



Estudi de l'expressió i funció del gen SIRT3 en el teixit adipós marró

Albert Giralt Coll

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Estudi de l'expressió i funció del gen SIRT3
en el teixit adipós marró**

Albert Giralt Coll, 2011

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

Programa de doctorat de Biomedicina

Bienni 2005-2007

**Estudi de l'expressió i funció del gen SIRT3
en el teixit adipós marró**

Memòria presentada per

Albert Giralt Coll

Per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau del director

Dr. Francesc Villarroya i Gombau

Als meus pares i a l'avi, el *number one*

Sóc conscient que aquestes dues pàgines seran les úniques que llegirà la majoria de la gent així que tot i no disposar de gaire temps i no voler estendre'm gaire, intentaré que quedin el millor possible i que posin de manifest la gratitud que sento per molta gent. Tot i així, he volgut cenyir-me expressament a les persones que han participat directament en el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral que teniu entre les mans. No comparteixo el costum de convertir aquestes paraules en una mena de "Tomb per la vida" i no crec que aquest sigui el lloc per posar blanc sobre negre, l'agraïment que sento per la gent del meu entorn. Em sento molt afortunat en aquest sentit i tinc tant que agrair a certes persones, que si començo no acabo, i tot i que potser és el moment, no crec que sigui pas el lloc.

Entrant en matèria, en primer lloc, com no podria ser d'altra manera, moltes gràcies al Cesc i a la Marta per la confiança dipositada en mi en un primer moment i per l'ajuda, els bons consells, els ànims i fins i tot la comprensió que heu mostrat durant tots aquests anys. Seria tant obvi dir que sense vosaltres aquesta tesi no hauria estat possible, que no ho faré pas. Gràcies de veritat.

Gràcies també a la Roser, per introduir-me al lab i sobretot per tota la feina que hem fet amb els ratolins. També és clar, gràcies a la Tresa i l'Octavi .

Els companys, que en definitiva són els que t'ajuden dia a dia i amb qui es comparteixen penes i alegries (laborals i extralaborals). Perill, tòpic: He de dir que em sento especialment afortunat d'haver caigut en un laboratori on, a més de companys de feina hi he fet bons amics. *Eso es así*. Volia estalviar-me de fer el típic repàs exhaustiu en forma de llistat de totes les persones amb qui he compartit moments al lab i que "ja no hi són entre nosaltres" seguit dels típics "per ajudar-me en les primeres real times..." perquè en la majoria dels casos reduir l'ajuda oferta o fins i tot l'amistat a sentències d'aquest tipus no fa més que restar valor a la relació que has tingut amb certa gent. Tot i així, no podia deixar d'esmentar per a que constin en acta, la Daniella, per la feina amb els nadons, i sobretot per tot el temps que vam passar junts, els Jordis (Jarmen y Guallarcín) i el Ramon. I és clar, la Txell, amb qui hem acabat compartint molt més que un passat en comú al lab.

També voldria agrair a tota la gent de fora del TAM que m'ha ajudat en els darrers anys, com les noies d'RST, en especial la Lorena, per la paciència de deixar-me muntar cada dos per tres les PCRs al seu laboratori, lliure de SIRT3. També al Toni i la Raquel per tota l'ajuda i a l'Antonio de l'estabulari.

I és clar, voldria agrair especialment un munt de coses a la gent que més m'ha patit els darreres anys i mesos....De nou no vull reduir certes coses a una simple frase però bé, sembla inevitable voler esmentar tothom i no caure-hi. *Los últimos serán los primeros, no?* Doncs gràcies i molts ànims pels que comenceu o esteu ja a mitges. Ibón, como solo hace tres meses que corres por aquí, no hemos llegado a conocernos demasiado, pero te deseo el mejor futuro en el lab y en la ciudad. Gràcies Francesc per tota la feina que vam fer junts al principi de la teva estada aquí, tot i que la gravació de cert vídeo hagi erosionat una mica la nostra

relació en els darrers temps...Espero que pel meu t'hagis comportat una mica almenys. Gràcies Rubén per les *freakades* varies i pels consells informàtics, que no han estat pocs, sobretot darrerament. Et diria *siempre estas ahí*, però tampoc seria cert del tot. Isis, moltes, moltes gràcies pel teu bon humor i la teva paciència infinita, sé que treballar amb nosaltres no sempre és fàcil i gairebé sempre t'ho prens amb filosofia. Gràcies també Anna pel teu bon humor i pels consells de veterana, y claro, a ti Julieta por todo el trabajo con los MEFS y por la infinidad de buenos consejos que me has dado, el mejor ejemplo de que la experiencia es un grado. Juanillo, eres tu el que deies que als amics no cal agrair-los res, no? Doncs això.

And very very special thanks to Aleix. Et diria que gràcies pel *típico acordeón* o per l'apanyo de l'Ipod, que gairebé em costa un ensurt ben seriós a Israel però resumir en anècdotes tots els cops que m'has donat un cop de mà, desvirtuaria totalment "*l'assuntu*". Moltes gràcies de veritat per tot, mai has tingut un *no* per resposta, i vals un munt, et mereixes un *trofeu*.

Josemi, ai Josemi...Podría escribir líneas y líneas sobre ti y siempre me quedaría corto. Gracias por estos *años locos* de risas infinitas, por aportar al léxico colectivo infinidad de expresiones inútiles que, sin duda, hacen que hable aún peor, por los exquisitos fondos de pantalla, y por hacer de cada día en el laboratorio y en can Soterias una experiencia descojonante a la par que surrealista, y en fin, aunque no proceda, gracias por tu amistad. Eres sin duda, el mejor peor compañero de trabajo de la historia.

Y por último, pero con toda la intención del mundo, gracias Ela. Gracias por todo. Has sido pieza fundamental en el funcionamiento del TAM desde que entré pero conmigo además has jugado multitud de roles que van más allá de una simple compañera de trabajo, has sido una gran amiga y casi una hermana mayor. Gracias por todo el cariño, solo tengo palabras de agradecimiento para ti. Siento si a veces no he sabido transmitírtelo lo suficiente en *tiempo real*. Sirvan estas líneas para que te hagas una ligera idea.

Contingut

La present Tesi doctoral s'estructura segons la normativa vigent pel què fa al format de tesi "per compendi de publicacions" establert per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, i per tant consta de la següent estructura:

1. Introducció general

2. Objectius

3. Resum global i discussió general

4. Conclusions

5. Bibliografia

6. Publicacions

1. Role of SIRT3 in the metabolic adaptations to physiological conditions of altered thermogenic activity: a transcriptomic approach

2. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α Controls Transcription of the Sirt3 Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype.

7. Informe del director de Tesi sobre els articles publicats.

8. Índex

9. Apèndix

3. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue.

Introducció general

1. LES SIRTUÏNES

La proteïna SIR2 (*silence information regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae* és el membre fundador d'una família de proteïnes amb activitat desacetilasa NAD⁺ dependent i ADP ribosil transferasa anomenades sirtuïnes.

El gen SIR2 va ser identificat a mitjans dels anys noranta arrel de la seva implicació en el silenciament de la transcripció a llevats. Posteriorment se'l va relacionar amb el silenciament telomèric i amb el DNA recombinant (rDNA) (1;2) així com amb el repartiment de proteïnes carbolinades entre la cèl·lula mare i filla a llevat (3). La seva relació amb l'envelliment però, es va posar de manifest al estudiar el *replicative life span*, és a dir, la mesura del nombre de cops que una cèl·lula mare produeix una cèl·lula filla abans d'entrar en senescència. Es va veure que SIR2 participava en un dels esdeveniments implicats en l'envelliment a llevats, la formació d'un cercle de RNA ribosòmic extracromosomal (ERC) per recombinació homòloga. Sorprenentment, la simple addició d'una còpia extra de SIR2, reduïa la formació de l'ERC al suprimir la recombinació homòloga i produïa l'allargament del *life span* fins un 30 % en aquests organismes. De manera inversa, la deleció de SIR2 produïa un escurçament del *life span* (4).

Posteriorment es va veure que, lluny de ser una proteïna exclusiva de llevat, SIR2 era membre d'una família de proteïnes present en multitud d'organismes que comprenien des dels bacteris fins als mamífers. A més, SIR2 conservava el seu paper en l'envelliment a organismes més complexos com el cuc *Caenorhabditis elegans* o la mosca *Drosophila*. Al augmentar-ne la dosi gènica s'aconseguia allargar el *life span* també en aquests organismes més complexos (5).

El descobriment fa una dècada de l'existència de set homòlegs de SIR2 a mamífers anomenats de SIRT1 a SIRT7 va plantejar una sèrie de qüestions. Estaven implicades les sirtuïnes en l'envelliment també a mamífers? Degut a la dependència del NAD⁺, jugaven un paper com a sensors de l'estat metabòlic de l'organisme? Estaven implicades en la mediació dels efectes de la restricció calòrica sobre l'augment del *life span* en mamífers? Eren redundants les seves funcions? Quins eren els seus substrats?

Aviat es va veure que cada sirtuïna podia jugar un paper específic donat que, malgrat presentar una elevada homologia en el seu domini central diferien substancialment entre elles en els seus dominis carboxi i amino terminal, presentaven diferents activitats enzimàtiques (no totes tenen activitat desacetilasa) i mostraven diferent localització cel·lular i distribució tissular.

En la darrera dècada s'ha avançat molt en el coneixement de la biologia de les sirtuïnes així com s'ha aprofundit en l'aclariment de la seva rellevància fisiològica.

Restricció calòrica

Diversos estudis han demostrat que una dieta reduïda en calories, l'anomenada restricció calòrica, és capaç d'allargar la vida fins a un 50% a una gran varietat d'organismes que van des dels llevats als ratolins passant per cucs i algunes mosques. Entre altres afectes més o menys ben descrits, la restricció calòrica millora en aquests organismes l'homeòstasi de la glucosa. En aquestes condicions s'ha demostrat una menor secreció d'insulina i una major sensibilitat a aquesta en mamífers superiors com ratolins i humans. A més, es creu que la disminució de la senyalització per insulina té una implicació en l'envelliment segons els estudis realitzats en diversos organismes model (6).

SIR2 és capaç de vehicular l'efecte de la restricció calòrica sobre l'augment del *life span* a llevats. Una restricció moderada (0,5 % glucosa) augmenta l'activitat de SIR2 i suprimeix la recombinació del rDNA. Aquest efecte depèn de SIR2 però, depèn de la severitat de la restricció i del rerefons genètic. Per exemple, s'ha vist que una restricció calòrica més severa (0,05% de glucosa) és capaç d'allargar el *life span* a llevats de manera independent de SIR2 (7).

Degut a que l'expressió de SIR2 no augmenta durant la restricció calòrica, s'han proposat diverses explicacions possibles a l'augment de la seva activitat en aquestes condicions. La més acceptada, proposa que en condicions de restricció calòrica es produeixen canvis en las concentracions dels principals reguladors de l'activitat de SIR2. Per una banda es produeix una disminució de NADH, que és un inhibidor de SIR2. L'altra, és l'augment de l'expressió de l'enzim PCN1, que es tradueix en una disminució de NAM i un augment del NAD⁺, inhibidors i activadors de SIR2 respectivament (8).

Les evidències de la implicació de SIR2 en la regulació del *life span* a organismes inferiors, van fer augmentar d'interès en les sirtuïnes i en si aquestes jugaven un paper en els mecanismes que es desenvolupen durant la restricció calòrica en mamífers.

Els primers estudis, indicaven que SIRT1, la sirtuïna més homologa a SIR2 augmentava la seva expressió en condicions de restricció calòrica en diversos teixits com el cervell, el ronyó, el fetge, el teixit adipós blanc i el múscul esquelètic (9). Posteriorment s'han realitzat multitud d'estudis amb models de ratolins transgènics o *knockout* per SIRT1 (SIRT1 -/-), que semblen confirmar que aquesta sirtuïna media multitud dels efectes beneficiosos de la restricció calòrica sobre l'organisme (10). S'ha vist que SIRT1 és necessària per induir almenys una de les respostes que es donen en condicions de restricció calòrica; l'augment de l'activitat física, la qual es creu que es una resposta adaptativa davant la manca moderada d'aliment (11). En general, els models de ratolins

transgènics per SIRT1 demostren una millor tolerància a la glucosa, i nivells reduïts de colesterol, adipoquines diabetogèniques i d'insulina que els animals *wild-type* i són més resistents a l'esteatosi hepàtica. Aquests efectes són similars als obtinguts al tractar ratolins amb activadors de SIRT1 com el resveratrol o SRT1720. Per contra els ratolins SIRT1 *-/-*, presenten una longevitat reduïda i la restricció calòrica no n'augmenta el *life span* (12)

Malgrat això, cal remarcar que els nombrosos estudis realitzats en animals modificats genèticament, semblen indicar que tot i que SIRT1 està relacionada amb diverses malalties associades amb l'envelliment i amb els efectes positius de la restricció calòrica, no és capaç d'augmentar per si sola el *lifespan* a mamífers (12).

Com veurem més endavant, la restricció calòrica té un efecte sobre l'expressió de SIRT3, la qual es veu augmentada en aquestes condicions en teixits com el múscul, el fetge o el teixit adipós marró.

Mecanisme d'acció i regulació de l'activitat de les sirtuïnes

La majoria de sirtuïnes presenten activitat histona desacetilasa NAD⁺ dependent. No s'ha pogut demostrar però activitat desacetilasa ni per a SIRT4 ni per a SIRT7, tot i que pot ser degut a una elevada especificitat de substrat i que aquests encara no hagin estat identificats. Així mateix, SIRT4, SIRT1 i SIRT6 presenten activitat mono ADP-ribosil transferasa NAD⁺ dependent, una activitat enzimàtica que ja s'havia descrit en cobB, l'homòleg de SIR2 a bacteris (5).

El mecanisme de reacció de desacetilació de lisines dut a terme per les sirtuïnes, és nou i exclusiu fins al moment d'aquesta família de proteïnes, motiu per el qual van ser definides com a Histona desacetilases de tipus III (amb activitat dependent de NAD⁺). Les sirtuïnes realitzen la desacetilació en residus de lisina modificats en una reacció enzimàtica única que requereix NAD⁺ en cada reacció, a diferència de la hidròlisi portada a cap per la resta d'histona desacetilases conegudes. El mecanisme de reacció comporta la transferència del grup acil d'una amida a un ester, que és desfavorable energèticament, però l'hidròlisi del NAD⁺ afavoreix globalment la reacció. Es forma Nicotinamida (NAM) i un pèptid intermediari ADP-Ribosilat que és transformat ràpidament a O-acetyl-ADP ribosa (OAADPR) i el substrat desacetilat, que és alliberat.

La nicotinamida (NAM) alliberada és un potent inhibidor de les sirtuïnes. Aquesta inhibició es dona de manera no competitiva amb el NAD⁺ ja que aquesta entra en una butxaca-C (*c-pocket*) altament conservada, adjacent al lloc d'unió al NAD⁺ i reacciona amb el pèptid intermediari de la reacció generant així NAD⁺.

