

TITULO: OXIDO NITRICO Y PROLIFERACION CELULAR EN EL HIGADO

MEMORIA FINAL

ANTECEDENTES

Una de las características fundamentales del hígado es la capacidad regenerativa que presenta después de haber sufrido un daño. Este proceso proporciona un excelente modelo para estudiar la proliferación celular *in vivo* (1,2). La proliferación celular es consecuencia de la respuesta del hepatocito a factores de crecimiento como el caso del Hepatocyte growth factor (HGF) (1,2). Pero para que se produzca esta reacción es necesario que la célula se encuentre en un estadio en el que sea sensible a estas señales mitógenas (1,2). Se conoce que la inducción tanto de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible como de la producción de NO es importante en la respuesta de crecimiento del hepatocito, sin embargo el mecanismo por el cual ejerce este efecto está aun por determinar(3). Recientemente se ha descrito que el NO podría modular los niveles de la S adenosilmetionina (SAM) y de esta forma regular la respuesta del hepatocito. La metionina adenosiltransferasa (MAT), enzima clave en el ciclo de la metionina y responsable de la síntesis de SAM es inhibida de forma específica por el NO (4, 5). Se ha observado que la respuesta mitógena del hepatocito al HGF se encuentra bloqueada cuando se inhibe la iNOS y este efecto es dependiente de los niveles de SAM intracelulares (6). Unos niveles elevados de SAM suprimen la inducción por HGF de la ciclina D1, la ciclina D2, el activador de la proteína 1 (AP1) y por consiguiente la proliferación celular. Por tanto se puede concluir que el NO cambiaría el estado de los hepatocitos a una forma sensible a HGF a través de una disminución de los niveles de SAM (6) y. Sin embargo, se desconoce actualmente, cual es el mecanismo por el cual SAM regula el crecimiento del hepatocito. El efecto que SAM ejerce sobre la ruta de señalización iniciada por el tratamiento con el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) no altera la fosforilación de ERK, sugiriendo que deben de existir otras rutas de señalización diferentes de las MAP quinasas implicadas en el proceso (7).

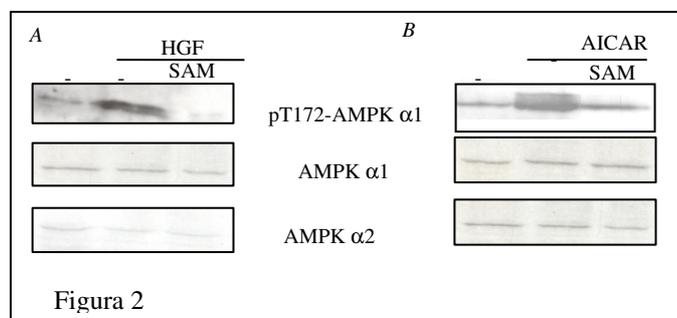
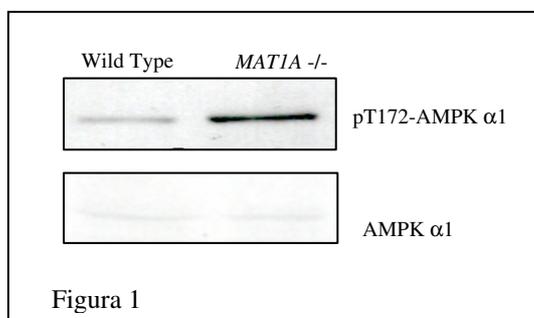
Por tanto, en este proyecto hemos intentado conocer cual es el mecanismo por el que el SAM bloquea la proliferación celular y como modula los niveles de NO en el proceso de sensibilización celular a los factores de crecimiento.

