An. R. Acad. Nac. Farm., 2008, 74: 325-344

- Artículo original —

Papel de la proteína S6K1 en el balance supervivencia/muerte celular en el hígado

Recibido el 26 de marzo de 2008

ÁGUEDA GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *, JAVIER ALBA y ÁNGELA M. VALVERDE * Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM)

RESUMEN

La ruta mTOR/S6K1 controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentran la proliferación y el crecimiento de la masa celular. La insulina, IGF-I y EGF son factores de supervivencia de los hepatocitos. En las rutas de señalización mediadas por sus receptores, todos ellos de la superfamilia tirosina quinasa, la proteína S6K1 resulta activada. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si la deficiencia en S6K1 tiene consecuencias en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular en el hígado. Para ello, hemos generado líneas

* Información de contacto: Águeda González-Rodríguez. Dirección: Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM). C/ Arturo Duperier, 4 - 28029 Madrid. Telf.: 91 585 44 98. Fax: 91 585 44 01. Email: aguedagr@iib.uam.es

Ángela M. Valverde. Dirección: Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM). C/ Arturo Duperier, 4 - 28029 Madrid. Telf.: 91 585 44 97. Fax: 91 585 44 01. Email: avalverde@iib.uam.es

Abreviaturas: SF, suero fetal; TNF, factor de necrosis tumoral; Con A, concanavalina A.

celulares de hepatocitos inmortalizados a partir de hígados de ratones neonatos de genotipo salvaje (S6K1^{+/+}) y deficientes en S6K1 (S6K1^{-/-}). Dichas células se han sometido a dos protocolos de inducción de muerte celular por apoptosis: activación de receptores de muerte (TNFR y Fas) y retirada de factores tróficos del medio de cultivo. Nuestros resultados indican que la falta de S6K1 confiere protección frente a la apoptosis inducida por activación de receptores de muerte. Este fenómeno se debe a que la expresión de la proteína pro-apoptótica Bid está disminuida, la caspasa-8 no se activa y no se produce la degradación de FLIP ni truncamiento de Bid en respuesta a TNF y Jo2. De hecho, la falta de S6K1 protege del daño hepático fulminante producido por la invección de concanavalina A. Asimismo, la pérdida de S6K1 en los hepatocitos evita la apoptosis inducida por la retirada de factores tróficos. Esto es debido a que en ausencia de S6K1 no se inicia la retroalimentación negativa mediada por la actividad serina quinasa de esta proteína y, en consecuencia, los hepatocitos S6K1-/- mantienen activada la ruta IRS-1/PI3-quinasa que conduce a la activación de las quinasas Akt y ERK que mantienen la supervivencia celular. Nuestros resultados sugieren que la resistencia de los hepatocitos deficientes en S6K1 a la muerte celular por apoptosis podría explicar la resistencia a los compuestos inhibidores de mTOR en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como el hepatocarcinoma.

Palabras clave: Apoptosis.—Hepatocito.—TNF.—Retirada de suero.—Daño hepático.

ABSTRACT

Role of S6K1 in the balance between survival and cell death in the liver

The mTOR/S6K1 signaling pathway controls proliferation and cell growth. Insulin, IGF-I, EGF are trophic factors that elicit survival effects in hepatocytes. These molecules activate mTOR/S6K1 by acting through tyrosine kinase receptors. The aim of this study was to investigate whether S6K1 deficiency alters the balance survival/cell death in hepatocytes. For this goal, we have generated immortalized hepatocyte cell lines from neonatal wild-type and $S6K1^{-/-}$ deficient mice. Apoptosis has been induced in these cells by activating the death receptor pathway or, alternatively, by growth factors deprivation. Our results indicate that the lack of S6K1 in hepatocytes protects from apoptosis induced by the activation of death receptors (TNFR and Fas). In fact, in S6K1^{-/-} hepatocytes the pro-apoptotic protein Bid is down-regulated and its active proteolitic fragment is absent in response to TNF or Jo2. Moreover, neither caspase-8 is activated nor FLIP is degraded upon TNF or Jo2 treatment. In vivo, S6K1-deficient mice are protected against Concanavalin A-induced hepatic failure. Deprivation of growth factors induces apoptosis in wild-type, but not in S6K1^{-/-} hepatocytes. This is due to the lack of the negative feed-back that increases IRS-1 serine phosphorylation and inhibits PI3-kinase/Akt and MAPK survival molecular pathways. Consequently, there is a sustained activation of Akt and MAPK in the absence of trophic factors and S6K1deficient hepatocytes are protected from apoptosis. The molecular mechanisms by which S6K1 deficiency protects hepatocytes from apoptosis could be related with the resistance of some mTOR inhibitors in cancer therapies.