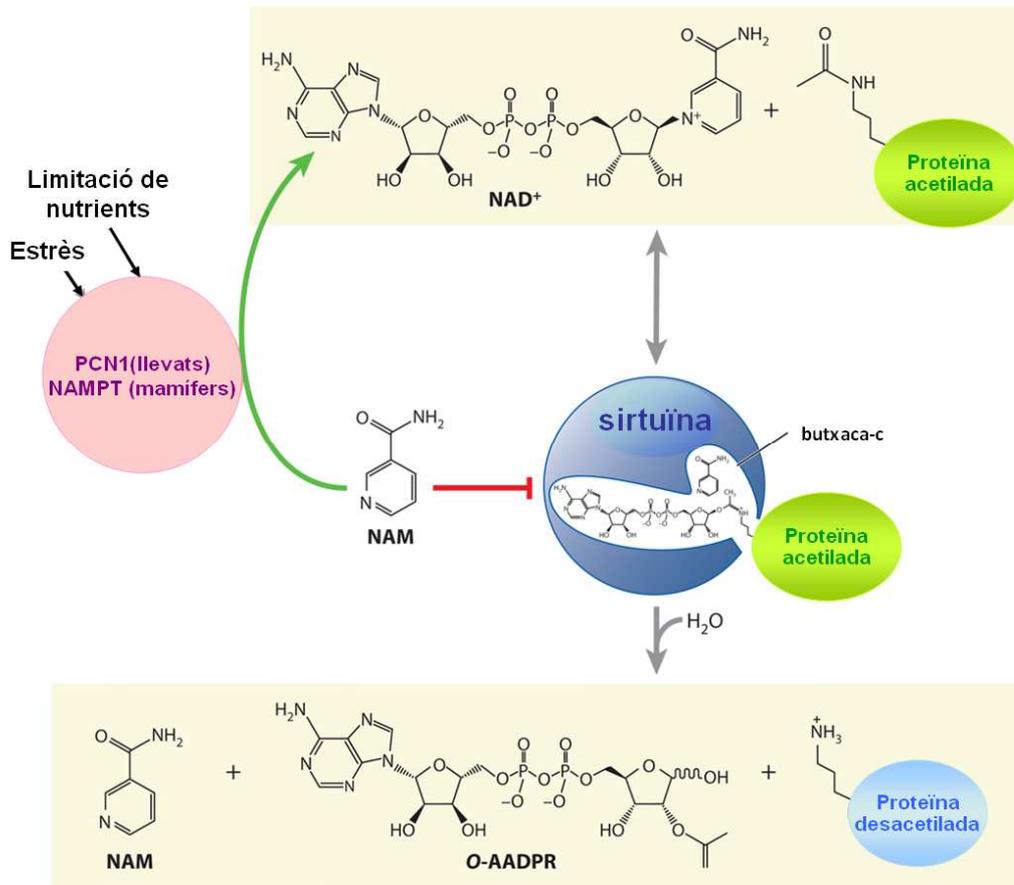


Figura 1. Mecanisme de reacció de la desacetilació mediada per les sirtuïnes. Les sirtuïnes catalitzen una reacció de desacetilació única que consisteix en dos passos i que consumeix nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD⁺) i allibera nicotinamida (NAM), O-acetil-ADP-ribose (OAAADPR) i el substrat desacetilat. L'activació de les sirtuïnes pot venir facilitada per l'eliminació de la NAM i la seva conversió a NAD⁺ pels enzims PCN1 (a llevats i metazous simples) o NAMPT (mamífers), dos gens regulats per l'estrès i la limitació de nutrients

D'altra banda, l'OAAADPR produït per les sirtuïnes és un metabòlit descrit recentment i per tant, poc estudiat. Es creu que podria realitzar diverses funcions actuant com a molècula de senyalització. Microinjeccions d' OAAADPR produeixen un retard en la maduració dels oòcits. S'ha vist que a llevats promou la unió de SIR2 a la cromatina promovent el silenciament gènic. A mamífers s'ha vist que s'uneix i activa el canal de membrana de cations *transient receptor potential melastin-related 2* (Trpm2). A més, s'han descrit diversos enzims capaços de degradar l'OAAADPR com per exemple l'enzim ARH3 a mamífers, que hidrolitza l' OAAADPR a ADPr i acetat (13). Curiosament com veurem més endavant SIRT3 juga un paper important en el metabolisme de l'acetat.

Així doncs, els subproductes generats en la reacció catalitzada per les sirtuïnes poden tenir un efecte sobre el metabolisme cel·lular actuant tant sobre les pròpies sirtuïnes com a altres nivells.

Tot i haver estat descrites com a histona desacetilases, com veurem més endavant, s'han descrit multitud de substrats no histona per a les diverses sirtuïnes (5).

Metabolisme del NAD⁺

Degut a l'alta dependència del NAD⁺ per a l'activitat de les sirtuïnes, aquestes probablement es comporten com a sensors de les fluctuacions de les concentracions d'aquest metabòlit, i per tant, de l'estat metabòlic de la cèl·lula. Estudis recents demostren que el *pool* de NAD⁺ a la cèl·lula augmenta en condicions de dejuni perllongat i de restricció calòrica. Aquesta acumulació de NAD⁺ podria donar lloc a l'activació de les sirtuïnes en aquestes condicions (14).

Degut a la importància del NAD⁺ en el metabolisme de les sirtuïnes i altres reaccions enzimàtiques, les rutes biosintètiques que el produeixen han estat objecte d'estudi en els darrers anys. A llevats, cucs i mosques, la NAM és reconvertida a NAD⁺ a través de quatre reaccions, la primera de les quals és catalitzada per l'enzim PCN1, el qual es sobreexpressa en condicions de restricció calòrica i en altres situacions d'estrès com la calor o la restricció de nitrogen. Així, través de la disminució de NAM i l'augment del NAD⁺ i el consegüent augment en l'activitat de SIR2, PCN1 promou la supervivència cel·lular en resposta a l'estrès.

Els mamífers per la seva banda, reciclen el NAD⁺ a partir del NAM en dos passos, el primers dels quals és catalitzat per una NAM ribosil transferasa anomenada Nampt (també Visfatina o PBEF) formant un mononucleòtid de nicotinamida (NMN) que és finalment convertit a NAD⁺ per les diverses isoformes de l'enzim Nmmnat (Nmmnat 1-3). De manera anàloga al paper de PCN1 a llevat, s'ha vist que tant el Nampt com el Nmmnat, regulen l'activitat de SIRT1, l'enzim més homòleg a SIR2 a mamífers. Igualment de forma anàloga a PCN1, el Nampt es sobreexpressa en resposta a l'estrès cel·lular així com en condicions de restricció de nutrients.

Gairebé el 70% del total del NAD⁺ cel·lular es pot trobar dins el mitocondri, on pot ser utilitzat com a cofactor en multitud de reaccions redox així com probablement en les reaccions catalitzades per les sirtuïnes mitocondrials (SIRT3-5) que presenten activitat NAD-dependent. Tot i que s'han descrit dos transportadors mitocondrials de NAD⁺ (l'Ndt1p i l'Ndt2p) que poden transportar-lo des del citosol fins al mitocondri (15), s'ha vist que existeix també una ruta biosintètica de NAD⁺ en aquest orgànul. Tant l'enzim Nampt, com una isoforma del Nmmnat (Nmmnat 3) es troben presents al mitocondri. S'ha descrit que el manteniment dels pools intramitocondrials de NAD⁺ per part del Nampt i

el Nmnat, és crític per la supervivència cel·lular en condicions d'estrès genotòxic. Tot i que no s'ha esclarit el mecanisme concret, s'ha vist que les sirtuïnes mitocondrials SIRT3 i SIRT4, són imprescindibles per la supervivència cel·lular en aquestes condicions (8).

Localització subcel·lular de les sirtuïnes

A mamífers, les diferents sirtuïnes es troben distribuïdes per diversos compartiments cel·lulars.

SIRT1, SIRT6 i SIRT7 es troben predominantment al nucli. Com veurem més endavant, SIRT1 actua com a repressor de la transcripció a través de la desacetilació d'histones, a més de regular la transcripció al modificar els nivells d'acetilació de diversos factors de transcripció com MyoD, FOXO, p53 i NF- κ B. SIRT6 actua principalment com a desacetilasa de la histona H3K9 (16) i regula la cromatina telomèrica (17) mentre que SIRT7 es localitza al nuclèol i actua com a regulador positiu de la RNA polimerasa I (18). SIRT2, es troba al citoplasma, on s'associa als microtúbuls i desacetila l' α -tubulina (19). Mentre que les sirtuïnes 3, 4 i 5 resideixen al mitocondri (20).

En alguns casos, la localització de les sirtuïnes dins la cèl·lula pot variar en funció del tipus cel·lular, la interacció amb altres proteïnes o l'estat metabòlic. La localització subcel·lular diferencial de les sirtuïnes, de la mateixa manera que la d'altres proteïnes descrites prèviament depèn de senyals de localització, ja siguin d'import (SIRT1, SIRT6, SIRT7) o d'export del nucli (SIRT1) o d'import a mitocondri (SIRT3-5).

Regulació de l'expressió i l'activitat de les sirtuïnes

Ja fa més de deu anys que es va descriure SIRT1 a mamífers a partir de la seva elevada homologia de seqüència amb SIR2. Un dècada després, és de llarg la sirtuïna més ben estudiada. Se n'han descrit multitud de funcions i interaccions amb altres proteïnes, algunes de les quals s'esmentaran més endavant i que posen de manifest la seva funció en el metabolisme energètic, la supervivència cel·lular i els processos inflamatoris (7).

L'expressió de SIRT1 es veu alterada en diverses situacions fisiològiques com els ritmes circadians, l'estrès cel·lular o la restricció calòrica. L'expressió de SIRT1 està sotmesa al control de nombrosos factors de transcripció i microRNAs, entre els quals es troben p53, FOXO3, HIC1:CtBP, E2F1, c-MYC, miR-34 i miR-199.

Es desconeixen en gran mesura els factors que regulen l'expressió de les altres sirtuïnes a mamífer, la qual cosa, en el cas de SIRT3, es motiu d'estudi en la present tesi doctoral.

Igualment s'ha avançat molt en el coneixement de molècules activadores i de proteïnes moduladores de l'activitat de SIRT1, i poc es coneix sobre la resta de les sirtuïnes de mamífer.

L'activador més estudiat de SIRT1 és el resveratrol, però en els darrers anys diversos estudis posen de manifest que no es tracta necessàriament d'un activador directe de SIRT1. L'activació de SIRT1 observada per part del resveratrol *in vivo* pot venir donada també perquè aquest activa l'AMPK, que al seu torn augmenta els nivells de NAD⁺ estimulant d'aquesta manera indirectament SIRT1. D'altra banda en la darrera dècada s'han sintetitzat centenars de compostos activadors de SIRT1, alguns dels quals s'ha postulat que són capaços d'augmentar el *life span* en multitud d'organismes, resultats però que han estat discutits per altres laboratoris (12) . Entre els compostos inhibidors de SIRT1 trobem la splitomicina, el sirtinol o algun dels seus anàlegs, capaços d'inhibir també SIR2.

Entre les proteïnes moduladores de l'activitat de SIRT1 trobem l'activador AROS, la necdina i DBC1, que s'uneixen a l'extrem N-terminal de la proteïna. A més, SIRT1 pot ser regulada post-transcripcionalment per mecanismes de fosforilació i desfosforilació (7).

Sirtuïnes i metabolisme

Des del seu descobriment, s'han dedicat molts esforços en l'estudi del paper de les sirtuïnes com a possibles reguladores de diverses vies metabòliques. El nombre d'evidències sobre la implicació d'aquesta família de proteïnes en la regulació de l'homeòstasi energètica no ha fet més que créixer en els darrers anys. De nou però, la majoria dels estudis s'han centrat en el paper central de SIRT1.

Un gran nombre de dades indiquen que SIRT1 actua com a sensor de la disponibilitat de nutrients i actua sobre proteïnes implicades en la utilització i l'emmagatzematge de l'energia en diversos òrgans i teixits. Per realitzar aquesta funció, SIRT1 s'uneix i desacetila multitud de factors de transcripció per tal d'activar respostes metabòliques diverses com la secreció d'insulina, la gluconeogènesi o l'oxidació d'àcids grassos. De forma general, diversos models animals, demostren un paper protector de SIRT1 davant patologies associades amb una ingesta crònica d'una dieta rica en greixos, com la intolerància a la glucosa o l'esteatosi hepàtica (7) .

Dins dels factors reguladors de la transcripció, s'ha descrit que PGC1 α (del qual en parlarem extensament més endavant) és una diana important de SIRT1 en multitud de tipus cel·lulars. SIRT1 interacciona amb PGC1 α i la desacetila, augmentant-ne la seva activitat. Aquesta activació té diverses conseqüències en

funció del teixit. Al fetge per exemple, la desacetilació de PGC1 α per part de SIRT1 activa la inducció de gens gluconeogènics i la repressió de gens glucolítics (21). Al múscul en canvi, a través de PGC1 α , SIRT1 orquestra i coordina el canvi de substrat metabòlic que consisteix en promoure la utilització mitocondrial d'àcids grassos per tal de preservar la glucosa en condicions de dejuni. Aquest canvi es dona a través de l'augment de la transcripció tant de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos a través de PPAR α com de gens implicats en la fosforilació oxidativa (22;23). Així, SIRT1 actua acoblant l'oxidació d'àcids grassos amb la producció d'energia (24). La acció de SIRT1 sobre PGC1 α en el cas del múscul esquelètic és a més doble; a més d'actuar a través de la seva desacetilació, també n'activa la transcripció (25).

