



**Fundació**  
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM  
Diabetis i Obesitat



## **REDUCCIÓ DE L'OBESITAT: TERÀPIA ANTI-S6K1**

**Sara Catherine Kozma**

IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica Hospital Univesitari de Bellvitge

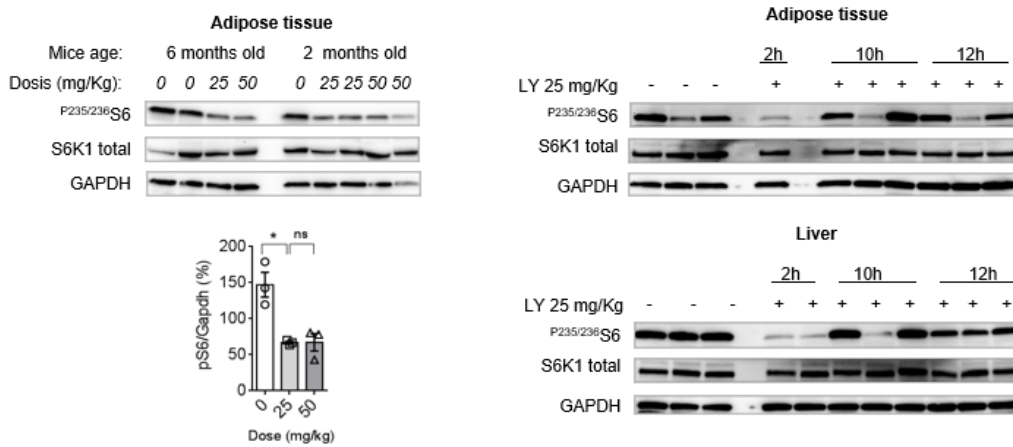
## 1. Resum

L'epidèmia d'obesitat és un problema de salut mundial important en adults i actualment també en infants. És important la inhibició del reclutament de cèl·lules mare mesenquimàtiques derivades d'adipòcits (ASC) en dipòsits de greix, ja que s'ha identificat com una possible via de tractament de l'obesitat. Tanmateix, se sap que els ratolins que no tenen el gen *S6K1* tenen una lesió en l'adipogènesi a causa d'un defecte en la capacitat d'induir el compromís de les ASC al llinatge adipogènic. Estudis recents han demostrat que els mediadors de l'adipogènesi normalment indueixen la proteïna S6K1 a translocar-se al nucli de les ASC, on desencadenen un programa transcripcional adipogènic mediat per una cascada de fosforilació/metilació d'histones específiques. Aquesta cascada bloqueja l'expressió del gen *Wnt* i afavoreix el llinatge adipogènic. Les anàlisis preliminars de mostres de liposucció de pacients mostren una correlació directa entre el grau d'obesitat i l'activació de la cascada de fosforilació/metilació, de manera que la intervenció terapèutica amb inhibidors d'S6K1 ofereix una via potencial per al tractament de l'obesitat. En aquest estudi hem utilitzat un inhibidor específic d'S6K1 anomenat *tosilat LY2584702* (LY). Per als estudis de cultiu cel·lular *in vitro* en cèl·lules humanes hem utilitzat preadipòcits SPF2 i SPF3 o cèl·lules mare de medul·la òssia (hBMSC). Per als estudis *in vivo*, hem utilitzat ratolins C57BL6. A causa de les limitacions d'espai, només es mostren els experiments seleccionats, però tots els resultats s'han enviat per a la seva publicació i els que no es mostren aquí s'indiquen com a «(enviat)».

## 2. Resultats

Vam avaluar en ratolins C57BL6 l'impacte de LY, un inhibidor oral d'S6K1, desenvolupat inicialment per al tractament de tumors sòlids. Aquest fàrmac augmenta la fosforilació d'S6K1 a la T389, a causa de la inhibició competitiva d'ATP en l'acoblament molecular amb el lloc actiu d'S6K1, i bloqueja així la seva activitat quinasa. En el primer experiment, els ratolins es van sotmetre a dosis de 25 i 50 mg/kg de LY. L'anàlisi per *western blot* del teixit adipós va mostrar que els ratolins van aconseguir el mateix grau d'inhibició de la fosforilació d'S6 amb concentracions de 25 i 50 mg/kg, de manera que la dosi més baixa va ser suficient (figura 1, esquerra). El teixit adipós i el fetge dels ratolins que van rebre 25 mg/kg, sacrificats en diferents

moments després de rebre la dosi, van ser extrets i analitzats per *western blot*, i així es va revelar que la resposta va durar  $\leq 12$ h (figura 1, dreta).