Keywords: Apoptosis.—Hepatocyte.—TNF.—Serum withdrawal.—Hepatic failure.

INTRODUCCIÓN

El balance supervivencia/muerte celular en el hígado es necesario para evitar un crecimiento anormal del mismo que desemboque en diferentes patologías, como daño hepático, fibrosis o cáncer. Un desequilibrio entre las señales pro y antiapoptóticas intracelulares conlleva, a través de distintos mecanismos, a la activación de rutas de señalización que dan lugar a la muerte celular por apoptosis del hepatocito (1). Los estímulos proapoptóticos activan la muerte celular a través de dos vías fundamentales y convergentes: la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial. La insulina, IGF-I y EGF son factores de supervivencia de los hepatocitos y su señalización vía PI3K/Akt representa una ruta principal de supervivencia asociada a la resistencia frente a la apoptosis y a la aparición de células malignas con fenotipo transformante. Uno de los sustratos de la ruta PI3K/Akt es mTOR. La ruta mTOR/S6K1 controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentran la proliferación y el crecimiento de la masa celular (2).

La importancia de la proteína S6K1 en las rutas de señalización que conducen al mantenimiento de la supervivencia celular y de la homeostasis glucídica del organismo se ha puesto de manifiesto tras la generación de ratones deficientes para esta proteína (3). Los ratones nulos para S6K1 son aproximadamente un 20% más pequeños al nacer. Este efecto es más notable en fases tempranas del desarrollo. Estos resultados indican un papel esencial del S6K1 en el crecimiento celular (4, 5).

La inhibición de mTOR se considera a día de hoy una diana terapéutica frente a distintos tipos de patologías tumorales (6-8). Así, compuestos como la rapamicina y derivados, potentes inhibidores de mTOR, se encuentran en fases II y III de ensayos clínicos. Sin embargo, la aparición de resistencias a dichos fármacos ha puesto

de manifiesto mecanismos moleculares desconocidos hasta ahora. Uno de ellos, que implica a S6K1, se ha descrito en líneas celulares de cancer de pulmón. Estos autores describen que la inhibición de mTOR por rapamicina pone en marcha una ruta de supervivencia mediada por Akt. En síntesis, la activación de la ruta mTOR/S6K1 conlleva a la fosforilación en residuos serina (Ser307, Ser636) de IRS-1. Estas fosforilaciones en serina inhiben las fosforilaciones en tirosina que son las responsables de la asociación y activación de la ruta PI3K/Akt (9).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo ha sido investigar el efecto de la pérdida de S6K1 sobre la supervivencia celular de los hepatocitos como mecanismo molecular de potencial interés en la carcinogénesis hepática. Nuestros estudios se han realizado *in vitro* en modelos celulares e *in vivo* en modelos murinos modificados genéticamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de hepatocitos neonatales

Para el cultivo primario de hepatocitos neonatales se utilizaron ratones neonatos de 3-5 días de vida de genotipo salvaje (S6K1^{+/+}) y deficientes en S6K1 (S6K1^{-/-}). El protocolo de cultivo se describe de-talladamente en Fabregat y col., 1989 (10). En los estudios donde se experimenta con animales, se asegura que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio» preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH publicación 86-23 revisada 1985).