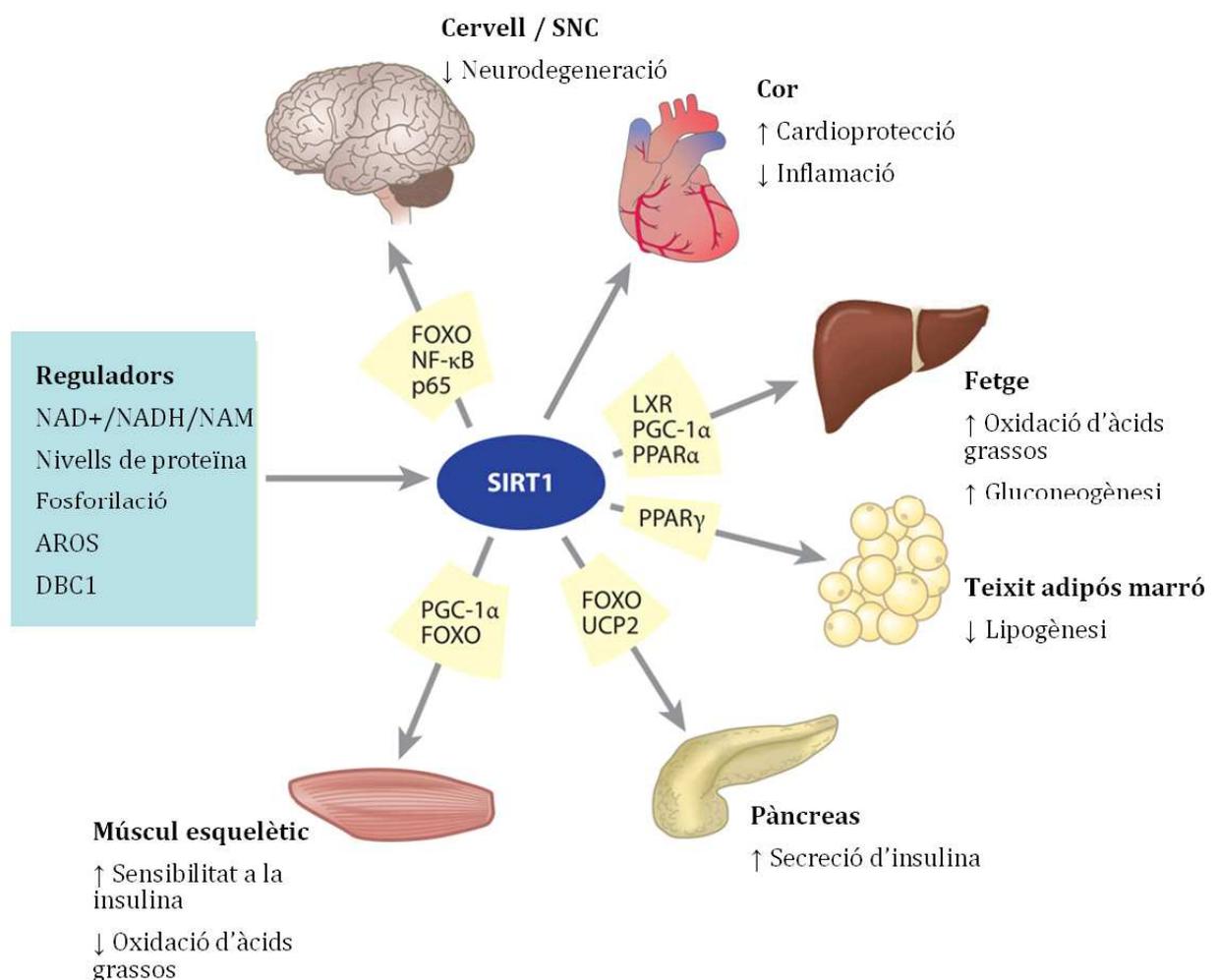


Figura 2. Regulació del metabolisme per part de SIRT1. L'activitat de SIRT1 es regula tant a nivell de quantitat de proteïna com del seu grau de fosforilació així com per les concentracions relatives de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleòtid) i NAM (nicotinamida). SIRT1 pot ser activada per AROS (*active regulator of SIRT1*) i inhibida per DBC1 (*deleted in breast cancer 1*). L'activació de SIRT1 promou l'activació e inhibició de diverses vies metabòliques a diferents teixits a través de la seva interacció amb multitud de factors de transcripció i correguladors

La implicació de SIRT1 en la biogènesi mitocondrial es dona també a altres òrgans com el fetge. Els ratolins SIRT1 *-/-* presenten una taxa respiratòria i una producció d'espècies reactives d'oxigen inferior als ratolins *wild-type*, així com una major activació de l'AMP cinasa (AMPK) com a conseqüència d'uns nivells més baixos d'ATP (10). De fet, SIRT1 i l'AMPK presenten cert solapament de funcions. Aquesta s'explica en part degut a que l'AMPK, en condicions d'exercici i manca de nutrients, activa SIRT1 al incrementar la concentració de NAD⁺. Al mateix temps SIRT1 activa els programes de transcripció dirigits per PGC1 α al desacetilar-la (biogènesi mitocondrial, oxidació d'àcids grassos), mentre que l'AMPK també activa PGC1 α fosforilant-la (26).

Alhora que modula l'homeòstasi de la glucosa al fetge i al múscul esquelètic, SIRT1 també actua directament sobre la cèl·lula beta pancreàtica. SIRT1 és un regulador positiu de la secreció d'insulina (27). Aquest efecte es deu a la supressió de l'expressió d'UCP2 per part de SIRT1, que condueix a un increment en la relació d'ATP/ADP citosòlica (28).

SIRT1 també actua regulant l'homeòstasi energètica a nivell del teixit adipós blanc, un òrgan clau en el balanç energètic degut a la seva capacitat tant per emmagatzemar greix com per secretar adipoquines com la leptina o l'adiponectina. SIRT1 s'uneix a PPAR γ i reprimeix l'expressió de gens involucrats en l'emmagatzematge de greixos. L'augment de l'expressió de SIRT1 en adipòcits provoca un increment de la lipòlisi i una disminució de la lipogènesi (29). L'increment de l'activitat de SIRT1, forma part del programa metabòlic que mobilitza els àcids grassos durant el dejuni i redueix l'adipositat durant la restricció calòrica. Aquest efecte evidencia la complexitat, encara poc entesa, dels efectes de SIRT1, ja que l'adiponectina és un gen fortament regulat per PPAR γ i SIRT1 n'activa la transcripció gènica tot i tenir efectes inhibidors sobre l'activitat de PPAR γ . A més, dins del teixit adipós blanc, SIRT1 contribueix a la producció d'adiponectina al estimular la interacció entre FOXO1 i C/EBP (30). Amb la secreció d'adiponectina, SIRT1 estaria afavorint la sensibilitat a insulina a nivell perifèric.

A nivell hepàtic SIRT1 desacetila i activa el receptor nuclear LXR promovent la transcripció de gens implicats en el metabolisme lipídic, com el transportador ABCA1, implicat en la síntesi de les HDLs, així com gens implicats en el flux de colesterol des dels teixits perifèrics. També controla la síntesi hepàtica de triglicèrids activant gens com SREBP1 (31). Els ratolins SIRT1 $-/-$ mostren una disminució de la síntesi d'HDLs, dels triglicèrids plasmàtics i de la secreció d'insulina i sorprenentment una major tolerància a la glucosa.

Així doncs, de manera general es pot concloure que SIRT1 juga un paper molt rellevant en la regulació de l'homeòstasi energètica actuant a diversos òrgans clau en el metabolisme glucídic i lipídic. A més, SIRT1 juga un paper molt

important en altres processos biològics com la inflamació o el càncer a través de la regulació de factors com NFκB o p53 (32).

2. SIRT3

Les sirtuïnes 3, 4 i 5 resideixen al mitocondri, un orgànel clau en el metabolisme cel·lular degut al seu paper central en la producció d'energia en forma d'ATP, la generació d'espècies reactives d'oxigen i la senyalització durant l'apoptosi. Cada cop existeixen més evidències de la importància de la disfunció mitocondrial en l'envelliment, malalties metabòliques com la diabetis de tipus II, diversos desordres neurodegeneratius o el càncer (20).

En els darrers anys s'ha posat de manifest que almenys el 20% de proteïnes mitocondrials es troben acetilades, i que, dins d'aquestes, s'inclouen proteïnes que pertanyen a una gran varietat de rutes metabòliques, com el cicle de Krebs, la fosforilació oxidativa, la β-oxidació dels àcids grassos, el cicle de la urea, canals mitocondrials, així com proteïnes implicades en el metabolisme de carbohidrats i aminoàcids. S'ha vist també que l'estat d'acetilació de moltes d'aquestes proteïnes es troba alterat durant la restricció calòrica i el dejuni (33).

Es desconeix el responsable i el lloc on és produeix l'acetilació de les proteïnes mitocondrials. No s'ha descrit fins al moment cap acetiltransferasa mitocondrial, però diverses evidències indiquen que l'acetilació d'aquestes proteïnes podria tenir lloc almenys en part dins el mitocondri. Per exemple, s'ha vist que algunes proteïnes codificades pel DNA mitocondrial com la subunitat 8 de l'ATP sintasa es troben acetilades (33). A més, els motius d'acetilació de les proteïnes mitocondrials són diferents dels de proteïnes nuclears i citosòliques. Mentre que a les darreres, l'aminoàcid asparagina es troba afavorit a la posició -1 i la histidina a la posició +1 (essent la lisina acetilada la posició 0), a les proteïnes mitocondrials tant la histidina com la tirosina es troben afavorides a la posició +1. Aquest fet suggereix un mecanisme d'acetilació diferencial, propi de les proteïnes mitocondrials (33). De totes maneres, no es pot descartar que l'acetilació d'algunes proteïnes es doni de manera no enzimàtica (34;35).

Al contrari que a altres compartiments cel·lulars, no s'ha descrit activitat histona desacetilasa independent de NAD⁺ al mitocondri (36) per tant és molt probable que les sirtuïnes mitocondrials siguin les desacetilases principals d'aquest orgànel. En aquest sentit, s'ha vist que els mitocondris dels ratolins SIRT3 ^{-/-} presenten una hiperacetilació de proteïnes generalitzada. A més, la incubació d'extractes mitocondrials de ratolins SIRT3 ^{-/-} amb una forma recombinant de SIRT3 és capaç de revertir aquest estat d'hiperacetilació. Per contra, els ratolins SIRT4 ^{-/-} i SIRT5 ^{-/-} no mostren un patró general d'acetilació de proteïnes mitocondrials alterat, fet que suggereix que SIRT3 podria ser la desacetilasa principal al mitocondri, i que actuaria sobre un ampli ventall de substrats,

mentre que SIRT4 i SIRT5, en cas de tenir activitat desacetilasa *in vivo*, actuarien de manera més específica i restringida (37). De fet, no s'ha descrit activitat desacetilasa *in vitro* per a SIRT4 (38) però sí activitat ADP-ribosiltransferasa NAD⁺ dependent, una activitat inhibida també per NAM i que també la presenten SIR2 a llevats i SIRT6 a mamífers (39).

SIRT3 és la sirtuïna mitocondrial que presenta més homologia amb SIRT1. S'expressa de forma ubiqua però presenta nivells més elevats a teixits metabòlicament més actius com el teixit adipós marró (TAM), múscul, fetge, ronyó, cor i cervell (36);(40).

Localització de sirt3

SIRT3 es una proteïna soluble localitzada a la matriu mitocondrial. La forma humana de SIRT3 conté una senyal de localització al mitocondri al extrem N-terminal que és proteolitzada per la peptidasa de processament mitocondrial (MPP) després del seu import al mitocondri. Dos residus d'arginina, l'Arg 99 i l'Arg 100, són essencials perquè aquest tall proteolític tingui lloc. Aquest processament de la proteïna a més, és necessari perquè SIRT3 esdevingui activa (36).

El cDNA de ratolí de SIRT3 descrit originàriament no contenia una seqüència de direccionalització al mitocondri (la denominarem forma curta). Aquesta forma curta, va ser descrita per Yang i col·laboradors (41) i és la forma utilitzada per Shi i col·laboradors en els seus estudis de sobreexpressió a teixit adipós marró (40) que comentarem extensament més endavant. Aquest cDNA codificava per una proteïna de 257 aminoàcids, molt homòloga a la forma humana però molt més curta, ja que el seu inici de traducció corresponia a la metionina 143 d'aquesta. Degut a la manca d'una seqüència d'import al mitocondri i a al fet que alguns articles qüestionaven que la sobreexpressió d'aquesta forma curta presentés una distribució mitocondrial (42) (43) es va qüestionar que el cDNA clonat inicialment correspongués realment a la forma SIRT3 endògena, majoritària *in vivo*.

Recentment, diversos estudis independents han descrit la clonació d'un nou cDNA de ratolí que codifica per una forma més llarga de SIRT3 (42;44;45) . De fet aquest cDNA, ja va ser descrit també inicialment per Yang i col·laboradors (41), però va el van descartar degut a que no la van poder amplificar a partir de RT-PCR i al considerar que presentava en la seva regió N-terminal una pobre homologia de seqüència amb la forma humana (41). Aquesta variant d'*splicing*, que no conté una seqüència de 8 pb al inici de l'exó 2 present al cDNA de la forma curta, dóna lloc a un canvi de pauta de lectura. Fruit de la seva traducció es produeix una proteïna més llarga i de mida similar a la forma humana , que conté dues possibles metionines inicials, la Met 1 i la Met 15. La metionina inicial

del cDNA clonat inicialment correspon al residu 78 d'aquesta nova forma més llarga.

En aquest fragment addicional, s'ha caracteritzat una seqüència funcional de localització a mitocondri (45). De la mateixa manera que la forma humana, la forma llarga de la proteïna de ratolí pateix un tall proteolític al voltant de l'aminoàcid 38 que és necessari per a la seva activitat desacetilasa. Així, la forma curta de la proteïna presenta el mateix pes molecular de la forma endògena, i presenta una clara distribució mitocondrial (45).

La mida de la forma curta descrita prèviament és lleugerament més petita que la forma endògena present a hepatòcits primaris (42), no presenta activitat desacetilasa i la seva sobreexpressió sembla tenir un efecte deleteri en l'estructura mitocondrial (44). Tot i així, sembla que ambdues formes de cDNA, són presents *in vivo* de manera que caldrà aprofundir en el significat de l'existència d'aquesta forma curta de mSIRT3.

També ha existit certa controvèrsia amb la possibilitat que SIRT3 pogués tenir una funció important fora del mitocondri. Alguns estudis suggerien que almenys una fracció de la forma humana de SIRT3 podia estar present també al nucli (46;47);(48). L'estudi més polèmic va ser el realitzat per Scher i col·laboradors, en el qual s'afirmava que la forma humana de SIRT3 era una proteïna nuclear que es translocava al mitocondri en condicions d'estrès (47). L'article proposava que en condicions normals SIRT3 residiria principalment al nucli on podria actuar a través de la seva activitat histona desacetilasa silenciament alguns gens, i que en aquestes condicions només una petita fracció de la proteïna total es trobaria al mitocondri. També assegurava, en contra del descrit prèviament que la forma llarga (no proteolitzada) de la proteïna presentava activitat desacetilasa. En condicions d'estrès cel·lular, aquesta seria processada al propi nucli i translocada al mitocondri on es produiria un augment dramàtic de SIRT3 (47). Diversos autors van rebatre aquestes dades argumentant una possible contaminació creuada de les diferents fraccions cel·lulars. Realitzant nous fraccionaments més restringents dos estudis publicats posteriorment afirmaven que tant la forma endògena humana de SIRT3 com la sobreexpressada de manera exògena, tal i com s'havia assegurat inicialment, presenten una distribució exclusivament mitocondrial (49); (43).

Funció de sirt3

En el moment d'inici de la present tesi doctoral pràcticament només existia un article sobre el possible rol fisiològic de SIRT3, i era el publicat per Shi i col·laboradors l'any 2005 sobre el paper de SIRT3 al teixit adipós marró (TAM) (40). Els autors afirmaven que SIRT3 s'expressa abundantment en aquest teixit de manera diferencial respecte al teixit adipós blanc i que la seva expressió al

TAM augmenta en condicions de restricció calòrica i en resposta al fred. Per contra, es troba disminuïa en aquest teixit als ratolins obesos. Es descrivia SIRT3 com una desacetilasa mitocondrial que participa en la regulació de la termogènesi al TAM. Al sobreexpressar SIRT3 en adipòcits marrons, es produïa un augment de l'expressió de PGC1 α (dependent de la fosforilació de CREB) que produïa al seu torn un augment de l'expressió de gens mitocondrials com UCP1, les subunitats II i IV de la citocrom c oxidasa o l'ATP sintetasa. Com a conseqüència de l'augment de l'expressió d'aquests enzims, es produïa un augment del consum d'oxigen, el desacoblament de la cadena respiratòria, i la disminució del potencial de membrana i de la producció d'espècies reactives d'oxigen (40).