1. MECANISMO DE REGULACION DE SAM EN EL CICLO CELULAR.

La reciente secuenciación del genoma humano ha permitido identificar nuevas dianas potenciales de pequeñas moléculas que contienen grupos adenosilo como el SAM. Entre ellas se encuentran las denominadas "CBS-domain containing proteins" (8), proteínas que contienen un motivo estructural denominado "dominio CBS", que está presente, entre otras, en la cistationina beta sintasa (CBS) (de la que recibió el nombre) (<http://www.sanger.ac.uk/Users/agb/CBS/CBS.html>), en algunos canales de cloro, en transportadores de Mg, o en la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), cuya subunidad γ contiene cuatro de estos motivos en tandem (8) La proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) descubierta hace ya dos décadas, juega un papel fundamental en la regulación del estado energético de la célula (9). Sin embargo se desconocen en gran medida los detalles de la composición molecular, regulación y función de esta enzima, que ha permanecido muy conservada

durante la evolución. AMPK se activa directamente por un aumento en los niveles de AMP y se inhibe por altas concentraciones de ATP (10). En esta condición, la AMPK inhibe las rutas biosintéticas (consumidoras de ATP) mediante la fosforilación de las enzimas claves de estas vías, (por ejemplo, en la síntesis de ácidos grasos y colesterol), y activa las rutas catabólicas que generan ATP (como es el caso de la oxidación de los ácidos grasos) (11,12). Además del mantenimiento de la homeostasis energética de la célula descrito anteriormente, la AMPK está implicada en procesos como el control de la transcripción (13,14), la secreción de insulina por las células β pancreáticas (15), la regulación de la NO sintasa endotelial (16), y de la Raf-1 quinasa (17). Estos datos sugieren que esta enzima puede estar involucrada en la regulación de numerosos procesos celulares aún no identificados. AMPK es capaz de activarse sin que exista alteración en los niveles de adenina, lo que indica la posible existencia de otras enzimas "upstream" en la cascada de señales. La información acumulada hasta el momento sugiere la posibilidad de que AMPK sea un punto de unión entre metabolismo y proliferación celular.

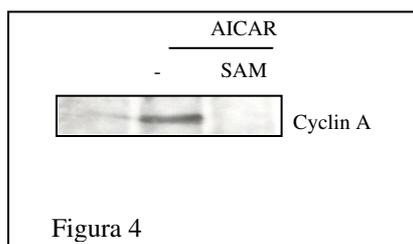
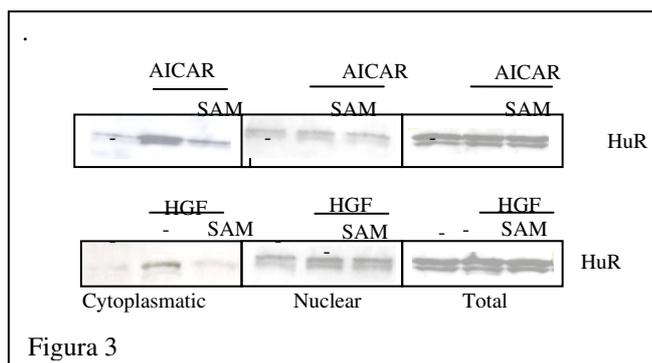
Basándonos en los datos anteriores hemos medido la actividad de la AMPK en MAT0 a los 8 meses, donde los ratones presentan un episodio claro de esteatohepatitis no alcohólica y a los 18 meses donde los animales muestran un hepatocarcinoma (18). En los dos casos observamos una inducción en la actividad de la AMPK con respecto a los ratones control de la misma edad (figura 1). Estos datos sugieren la posible implicación de esta enzima en procesos proliferativos, en nuestro modelo de ratón KO. Además, el HGF, factor que induce múltiples vías de proliferación y el AICAR (un inductor de la AMPK) y regulador a su vez del ciclo celular, inducen la fosforilación y activación de la AMPK en el modelo *in vitro* de hepatocitos aislados de rata y SAM es capaz de bloquear este proceso (figura 2).



La información acumulada hasta el momento sugiere la posibilidad de que AMPK sea un punto de unión entre metabolismo y proliferación celular. Datos experimentales de proteómica y genómica obtenidos en nuestro laboratorio con el ratón MAT0 confirman que la molécula de SAM es capaz de regular la expresión de un enorme y diverso número de genes y proteínas implicados en rutas metabólicas (18). Estos resultados junto con la demostración de que SAM podría mediar la actividad de la AMPK tanto *in vitro* como *in vivo*, demostraría que niveles no controlados de SAM pueden provocar daños y procesos proliferativos en el hígado en los que están implicadas múltiples rutas metabólicas.