Inmortalización de los hepatocitos neonatales

Una vez establecidos los hepatocitos neonatales en cultivo primario, éstos se mantuvieron en medio MEM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino hasta alcanzar el 60-70% de confluencia. En este momento, el cultivo se infectó con partículas virales que Vol. 74 (3), 325-344, 2008

expresaban la proteína viral LTAg. Transcurridas 48-72 horas se retiró el medio que contenía las partículas virales y las células infectadas se seleccionaron mediante el cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y con el antibiótico puromicina (1 μ g/ml). Transcurridos quince días en cultivo en estas condiciones, se caracterizaron genotípica y fenotípicamente los hepatocitos inmortalizados (11).

Caracterización de los hepatocitos neonatales inmortalizados por inmunofluorescencia y microscopía confocal

Los hepatocitos inmortalizados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} se cultivaron en placas de cultivo que contenían cristales de vidrio. Una vez alcanzado el 60-80% de confluencia, se fijaron las células y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-albúmina, anti-carbamoíl fosfato sintetasa (CPS) y anti-vimentina (VIM) seguido de incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (FITC-conjugated sheep anti-mouse y Cy3-conjugated gota anti-rabit). El análisis de inmunofluorescencia se realizó en un microscopio confocal MRC-1024 (Bio-Rad) adaptado a un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300.

Análisis de la expresión de proteínas mediante Western blot

Se ha seguido el protocolo descrito por Valverde y col., 2004 (12).

Determinación del porcentaje de células apoptóticas

Una vez finalizado el tratamiento con los estímulos apoptóticos, las células se recogieron mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4° C. El porcentaje de células apoptóticas se determinó fijando las células con etanol al 70% seguido de incubación con RNAsa A y ioduro de propidio (0,1% en PBS).

Determinación de las actividades caspasa-3 y caspasa-8

Las actividades caspasa-8 y 3 se determinaron por un método fluorimétrico siguiendo el protocolo descrito por González-Rodríguez y col., 2007 (13).

RT-PCR

Una vez sintetizado el cDNA (kit High-capacity archive kit de Applied Biosistem); la PCR se realizó con Power SYBR green PCR mastermix en el servicio de secuenciación del IIB. El programa realizado fue el Standard 10 minutos a 95° C y (15 segundos a 95° C; 1 minuto a 60° C) en 40 ciclos. Además, el ensayo se realizó con una curva de disociación a 90° C, 15 segundos. Los oligonucleótidos utilizados fueron: Bid sense: CTT GGT TAG AAA CGA GAT GGA CTG A y Bid antisense: TGT TCT CTG GGA CCT GTC TTC AG.

Inducción de daño hepático fulminante in vivo

Ratones de genotipos salvaje y deficientes en S6K1 fueron inyectados con Concanavalina A (25 mg/Kg peso) disuelta en PBS a través de la vena de la cola (14). Transcurridas 8 horas, se sacrificaron los animales y se extrajo el hígado.

Análisis histológico

Los hígados de ratón fueron fijados con paraformaldehído por perfusión del animal previa hepatectomía. Dichos hígados, tras ser extirpados, fueron incluidos en parafina, cortados con un espesor de 4 micras y teñidos con eosina-hematoxilina; el análisis histológico se realizó por microscopia óptica.

Análisis estadístico

Las representaciones gráficas se elaboraron utilizando los valores medios \pm los errores estándar de las medias (SEM). Las diferencias significativas se determinaron mediante el test *t de student*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las líneas celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}

Para realizar este estudio, hemos generado líneas celulares a partir del hígado de ratones S6K1^{+/+} (genotipo salvaje) y S6K1^{-/-} (deficientes en S6K1) de 3 a 5 días de vida post-natal. Estos ratones proceden de una colonia que se encuentra en el «Genome Research Institute» (University of Cincinnati, U.S.A.), del laboratorio de Sara Kozma y George Thomas, con los que hemos realizado una colaboración. En primer lugar, se inmortalizaron los hepatocitos primarios obtenidos en cultivo mediante una infección con el vector retroviral que expresa la proteína antígeno T largo del virus SV40 (AgT) (11). Los hepatocitos infectados se seleccionaron en medio suplementado con puromicina (0,5 μ g/ml) y se obtuvieron diversos clones a partir de los hepatocitos supervivientes. A partir de este momento trabajamos con dos clones de células S6K1^{-/-}