Aquests resultats obtinguts a través de la sobreexpressió de SIRT3 però, han estat posteriorment qüestionats, degut a que el cDNA utilitzat per Shi i col·laboradors en els estudis de sobreexpressió correspon a la forma curta identificada inicialment que ja hem esmentat anteriorment, la qual no conté la seqüència de direccionalització al mitocondri ni activitat desacetilasa (44). Així, el paper que juga SIRT3 en la biologia del teixit adipós marró i la seva rellevància en la termogènesi es troba actualment en discussió. Per una banda, l'expressió de SIRT3 al TAM augmenta en resposta al fred, però els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten una morfologia mitocondrial normal, nivells d'UCP1 també normals i presenten una adaptació normal a una exposició aguda al fred durant sis hores (37). La única evidència de la implicació de SIRT3 en la termogènesi del teixit adipós marró són els resultats obtinguts per *Hirschey* i col·laboradors que mostren que els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten una termogènesi deficient en condicions de dejuni (50). Tot i que aquest efecte pot ser degut en part al paper de SIRT3 al fetge (al qual es farà referència més endavant), l'expressió de SIRT3 al teixit adipós marró augmenta durant el dejuni (50), i podria ser important en l'oxidació de determinats substrats com també veurem més endavant.

Una eina molt eficient per tal de determinar la funció d'un gen concret, són els ratolins *knockout*. Els ratolins SIRT3 $-/-$, són viables, fèrtils i no presenten diferències metabòliques remarcables respecte als animals *wild-type* en condicions bassals (37). Els estudis histològics de fetge, TAM, cor, i múscul esquelètic realitzats en aquests animals en l'edat adulta, mostren una morfologia normal tant en condicions normals com en dejuni. Sotmesos a una dieta normal no presenten tampoc diferències en la composició corporal obtinguda per anàlisi de densitometria òssia. Així mateix, quan són sotmesos a un dejuni de 24 hores no mostren alteracions en el consum d'oxigen o l'activitat, ni en la quantitat d'ingesta durant les 6 primeres hores de realimentació (37).

Aquesta aparent normalitat dels paràmetres fisiològics dels ratolins SIRT3 $-/-$ és sorprenent, donat que presenten una hiperacetilació generalitzada de proteïnes mitocondrials en condicions bassals a diversos teixits com el fetge, el TAM, cervell i cor. En els darrers cinc anys, s'han emprat els ratolins SIRT3 $-/-$ per tal d'identificar aquestes proteïnes hiperacetilades, candidats potencials de ser substrat de SIRT3 al mitocondri. Com veurem a continuació, aquests estudis han

donat com a fruit la identificació de multitud d'enzims, l'activitat dels quals està regulada per SIRT3.

SIRT3 i la producció d'ATP.

Diversos treballs posen de manifest la implicació de SIRT3 en la producció d'ATP.

Un estudi realitzat amb ratolins SIRT3 $-/-$ (51) que corroborava la hiperacetilació generalitzada de proteïnes mitocondrials observada anteriorment (37) mostrava a més que en els animals SIRT3 $-/-$, els teixits que normalment presenten uns nivells bassals d'ATP més elevats com són el cor, el fetge, el ronyó o el múscul esquelètic (teixits on precisament l'expressió de SIRT3 és més elevada) existeix una reducció dels nivells bassals d'ATP de fins un 50%. Això no s'observa en teixits on SIRT3 no s'expressa gaire com al pàncrees (51).

D'aquesta manera, estudis amb fibroblasts embrionaris de ratolí (*Mouse embryonic fibroblasts, MEFS*) obtinguts de ratolins SIRT3 $-/-$, els quals presenten uns nivells bassals d'ATP reduïts, mostren que la reconstitució amb la forma humana de SIRT3, és suficient per restituir aquests nivells d'ATP fins la normalitat. Aquest efecte de la manca de SIRT3 en els nivells d'ATP, va fer pensar en la possibilitat que SIRT3 regulés algun component de la cadena respiratòria. A través d'estudis comparatius d'inmunoprecipitació amb anticossos contra residus de lisines acetilades, es va veure que diverses proteïnes del complex I de la cadena respiratòria es troben hiperacetilades als mitocondris dels ratolins SIRT3 $-/-$ respecte als *wild-type*. Així mateix, els mitocondris aïllats dels ratolins SIRT3 $-/-$ presenten una reducció del 20% en l'activitat del complex I, mentre que l'addició de proteïna recombinant SIRT3 és capaç d'augmentar-ne l'activitat *in vitro*. S'ha vist que SIRT3 interacciona físicament i desacetila almenys una subunitat del complex I, la NDUFA9 (51;52).

De manera similar, a més de regular l'activitat del complex I, SIRT3 també desacetila i activa el complex II de la cadena respiratòria (52). Novament, estudis amb ratolins SIRT3 $-/-$ demostren una hiperacetilació del complex II i una menor activitat d'aquest. SIRT3 concretament és capaç de desacetilar i activar la flavoproteïna de la subunitat succinat deshidrogenasa del complex II.

A més de la regulació directa de l'activitat de la cadena respiratòria, SIRT3 participa també en el flux de substrats, com demostren els exemples següents i com veurem també més endavant.

S'ha vist que SIRT3 és capaç de desacetilar i activar *in vitro* la Glutamat deshidrogenasa (GDH). A més, la GDH es troba hiperacetilada als ratolins SIRT3 $-/-$ i se sap que l'acetilació química de l'enzim en redueix la seva activitat (53), la

qual cosa suggereix que SIRT3 podria estar activant-la també *in vivo*. La GDH és un enzim situat a la matriu mitocondrial que catalitza la conversió de glutamat a α -cetoglutarat i a més a fetge, ronyó, cervell i cèl·lula beta pancreàtica. Aquesta reacció genera ATP a la cèl·lula pancreàtica i hi regula la secreció d'insulina en resposta a glucosa i aminoàcids. L'enzim GDH està fortament regulat alostèricament per tal de mantenir un estricte control sobre la secreció d'insulina. Curiosament, la GDH és inhibida per la sirtuïna mitocondrial SIRT4, en aquest cas a través de l'ADP ribosilació de l'enzim. Els ratolins SIRT4 $-/-$ presenten hiperinsulinèmia i una lleugera hipoglucèmia. Els illots pancreàtics aïllats de ratolins SIRT4 $-/-$ mostren una secreció d'insulina augmentada en resposta a glucosa i aminoàcids respecte als animals *wild-type*. Així mateix, la sobreexpressió de SIRT4 reprimeix la secreció d'insulina (38;54). Aquesta regulació oposada de la GDH per part de SIRT3 i SIRT4 no és contradictòria, sinó que fa pensar en una regulació coordinada de l'activitat de l'enzim per part de les dues sirtuïnes mitocondrials en funció de la situació metabòlica. Per exemple, mentre que l'expressió de SIRT3 augmenta en resposta a la restricció calòrica (40), l'activitat de SIRT4 disminueix en aquestes condicions (38;54).

Un altre mecanisme pel qual SIRT3 pot regular la síntesi d'ATP és a través de la regulació de la cinasa activada per AMPc (AMPK). L'AMPK actua com a sensor de l'estat energètic cel·lular. Un cop activada, activa al seu torn vies catabòliques com la captació de glucosa o l'oxidació d'àcids grassos per tal de produir ATP, alhora que inhibeix vies que impliquen despesa d'ATP. L'AMPK s'activa típicament per la cinasa reguladora LKB1. S'ha vist que SIRT3 interacciona i desacetila la LKB1 a cor, la qual cosa activa al seu torn l'AMPK i manté els nivells d'ATP (55).

A més, SIRT3 estimula la fosforilació oxidativa de manera indirecta al modular l'activitat de la ciclofilina D (56). La desacetilació de la ciclofilina D per part de SIRT3 inhibeix la seva activitat i indueix la seva dissociació d'ANT1 (*adenine nucleotide translocator 1*), la qual cosa promou la separació de l'hexoquinasa II del canal d'anions dependent de voltatge. Tot plegat causa la redistribució de l'hexoquinasa II del mitocondri al citosol, que al seu torn resulta en un increment de la fosforilació oxidativa.

SIRT3 i el metabolisme de l'acetat.

El primer substrat mitocondrial desacetilat per SIRT3 en ser identificat va ser l'enzim mitocondrial Acetil Coa Sintetasa II (AceCS2) en dos estudis paral·lels publicats l'any 2006 (57;58).

Les Acetil Coa Sintetases (AceCS) lliguen l'acetat al coenzim A per formar Acetil CoA. A mamífers existeixen dues formes d'aquest enzim; una citosòlica (Acetil Coa Sintetasa 1, AceCS1) i una situada a la matriu mitocondrial (Acetil Coa Sintetasa 2, AceCS2) (59). L' AceCS1 proporciona acetil CoA per a la síntesi

d'àcids grassos i colesterol. S'expressa abundantment al fetge i ronyó. En canvi l'isoforma mitocondrial, l'AceCS2, produeix acetil CoA per a l'oxidació al cycle dels àcids tricarboxílics per produir ATP i CO₂ (59) i s'expressa majoritàriament a TAM, cor i múscul esquelètic, teixits on SIRT3 també s'expressa abundantment. Els nivells d'AceCS2 augmenten en aquests teixits condicions cetogèniques.

L'homòleg de SIR2 a *Salmonella enterica* regula l'activitat de l'Acetil Coa Sintetasa a través de la seva desacetilació permetent-ne el creixement a partir d'acetat i propionat. De manera similar en mamífers, l'AceCS1 i l'AceCS2 es troben regulades post-transcripcionalment per SIRT1 i SIRT3 respectivament. (57;58) . SIRT3 desacetila i activa l'AceCS2 en la lisina-635 tant *in vitro* com *in vivo* (58).

Tot i que les fonts d'acetat a mamífers són diverses (60), la rellevància d'aquest metabòlit com a font d'energia tot just comença a posar-se de manifest. Dins les diverses fonts d'acetat, trobem l'acetat generat pels bacteris entèrics, que pot ser absorbit al intestí, el produït en processos metabòlics endògenes com a producte de les acetilcolin esterases o les histona desacetilases de tipus I i II, així com el produït durant la metabolització de l'etanol. Després de la ingesta d'etanol, els nivells d'acetat en sang augmenten de 20 a 30 cops (61). En condicions de dejuni perllongat i diabetis, les rutes endògenes en són la font principal de producció.

L'acetat és sintetitzat al fetge en condicions cetogèniques a partir de la hidròlisi de l'Acetil CoA per part de l'Acetil CoA hidrolasa (62) com a producte final de l'oxidació d'àcids grassos al fetge i és utilitzat com font alternativa d'energia a teixits perifèrics (62-64) .

La principal evidència del paper de l'acetat com a font d'energia en condicions cetogèniques, són els estudis realitzats amb ratolins AceCS2 -/- (65) . La manca d'aquest enzim impedeix oxidar l'acetat a teixits perifèrics. Com a conseqüència, els ratolins AceCS2 -/- mostren una disminució de la temperatura corporal i menys tolerància al exercici en condicions de dejuni. Igualment, presenten una major mortalitat en aquestes condicions. Així mateix, els ratolins AceCS2 -/- mostren hipotèrmia i hipoglucèmia als ser sotmesos a una dieta baixa en carbohidrats i elevada en greixos (65).

Aquests resultats indiquen que l'acetat és una font important d'energia en condicions cetogèniques. Donat que l'expressió de SIRT3 augmenta durant la restricció calòrica (40) i que és la responsable de l'activació de l'AceCS2, SIRT3 podria ser clau en l'oxidació de l'acetat i possiblement també altres substrats en condicions de manca de nutrients. De fet, els ratolins SIRT3 -/- presenten un fenotip similar als AceCS2 -/-, ja que presenten intolerància al fred en condicions de dejuni (50) .

SIRT3 i el metabolisme lipídic al fetge.

Diversos estudis publicats en els darrers dos anys indiquen que SIRT3 juga un paper fonamental en l'oxidació d'àcids grassos al fetge, que es dona sobretot en condicions d'una dieta rica en greixos i durant el dejuni, degut a la mobilització de reserves al teixit adipós.

S'ha descrit que l'expressió de SIRT3 augmenta al fetge en resposta al dejuni. En aquestes condicions, els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten un desequilibri en els intermediaris de l'oxidació dels àcids grassos; existeix una major proporció d'acilcarnitines de cadena llarga respecte a les de cadena mitjana i curta tant al fetge com al plasma (50). En aquestes condicions els ratolins SIRT3 $-/-$ mostren també una major acumulació de triglicèrids hepàtics. Malgrat això, presenten una lipogènesi i una captació d'àcids grassos per part del fetge normals, a més d'uns mitocondris morfològicament indistingibles dels animals *wild-type*.

Els desordres lipídics observats als ratolins SIRT3 $-/-$ són conseqüència d'una oxidació deficient d'àcids grassos al fetge, que també es dona, però en menor mesura al múscul cardíac, al múscul esquelètic i al teixit adipós marró. Aquesta oxidació deficient és deguda a que l'enzim *Long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (LCAD), el qual catalitza l'oxidació dels àcids grassos de cadena llarga, és desacetilat i activat per part de SIRT3 (50). A causa de l'oxidació deficient d'àcids grassos, d'acord amb el descrit prèviament (51) els nivells d'ATP hepàtics es troben disminuïts als ratolins SIRT3 $-/-$, especialment en condicions de dejuni (50).

Malgrat que els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten unes concentracions de glucosa i d'àcids grassos circulants normals en condicions bassals, s'ha vist que presenten una producció de cossos cetònics deficient, que pot ser conseqüència, almenys en part d'aquesta oxidació d'àcids grassos alterada. A més, en condicions de dejuni, els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten intolerància al fred; mostren una disminució de la temperatura corporal i certa hipoglicèmia, la qual podria ser parcialment explicada per una gluconeogènesi deficient degut a la manca d'ATP al fetge (50).

Un altre estudi independent mostra resultats similars. Al sotmetre ratolins SIRT3 $-/-$ a un dejuni de 48 hores, s'observa un augment de palmitoilcarnitina al fetge així com de diverses acilcarnitines en sang, fet que indica una β -oxidació hepàtica deficient en aquests animals (66). A més, mitjançant un *array* de pèptids mitocondrials acetilats, es descriuen diverses proteïnes que són potencials dianes de desacetilació per part de SIRT3, entre elles alguns enzims implicats en la β -oxidació dels àcids grassos com la *Short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase* (SCHAD), la *short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase* (ACADSB) o la *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD), així com, precisament, la pròpia LCAD (50).

A través d' experiments de *knockdown* en cèl·lules hepàtiques HepG2 amb SIRT3 siRNA, s'ha vist que en absència de SIRT3 s'observa una disrupció parcial de la cadena transportadora d'electrons, que es reflexa en una disminució del potencial de membrana i un excés dels nivells basals d'espècies reactives d'oxigen (67). Al testar la sensibilitat a la lipotoxicitat tant en aquest model com en el d'hepatòcits primaris de ratolins SIRT3 $-/-$, es veu que en absència de SIRT3 es produeix una major lipotoxicitat, la qual es reflexa en una major producció d'espècies reactives d'oxigen i una major mortalitat cel·lular. La reconstitució amb SIRT3 és capaç de disminuir aquests efectes adversos. Sorprenentment però, segons aquest estudi els nivells de SIRT3 es troben reduïts al fetge en resposta a una dieta rica en greixos (67).