Recientemente se ha descrito que la activación de la AMPK por AICAR produce una reducción en los niveles citoplasmáticos de la proteína HuR en células de cáncer de colon RKO. HuR pertenece a la familia de proteínas que se unen a zonas ricas en AU normalmente localizadas en el 3'

UTR de ARN de vida corta como son genes del ciclo celular y citoquinas, aumentando la estabilidad del ARNm (19,20). En nuestro modelo de hepatocitos de rata se comprobó si la AMPK era capaz de regular el transporte de HuR del núcleo al citosol después del tratamiento con HGF o AICAR, si este hecho provocaba una inducción de genes implicados en el control del crecimiento celular y si SAM intervenía en alguno de estos pasos. Como se muestra en la (figura 3) tras la inducción de la actividad de la AMPK con AICAR o HGF en los hepatocitos, se produce un transporte de HuR del núcleo al citosol, que es bloqueada en presencia de SAM. Este tránsito de HuR al citosol va acompañado de la expresión de ciclina A que se encuentra inhibida en presencia de SAM (figura 4)



Todo estos datos sugieren que SAM podría controlar el metabolismo de lípidos y glucosa en el hígado a través de la regulación de la AMPK y proporcionar un nuevo ejemplo de relación entre rutas metabólicas y vías que controlan el crecimiento celular.

2. MECANISMO DE REGULACION DE LOS NIVELES DE NO POR SAM.

El NO actúa modulando múltiples rutas biológicas. Un desequilibrio en los niveles de NO, en su metabolismo, o en sus funciones ha sido asociado con problemas vasculares, trombosis, y diversas patologías inflamatorias (21). En el hígado, el NO es generado por la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y por la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (22). Este NO está implicado en gran cantidad de reacciones fisiológicas que pueden provocar ciertos desordenes fisiológicos en este órgano. Se han utilizado diversos modelos en animales con el fin de conocer el papel del NO en los procesos inflamatorios que ocurren en el hígado (23). Mientras que el NO generado por la eNOS es claramente favorable para el hígado, el NO sintetizado a partir de la iNOS puede provocar tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en la homeostasis del hígado. Recientemente se ha demostrado por técnicas inmunohistoquímicas que la eNOS está distribuida de forma uniforme en los hepatocitos (24).

Entre las proteínas quinasas implicadas en la regulación de la eNOS se incluye la AMPK (25). La AMPK induce la activación de la eNOS en procesos de isquemia pero, han sido descritos

múltiples estímulos como pueden ser el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) (26), IGF I (factor de crecimiento semejante a la insulina) (26), estrógenos (27), o señalización a través de la ruta de Akt implicadas en la fosforilación de la eNOS en Ser 1177. Hemos intentado averiguar en nuestro modelo de la línea celular MLP 29 (línea hepatocitaria de ratón) si el AMPK puede estar fosforilando la eNOS tanto en la Ser 1177 como en la Thr 495 y en consecuencia generando niveles beneficiosos de NO a partir de un estímulo como puede ser el HGF. El HGF como se explicó anteriormente promueve tanto la actividad de la AMPK fosforilando el residuo Thr 172 de la subunidad alpha de la proteína como de la proteína Akt. Por tanto, en nuestro estudio hemos intentado conocer si existe algún tipo de comunicación cruzada entre la ruta de PI3 quinasas (PI3K) y la ruta de la AMPK en la activación de la eNOS a través de la utilización de inhibidores específicos de la (PI3K). Por ultimo, se ha investigado la posibilidad que inhibidores específicos de la NOS puedan regular tanto la actividad de la AMPK como de Akt en presencia de factores mito génicos como el HGF. Por tanto y en esta situación explicaríamos la necesidad de unos determinado niveles de NO para un estado receptivo del hepatocito a señales de factores de crecimiento. En el modelo propuesto es fundamental el papel del SAM. Al bloquear la actividad de la AMPK inhibiría la fosforilación de la eNOS e impediría la liberación del NO responsable en parte del inicio de la respuesta celular a los factores mitogénicas. De esta manera, el NO generado a través de la activación de la eNOS producida por la fosforilación de la AMPK revertiría de nuevo en la parte inicial de la cascada permitiendo la respuesta al HGF.