A continuación, caracterizamos los clones seleccionados mediante el análisis de la expresión endógena de proteínas marcadoras de los hepatocitos como albúmina (ALB: proteína plasmática secretada exclusivamente por estas células), citoqueratina 18 (CK18: proteína de citoesqueleto marcadora de células epiteliales parenquimatosas) y carbamoil fosfato sintasa (CPS: marcador del ciclo de la urea) por inmunofluorescencia y microscopía confocal (Figura 1A). Por otro lado, comprobamos que las células no emiten fluorescencia cuando se ponen en contacto con el anticuerpo anti-vimentina y se visualizan en el microscopio confocal. Esto indica que no hay contaminación de fibroblastos ya que la vimentina es un marcador del citoesqueleto que no se expresa en células parenquimáticas pero es un marcador positivo para células mesenquimales.

En paralelo, analizamos lisados celulares procedentes de cada una de las líneas de hepatocitos inmortalizados por Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce S6K1 (Figura 1B).



FIGURA 1. Caracterización de los hepatocitos inmortalizados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}.
A. Análisis por inmunofluorescencia de albúmina (ALB), carbamoil fosfato sintasa (CPS), citoqueratina 18 (CK18) y vimentina (VIM) de los hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} en condiciones de crecimiento. Como control negativo de ALB y CPS, usamos células β y, como control positivo de VIM, fibroblastos. B. Análisis por Western blot de la expresión de S6K1, AgT y β-actina, como control de carga.

Para investigar si la falta de S6K1 altera la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas, preparamos extractos de hígado de ratones neonatales y adultos procedentes de ratones de ambos genotipos y lisados de las líneas de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} y, a continuación, analizamos la expresión endógena de proteínas pro y antiapoptóticas mediante Western blot.

Los niveles de las proteínas antiapoptóticas $Bcl-x_L y$ Flip, así como los de las proteínas proapoptóticas Bim, FADD, Fas-L y Foxo-1 permanecen sin cambios significativas en su expresión (resultados no mostrados). Bid es la única proteína proapoptótica que muestra un Vol. 74 (3), 325-344, 2008

cambio significativo al comparar los extractos de tejido y los lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}, indicando que la deleción de S6K1 conlleva una disminución en el contenido de Bid (Figura 2). Para confirmar este resultado, medimos los niveles de ARN mensajero de Bid y comprobamos que, tanto en los hígados como en los hepatocitos carentes de S6K1, los niveles de ARN mensajero están disminuidos significativamente en comparación con su control. A la vista



FIGURA 2. Expressión endógena de proteínas anti y proapoptóticas en hepatocitos inmortalizados e hígados de neonatos de ratón S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}.
A. Análisis por Western blot de la expressión de Bid, S6K1 y β-actina, como control de carga, en lisados celulares de las dos líneas celulares y extractos hepáticos procedentes de ratones neonatales y adultos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}.
B. La gráfica representa los datos cuantitativos de las densitometrías correspondientes a cinco experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores medios ± SE de los cinco experimentos.
* p < 0,05. C. Niveles de ARNm de Bid de hepatocitos neonatales inmortalizados e hígados neonatales S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}. La gráfica representa los datos cuantitativos correspondientes a tres experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores a tres experimentos independientes y los datos cuantitativos correspondientes a tres experimentos independientes y los datos cuantitativos correspondientes a tres experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores medios ± SE de los datos cuantitativos correspondientes a tres experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores medios ± SE de los tres experimentos independientes

de los resultados, nos planteamos la posibilidad de la existencia de un efecto directo o indirecto de la proteína S6K1 sobre la expresión de la proteína proapoptótica Bid.