Un altre estudi mostra que el tractament amb una dieta rica en greixos provoca un augment de l'acetilació d'una gran quantitat de proteïnes hepàtiques. Entre aquestes 193 proteïnes hiperacetilades s'han identificat algunes implicades en la gluconeogènesi, l'oxidació mitocondrial, el metabolisme de la metionina o el dany hepàtic. En resposta a aquesta dieta rica en greixos, SIRT3 presenta menys activitat al fetge, fruit poder de la disminució dels nivells de NAD⁺ que es dona en aquest teixit en aquestes condicions. Segons aquest estudi i en contrast amb l'anterior, l'expressió de SIRT3 no es veu alterada en resposta a una dieta rica en greixos. La diferència entre els dos articles, pot ser deguda a que en aquest darrer treball es va sotmetre als ratolins a una dieta més rica en greixos i durant més temps (16 setmanes enlloc de 12) (68).

En aquest sentit i en consonància amb el possible paper principal de SIRT3 en la regulació de l'estat d'acetilació de diverses proteïnes mitocondrials en resposta a la dieta, s'ha vist que els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten una hiperacetilació de proteïnes hepàtiques més marcada en resposta a la dieta rica en greixos. Concretament, s'han identificat algunes subunitats dels complexos III i V de la cadena respiratòria que mostren un augment de l'estat d'acetilació respecte als animals control en resposta a la dieta rica en greixos. Així mateix els complexos III i IV de la cadena respiratòria presenten una activitat reduïda.

Per altra banda, estudis de sobreexpressió i pèrdua de funció de SIRT3 en hepatòcits, demostren que aquesta participa en la regulació del metabolisme lipídic hepàtic a través de l'AMPK (69). De manera consistent amb el estudis anteriors, s'ha descrit que en absència de SIRT3 es produeix una acumulació de lípids als hepatòcits, mentre que la seva sobreexpressió inhibeix la síntesi lipídica. Aquest efecte de SIRT3 depèn de la seva activitat desacetilasa i depèn de la fosforilació de l'AMPK. Com ja hem vist, l'AMPK actua com a sensor de l'estat energètic cel·lular i en resposta a la manca d'ATP activa vies catabòliques mentre que inhibeix vies anabòliques. En aquest context, SIRT3 activa la fosforilació de l'AMPK, que al seu torn fosforila i inhibeix l'acetil CoA carboxilasa (ACC), enzim limitant en la síntesi d'àcids grassos. En aquest treball no es descriu el mecanisme a través del qual SIRT3 promou la fosforilació de l'AMPK, però com ja hem vist, SIRT3 és capaç de desacetilar i activar l' LKB1, cinasa reguladora de la pròpia AMPK (55).

Tots aquests resultats indiquen que SIRT3 juga un paper important en la metabolització hepàtica dels àcids grassos mitjançant el control sobre l'activitat de diverses proteïnes hepàtiques a través de la regulació del seu estat d'acetilació. Aquesta regulació per part de SIRT3 es produeix tant a nivell de l'oxidació de l'àcid gras pròpiament dita (50), com de la posterior utilització del poder reductor obtingut per produir ATP a la cadena respiratòria (51;52) i de la inhibició de vies catabòliques de síntesi d'àcids grassos (69).

SIRT3 i la cetogènesi.

SIRT3 també està implicada en la regulació de l'homeòstasi energètica durant el dejuni a nivell de la producció hepàtica de cossos cetònics. Mitjançant novament, estudis comparatius d'acetilació entre ratolins SIRT3 *-/-* i *wild-type*, s'ha descrit que la 3-Hidroxi-3 metilglutaril CoA sintasa (HMGCS2), enzim limitant en la producció del β -hidroxi butirat, es desacetila en condicions de dejuni, mentre que en absència de SIRT3 es troba hiperacetilat tant en condicions basals com especialment durant el dejuni. A més, SIRT3 és capaç de desacetilar la HMGCS2 *in vitro*, fet que provoca un canvi conformacional de l'enzim que comporta una major activitat (70).

Així, SIRT3, que augmenta al fetge durant el dejuni i la restricció calòrica (50) desacetilaria i activaria la HMGCS2 per tal de regular directament la producció de cossos cetònics. Com a conseqüència, els ratolins SIRT3 *-/-* presenten una reducció significativa dels nivells plasmàtics de β -hidroxibutirat en condicions de dejuni ((70) i resultats obtinguts durant la realització de la present tesi doctoral). Curiosament SIRT1 desacetila i activa la isoforma citosòlica de l'enzim, l'HMGCS1 (71). Aquest fet, similar amb el que ja hem vist que passa amb les isoformes citoplasmàtica i mitocondrial de l'ACCS (58), posa de manifest la possible regulació coordinada per part de les diferents isoformes de les sirtuïnes de determinades vies metabòliques en determinades condicions.

SIRT3 i el cicle de la urea.

S'ha vist que SIRT3 també participa en un altra via hepàtica molt important; el cicle de la urea, clau en la detoxificació de l'amoni generat en el catabolisme aminoacídic. Un estudi publicat recentment, descriu que SIRT3 desacetila l'ornitina transcarbamilasa (OTC), enzim limitant del cicle (66). Aquesta desacetilació de l'OTC a la lisina 88 per part de SIRT3 es tradueix en una major activitat de l'enzim *in vitro* (66). Com a conseqüència, els ratolins SIRT3 *-/-* sotmesos a un dejuni durant la nit, presenten uns nivells hepàtics més elevats de diversos metabòlits com l'ornitina (substrat de l'OCT), l'aspartat (aminoàcid necessari pel correcte flux del cicle) i l'uridina, així com una disminució d'uracil,

fet que reflexa una típica disfunció del cicle de la urea en aquests animals en condicions de manca de nutrients (66).

Curiosament, s'ha descrit que SIRT5, l'altra sirtuïna mitocondrial amb activitat desacetilasa, desacetila i activa un altre enzim del cicle de la urea, la carbamoil fosfat sintetasa 1 (CPS1) en condicions de dejuni, situació en la qual SIRT5 es troba també sobreexpressada a fetge (72;73). La CPS1 és un enzim que catalitza el primer pas del cicle de la urea i la seva activitat és clau per l'eliminació de l'amoni generat pel metabolisme dels aminoàcids. Els ratolins SIRT5 -/- presenten una CPS1 hiperacetilada i nivells elevats d'amoni en condicions de dejuni perllongat, mentre que la sobreexpressió hepàtica de SIRT5 produeix una major activitat de la CPS1 (72;73).

Aquest fet posa de manifest la importància del cicle de la urea en les adaptacions mediades per les sirtuïnes en situacions de limitació de substrats energètics i reforça la idea d'una regulació coordinada de diverses vies metabòliques per part dels diferents membre de la família de les sirtuïnes .

SIRT3 al múscul esquelètic.

SIRT3 s'expressa de forma abundant a múscul esquelètic. La seva expressió és més elevada en músculs de contracció lenta (tipus I) que en músculs de contracció ràpida (tipus II) (74). Les fibres de tipus I o vermelles, també anomenades de contracció lenta, presenten una elevada capacitat oxidativa (alta activitat d'enzims del cicle de Krebs, de la β -oxidació d'àcids grassos i del sistema oxphos), són riques en mitocondris i principalment utilitzen l'oxidació dels àcids grassos, alternativament a la glucosa, per a la producció d'energia. Són fibres resistents a la fatiga, pròpies dels músculs posturals que requereixen una producció constant d'ATP, ja que pateixen contraccions llargues en el temps i amb pocs canvis d'intensitat. En canvi les fibres de tipus II o blanques, anomenades també de contracció ràpida, presenten un baix contingut en mitocondris i enzims oxidatius, de manera que el seu metabolisme és essencialment glucolític i són susceptibles a la fatiga. L'expressió de SIRT3 augmenta al múscul esquelètic en resposta al exercici físic tant en ratolins (74) com en rates (74;75). Aquest augment de SIRT3 es correlaciona amb un augment de la fosforilació de CREB i de l'expressió de PGC1 α . Per contra, l'expressió de SIRT3, disminueix al múscul esquelètic en humans en relació amb l'edat com a conseqüència del sedentarisme. Aquest fet és paral·lel a la disminució de PGC1 α i de la capacitat oxidativa i de producció d'ATP d'aquests individus i de la mateixa manera, pot ser revertit amb l'exercici perllongat (76).

De manera similar al descrit prèviament al TAM, l'expressió de SIRT3 al múscul esquelètic també respon a la dieta. SIRT3 augmenta al múscul en condicions de restricció calòrica (12 mesos) i de dejuni (24 hores) i contràriament disminueix després de tres mesos de dieta rica en greixos.

Els ratolins -/- SIRT3 presenten a més una disminució de la fosforilació de l'AMPK en condicions normals (74).

SIRT3 a cor.

Com hem esmentat , SIRT3 s'expressa abundantment a cor, i juga un paper protector davant l'hipertrofia, actuant a diferents nivells.

La hipertròfia cardíaca és una resposta de creixement complexa que es dona al cor, en la qual els cardiomiòcits diferenciats pateixen una remodelació estructural, genètica i funcional en resposta a varietat d'estímuls fisiològics i patològics (77). Degut a que els cardiomiòcits de mamífers perden la capacitat de dividir-se poc després del naixement, la única manera que tenen de compensar l'increment de la demanda de treball és créixer. Així, davant d'estímuls patològics com la hipertensió, malalties isquèmiques diverses o la insuficiència valvular, es desenvolupa la hipertròfia, donant lloc a cardiomiòcits més grans, la formació de nous sarcòmers i la inducció de gens fetals. Aquests canvis proporcionen al cor un mecanisme de protecció a curt termini que disminueix l'estrès a la paret ventricular i millorar la funció cardíaca. Malgrat això, si l'estímul perdura i la hipertròfia es perllonga, dona lloc a la mort dels cardiomiòcits, fibrosi, dilatació ventricular i finalment la fallida cardíaca i la mort sobtada deguda a arítmies. És per això que el coneixement dels mecanismes que regulen la hipertròfia té molt interès, ja que bloquejant-la es podria millorar la supervivència dels pacients.

A nivell molecular la hipertròfia als cardiomiòcits es conseqüència del resultat del balanç entre estímuls pro-hipertòfics i anti-hipertòfics, i els respectius mecanismes corrent avall que controlen el creixement cel·lular. A nivell cel·lular, són diversos els mecanismes de senyalització descrits que donen lloc al desenvolupament de la hipertròfia. Entre ells es troba l'estrès oxidatiu.

SIRT3 es sobreexpressa a cor de ratolí en condicions d'hipertròfia induïda per fenilefrina o Ang II (78). La sobreexpressió de SIRT3 bloqueja la hipertròfia tant *in vitro*, en cultius primaris de cardiomiòcits com *in vivo*, en animals que sobreexpressen SIRT3 a cor dirigida per un promotor α MHC (Tg SIRT3). Ambdós models, juntament amb el de ratolins SIRT3 -/- demostren que l'efecte protector de SIRT3 és a través de les vies de *MAPK/ERK* i *PI3K/Akt*. Aquestes vies estan típicament implicades en la resposta hipertòfica i comparteixen elements reguladors *upstream* com Ras. Precisament SIRT3 bloqueja l'activació de Ras durant el procés d'hipertròfia (78).

La producció de ROS és necessària per a l'activació de les vies hipertòfiques. Ras pot activar-se degut a la modificació mediada per ROS (es produeix modificació del grup Tiol de la Cys 118). SIRT3 bloqueja parcialment la producció de ROS en resposta a estímuls pro-hipertòfics a través del control de

l'expressió de gens implicats en la maquinaria antioxidant de la cèl·lula. Concretament, la superòxid dismutasa (MnSOD) i la catalasa es troben sobreexpressades i presenten una major activitat tant als cardiomiòcits infectats amb adenovirus SIRT3 com al cor dels ratolins Tg SIRT3, mentre que als cors dels ratolins SIRT3 $-/-$ succeeix el contrari. Es desconeix el mecanisme mitjançant el qual SIRT3 controla l'expressió d'aquests gens antioxidants però podria ser dependent de Foxo3a (78).

Un altre estudi demostra que la hipertrofia està relacionada amb una baixada dels nivells intracel·lulars de NAD⁺ i que la simple addició de NAD⁺ és capaç de mantenir-ne els nivells intracel·lulars i de bloquejar la hipertrofia tant *in vivo* com *in vitro* (55). L'addició de NAD⁺ bloqueja l'activació de la via de senyalització pro-hipertròfica d'Akt1 i activa la via anti-hipertròfica de LKB1-AMPK al cor. Aquest efecte protector del NAD⁺, és dependent de SIRT3 i no de SIRT1. Com ja hem esmentat SIRT3 desacetila LKB1, cinasa reguladora de AMPK, que al seu torn evita la disminució d'ATP i bloqueja la hipertròfia (55).

En un altre estudi més recent (79) Hafner i col·laboradors, emprant ratolins SIRT3 $-/-$ mostren noves evidències que lliguen SIRT3 amb l'envelliment. Els cors d'aquests ratolins són més propensos a presentar diverses patologies associades a l'envelliment, com la hipertrofia cardíaca o la fibrosi, i ser menys resistents al estrès.

La fallida cardíaca és una de les principals causes de la mort relacionada amb l'envelliment i malgrat que les seves causes no es coneixen amb detall, s'ha vist que està relacionada amb una disminució de l'activitat mitocondrial al cor que és conseqüència, almenys en part, d'una progressiva obertura del porus de transició de permeabilitat mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore, mPTP*). Es tracta d'un complex multi-proteic que connecta la matriu mitocondrial amb el citosol, l'obertura del qual provoca l'alliberament de factors pro-apoptòtics i la depleció d'ATP. Aquest fet pot derivar en apoptosi i necrosi dels cardiomiòcits en funció de la severitat d'aquesta depleció dels nivells d'ATP. D'aquesta manera, la inhibició del mPTP podria tenir un gran valor terapèutic. En aquest sentit, els autors demostren que SIRT3 interactua i desacetila la ciclofilina D, regulant l'obertura del porus. El lloc desacetilació per part de SIRT3 (la lisina 166) és a més adjacent al lloc d'unió de la ciclosporina A, droga inhibidora de la ciclofilina D (79). Malauradament la ciclosporina A inhibeix també les ciclofilines A i B, crítiques per la funció immune i és precisament per això que una regulació específica del mPTP, que no afecti el sistema immune com la desacetilació específica per part de SIRT3, podria ser una diana terapèutica d'elevat interès.

Com hem comentat, la hipertrofia cardíaca sovint està acompanyada de l'estrès oxidatiu, que causa l'oxidació i la pèrdua de funcionalitat de multitud de proteïnes mitocondrials, fet que resulta en un cercle viciós, que causa més dany oxidatiu. De fet, la transició de la hipertròfia a la fallida cardíaca gairebé sempre està acompanyada d'un increment en l'estrès oxidatiu i d'una disfunció

mitocondrial, i sovint és difícil determinar quin dels dos processos actua de manera primària. SIRT3 actua protegint davant l'hipertròfia cardíaca de manera més o menys directa a través dels diferents mecanismes que hem esmentat, però com veurem en el següent apartat, segurament ho fa també protegint davant la producció de ROS.

SIRT3 i ROS.

Diversos estudis publicats en els darrers anys posen de manifest el paper de SIRT3 en la protecció davant la producció de ROS, dos articles en concret, a més, aporten algunes de les evidències més significatives que relacionen l'activitat de les sirtuïnes amb els efectes beneficiosos de la restricció calòrica a mamífers.