En primer lugar se determinó si la respuesta de la línea celular MLP 29 (hepatocitos de ratón) al HGF, en relación a la fosforilación de la AMPK, es la misma que la mostrada en los hepatocitos primarios de rata. Como se puede observar en la figura 1 el factor de crecimiento actúa activando la AMPK y el SAM es capaz de bloquear esta respuesta.

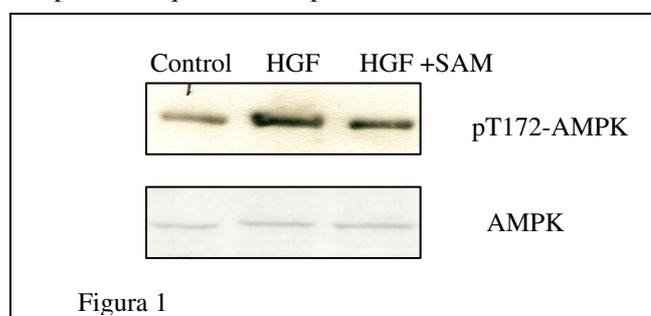
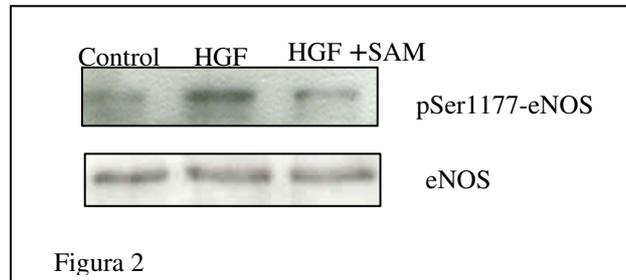


Figura 1

Teniendo en cuenta el papel en la señalización celular que presenta la molécula de NO, quisimos conocer el efecto que inhibidores de la NOS como el N^G monometil L arginina metil ester (L NAME) o donantes de grupos NO como la S nitroso N acetilpenicilamina (SNAP) ejercen en la actividad de la AMPK. En consecuencia, se midió la actividad de la AMPK, la fosforilación en su residuo de Thr 172, y se calculó el ratio en cada caso con la enzima sin fosforilar. Los resultados mostraban que tanto el SAM como el NAME bloqueaban 1,5 y 2,8 veces respectivamente la fosforilación con respecto al control, en presencia de HGF, mientras que el SNAP no alteraba el estadio de activación de la AMPK con HGF.

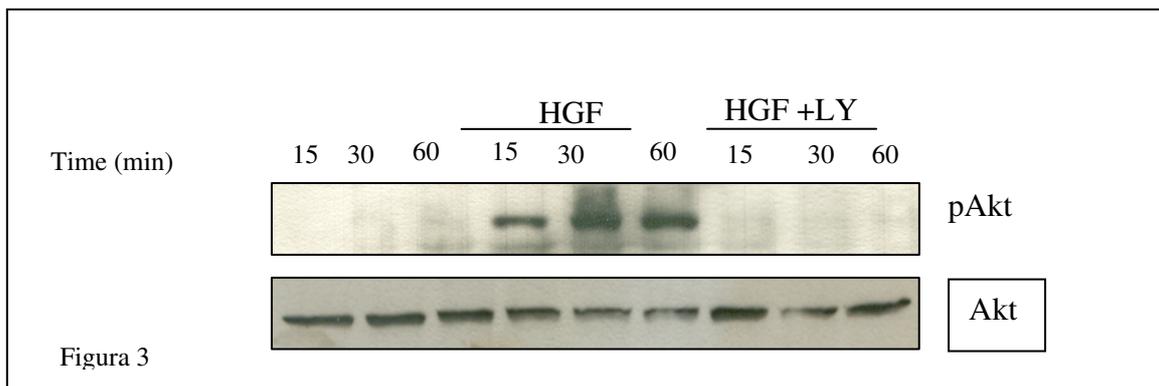
A continuación, determinamos si a través de la respuesta mitogénica del HGF se provocaba la fosforilación de la eNOS tanto en la Ser1177 como en la Thr 495 en las células MLP. Como se puede

observar en la figura 2, el tratamiento de las células con el factor de crecimiento inducía la fosforilación de la eNOS en Ser1177 sin producirse cambios en la eNOS 495 (datos no mostrados).

