinar los sustratos sobre los que actúa como se ha tratado en la introducción de este mismo proyecto.

Debido a que se ha visto como las ceramidas sintasas de mamíferos actúan formando complejos entre ellas, se podría hacer un análisis del tamaño y actividad de TORC2 en mutantes de levaduras que co-expresaran diferentes ceramidas sintasas de mamíferos a la vez para analizar que efecto conjunto tienen más allá de la actividad individual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes de levaduras y condiciones de cultivo

Las estirpes de células de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas se encontraban previamente congeladas a -80°C en medio rico con 15% glicerol. Se descongelan en placas de Petri con medio solido YPD. Para los medios líquidos se han empleado medio rico YPD o medio pobre YP Glicerol /Etanol. La composición del medio YP consiste en 1% extracto de levadura, 2% peptona, 40 mg/l Adenina siendo suplementado con 2% glucosa en el medio rico YPD o con 2% glicerol/ etanol en el medio pobre YPG/E. Todos los medios empleados se usan tras su previa esterilización en autoclave (20 minutos, 121°C).

Tabla 2: Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas.

Estirpe	Genotipo (fondo W303)	Referencia
RL1	his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1	Altman and Kellogg, 1997
RL190	his4, leu2, ura3, lag1::HIS3, lac1::ADE2, TDH3::GhLAG1::TRP1	Epstein <i>et al.</i> , 2012
CERS1	ura3 leu2 lag1::HIS3 lac1::ADE2 trp1::TRP1-GPD-CerS1-CYC	Hannich <i>et al.</i> , 2019
CERS2	ura3 leu2 lag1::HIS3 lac1::ADE2 trp1::TRP1-GPD-CerS2-CYC	Hannich <i>et al.</i> , 2019
CERS3	ura3 leu2 lag1::HIS3 lac1::ADE2 trp1::TRP1-GPD-CerS3-CYC	Hannich <i>et al.</i> , 2019
CERS4	ura3 leu2 lag1::HIS3 lac1::ADE2 trp1::TRP1-GPD-CerS4-CYC	Hannich <i>et al.</i> , 2019

Medición del tamaño celular

Para la medición del tamaño celular, las células se descongelaron en medio sólido YPD-Agar durante un día a 25°C. Posteriormente se inocularon en medios líquidos YPD en tubos de cultivo con 4 ml de medio y se dejaron crecer hasta el inicio de la fase exponencial en agitación (250 rpm), para un correcto aporte de O₂, y a 25°C. Para asegurar que todas las células se encontraban en la misma fase de crecimiento se llevaron a cabo mediciones de la DO₆₀₀ con un

espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU730). Se diluían las células hasta 0.1 y se dejaban crecer un tiempo de generación (2 horas aproximadamente). En este punto, todos los cultivos recogidos se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, momento óptimo para medir el tamaño celular y también recoger muestras para Western Blotting.

Para la medición del tamaño celular, de manera previa se fijaban las células añadiendo 100 μ l de formaldehído 37% a 900 μ l de cultivo de células, siendo la concentración final de formaldehído 3.7%. Tras 10 minutos de agitación, se realizan dos lavados con buffer PBS + 0.02% Tween-20 + 0.04% azida de sodio. Seguidamente se les aplica tres pulsos de ultrasonido con un sonicador (Branson Sonifier 250) para que las células se separen entre sí y la medición se lleve a cabo correctamente.

La medición del tamaño celular se realizó con un Coulter Counter Z2 y Z3 (Beckman Coulter), que mide el volumen de las células en femtolitros (fL, eje x) así como el porcentaje de células que presentan dicho volumen (% , eje y). Para ello se vierten 200 μ l de células en 20 ml de una solución de NaCl 1%. El análisis estadístico se realizó a partir de cuatro medidas independientes para cada muestra empleando el programa informático Multisizer 3.

Western Blotting

Para que los resultados del western sean comparables entre sí, es importante que los cultivos de células de los que partimos tengan toda la misma concentración, así que se diluyen en función de su DO_{600} a una concentración final de 0.2-0.3 aproximadamente.

Para la recolección de muestras se procede a centrifugar 1.6 ml de cultivo 20 segundos (13.400 rpm), se retira el sobrenadante con vacío, se añaden 250 μ l de glass beads, se depositan en nitrógeno líquido para una congelación instantánea de las muestras y se almacenan a -80°C .