Estudio de la apoptosisis inducida por la activación de receptores de muerte

A partir de este momento trabajamos únicamente con líneas celulares inmortalizadas de hepatocitos de ratón neonato S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}.

Para realizar el estudio de la apoptosis inducida por la activación de receptores de muerte, estimulamos las células por un lado con TNF α (30 ng/ml) y actinomicina D (0,2 µg/ml) y por otro con Jo2 (2 µg/ml), un anticuerpo agonista del receptor de muerte FAS, y trancurridas 16 horas analizamos diferentes parámetros indicadores de la apoptosis celular. En primer lugar, realizamos el estudio diferencial de la activación de la apoptosis a través de estímulos de la vía de receptores de muerte en los hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} analizando la morfología celular tras el tratamiento con los distintos estímulos que activan esta ruta apoptótica. Los hepatocitos S6K1^{+/+} adquieren una morfología típica de las células apoptóticas tras someterlos a los estímulos va citados y, por el contrario, los hepatocitos carentes en S6K1 no cambian su apariencia tras la estimulación (Figura 3A). Al determinar la morfología nuclear antes y después de la estimulación mediante tinción con DAPI, observamos que no aparecen o aparecen de forma muy puntual cuerpos apoptóticos en los hepatocitos deficientes en S6K1 (Figura 3B).

A continuación, medimos el porcentaje de células apoptóticas (con contenido de ADN inferior a 2N) en las mismas condiciones experimentales. Al analizar por citometría de flujo el porcentaje de células apoptóticas, encontramos que las células S6K1^{+/+} son sensibles a la apoptosis inducida con ligandos de receptores de muerte, ya que al ser estimuladas con TNF α en presencia de Actinomicina D, el porcentaje de células con contenido de ADN inferior a 2N aumenta siete veces con respecto a su control no inducido. De la misma manera, tras la estimulación con Jo2 observamos un aumento en este procentaje de tres veces con respecto al control no estimulado.



FIGURA 3. Morfología celular y nuclear de los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras el tratamiento con ligandos de receptores de muerte. Imágenes representativas de campos celulares realizadas por microscopía de contraste de fases (A) o por microscopía de fluorescencia, tras la tinción de DAPI (B) de hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras ser estimulados con $TNF\alpha$ + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas en comparación con su control (SF). Las flechas indican la formación de cuerpos apoptóticos.

Sin embargo, no ocurre así con los hepatocitos carentes de S6K1, que no se ven afectados por estos estímulos proapoptóticos con respecto a las células controles (Figura 4A).

La apoptosis indica, por definición, que se trata de un proceso de muerte celular dependiente de caspasas. Por tanto, analizamos la variación de los niveles de actividad caspasa-3 y 8 en los hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. Las células de genotipo salvaje presentan un aumento significativo de actividad caspasa-3 y caspasa-8 ante estos estímulos apoptóticos. Sin embargo, los hepatocitos S6K1^{-/-} permanecen sin alterar los niveles de actividad de dichas caspasas (Figura 4B). Para corroborar los ensayos fluorimétricos de actividad caspasa, analizamos los niveles de expresión de los fragmentos activos tanto de

la caspasa-3 como de la caspasa-8 mediante Western blot. En ambos casos, observamos que en los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ aparecen los fragmentos activos de estas caspasas tras el tratamiento con TNF α en presencia de Actinomicina D y con Jo2, y que no ocurría así con los hepatocitos deficientes en S6K1.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de otras proteínas implicadas en la ruta apoptótica mediada por receptores de muerte. La activación de Bid se produce como consecuencia de su proteolisis debido a la activación de la caspasa-8. En consecuencia, aparece un fragmento truncado de Bid (tBid) de 15 KDa con gran actividad proapoptótica. Como ocurría anteriormente, los niveles de expresión de Bid están disminuidos en los hepatocitos S6K1^{-/-} comparado con los hepatocitos S6K1^{+/+}. A la hora de analizar tBid, observamos que en los hepatocitos de genotipo salvaje aparece un aumento en los niveles de expresión de tBid ante el estímulo de muerte. Sin embargo, no ocurre lo mismo en las células S6K1^{-/-}, donde tBid no aparece tras el tratamiento (Figura 4C). Finalmente, estudiamos posibles cambios en Bcl-x, en las mismas condiciones experimentales. En los hepatocitos de genotipo salvaje, los niveles de Bcl-x_L disminuyen significativamente tras el tratamiento con TNFα en presencia de Actinomicina D y con Jo2. Sin embargo, la expresión de Bcl-x₁ no se modifica tras la inducción de apoptosis en los hepatocitos deficientes en S6K1.