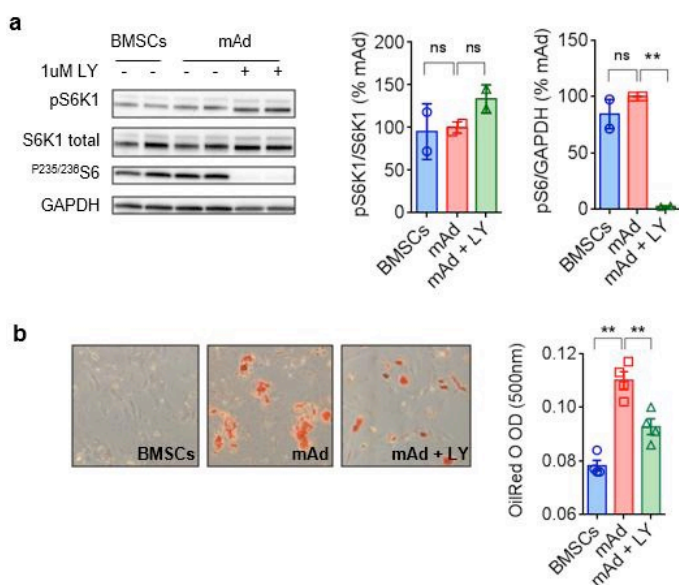
**Figura 1.** Avaluació de l'impacte de dues dosis (25 i 50 mg/kg) de LY administrat per via oral en mostres de greix subcutani de ratolins mascles de 3 i 6 mesos d'edat. La (p)S6 fosforilada i l'S6K1 total, normalitzada per GAPDH, no mostren diferències significatives. L'avaluació del temps d'inhibició d'S6K1 amb el fàrmac en el teixit adipós i el fetge va indicar efectes de durada  $\leq 12$ h.

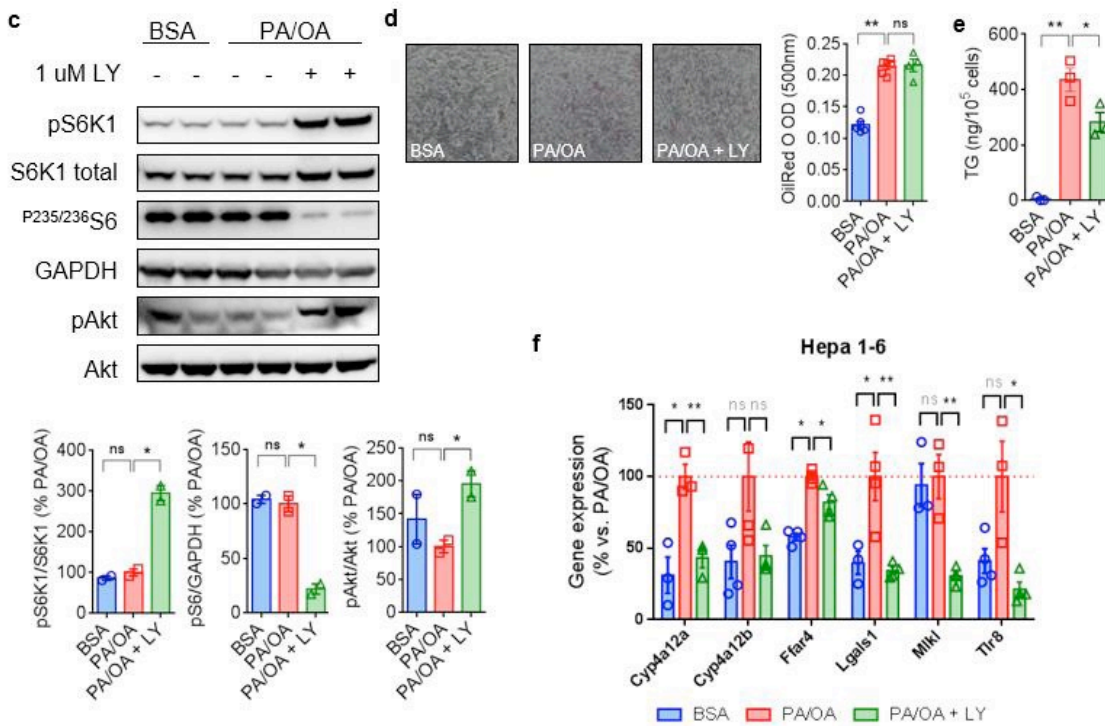
A continuació, vam provar cèl·lules humanes en cultiu: hASC i preadipòcits SPF2 i SPF3 per testar l'efecte de LY. Vam trobar que una concentració d'1 i 5  $\mu$ M era suficient per inhibir la fosforilació d'S6. No obstant això, tot i la inhibició d'S6K1, aquests preadipòcits es van diferenciar en adipòcits en presència d'1  $\mu$ M de LY, segons es va mesurar mitjançant tinció *red oil*. Vam concloure que aquests preadipòcits ja estaven compromesos al llarg del llinatge adipogènic, de manera que es requerien cèl·lules en una etapa anterior de diferenciació, com són les cèl·lules mare mesenquimàtiques de la medul·la òssia, per induir-les a comprometre's al llinatge adipogènic.