Com ja hem esmentat anteriorment, la restricció calòrica és capaç d'estendre el *life span* a multitud d'organismes que van des dels llevats, on es va descobrir aquest fenomen fins a les mosques o als rosegadors, en els quals és la única intervenció realment efectiva per allargar-ne la vida. Un dels beneficis descrits de la restricció calòrica en animals superiors és el retard de l'aparició de multitud de malalties relacionades amb l'envelliment com el càncer, la diabetis, el Parkinson, o la malaltia d'Alzheimer (80). La teoria dels radicals lliures d'oxigen mitocondrials proposa que l'envelliment, és resultat, almenys en part, de l'acumulació dels danys provocats a lípids, proteïnes i DNA per l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen originades a la cadena respiratòria mitocondrial (81). Existeixen multitud d'evidències que suggereixen que la restricció calòrica redueix en part aquestes agressions acumulades a diverses macromolècules de la cèl·lula (80).

Una de les patologies associades a l'envelliment que presenta un retard en la seva aparició en condicions de restricció calòrica és la pèrdua d'audició relacionada amb l'edat (*age-related hearing loss*, AHL). L'AHL es caracteritza per una pèrdua progressiva de neurones i cèl·lules ciliades de la còclea per apoptosi a l'oïda interna, que provoca al seu torn una progressiva disminució de la capacitat auditiva. Mitjançant estudis comparatius entre ratolins *wild-type* i SIRT3 *-/-*, un article recentment publicat a *Cell*, descriu que SIRT3 és necessària per mediar l'efecte positiu de la restricció calòrica en la prevenció de l'AHL a ratolins (82). La restricció calòrica és capaç de retardar l'aparició de l'AHL als ratolins *wild-type*, però és incapaç de fer-ho als SIRT3 *-/-*. L'expressió de SIRT3 es troba augmentada a les cèl·lules de la còclea en resposta a la restricció calòrica. De manera significativa, SIRT3 és capaç de prevenir de l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen en aquestes condicions. Aquest efecte protector és degut, almenys en part, a que SIRT3 és capaç de desacetilar i activar l'isocitrat deshidrogenasa 2 (IDH2), l'enzim que converteix el NADP⁺ a NADPH al mitocondri. Així, en condicions de restricció calòrica, SIRT3 estimula l'increment de NADPH i en conseqüència la relació glutatió reduït / glutatió oxidat (la parella redox més important) protegint d'aquesta manera la cèl·lula davant el dany oxidatiu (82). Aquest article presenta l'evidència més clara publicada fins al

moment que vincula restricció calòrica i ROS amb sirtuïnes i envelliment. En aquest sentit com ja hem vist, SIRT3 desacetila i activa també, la glutamat deshidrogenasa (GDH), que també produeix NADPH (83;84).

Un estudi similar (85), on també es comparava l'efecte protector de la restricció calòrica en ratolins *wild-type* i SIRT3 *-/-*, demostrà que efectivament SIRT3 protegeix la cèl·lula de l'estrès oxidatiu en aquestes condicions, i que és capaç de fer-ho mitjançant la desacetilació i activació de la Superòxid dismutasa 2 (SOD 2) en dos residus de lisina conservats de la proteïna (K53 i K89). En aquest sentit, un altre estudi més recent descriu un nou lloc de desacetilació i activació de la SOD2 (K 122) per part de SIRT3 (86). La SOD2 és un dels enzims mitocondrials més importants de detoxificació d'espècies reactives d'oxigen i mitjançant la seva regulació post-transcripcional, SIRT3 participaria en el control dels nivells de ROS intracel·lulars en resposta a l'estrès.

En aquest sentit Kim i col·laboradors (87) ja havien observat un increment dels nivells de ROS als MEFS SIRT3 *-/-* sotmesos a estrès genotòxic. Aquests nivells elevats de ROS, contribuirien parcialment a un fenotip més propens a generar tumors als MEFS SIRT3 *-/-*.

Tots aquests estudis lliguen directament i per primera vegada SIRT3 (i les sirtuïnes en general) amb la protecció en front de l'estrès oxidatiu en resposta a la restricció calòrica a mamífers. A més, el fet que SIRT3 es sobreexpressi en diversos teixits en condicions de restricció calòrica (40;66;88) i que multitud de proteïnes variïn el seu estat d'acetilació en aquestes condicions de manera SIRT3 dependent (89), suggereix que SIRT3 podria tenir un efecte protector similar actuant sobre diversos substrats en teixits diferents.

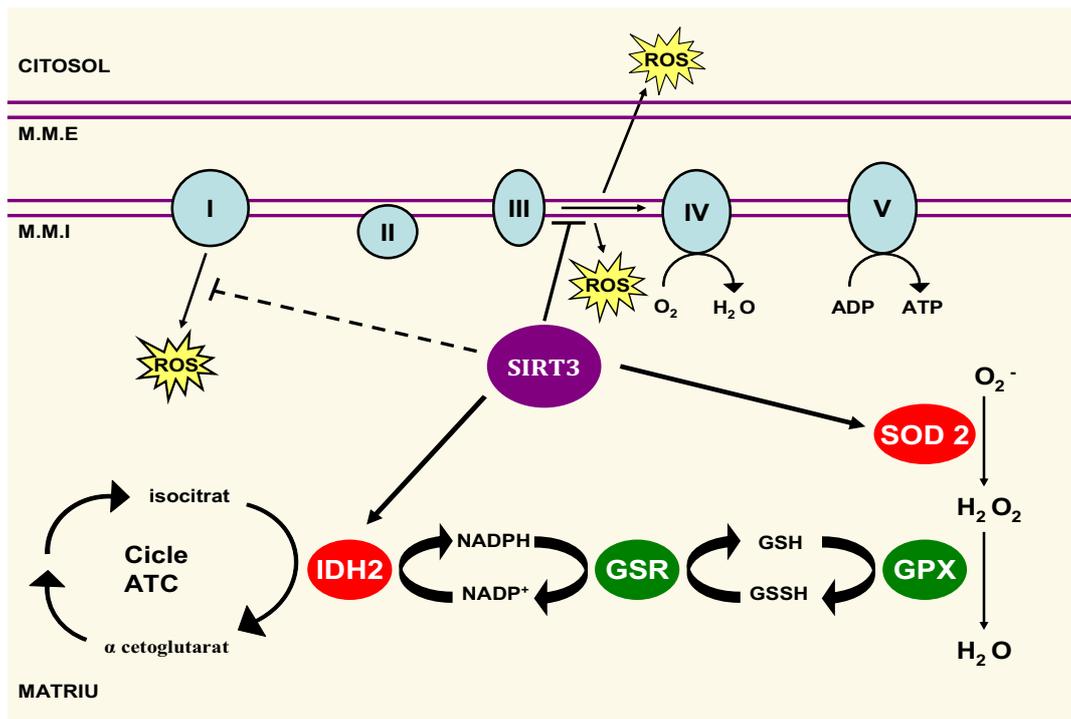


Figura 3. SIRT3 protegeix davant el dany derivat de la producció mitocondrial de ROS. Els ROS es generen majoritàriament a partir del complex I i el complex III. Els superòxids (O_2^-) són detoxificats per la manganès superòxid dismutasa (SOD2) generant peròxid d'hidrogen (H_2O_2) que és subseqüentment convertit en aigua per la glutatió peroxidasa (GPX). La GPX requereix de glutatió reduït (GSH) per a la seva activitat enzimàtica. El glutatió oxidat (GSSH) és reduït per la glutatió reductasa (GSR) que requereix al seu torn de NADPH, que es genera a partir de $NADP^+$ per la isocitrat deshidrogenasa (IDH2). Al activar SOD2 i IDH2 i al inhibir la generació de ROS per part del complex III i potencialment també el complex I, SIRT3 és un actor principal en la protecció davant el dany oxidatiu a la cèl·lula.

SIRT3 i càncer.

Dos articles recents relacionen precisament el rol protector de SIRT3 davant la producció de ROS amb un possible paper antitumoral de la sirtuïna mitocondrial.

El primer d'ells demostra que els MEFS obtinguts de ratolins SIRT3 $-/-$ presenten uns nivells més elevats del radical superòxid induït per l'estrès genotòxic i una major inestabilitat cromosòmica. Així mateix els extractes de fetge d'aquests ratolins SIRT3 $-/-$ mostren amb l'envelliment un major dany al DNA mitocondrial així com una menor integritat d'aquest orgànul respecte als animals *wild-type* (87).

Fa prop de 20 anys es va establir que per transformar *in vitro* cèl·lules primàries immortalitzades calia la cooperació d' almenys dos oncogenes, o de manera més

extensa, calia l'activació d'un sol oncogen si s'inactivava o deleccionava alhora, un gen supressor de tumors (90). En aquest sentit, s'ha vist que l'expressió d'un sol oncogen (Myc o Ras) en MEFS SIRT3 -/- és capaç de produir-ne la transformació *in vitro*. Aquests MEFS SIRT3 -/- transformats presenten una glicòlisi augmentada, característica de les cèl·lules tumorals, una disminució de la fosforilació oxidativa i una major producció de ROS. Per contra, la sobreexpressió de l'enzim Superòxid Dismutasa 1 (SOD1) és capaç d'evitar aquesta transformació amb un sol oncogen i és capaç de revertir el fenotip tumoral i la inestabilitat cromosòmica (87). La SOD1 és la isoforma citoplasmàtica de la superòxid dismutasa, enzim clau en la detoxificació de ROS intracel·lulars. Així SIRT3, de manera dependent de la producció de ROS, evitaria aquesta inestabilitat cromosòmica, que és una de les majors causes de la iniciació tumoral actuant així com a gen supressor de tumors. Com acabem de veure, SIRT3 activa de la isoforma mitocondrial SOD2, que regula directament la producció mitocondrial de ROS (85;86).

En aquest sentit, dos estudis recents relacionen SIRT3 amb càncer, i ambdós impliquen l' HIF1- α (*Hipoxia inducible factor 1*). El primer d'ells demostra que la sobreexpressió de SIRT3 és suficient per inhibir la tumorigènesi en condicions d'hipòxia. Aquest efecte es produiria a través de la menor activació de HIF1- α (Hipoxia inducible factor 1) en presència de SIRT3 degut precisament al seu paper en la producció de ROS (91).

HIF1- α és un oncogen que activa directament en la transcripció de gens implicats en la tumorigènesi i la metastasi i que s'activa en condicions d'hipòxia. La producció de ROS en condicions d'hipòxia, inhibeix els enzims encarregats d'hidroxilar HIF1- α , i per tant aquesta no es degrada, s'estabilitza, heterodimeritza esdevenint activa i promou la tumorigènesi. Així, l'estabilització aberrant de HIF1- α està associada a diversos tipus de càncers.

En aquest primer treball es demostra mitjançant l'ús de *short hairpin* RNA, que en absència de SIRT3, tant els MEFS com diverses línees tumorals, mostren una major capacitat proliferativa i una major estabilitat de HIF1- α en condicions d'hipòxia. Aquest efecte és dependent de la major producció de ROS en absència de SIRT3. Per contra, la sobreexpressió de SIRT3 és capaç de disminuir l'estabilitat de HIF1- α i la tumorigènesi, inclús quan aquesta sobreexpressió es produeix després de la iniciació tumoral (91).

L'altre estudi, apunta en aquest mateix sentit. Els MEFS dels ratolins SIRT3 -/- consumeixen més glucosa, tenen nivells més alts d'intermediaris glicolítics, nivells reduïts d'intermediaris del cicle d'àcids tricarbòxics i mostren una hiperactivació dels gens diana de HIF1- α , de forma consistent amb el metabolisme cel·lular alterat degut al *efecte Warburg* en cèl·lules cancerígenes (canvi a metabolisme glicolític en presència d'oxigen). A més, la sobreexpressió de SIRT3 és capaç de revertir aquest efecte Warburg en diverses línees cel·lulars de càncer de mama (92). Finalment, en consonància amb aquestes dades, s'ha vist que els ratolins SIRT3 -/- són més propensos a patir càncers de mama ER/PR

positius i s'ha observat que alguns tumors a humans com el de pulmó presenten nivells reduïts de SIRT3 (87).

D'aquesta manera, el paper antitumoral de SIRT3 degut a la protecció davant la producció de ROS, podria explicar parcialment els dos únics estudis que relacionen les sirtuïnes amb longevitat a humans. En un d'ells, realitzat en poblacions del sud d'Itàlia, s'ha vist que un polimorfisme al gen humà de SIRT3, amb activitat d'*enhancer*, es correlaciona amb una major longevitat (93). De la mateixa, el locus de SIRT3 presenta diferències en la freqüència al·lèlica que també es relacionen amb un fenotip més longeu (94).

3. EL TEIXIT ADIPÓS

Gairebé totes les espècies d'animals, des de *C. elegans* fins a *Homo sapiens* han trobat al llarg de l'evolució una manera d'emmagatzemar l'excés d'energia. En la majoria d'espècies aquest excés d'energia s'emmagatzema en un teixit que prové del mesoderm, el teixit adipós, o òrgan adipós com recentment l'ha anomenat Cinti (95).

El teixit adipós juga un paper crucial en la regulació i disfunció de l'homeòstasi energètica. L'homeòstasi energètica implica un compromís entre l'aport i la despesa energètica i aquest s'aconsegueix a través de la resposta coordinada entre el sistema nerviós i els teixits adiposos. Situacions com la ingesta, el manteniment de la temperatura corporal i l'exercici físic així com el rerefons genètic són punts clau que determinaran el balanç energètic.

Quan aquest balanç és positiu, ja sigui per una ingesta excessiva o per una despesa reduïda, el teixit adipós s'atrofia i es produeix un augment de pes en l'individu que pot acabar en obesitat. L'obesitat implica un risc elevat per la salut ja es troba associada a un conjunt d'anomalies metabòliques que es coneixen com el síndrome metabòlic; entre les quals es troben la resistència a la insulina, diverses dislipidèmies i malalties cardiovasculars.

S'han identificat tres tipus de teixits adiposos funcionals en mamífers: el teixit adipós blanc (TAB), el teixit adipós marró (TAM) i el teixit adipós del moll de l'ós (96-98). Pel que fa al teixit adipós blanc i marró, tot i presentar tots dos capacitat per metabolitzar i emmagatzemar lípids, tenen funcions molt diferents. El teixit adipós blanc és l'òrgan on específicament s'emmagatzema l'excés d'energia en forma de triglicèrids després de la ingesta i és capaç d'hidrolitzar aquests triglicèrids per alliberar àcids grassos i glicerol en situacions de falta de substrats energètics com el dejuni. A més, el TAB es considera un important òrgan endocrí.

Per altra banda, el teixit adipós marró emmagatzema triglicèrids però no com a reserva energètica, sinó com a combustible per a generar calor mitjançant la dissipació d'energia. Tant el TAB com el TAM es desenvolupen en llocs concrets i diferents; les diferents localitzacions del TAB (sent el subcutani i el visceral els dipòsits més importants) determinen un conjunt de característiques metabòliques i moleculars diferencials (99).

Per contra, el paper dels adipòcits medul·lars ha estat poc estudiat i no es coneix amb profunditat (98). El nombre i mida d'aquests adipòcits sembla estar inversament relacionat amb l'activitat hematopoètica del moll de l'ós. S'ha trobat un patró d'expressió gènica similar al del teixit adipós subcutani en humans, cosa que fa pensar que els adipòcits medul·lars podrien compartir algunes funcions que posseeix aquest teixit (100).