Nuestros resultados indican que la falta de S6K1 tiene como consecuencia una menor expresión de Bid. Esto conlleva la ausencia de su forma activa. Asimismo, la inducción de la apoptosis no provoca activación de la caspasa-8. Paralelamente, se mantienen los niveles de Bcl- x_L ante dichos estímulos apoptóticos. Por tanto, podríamos decir que en los hepatocitos deficientes en S6K1 existe un balance a favor de las proteínas antiapoptóticas frente a las proteínas proapoptóticas.

Estudio de la apoptosis inducida por la deprivación de factores tróficos

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la deprivación de factores tróficos inducía muerte celular por apoptosis en los hepatocitos inmortalizados (12, 13). Por ello, analizamos el efecto de la pérdida de S6K1 sobre la apoptosis inducida por la retirada de factores de crecimiento del medio de cultivo durante diferentes tiempos.

Al analizar el porcentaje de células apoptóticas que aparecen tras la retirada de suero, encontramos que los hepatocitos de genotipo salvaje son sensibles a la apoptosis inducida de esta manera. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los hepatocitos carentes en S6K1, los cuales, a pesar de mostrar un pequeño aumento de 1,5 veces en sus niveles de células con contenido de ADN inferior a 2N, no es comparable con el aumento tan significativo de los hepatocitos controles (Figura 5A). A continuación, medimos la actividad de la caspasa-3 por un ensayo fluorimétrico y demostramos que aumenta tras la retirada de suero en las células S6K1^{+/+}, pero esto no ocurre en los hepatocitos deficientes en S6K1 (Figura 5B).

Al analizar la expresión de otras proteínas, encontramos inducción de la proteína proapoptótica Bim en los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ cultivados en ausencia de suero durante 8 y 16 horas. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, la expresión de Bim se mantiene muy baja en los hepatocitos $S6K1^{-/-}$, prácticamente en los mismos niveles que en presencia de suero (10% de suero fetal). Asimismo, la proteína antiapoptótica Bcl- x_L se modula tras la retirada de suero. En ausencia de suero durante 8 y 16 horas, disminuyen los niveles de expresión de Bcl- x_L en los hepatocitos de genotipo salvaje. Sin embargo, de la misma forma que ocurre con Bim, la falta de S6K1 en los hepatocitos mantiene la expresión de Bcl- x_L en niveles semejantes que las células controles (Figura 5C).

Estudio de las rutas de supervivencia activadas por factores de crecimiento

A la vista de la marcada resistencia a la apoptosis de los hepatocitos carentes de S6K1, nos planteamos la posibilidad de que se pudieran mantener activadas las rutas de supervivencia en ausencia de suero. Para comprobar esta hipótesis, determinamos los niveles de fosforilación de Akt y MAPK, dos proteínas clave en las rutas de supervivencia de los hepatocitos (15).

Los niveles de fosforilación de MAPK y Akt disminuyen conforme avanza el tiempo de retirada de suero en las células controles. Sin embargo, los hepatocitos $S6K1^{--}$ mantienen los niveles de fosforilación de ambas proteínas a pesar de la deprivación de suero (Figura 6A).