Per analitzar la inhibició de la diferenciació, es van induir les cèl·lules mare humanes de la medul·la òssia (hBMSC) a diferenciar-se en adipòcits sota el tractament amb LY a 1  $\mu$ M. L'anàlisi per *western blot* va revelar l'estat de fosforilació d'S6K1 i S6, i en va confirmar la inhibició (figura 2a). La disminució de l'acumulació de lípid, mesurat mitjançant tinció *red oil*, va mostrar un efecte antiadipogènic de LY (figura 2b). Paral·lelament, es van induir les cèl·lules de la línia cel·lular d'hepatoma de ratolí Hepa1-6 a acumular lípid utilitzant una combinació de palmitat i oleat (PA/OA), la qual imita l'hepatoesteatosi induïda per dieta alta en greixos, un efecte secundari comú de l'obesitat *in vivo*, i es van tractar amb LY (PA/OA+LY) durant 24 hores. Es van

quantificar la fosforilació d'S6, Akt, la quantitat de lípid (tinció *red oil*), els triacilglicèrids intracel·lulars (TG) i l'expressió de gens diana preseleccionats. Tal com s'esperava, LY va disminuir pS6 en aquestes cèl·lules, mentre que pS6K1 no es va veure afectat. Això és perquè LY és un inhibidor alostèric específic d'S6K1, sense efectes sobre el seu lloc d'unió a ATP (figura 2c), de manera que l'activació *upstream* mesurada pel seu estat de fosforilació està activada, però la seva capacitat per fosforilar substrats, inclòs S6, està bloquejada. En alguns casos, sembla que S6K1 s'hiperfosforila. Encara que les mesures macroscòpiques de la tinció de lípids no van confirmar variacions significatives, a simple vista va semblar que hi havia una disminució (figura 2d), consistent amb la quantificació de TG que va revelar una reducció significativa de lípids en les cèl·lules tractades (figura 2e). Cal destacar que, d'acord amb la inhibició d'S6K1, els hepatòcits tractats amb PA/OA+LY van mostrar quantitats augmentades de pAkt (figura 2c) i patrons d'expressió gènica coincidents amb els resultats *in vivo*, és a dir, disminució de *Cyp4a12a*, *Ffar4*, *Lgals1*, *Mi1k* i *Tlr8* (figura 2f).

A continuació vam avaluar el fàrmac en el fenotip de ratolí obès, comparant ratolins de control alimentats amb menjar normal (NC) i ratolins alimentats amb HFD i tractats amb vehicle (veh) o LY en un experiment d'una setmana de durada (NC+veh, NC+LY, HFD+veh, HFD+LY), que va confirmar que el tractament era ben tolerat en tots els grups d'estudi.