Cuando se tenían todas las muestras necesarias que se querían comparar, se procesaban las muestras para prepararlas para electroforesis. Se añade 140 μ l de SB1X (65 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 10% glicerol, 50 mM NaF, 100 mM β -glicerolfosfato, 5% 2-mercaptoetanol, 2 mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF] y azul de bromofenol) por muestra e inmediatamente se lisan las células en un Multibeater-16 (Biospect) durante 2 minutos.

Tras el lisado, se centrifugan las muestras durante 10 segundos a 13400rpm. Después, se hierven las muestras en un termobloque previamente calentado a 95°C durante 5 minutos y

se vuelve a centrifugar 5 minutos a 13.400rpm. Luego, las muestras están listas para ser cargadas en un gel de acrilamida.

Se emplea un gel de acrilamida compuesto por un 12.5% de poliacrilamida y 0.13% de bis-acrilamida. Se añaden 20 µl de cada muestra en los pocillos y se corren a una corriente constante y 20 mA por cada gel durante 2 horas y media aproximadamente.

De manera posterior a la electroforesis, los geles de acrilamida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa empleando Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Las membranas se dividieron en dos mitades para incubar en diferentes anticuerpos. En primer lugar, ambas se incubaron en diferentes buffers con leche para hacer el bloqueo:

- Para la mitad que se incubaba con el anticuerpo T662 se bloquea con un buffer formado por 1X TBS, 0.25 M NaCl, 0.1 Tween 20, complementado por leche en polvo 3%.
- Para la mitad que se incubaba con el anticuerpo Ypk1 se bloquea con un buffer formado por 1X PBS, 0.25 M NaCl, 0.1% Tween 20, complementado con leche en polvo 3%.

Se bloquean durante 1 hora, luego se vierte la cantidad requerida de cada anticuerpo correspondiente y se deja incubando a 4°C durante la noche:

- T662 anticuerpo primario monoclonal anti-fosfo-T662 para detectar la fosforilación diferencial de Ypk1/2 al 1:5000 en TBS-T 1X leche 3%.
- Ypk1 anticuerpo primario monoclonal anti-Ypk1 (para detectar el nivel total de Ypk1) al 1:5000 en PBS-T 1X leche 3%.

Posteriormente se realizan 3 lavados con el buffer correspondiente sin leche de cada una de las membranas de nitrocelulosa y se incuban finalmente con el anticuerpo secundario policlonal anti-rabbit conjugado a peroxidasa al 1:5000 en TBS o PBS según el anticuerpo primario empleado durante una hora a temperatura ambiente. Tras ello, el revelado se realiza por quimioluminiscencia, empleando el kit de detección West Pico Signal (Pierce), las imágenes se tomaron con el dispositivo (Chemidoc Imaging System, Bio-Rad). La cuantificación del resultado se realizó por Densitometría empleando el programa de análisis ImageJ.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Romero, A. and Muñiz, M. (2021) ‘A Role for Lipids in Protein Sorting?’, *Chimia*, 75(12), pp. 1026–1030. doi: 10.2533/chimia.2021.1026.

Aronova, S. *et al.* (2008) ‘Regulation of Ceramide Biosynthesis by TOR Complex 2’, *Cell Metabolism*, 7(2), pp. 148–158. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.015.

Audhya, A. *et al.* (2004) ‘Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton’, *EMBO Journal*, 23(19), pp. 3747–3757. doi: 10.1038/sj.emboj.7600384.

Berchtold, D. *et al.* (2012) ‘Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis’, *Nature Cell Biology*, 14(5), pp. 542–547. doi: 10.1038/ncb2480.

Berchtold, D. and Walther, T. C. (2009) ‘TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain’, *Molecular biology of the cell*, 20, pp. 1565–1575. doi: 10.1091/mbc.E08.

Brown, E.J. *et al.* (1994) ‘A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex’, *Nature*, 369, pp. 756–758. doi: 10.1038/369756a0.

Brunet, S. *et al.* (2004) ‘Characterization of the TPX2 Domains Involved in Microtubule Nucleation and Spindle Assembly in *Xenopus* nucleation around chromatin and functions in a network of other molecules , some of which also are regulated by’, *Mol Biol Cell*, 15(December), pp. 5318–5328. doi: 10.1091/mbc.E04.

Casamayor, A. *et al.* (1999) ‘Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast’, *Current Biology*, 9(4), pp. 186–197. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80088-8.