FIGURA 4. Análisis de la apoptosis en hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{+/-} tras el tratamiento con ligandos de receptores de muerte. A. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras el tratamiento con TNFα + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas.
En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes.
* p < 0,05. B. Análisis de la actividad enzimática de caspasa-3 y 8 en lisados de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras el tratamiento con TNFα + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores Medios ± SE de cinco con TNFα + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * p < 0,05. C. Análisis por Western blot de la expresión de Bcl-x_D, Flip, Bid, caspasa-8, del fragmento activo de caspasa-3 y β-actina, como control de carga, en los lisados de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tratados como se describe en B.



FIGURA 5. Análisis de la apoptosis en hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero. A. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * p < 0,05.
B. Análisis de la actividad caspasa-3 y acumulación de su fragmento activo por Western blot en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero.
En la gráfica, los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes.
* p < 0,05. C. Análisis por Western blot de la expresión Bcl-x_L, Bim y β-actina, como control de carga, en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero.

Una vez comprobado que los niveles de fosforilación y, por tanto, de activación de estos dos miembros importantes de las rutas de supervivencia no se pierden a pesar de la falta de factores tróficos, investigamos el comportamiento de los hepatocitos deficientes en S6K1 ante el mismo estímulo de muerte al inhibir ambas rutas de supervivencia. Para realizar este experimento utilizamos dos inhibi-

dores que impiden la activación de Akt y MAPK. Estos inhibidores son LY294002 (inhibe la PI3K) a una dosis 40 μ M y PD098059 (inhibe MEK) a una dosis de 20 μ M.

En los hepatocitos S6K1^{-/-} el porcentaje de células apoptóticas aumenta dos veces después del tratamiento con PD o LY conjuntamente con retirada de suero. Además, la incubación de estas células con LY y PD de manera simultánea produjo un efecto sinérgico, alcanzándose un aumento de cuatro veces en este porcentaje (Figura 6B). Este dato resulta muy similar al número de células apoptóticas que aparecen con el tratamiento único de la retirada de suero en los hepatocitos de genotipo salvaje.



FIGURA 6. Medida de la activación de Akt y MAPK tras la retirada de suero.
A. Análisis por Western blot de la fosforilación de Akt, MAPK y β-actina, como control de carga, en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero.
B. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras 16 horas de retirada de suero en presencia de LY, PD y de LY + PD.

En la gráfica, los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios \pm SE de tres experimentos independientes. * p < 0,05.

Aproximación *in vivo* de un daño hepático fulminante producido por el tóxico concanavalina A: papel protector de la deficiencia en S6K1

Para comprobar los resultados obtenidos *in vitro*, analizamos el efecto de la falta de S6K1 frente a un daño hepático fulminante producido por el tóxico concanavalina A (ConA). Ésta es una glico-proteína perteneciente a las lectinas que se obtiene de la planta *Canavalia ensiformes* y presenta una gran afinidad por el seno hepático, provocando daños en el hígado a través de la activación de los linfocitos T (16).

El protocolo seguido para realizar estos experimentos fue el siguiente: se inyecta PBS 1X (controles) o 25 mg/Kg de ConA disuelta en PBS a través de la vena de la cola (14) a ratones de genotipo salvaje y deficientes en S6K1. Transcurridas ocho horas, los animales se sacrifican. Con los hígados procedentes de ratones controles y ratones inyectados con el tóxico, se preparan cortes en parafina y extractos de proteínas para el posterior análisis de parámetros indicadores de muerte celular.

En la Figura 7A se muestran cortes de hígados de ratones S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} controles e inyectados con concanavalina A. Los hígados controles de ambos genotipos mostraron una histología de aspecto normal, al igual que los cortes de hígados procedentes de ratones deficientes en S6K1 inyectados con ConA. Sin embargo, en los cortes de hígados de genotipo salvaje inyectados con ConA aparece una intensa congestión vascular y esteatosis multivacuolar hepatocitaria, signos claros de un fuerte daño hepático. Asimismo, los niveles de actividad caspasa-3 aumentan cinco veces tras el tratamiento con ConA en los hígados de genotipo salvaje. Sin embargo, en hígados deficientes en S6K1 es prácticamente despreciable la variación de la actividad de caspasa-3 frente a su control sin inyectar. A continuación, analizamos el truncamiento de Bid. Tras el tratamiento con ConA, detectamos el fragmento activo de Bid en los hígados S6K1^{+/+} pero no en los hígados S6K1^{-/-} (Figura 7B).