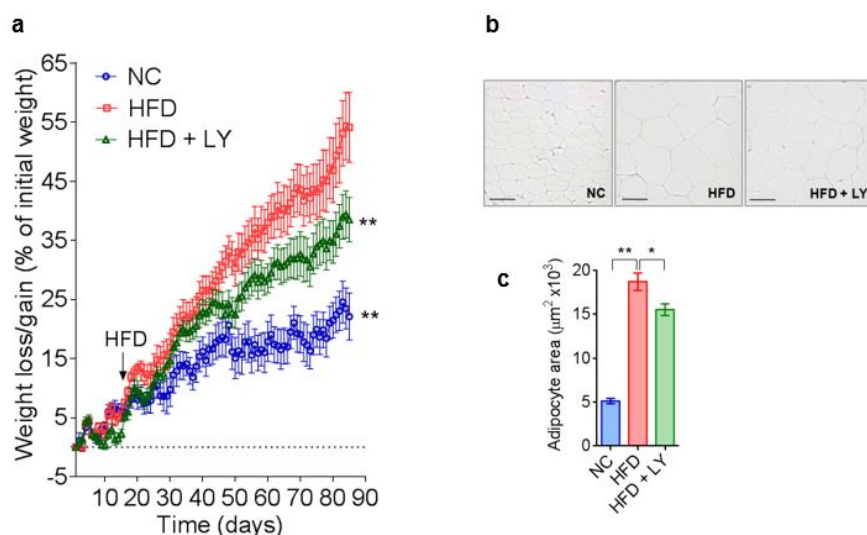




**Figura 2.** (a) Nivells (p)S6K1, S6K1, PS6 i GAPDH (control de càrrega) i quantificació relativa, prenent els adipòcits «madurs» (MAD) com a control. *BMSC* significa 'cèl·lules mare de medul·la òssia indiferenciades'. (b) Imatges representatives de tinció *red oil* i quantificació del contingut de lípids de les cèl·lules mare de la medul·la òssia quan es troben en condicions no diferenciades (hBMSC), o diferenciades amb (MAD + LY) o sense (MAD) 1  $\mu$ M LY584703 afegit als medis de diferenciació ( $n = 4$ ). (c) En cèl·lules d'hepatoma de ratolí Hepa1-6 cultivades *in vitro* i estimulades amb palmitat/oleat (PA/OA), induint esteatosi, 1  $\mu$ M de LY584703 també compromet la funció de p70S6K, però no redueix les quantitats de lípids, com es mostra per (d) tinció *red oil*. Hi va haver canvis significatius pel que fa al (e) contingut de triglicèrids i (f) l'expressió gènica de gens diana, cosa que reflecteix l'impacte del fàrmac en el fetge de ratolins HFD+LY. Les dades es presenten com a mitjana  $\pm$  SEM. La significació estadística es va determinar mitjançant la prova *t* de Student. \* Valor  $p < 0,05$ . \*\* Valor  $p < 0,01$ . *ns* com a *no significatiu*.

Seguidament vam avaluar l'efecte farmacològic d'inhibir S6K1 en ratolins adults sotmesos a HFD. Per tal de caracteritzar la capacitat de l'inhibidor d'S6K1 LY per contrarestar l'HFD, es van sotmetre ratolins mascles C57BL6N de vuit mesos d'edat a una HFD del 60% i es van tractar per via oral amb LY (HFD+LY) durant deu setmanes. Paral·lelament, es van utilitzar com a grups de referència ratolins sotmesos a HFD o a menjar normal (NC). Els ratolins alimentats amb HFD que van rebre LY (HFD+LY) van guanyar significativament menys pes corporal i van acumular quantitats menors de teixit adipós subcutani que els que van rebre HFD (figura 3a). Per avaluar les conseqüències metabòliques d'aquest tractament, vam mesurar les concentracions de glucosa, triglicèrids i colesterol circulants en dejú. Es van realitzar proves de tolerància a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratolins NC, HFD i HFD+LY. En particular el grup

HFD+LY va mostrar una regulació significativa a la baixa dels triglicèrids circulants (TG) respecte als ratolins HFD. No obstant això, el colesterol circulant, la glucosa en dejú i l'IPGTT no van revelar diferències importants entre els animals obesos sotmesos a HFD i els tractats amb el fàrmac (enviat). Després de sacrificar els ratolins, se'n van extreure els teixits i es va avaluar l'estat de fosforilació d'S6, S6K1 i Akt mitjançant *western blot*, i es va confirmar la inhibició adequada d'S6K1 en tots els teixits analitzats (adipós i fetge) (enviat). Paral·lelament, es va realitzar tinció amb hematoxilina i eosina (H&E) en mostres de teixit adipós, i l'anàlisi morfològica va revelar un reordenament de la mida dels adipòcits en els ratolins HFD+LY (figura 3b), ja que mostraven una àrea mitjana dels adipòcits més petita i menys hipertròfia que el grup HFD (figura 3c). També en mostres de fetge, la tinció H&E va revelar canvis aparents en el contingut de lípids, com ho demostren les quantitats de triglicèrids (TG) i colesterol totals, les dues significativament reduïdes en HFD+LY en comparació amb els nivells trobats en ratolins alimentats amb NC (enviat).