El teixit adipós blanc

El teixit adipós blanc és el teixit adipós majoritari i es troba distribuït en diversos dipòsits de gran mida. En mamífers es troba generalment en zones amb teixit conjuntiu lax, com les capes subcutànies de la dermis, però també el trobem internament envoltant òrgans com el cor o els ronyons. Els diferents dipòsits de TAB presenten diferències evidents en els seus patrons metabòlics i d'expressió gènica, evidenciant que no es tracta d'un teixit homogeni (101;102). A més, també es poden trobar cèl·lules adiposes a altres òrgans. Les cèl·lules adiposes madures es caracteritzen per presentar un gran vacúol lipídic que ocupa gairebé tot el citoplasma (desplaçant el nucli en una posició lateral) i pocs mitocondris amb crestes poc desenvolupades. El teixit adipós a part d'adipòcits madurs trobem també preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials i macròfags, que poden arribar a constituir el 50% del nombre total de cèl·lules del teixit. A part de la seva funció com a reservori d'energia funciona com un aïllant tèrmic, oferint protecció mecànica i com a òrgan endocrí (103).

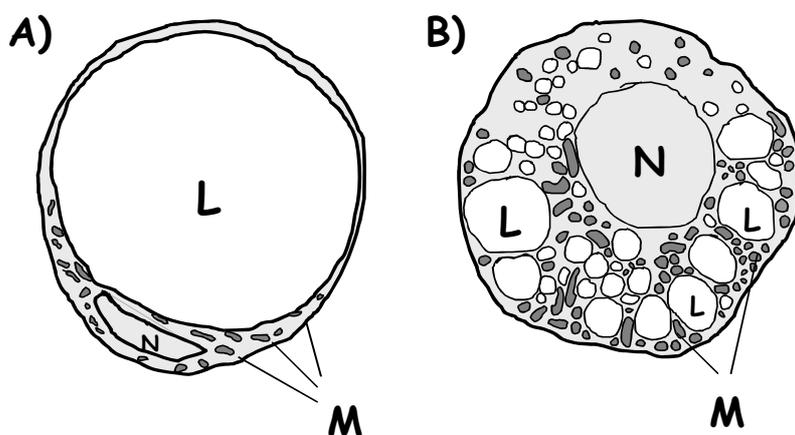


Figura 4. Diferències morfològiques entre un adipòcit blanc (A) i un adipòcit marró (B). N- Nucli, L- Vacuoles lipídiques i M- Mitocondris. Els adipòcits blancs presenten una gran vacuola lipídica que desplaça el nucli a una posició lateral. Presenten pocs mitocondris i amb crestes poc desenvolupades. En canvi, els adipòcits marrons són molt rics en mitocondris i emmagatzemen els lípids en múltiples petites vacuoles distribuïdes per tot el citosol.

La diferenciació adipocitària

Desenvolupament del teixit adipós blanc

El teixit adipós blanc es desenvolupa més tard que el marró. En humans apareix a la meitat de la gestació mentre que en ratolins poc després del naixement. Els adipòcits deriven de cèl·lules mare mesenquimals multipotents (d'origen mesodèrmic) que es converteixen en adipòcits madurs. Es descriuen dues fases en l'adipogènesi: en primer lloc la determinació, que implica l'adquisició d'unes característiques de la línia adipocitària per part d'una cèl·lula mare pluripotent. La determinació implica la transformació d'una cèl·lula a preadipòcit i la pèrdua de la seva capacitat per diferenciar-se a altres llinatges mesenquimals com poden ser els miòcits, condrocits o osteòcits (104). En segon lloc, la diferenciació terminal, fase en que el preadipòcit (que no pot ser distingit morfològicament dels seus precursors) adquireix la maquinària proteica necessària pel transport i síntesi de lípids, sensibilitat a la insulina i secreció d'adipoquines (104).

Els primers esdeveniments moleculars que promouen la determinació romanen encara per establir, mentre que les vies transcripcionals més importants en la diferenciació terminal estan molt ben descrites. De totes maneres, la complexitat d'aquests sistemes ha fet inevitable el seu estudi *in vitro*, amb les limitacions que això comporta. S'han emprat diversos models de cultius cel·lulars, com les línies cel·lulars preadipocitàries murines com les 3T3-L1 i 3T3-F442A (105;106) i els cultius primaris de preadipòcits aïllats de la fracció de l'estroma vascular de teixit adipós dissociat (104). Fins fa poc no hi havia cap línia d'adipòcits blancs humans amb capacitat per diferenciar-se després de diversos cicles de divisió. L'any 2001 es va descriure que els adipòcits aïllats de teixit adipós de nens amb síndrome Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), un rar síndrome que comporta un fenotip d'hipercreixement generalitzat (107), eren capaços de diferenciar-se després de més de 30 rondes de divisió. Els adipòcits derivats d'aquestes cèl·lules tenen una morfologia, funcionalitat i bioquímica idèntica a adipòcits d'individus sans (108) i han esdevingut una valuosíssima eina per a l'estudi del desenvolupament i metabolisme del teixit adipós blanc humà i han estat emprades durant la realització de la present tesis doctoral.

Cascada d'activació de la diferenciació

La diferenciació *in vitro* segueix una seqüència temporal de passos altament ordenats i caracteritzats. El primer d'ells és l'aturada de la proliferació; els preadipòcits proliferants surten del cicle cel·lular, generalment per processos d'inhibició per contacte, tot i que està descrit que el contacte cèl·lula-cèl·lula no és un requeriment indispensable (104;109). En models cel·lulars en cultiu però, l'aturada de la proliferació s'indueix amb l'addició de factors adipogènics que promouen una o dues rondes de divisió cel·lular (expansió clonal) abans

d'iniciar-se els processos d'activació transcripcional de gens marcadors de l'adipòcit i l'adquisició del fenotip adipós.

En aquest punt s'inicia una cascada d'esdeveniments transcripcionals que inclouen una primera fase de diferenciació primerenca i una fase més tardana. La primera fase comporta la inducció de dos factors de transcripció de la família C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*): C/EBP β i C/EBP δ . Aquests factors de transcripció són alhora els responsables del inici de la segona fase de diferenciació, la que comporta l'activació de PPAR γ (*Peroxisome Proliferator activated Receptor γ*) i C/EBP α , els gens mestres de la resta del procés de diferenciació. Durant la primera fase, els preadipòcits d'aspecte fibroblàstic adopten una morfologia més esfèrica i augmenten els nivells de mRNA de marcadors adipogènics com la *lipoprotein lipasa* (LPL) (110;111). L'aparició de PPAR γ i C/EBP α activa després l'expressió de la majoria dels gens que caracteritzen el fenotip adipocitari com la *fatty acid sintase* (FAS), la glicerofosfat deshidrogenasa, l'acetil-CoA carboxilasa (ACC), el transportador de glucosa GLUT4 (*glucose transporter 4*), el receptor d'insulina, la proteïna *fatty acid binding protein* (aP2/FABP), específica dels adipòcits i algunes adipoquines com la l'adiponectina, entre altres (112). A través d'aquest procés, van apareixent al citoplasma gotes lipídiques que van incrementant de volum i fusionant-se fins a formar una o dues grans gotes lipídiques que ocuparan gairebé tot el citoplasma.

Cal esmentar que PPAR γ no només és crucial per l'adipogènesi si no que és totalment necessari per al manteniment de l'estat diferenciat (113). A més, PPAR γ i C/EBP α indueixen la seva pròpia expressió i cadascun la de l'altre i malgrat que PPAR γ és per si sol capaç d'induir l'expressió de la majoria dels gens adipocitaris, C/EBP α és necessari per a conferir a l'adipòcit sensibilitat a la insulina (114).

Altres factors de transcripció estan implicats en l'adipogènesi, com LXR (*Liver X Receptor*), SREBP1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*) i CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*).

Senyalització extracel·lular en l'adipogènesi

Com ja hem esmentat, el programa adipogènic està modelat per una activació seqüencial de factors de transcripció. Aquests factors de transcripció actuen regulats per vies de senyalització que transdueixen senyals de factors extracel·lulars que determinaran que els preadipòcits iniciïn el procés de diferenciació o romanguin quiescents.

La insulina, a través del receptor de IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) dels preadipòcits, actua com a modulador positiu del procés de diferenciació adipocitària. Els glucocorticoides són també inductors de l'adipogènesi *in vitro*. Aquests, podrien actuar a través del receptor de glucocorticoides (GR,

glucocorticoide receptor) induint C/EBP δ (115). Altres moduladors positius de l'adipogènesi són el MCSF (*macrofag colony stimulating factor*)(116), els àcids grassos (117;118), l'AMPc (119) i la prostaglandina PGL2 (*prostaglandin 2*)(120).

Són també importants i diversos, els senyals que reprimeixen la diferenciació. Entre elles són de gran importància les glicoproteïnes de la família Wnt. Mitjançant la unió a receptors *frizzled* inicien cascades de senyalització a través de les quals inhibeixen la diferenciació dels preadipòcits (121). Igual d'important és el paper inhibitor de Pref-1 (*preadipocyte factor 1*), per mecanismes encara poc coneguts. També s'ha descrit que TGF- β (*transforming growth factor 1*) és capaç d'estimular la proliferació dels preadipòcits i inhibir l'adipogènesi *in vitro* (122), així com el paper inhibitor de la diferenciació de les citokines inflammatòries com TNF α (*tumor necrosis α*), interleuquines (IL-1, IL-6 IL-10) o l'interferó- γ (123-125). També l'àcid retinoic inhibeix la diferenciació *in vitro* quan és addicionat al cultiu en les primeres fases de la diferenciació (126); el qual sembla que actuaria impedit la inducció dels C/EBP que té lloc al principi del procés de diferenciació (127).

El teixit adipós blanc com a òrgan de reserva i mobilització de lípids

En situacions d'alimentació els lípids que provenen de la dieta, són majoritàriament triglicèrids, amb alguns àcids grassos lliures, colesterol i altres esterols. Els lípids entren al torrent sanguini en forma de quilomicrons principalment via el sistema limfàtic. En l'alimentació, també, el fetge ajuda a distribuir els lípids, esterificant els àcids grassos a triglicèrids i empaquetant-los en forma de VLDL (*very low density lipoprotein*) per tal d'exportar-les a la circulació i que els àcids grassos puguin ser captats i emmagatzemats al teixit adipós. Els quilomicrons i les VLDL interaccionen amb les lipoproteïna lipases de les cèl·lules endotelials que alliberen àcids grassos lliures no esterificats (NEFA). Els àcids grassos es transporten dins les cèl·lules principalment a través de dos tipus de transportadors: CD36 i la família de proteïnes transportadores d'àcids grassos (*fatty acid transport protein*, FATP) formada per 6 membres, que no comparteixen homologia amb CD36. Un cop dins les cèl·lules, els àcids grassos són esterificats a acils CoA i els seu destí varia en funció del tipus cel·lular. En mamífers i humans propers al seu pes ideal, el primer destí dels acil CoA d'àcids grassos en el teixit adipós és la seva reesterificació a triglicèrids, mentre que a múscul esquelètic i cardíac és la seva oxidació per generar ATP (128).

En el dejuni, el teixit adipós esdevé la font principal d'àcids grassos. La caiguda del ràtio insulina-glucagó i l'increment dels nivells de catecolamines activen la

lipòlisi al teixit adipós amb la conseqüent generació d'àcids grassos i glicerol. El dejuni provoca l'estimulació de l'oxidació d'àcids grassos i alhora que la disminució de la utilització de glucosa, la qual s'ha de minimitzar per tal que pugui ser utilitzada per teixits que depenen exclusivament de la glucosa com el cervell. En primer lloc s'inhibeix l'oxidació de glucosa al fetge, cosa que redueix el flux dels seus metabòlits cap a les vies mitocondrials. Es suprimeix la lipogènesi i s'estimula l'oxidació d'àcids grassos per desrepressió de la *carnitine palmityl transferase* (CPT1) enzim que permet l'entrada dels àcids grassos activats als mitocondris. L'estimulació de l'oxidació d'àcids grassos també comporta una inhibició de l'oxidació de glucosa a través de l'acumulació d'acetil CoA, NADH i ATP; ja que tots ells inhibeixen la al·lostèricament la piruvat deshidrogenasa (PDH). L'efecte net d'aquests canvis és incrementar la taxa d'oxidació d'àcids grassos i disminuir la de glucosa (128). D'altra banda, durant el dejuni, es produeix una disminució de l'expressió del transportador de glucosa GLUT-4 al teixit adipós associat a una certa resistència a la insulina (129).

El teixit adipós blanc com a òrgan endocrí

Tradicionalment s'havia considerat el teixit adipós blanc com un òrgan merament destinat a l'emmagatzemat de lípids, podríem dir que "metabòlicament passiu". El descobriment de la leptina el 1994, va representar un canvi de paradigma i actualment està àmpliament acceptat que el TAB és un òrgan endocrí que secreta un nombre important d'hormones i altres factors que actuen tant a nivell endocrí com paracrí i/o autocrí. Aquestes hormones, anomenades adipoquines, juguen un paper molt important en el control de la ingesta, l'homeòstasi metabòlica i en el desenvolupament d'alteracions metabòliques relacionades amb la obesitat, particularment la diabetis de tipus 2 i malalties cardiovasculars (130-132).

Leptina. Com ja hem esmentat el descobriment de la leptina i el seu receptor va transformar la visió del teixit adipós i l'obesitat. La leptina és una hormona proteica i la seva manca o la del seu receptor provoquen una obesitat mòrbida tant en ratolins (133;134) com en humans (135). Els nivells de leptina poden estar afectats per la insulina, l'entrada de glucosa als adipòcits i per reguladors del sistema nerviós simpàtic (136;137). Actuant a nivell hipotalàmic, la leptina inhibeix la ingesta i activa la despesa energètica i la funció neuroendocrina, regulant així el pes corporal. A més, la leptina té funcions reguladores durant la pubertat i la reproducció, la funció de la placenta, la resposta immune i la sensibilitat de múscul i fetge a la insulina (138;139)

Adiponectina. L'adiponectina és una hormona proteica que s'expressa preferencialment en el TAB subcutani i circula pel torrent sanguini en forma de varies isoformes multimèriques (140). S'han descrit dos receptors d'adiponectina, AdipoR1 i R2 (141), que s'expressen principalment en el múscul i el fetge respectivament. A diferència d'altres adipoquines, l'adiponectina es veu fortament reduïda en la obesitat (142), situacions de resistència a la insulina

(143) o estats d'inflamació (144), mentre que una pèrdua de pes en restableix els nivells (143). L'administració d'adiponectina recombinant reverteix la resistència a la insulina, incrementant l'oxidació d'àcids grassos i el desacoblament en el múscul esquelètic i suprimint la inflamació en el propi teixit adipós.

Àcids grassos lliures. Quantitativament, els NEFA representen el producte de secreció més important dels adipòcits blancs, que també poden secretar altres derivats lipídics com colesterol, retinol, hormones esteroides i prostaglandines (145). Els NEFA provenen de la lipòlisi que es produeix en els adipòcits. La major part d'ells circulen pel torrent sanguini units a albúmina. A banda de la seva funció com a substrats energètics també poden actuar com a molècules senyalitzadores relacionades amb la regulació de l'expressió gènica. El múscul, el fetge i el propi TAB són els principals teixits diana d'aquests àcids grassos. Poden estimular la transcripció de proteïnes implicades en el transport i el metabolisme d'àcids grassos (FABP, CPT-1, UCPs) o inhibir la transcripció d'altres proteïnes, com el transportador de glucosa GLUT4, la piruvat cinasa del fetge, l'àcid gras sintasa i la leptina (146). Els àcids grassos són capaços de regular l'expressió gènica mitjançant l'activació dels receptors PPAR.