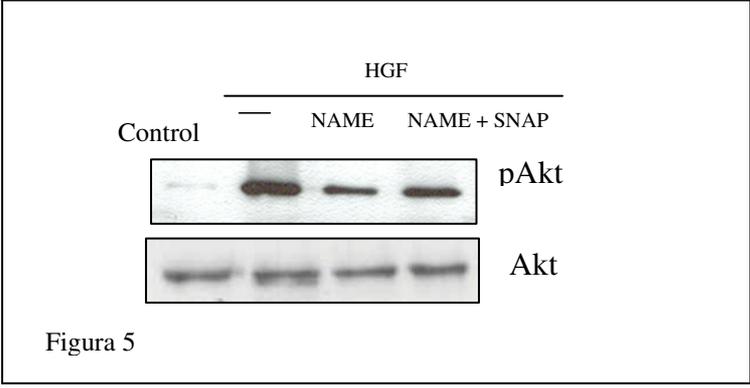
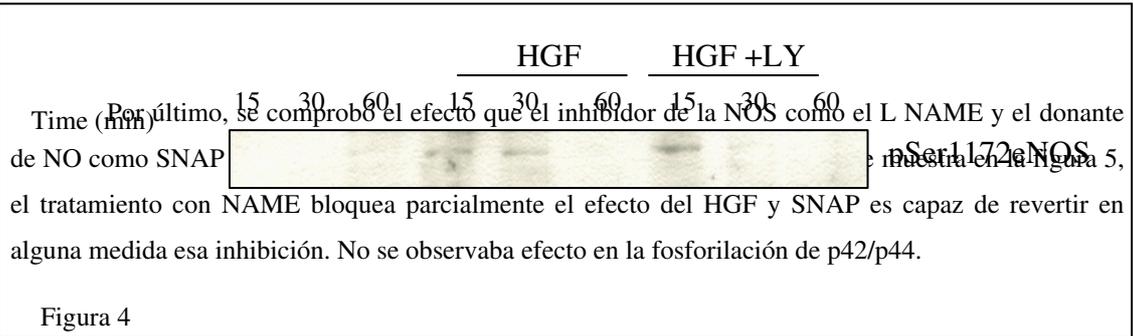


Se midieron los niveles de nitritos en las células tratadas tanto con HGF como con SAM, NAME y SNAP. Los niveles aparecían sensiblemente disminuidos en el caso del tratamiento con SAM y por supuesto con el inhibidor de NOS, L NAME, con respecto al control, 10,2 veces y 2,1 vez respectivamente.

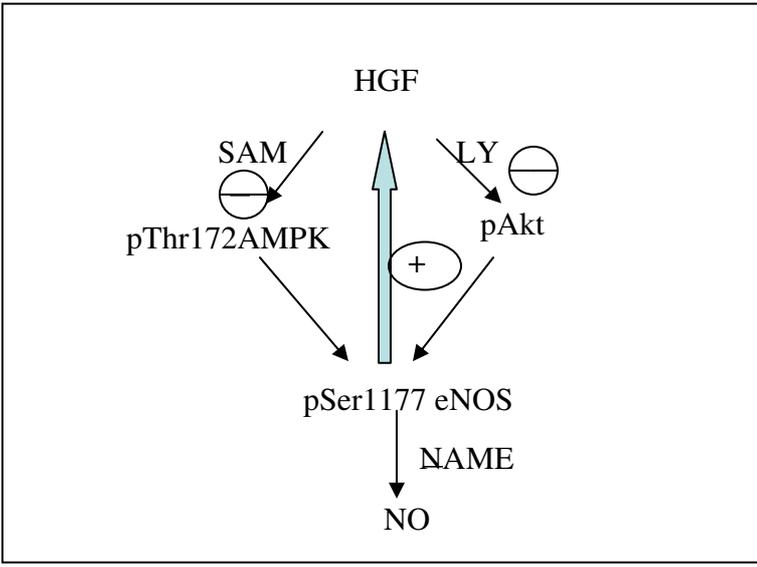
Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que Akt, enzima incluida en la ruta de las PI3K, puede fosforilar a eNOS en el residuo Ser1177. Con el fin de conocer si existe algún tipo de "comunicación" entre la ruta de la PI3K y la ruta de la AMPK, se utilizaron inhibidores de fosforilación y activación de Akt y se determinó el grado de fosforilación de Ser1177eNOS. En primer lugar se confirmó la inhibición de la fosforilación de Akt en las condiciones de nuestro ensayo en nuestra línea celular MLP. Como se muestra en la figura 3, la activación tras el tratamiento con HGF de Akt se ve bloqueada con el inhibidor LY294002.