FIGURA 7. Análisis de la apoptosis en hígados de ratones S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección con PBS 1X o ConA. A. Los cortes de hígados se tiñeron con hematoxilina-eosina a un aumento de: 4x (arriba) 60x (abajo). B. Análisis de la actividad caspasa-3 en extractos de hígados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección de Concanavalina A. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control inyectado con PBS 1X y son valores medios ± SE de tres experimentos independientes. * p < 0,05. C. Análisis por Western blot del truncamiento de Bid en extractos de hígados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección de Concanavalina A.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por un proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC/BFU 200501615) y por el CIBERDEM.

Vol. 74 (3), 325-344, 2008

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HENGARTNER, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
- (2) KIM, S. K. and NOVAK, R. F. (2007): The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* 113 (1): 88-120.
- (3) UM, S. H.; FRIGERIO, F.; WATANABE, M.; PICARD, F.; JOAQUIN, M.; STICKER, M.; FUMAGALLI, S.; ALLEGRINI, P. R.; KOZMA, S. C.; AUWERX, J. and THOMAS, G. (2004): Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 431 (7005): 200-205.
- (4) PENDE, M.; KOZMA, S. C.; JAQUET, M.; OORSCHOT, V.; BURCELIN, R.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; KLUMPERMAN, J.; THORENS, B. and THOMAS, G. (2000): Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 408 (6815): 994-997.
- (5) VOLAREVIC, S. and THOMAS, G. (2001): Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 65: 101-127.
- (6) ZHANG, J. F.; LIU, J. J.; LU, M. Q.; CAI, C. J.; YANG, Y.; LI, H.; XU, C. and CHEN, G. H. (2007): Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl. Immunol.* 17 (3): 162-168.
- (7) KIM, S. K. and NOVAK, R. F. (2007): The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* 113 (1): 88-120.
- (8) EVERSON, G. T. (2006): Everolimus and mTOR inhibitors in liver transplantation: opening the «box». *Liver. Transpl.* 12 (11): 1571-1573.
- (9) SUN, S. Y.; ROSENBERG, L. M.; WANG, X.; ZHOU, Z.; YUE, P.; FU, H. and KHURI, F. R. (2005): Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycinmediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 65 (16): 7052-7058.
- (10) FABREGAT, I.; LORENZO, M. and BENITO, M. (1989): Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (3): 1028-1034.
- (11) VALVERDE, A. M.; BURKS, D. J.; FABREGAT, I.; FISHER, T. L.; CARRETERO, O. J.; WHITE, M. F. and BENITO, M. (2003): Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes*. 52 (9): 2239-2248.
- (12) VALVERDE, A. M.; FABREGAT, I.; BURKS, D. J.; WHITE, M. F. and BENITO, M. (2004): IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology*. 40 (6): 1285-1294.
- (13) GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; ESCRIBANO, O.; ALBA, J.; RONDINONE, C. M.; BENITO, M. and VALVERDE, A. M. (2007): Levels of protein tyrosine phosphatase 1B determine susceptibility to apoptosis in serum-deprived hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 212 (1): 76-88.
- (14) CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S. and LEI, H. Y. (2007): Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*. 45 (2): 286-296.

- (15) MURATA, M.; KOJIMA, T.; YAMAMOTO, T.; GO, M.; TAKANO, K.; OSANAI, M.; CHIBA, H. and SAWADA, N. (2005): Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp. Cell. Res.* 310 (1): 140-151.
- (16) GANTNER, F.; KUSTERS, S.; WENDEL, A.; HATZELMANN, A.; SCHUDT, C. and TIEGS, G. (1997): Protection from T cell-mediated murine liver failure by phosphodies-terase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1): 53-60.