Cafferkey, R. *et al.* (1993) ‘Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity’, *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 6012–6023. doi: 10.1128/mcb.13.10.6012-6023.1993.

Chiu, M.I., Katz, H., and Berlin, V. (1994) 'RAP1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, pp. 12574–12578. doi: 10.1073/pnas.91.26.12574.

De Virgilio, C. and Loewith, R. (2006) 'The TOR signalling network from yeast to man', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(9), pp. 1476–1481. doi: 10.1016/j.biocel.2006.02.013.

Epstein, S. *et al.* (2012) 'An essential function of sphingolipids in yeast cell division', *Molecular Microbiology*, 84(6), pp. 1018–1032. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08087.x.

Facchetti, G., Chang, F. and Howard, M. (2017) 'Controlling cell size through sizer mechanisms', *Current Opinion in Systems Biology*, 5, pp. 86–92. doi: 10.1016/j.coisb.2017.08.010.

Hannich, J. T. *et al.* (2019) '1-Deoxydihydroceramide causes anoxic death by impairing chaperonin-mediated protein folding', *Nature Metabolism*, 1(10), pp. 996–1008. doi: 10.1038/s42255-019-0123-y.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991) 'Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast', *Science*, 253, pp. 905–909. doi: 10.1126/science.1715094.

Helliwell, S.B. *et al.* (1994) 'TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast', *Mol. Biol. Cell*, 5, pp. 105–118. doi: 10.1091/mbc.5.1.105.

Körner, C. and Fröhlich, F. (2022) 'Compartmentation and functions of sphingolipids', *Current Opinion in Cell Biology*, 74, pp. 104–111. doi: 10.1016/j.ceb.2022.01.006.

Kunz, J. *et al.* (1993) 'Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression', *Cell*, 73, pp. 585–596. doi: 10.1016/0092-8674(93)90144-f.

Laviad, E. L. *et al.* (2012) 'Modulation of ceramide synthase activity via dimerization', *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), pp. 21025–21033. doi: 10.1074/jbc.M112.363580.

Li, Q. *et al.* (2015) ‘Cancer stem cells and cell size: A causal link?’, *Semin Cancer Biol*, 35, pp. 191–199. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.07.002.Cancer.

Loewith, R. and Hall, M. N. (2011) ‘Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control’, *Genetics*, 189(4), pp. 1177–1201. doi: 10.1534/genetics.111.133363.

Lucena, R. *et al.* (2018) ‘Cell Size and Growth Rate Are Modulated by TORC2-Dependent Signals’, *Current Biology*, 28(2), pp. 196-210.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.11.069.

Marshall, M. N. M. *et al.* (2019) ‘Analysis of the roles of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and individual subunits in assembly, localization, and function of *Saccharomyces cerevisiae* target of rapamycin complex 2’, *Molecular Biology of the Cell*, 30(12), pp. 1555–1574. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0682.

Muir, A. *et al.* (2014) ‘TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids’, *eLife*, 3, pp. 1–34. doi: 10.7554/eLife.03779.

Mulet, J. M. *et al.* (2006) ‘Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp. 33000–33007. doi: 10.1074/jbc.M604244200.

Rhind, N. (2021) ‘Primer: Cell-Size Control’, *Current Biology*, 31(21). doi: 10.1016/j.cub.2021.09.017.

Riggi, M. *et al.* (2019) ‘Decrease in Plasma Membrane Tension Triggers PtdIns (4 , 5) P 2 Phase Separation to Inactivate TORC2’, *Nature Cell Biology*, 20(9), pp. 1043–1051. doi: 10.1038/s41556-018-0150-z.

Riggi, M., Kusmider, B. and Loewith, R. (2020) ‘The flipside of the TOR coin - TORC2 and plasma membrane homeostasis at a glance’, *Journal of Cell Science*, 133(9). doi: 10.1242/jcs.242040.

Roelants, F. M. *et al.* (2010) ‘A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp. 34–39. doi: 10.1073/pnas.0912497106.

Sabatini, D.M. *et al.* (1994) 'RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin dependent fashion and is homologous to yeast TORs', *Cell*, 78, 35–43. doi: 10.1016/0092-8674(94)90570-3.

Sabers, C.J. *et al.* (1995) 'Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells', *J. Biol. Chem*, 270, p. 815822. doi: 10.1074/jbc.270.2.815.

Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000) 'TOR, a central controller of cell growth', *Cell*, 103, pp. 253–262. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00117-3.