A continuación, se comprobó el efecto del inhibidor LY294002 en la fosforilación de Ser1177eNOS. Como se muestra en la figura 4, el inhibidor de PI3K no bloquea totalmente la actividad de la eNOS. Además, este inhibidor no ejercía ningún efecto en la fosforilación de la AMPK inducida por HGF y a su vez SAM no era capaz de bloquear la fosforilación de Akt ejercida por el mismo mitógeno(datos no mostrados).



En consecuencia, podemos concluir que en nuestro modelo in vitro de células MLP29, tanto la AMPK, como Akt parecen participar en la fosforilación y activación de eNOS, regulando la síntesis de NO. Esos niveles de NO, revierten en conseguir un estado sensibilizado de la célula que haga receptiva al tratamiento de HGF. Estos datos nos lo confirma el hecho que el tratamiento con un inhibidor de la eNOS repercute en un bloqueo parcial tanto de la activación de la AMPK como de Akt. Además, tanto el SAM, inhibidor de la AMPK, como el LY 294002, inhibidor de la fosforilación de Akt, inhiben parcialmente la fosforilación de la Ser1177eNOS. Por tanto, el NO producido por la eNOS después del tratamiento con HGF entraría a formar parte de un loop donde modularía a su vez, esa respuesta al mitógeno. En la figura 6 se presenta un esquema del mecanismo propuesto.



REFERENCIAS

1. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60–66
2. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000 ; 32:19–31
3. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver.I.Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12:186–202
4. Avila MA, Mingorance J, Martinez Chantar ML, Casado M, Martín Sanz P, Bosca L, Mato, JM. Regulation of rat liver S adenosylmethionine synthetase during septic shock. Role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 73:265–280
5. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by nitrosylation. *Hepatology* 1998;28:1051–1057
6. Garcia Trevijano E, Martinez Chantar ML, Latasa MU, Mato JM, Avila MA. NO sensitizes rat hepatocyte to proliferation by modifying S adenosilmethionine levels.*Gastroenterology* 2002; 122:1355–1363.
7. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:679-690
8. Bateman A.The structure of a domain common to Archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends. Biochem.Sci.* 1997 ;22:12 –13
9. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 2004;113:274-284
10. Cheung, PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J* 2000;346:659-669
11. Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:821-855
12. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays* 2001;23:1112-1119
13. Foretz M, Carling d, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1998;273:14767-14771
14. Leclerc I, Kahn A, Doiron B. The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett.* 1998; 431:180-184
15. Salt I, Johnson G, Ashcroft SJH, Hardie DG. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem. J.* 1998;335:533-539

16. Cheng ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999;443:285-289
17. Sprenkle AB, Davies SP, Carling D, Hardie DG, Sturgill TW. Identification of Raf-1 Ser621 kinase activity from NIH 3T3 cells as AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1997;403:254-258
18. Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5560-5565
19. Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:266-277
20. Wang W, Fan J, Yang X, Fürer-Galban S, López de Silanes I, Kobbe C von, Guo J, Georas SN, Fougère F, Hardie DG, Careling D, Gorospe M. AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 2002;22:3425-3436
21. De Belder AJ, Radomski MW. Nitric oxide in the clinical arena. *J Hypertens.* 1994 ;12:617-624
22. Li J, and Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am.J.Physiol.*1999;276:1069-1073
23. Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin. Biochem.* 1999; 32:571-578
24. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski M. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *PNAS.*2002;99:17161-17166
25. Cheng ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999;443:285-289
26. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol* 1999;9:845-849
27. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka k, Miyoshi E, Fujiwara n, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem* . 2001;276:3459-3467