**Figura 3.** (a) Corba de guany de pes de ratolins amb menjar normal (NC), dieta alta en greixos (HFD) i HFD més sondatge oral (35 mg/kg/12 h) de LY (HFD+LY). (b) Imatges representatives i (c) quantificació de l'àrea dels adipòcits del teixit adipós subcutani (SAT) de ratolins NC, HFD i HFD+LY. Significació estadística mitjançant prova *t* de Student. \* Valor  $p < 0,05$ . \*\* Valor  $p < 0,01$ .

A partir d'aquestes mostres es va dur a terme un *microarray* i una anàlisi d'enriquiment de conjunts de gens (GSEA) en teixit adipós subcutani (SAT), visceral (VAT) i fetge de ratolins alimentats amb HFD i tractats amb el fàrmac (enviat). Es va obtenir una llista de gens expressats diferencialment en SAT i fetge de ratolins obesos tractats amb el fàrmac, en comparació amb controls obesos. Utilitzant el GSEA i els

termes de Gene Ontology (GO) en patrons d'expressió de teixit adipós, vam identificar rutes biològiques que estaven atenuades. Entre elles, l'adipogènesi, la transició epitelial-mesenquimàtica i la senyalització d'mTORC1 van ser les més afectades. La validació dels resultats del *microarray* mitjançant PCR a temps real va revelar que els gens relacionats amb la biosíntesi de lípids (*CYP2I1*, *FASN*, *Elovl6*) estaven inhibits. A més, els gens relacionats amb l'absorció d'àcids grassos (*CD36*, *Fabp5*), la transició epitelial-mesenquimàtica (*Lgals1*), la inflamació (*Gsto1*, *S100a8*, *Tlr8*) i el control de la biosíntesi d'àcids grassos (*Srebf1*, *Insig1*) també es van expressar menys al SAT i VAT de ratolins HFD+LY, en comparació amb ratolins alimentats amb HFD, fet que reflecteix parcialment els patrons d'expressió observats en ratolins alimentats amb NC (enviat). Aquests resultats confirmen el potencial de reduir el compromís al llinatge adipogènic i la hipertròfia dels adipòcits en ratolins tractats amb LY, de manera que s'inhibeix l'aparició d'obesitat (enviat). Contràriament, els patrons d'expressió gènica en mostres de fetge van mostrar variacions distintives que incloïen efectes significatius relacionats amb l'homeòstasi del colesterol i la senyalització d'mTORC1 (augment), i la regulació a la baixa de les transcripcions associades amb la transició epitelial-mesenquimàtica, angiogènesi, i la resposta inflamatòria de ratolins obesos en tractament, entre d'altres. Cal destacar que l'expressió de gens relacionats amb la biosíntesi d'àcids grassos (*Cyp4a12a*, *Cyp4a12b*, *CYP2I1*, *Pparg*) i la captació d'àcids grassos (*Ffar4*, *CD36*) en el fetge es van veure compromesos sota el tractament amb LY. A més, la síntesi d'ARNm relacionats amb la transició epitelial-mesenquimàtica (*Lgals1*) i els de resposta inflamatòria (*Mkl1*, *Tlr8*) també van ser regulats a la baixa, cosa que reflecteix el que trobem en les mostres de teixit adipós. Una aparent sobreexpressió de gens relacionats amb la senyalització de mTORC1 en ratolins HFD+LY va ser consistent en el teixit hepàtic i oposada al teixit adipós de les mateixes mostres, fet que suggereix l'activació de diferents cascades de senyalització en el greix i el fetge (enviat).

A continuació, es va fer una anàlisi lipidòmica en mostres de fetge d'aquests ratolins mitjançant cromatografia líquida i espectrometria de masses per avaluar en profunditat els canvis en el contingut de TG i altres espècies de lípids relacionats amb la patologia de fetge gras en ratolins alimentats amb HFD. Sorprenentment, moltes espècies de TG que van augmentar en HFD en comparació amb els ratolins NC (per exemple, TG 49: 1-3; 50: 1-4; 51: 1-2; 53: 2; 54: 2) es van reduir significativament a HFD+LY. De fet, la reducció significativa de la quantitat global de TG en ratolins HFD+LY va ser consistent amb els resultats en mostres de sèrum i fetge, i també en cèl·lules Hepa1-6

(enviat). En ratolins HFD+LY, diferents fosfolípids, incloent-hi fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) i fosfatidilcolina-èters (PC O), van mostrar variacions significatives que van ser oposades a les reportades en HFD en comparació amb ratolins NC (enviat). Específicament, PC O sembla prevaler en ratolins alimentats amb NC, ja que quatre espècies van ser detectables en aquests extractes de fetge (PC O-34: 1; 36: 4; 36: 5 i 38: 5), i només una espècie (PC O-38: 5) es va trobar en ratolins alimentats amb HFD. Els nostres resultats en ratolins HFD+LY van destacar la presència de dues espècies de PC O-36: 5 i 38: 5. Per tant, la relació PC/PE, que s'ha relacionat amb la progressió de l'esteatosi a l'esteatohepatitis, disminueix significativament en ratolins alimentats amb HFD en comparació amb els controls NC, i es restaura parcialment per LY en ratolins HFD+LY (enviat).

Aquests resultats indiquen que LY protegeix contra l'obesitat induïda per la dieta i condueix a una disminució de la massa grassa i del dipòsit de greix al fetge, de manera que redueix la dislipidèmia en ratolins obesos. En general, aquests descobriments pioners defineixen el potencial d'aquest compost com a agent terapèutic eficaç per alleujar la càrrega de dislipidèmia i fetge gras en pacients obesos.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

L'obesitat és una epidèmia mundial que fins fa poc es limitava sobretot als països industrialitzats del món occidental, però que ara també està en ascens en els centres urbans de les nacions subdesenvolupades. El factor clau per promoure l'estat d'obesitat és la sobrecàrrega de nutrients combinada amb l'impuls innat d'adquirir i emmagatzemar greix en els dipòsits adiposos. La recent identificació de cèl·lules progenitores d'adipòcits en el teixit adipós ha permès analitzar la composició molecular d'aquestes cèl·lules progenitores i estudiar el seu paper en el desenvolupament dels adipòcits. El paper de la via mTORC1/S6K1 ha estat àmpliament estudiat i s'ha posat de manifest la seva implicació en la regulació de nombroses vies metabòliques. És important el seu paper en la regulació dels processos relacionats amb l'adipogènesi i la regulació dels dipòsits de greix. En estudis previs del grup, havíem demostrat que la pèrdua d'S6K1 conduïa a una forta lesió en la capacitat de reclutament de les cèl·lules mare del llinatge adipogènic als dipòsits de greix, i els ratolins que no tenen aquesta proteïna estan protegits contra l'obesitat induïda per la dieta.



Fins ara, aquest és el primer estudi que utilitza un compost farmacològic dirigit contra S6K1 (tosilat LY3584703) com a diana terapèutica per revertir el fenotip obès, amb un primer estudi per veure'n la viabilitat en éssers vius i acompanyant aquests resultats amb estudis moleculars a fi d'avaluar a través de quines vies està tenint efecte el fàrmac. Podem confirmar l'efectivitat del compost per reduir la formació de massa grassa consumint una dieta alta en greixos (60 %) i també per reduir l'acumulació de greix al fetge mitjançant la modificació de la composició d'espècies lipídiques; a més, això s'acompanya d'una reducció de la dislipidèmia que desenvolupen els subjectes sota aquestes condicions. La reducció de l'adipogènesi és consistent amb la troballa que, *in vitro*, les cèl·lules mare mesenquimàtiques derivades de la medul·la òssia humana que es diferencien en adipòcits madurs sota el tractament amb LY acumulen menys quantitat de lípids en comparació amb els adipòcits madurs control. Aquests resultats proporcionen evidències clares que els inhibidors específics d'S6K1 podrien utilitzar-se per al maneig i cura de l'obesitat i les patologies associades, la qual cosa ofereix resultats prometedors per a l'aplicabilitat a la clínica. Queda pendent veure quins estudis futurs s'han de desenvolupar, ja sigui amb altres fàrmacs inhibidors o estudis d'implementació en humans, com a possible teràpia que ajudi a reduir i controlar el desenvolupament d'aquesta malaltia i totes les complicacions que se'n deriven.

#### 4. Bibliografia científic generada

Fruit de la realització d'aquest projecte, que ha sigut possible gràcies al finançament de la Fundació La Marató de TV3, s'ha obtingut una gran quantitat de resultats i coneixements, els quals s'han recollit al manuscrit següent, que actualment es troba en procés de revisió:

Lluch A, Veiga SR, Latorre J, Moreno-Navarrete JM, Bonifaci N, Rodríguez-Barrueco R, Llobet-Navas D, Liebisch G, Zhou Y, Oikkonen VM, Thomas G, Fernández-Real JM,\* Kozma SC,\* Ortega FJ.\*

*A compound directed against S6K1 hampers fat mass expansion and mitigates diet-induced hepatosteatosis.*