Citoquines proinflamatòries. Al 1993 Hotamisligil i col·laboradors demostraren que en rates genèticament obesas es detectava un increment de l'expressió de TNF α al teixit adipós (147). TNF- α és una proteïna transmembrana que pateix processos proteolítics donant lloc a la forma activa i que exerceix la seva funció sobre dos tipus de receptors (I i II). És sintetitzat tant pels adipòcits com per les cèl·lules de l'estroma vascular (148). En un principi es va relacionar amb la caquèxia, però actualment se sap que està implicat en la patogènesi de l'obesitat i la resistència a la insulina (147;149). Des d'aleshores s'han descrit una sèrie de factors proinflamatoris, que estan guanyant protagonisme des del reconeixement de l'obesitat com un estat inflamatori i el teixit adipós com un dels òrgans patogènics principals. Entre aquestes citoquines proinflamatòries trobem TGF β , interferó γ , interleuquines (IL-1, IL-6, IL-10, IL-8), MCP1 (*monocyte chemotactic protein 1*) i altres factors de la cascada del complement (metallotioneïna, fibrinògen, plasminògen) (150-153). Els nivells circulants d'aquestes factors incrementen amb l'augment de massa de teixit adipós. Molts d'aquests són produïts pels adipòcits i també per macròfags activats. També s'ha descrit que l'increment de la massa adiposa activa dues cascades típicament inflamatòries, la de la JNK (*c-jun NH₂-terminal kinase*)(154;155) i la IKK- β (*IkappaB kinase β*)(156).

Proteïna d'unió a retinol. La RBP4 (*retinol binding protein 4*) és el transportador específic de retinol (vitamina A)(157) i tot i que el seu lloc de síntesi principal és el fetge, els teixits adiposos també són capaços de sintetitzar-la i secretar-la en quantitats significatives (20% del produït pel fetge). Tant en ratolins com humans obesos o amb resistència a la insulina (158) l'expressió de GLUT4 es troba severament reduïda en el teixit adipós però no en les cèl·lules musculars. Al 2005 Yang i col·laboradors van suggerir que el teixit adipós

funcionaria com un sensor de glucosa on els adipòcits detectarien l'absència de glucosa a través GLUT4 i respondrien secretant RBP4, que és capaç d'inhibir la senyalització per insulina en el múscul i activar l'expressió d'un enzim gluconeogènic en el fetge, la PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*). Com a resultat s'incrementarien els nivells de glucosa circulants.

Implicació del teixit adipós blanc en l'obesitat i la resistència a la insulina

La disfunció del teixit adipós juga un paper crucial en la patogènesi de la resistència a la insulina i la diabetis de tipus 2 relacionades amb l'obesitat. De fet, l'obesitat és el principal factor de risc en el desenvolupament de diabetis de tipus 2. A més, els nivells d'adipositat es relacionen positivament amb la resistència a la insulina (159).

L'obesitat és el resultat d'un balanç positiu entre l'aport i la despesa energètica. Quan l'aport d'energia excedeix la despesa, l'energia restant s'emmagatzema en diversos òrgans. El teixit adipós, com ja hem esmentat, és el dipòsit de lípids més important, i exerceix la seva activitat tamponadora suprimint la sortida de NEFA cap a la circulació i incrementant l'aclariment de TAG. En l'obesitat, el teixit adipós està saturat i la seva capacitat tamponadora es veu reduïda, especialment en l'estat postprandial (160). Com a conseqüència, la resta de teixits (com el múscul esquelètic (161), els illots pancreàtics (162) i el fetge (163)) es veuen exposats a un influx excessiu de TAG i àcids grassos, que pot comportar l'acumulació ectòpica d'aquests lípids quan els teixits no són capaços de metabolitzar-los. Aquesta acumulació ectòpica de lípids pot jugar un paper molt important en el desenvolupament de la resistència a la insulina i/o defectes en la secreció d'insulina en individus obesos. A més, un aport excessiu d'àcids grassos al fetge va associat a una producció més elevada de glucosa (164) i de VLDL (165) i un aclariment reduït d'insulina (166) que resulten en unes complicacions associades a la resistència a la insulina com són la intolerància a la glucosa, la hiperlipidèmia i la hiperinsulinèmia (167).

En l'obesitat és freqüent observar un augment de mida dels adipòcits que també s'ha demostrat en individus prediabètics i amb diabetis de tipus 2. Aquest increment de mida pot ser degut a una fallida en la diferenciació de preadipòcits (168). Aquest adipòcits hipertròfics responen bé a la inhibició de la lipòlisi per insulina, però semblen ser resistents a la insulina pel que fa a la captació de glucosa (expressen menys receptor GLUT4 (169)) cosa que pot provocar efectes secundaris a nivell sistèmic (170).

Per altra banda, també s'ha demostrat que els adipòcits hipertròfics presenten un patró de secreció alterat. Com ja s'ha dit l'obesitat és un estat d'inflamació crònica (171) i sembla que aquesta inflamació es genera en el teixit adipós hipertròfic i expandit (172). El teixit adipós d'individus obesos i resistents a la insulina es caracteritza per presentar un increment en els nivells d'expressió de

molècules inflammatòries (TNF- α (172), IL-6(173), PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) (174) mentre que l'adiponectina es troba disminuïda (175). D'altra banda, els macròfags que hi ha al voltant dels adipòcits juguen un paper important en aquest estat inflamatori de l'obesitat. S'ha descrit una infiltració progressiva dels teixit adipós amb macròfags a mida que progressa la malaltia (176).

Sembla poc probable que els macròfags iniciïn la resposta inflamatòria. Existeix la hipòtesi que el desencadenant de la resposta sigui la hipòxia que pateix el teixit adipós de l'obès. Se sap que el teixit adipós de ratolins obesos és hipòxic (177). Aquesta hipòxia pot venir donada perquè els adipòcits arriben a una mida que excedeix la distància de difusió de l'oxigen (178) o bé perquè no es produeix suficient angiogènesi per abastar d'oxigen totes les cèl·lules del teixit (179). Diverses dades suggereixen que la hipòxia pot modular, directa o indirectament (via captació de macròfags) la secreció d'adipoquines (180). Per altra banda, la hipòxia pot provocar la mort d'alguns adipòcits i la subseqüent infiltració de macròfags per tal de fagocitar-ne les restes cel·lulars (181). També s'ha demostrat que la hipòxia provoca la inhibició de la diferenciació a través de la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*)(182) i finalment s'ha relacionat la hipòxia amb l'estrès del reticle endoplasmàtic (183;184), que activa la resposta inflamatòria contribuint a la resistència a la insulina (185).

En resum, un increment en la mida dels adipòcits així com un flux sanguini inadequat, infiltració de macròfags i inflamació local en el teixit adipós, desencadenen alteracions metabòliques i en la secreció d'adipoquines i una acumulació excessiva de greix en teixits no adiposos, els quals poden resultar en resistència a la insulina i en darrer lloc donar lloc a diabetis de tipus 2.

El teixit adipós marró

L'eutèrmia o capacitat per mantenir i regular la temperatura corporal és una funció bàsica dels animals superiors. Si la temperatura interna de l'organisme cau per sota de certs nivells, la supervivència està compromesa. Així doncs, és de vital importància que existeixin mecanismes ben desenvolupats i controlats de producció de calor. Aquesta, pot donar-se per dos mecanismes diferents. En ocells i grans mamífers la producció facultativa de calor es dona per tremolor (contracció muscular involuntària que no comporta treball útil). En canvi, tant en els nounats de mamífers com en els petits mamífers es duu a terme el que es coneix com a termogènesi no associada a tremolor que es duu a terme al teixit adipós marró (186). Per altra banda, aquest teixit juga també un paper important en la termogènesi adaptativa induïda per la dieta, regulant la despesa energètica i el pes corporal.

El teixit adipós marró es localitza en petits mamífers com els rosegadors en diverses zones de l'organisme, com la regió interescapular, cervical, axil·lar, intercostal i al voltant de l'aorta, el timus i els ronyons (187). Aquesta distribució permet la transferència de calor als òrgans i vasos sanguinis principals per contacte o convecció (188). La coloració marronosa del teixit és degut a l'elevada vascularització d'aquest i a l'elevat nombre de mitocondris que presenta. L'activitat termogènica del teixit requereix una elevada taxa de perfusió a través del sistema vascular, per tal de proporcionar l'oxigen i els substrats necessaris als mitocondris i per exportar la calor produïda (188). Per altra banda, el teixit adipós marró també presenta una important innervació simpàtica i sembla que el grau d'activitat termogènica està controlada per tres àrees del cervell. L'àrea reguladora en l'hipotàlem anterior activa el teixit quan la temperatura baixa. De manera similar, el centre hipotalàmic ventromedial (o centre de la sacietat) activa el teixit en relació amb la ingesta, mentre que, el centre lateral hipotalàmic (o el centre de la gana) inhibeix el teixit, per exemple, durant el dejuni.

El teixit adipós marró està format principalment per adipòcits marrons. El substrat principal d'aquestes cèl·lules són els àcids grassos emmagatzemats en forma de TAG en les nombroses gotes lipídiques disperses pel citoplasma. Com més activa és una cèl·lula, més pronunciada és la disposició multivacuolar dels dipòsits lipídics, cosa que permet una elevada i més fàcil mobilització de les reserves per a la seva oxidació. L'adipòcit marró també es caracteritza per presentar un nombre molt elevat de mitocondris, grans i de morfologia típicament allargada i amb un gran nombre de crestes altament desenvolupades, indicador de la seva elevada activitat. La membrana plasmàtica dels adipòcits marrons presenta una elevada densitat de receptors α i β -adrenèrgics (189). Els adipòcits marrons, però, representen el 40% de les cèl·lules que hi ha al el teixit (190). A banda dels adipòcits en el teixit adipós marró hi trobem cèl·lules endotelials, fibroblasts, cèl·lules perivasculars mesenquimals, preadipòcits, mastòcits i cèl·lules de Schwan, que conformen l'estroma vascular.

La capacitat del teixit adipós per a produir calor és deguda a un desacoblament regulat de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa que permet la dissipació de l'energia en forma de calor. Un adipòcit marró diferenciat expressa la proteïna desacobladora UCP1 en els seus mitocondris, proteïna que permetrà el desacoblament amb la subsegüent producció de calor.

La diferenciació adipocitària

Desenvolupament del teixit adipós marró.

El procés d'adipogènesi dels adipòcits marrons no està tant ben caracteritzat com en l'adipòcit blanc. En la majoria d'espècies, el desenvolupament del teixit adipós marró té lloc durant el període fetal o just després del naixement. En rosegadors els adipòcits marrons maduren ràpidament durant els primers dies de vida (189). Al llarg de la diferenciació els adipòcits marrons adquireixen la seva morfologia típica i la capacitat termogènica, amb l'expressió de gens característics del metabolisme lipídic i de la biogènesi i diferenciació mitocondrial i l'expressió d'UCP1, considerat el principal marcador d'aquest teixit. Els adipòcits marrons deriven com els blancs del mesoderm (191) i de manera similar a com succeeix en els adipòcits blancs, durant la diferenciació dels adipòcits marrons té lloc la inducció de diversos factors de transcripció entre els quals trobem membres de la família PPAR i de les C/EBPs. També tenen una gran importància en la diferenciació cap a adipòcit marró el coactivador PGC-1 α (*PPAR γ coactivator 1*)(192) i el recentment descobert PRDM16 (193).

Per a estudiar tots aquests esdeveniments s'han emprat diversos models cel·lulars. El cultiu primari d'adipòcits marrons a partir de precursors de la fracció de l'estroma ha estat una aproximació força informativa i d'ús comú, tot i que alguns gens característics del teixit no s'expressen als mateixos nivells en aquestes cèl·lules (com el receptor adrenèrgic β_2)(194). També s'han generat diverses línies cel·lulars capaces de diferenciar-se *in vitro* com la línia HIB-1B (derivada d'un tumor de TAM induït per l'antigen T)(195). En la present tesi doctoral s'han utilitzat ambdós models per alguns dels experiments *in vitro*.

Cascada d'activació de la diferenciació.

La noradrenalina és un dels factors principals que inicien el procés de proliferació i diferenciació dels adipòcits marrons (189). Factors de creixement clàssics com els FGF (*fibroblastic growth factor*)(196) i EGF (*epidermal growth factor*)(197) també influencien els preadipòcits marrons, però el significat de la seva rellevància fisiològica no és gaire clar i semblen estar implicats en el control ontogènic i l'organització bàsica del teixit (189). Les cascades de senyalització dependents d'insulina i IGF1 també indueixen potentment la diferenciació (198).

Tal i com succeeix a l'adipòcit blanc, els factors de transcripció considerats responsables del procés de diferenciació de l'adipòcit marró pertanyen principalment a les famílies de C/EBP i PPAR. En l'adipòcit marró però, al contrari que en el teixit adipós blanc C/EBP α s'expressa abans que C/EBP β i C/EBP δ , tot i que sembla estar implicat en l'adquisició de les característiques termogèniques, adipogèniques i mitocondriogèniques del fenotip diferenciat terminal. També se'l relaciona amb el funcionament general de les vies dependents d'hormones tiroïdals (199).

Pel que fa als PPARs, PPAR γ presenta un perfil d'expressió paral·lel al de C/EBP α (200) i podria jugar un paper semblant al que exerceix en el teixit adipós blanc (201). L'administració de tiazolidindiones (ligands sintètics de PPAR γ) promou la diferenciació dels preadipòcits i indueix un increment del teixit marró interesapular *in vivo* (202). Pel que fa a PPAR δ , es creu que controla la proliferació dels preadipòcits (203) i la disminució de la seva expressió podria induir la de PPAR α (204). A diferència del teixit adipós blanc, l'expressió de PPAR α és elevada i té lloc posteriorment a la de PPAR γ i PPAR δ , coincidint amb l'adquisició del fenotip diferenciat terminal (200). És probable que PPAR α estigui implicat en l'estimulació de l'activitat termogènica, donada la importància del receptor en la β -oxidació d'àcids grassos. En el teixit adipós marró els PPAR induïxen l'expressió d'UCP1 i UCP3, totes dues, proteïnes marcadores de l'adquisició del fenotip marró diferenciat.

Nombrosos estudis en cèl·lules en cultiu i models de ratolins han posat en evidència el paper central de PPAR γ en la diferenciació tant d'adipòcits blancs com de marrons (205-208). Així doncs, PPAR γ no és aparentment el primer factor en determinar si una cèl·lula adiposa assumeix un fenotip adipós marró. De fet, ja els preadipòcits blancs i marrons semblen estar completament determinats a un tipus concret en aquest estadi ja que els fibroblasts aïllats de teixit adipós marró es diferencien a adipòcits marrons i els aïllats a partir de teixit adipós blanc s'acaben diferenciant en adipòcits blancs (209;210).

Per altra banda, com ja hem vist el teixit adipós marró té una influència important en el balanç energètic cosa que ha motivat un fort interès en trobar el regulador clau de la determinació de l'adipòcit marró per intentar transformar els adipòcits blancs en marrons, és a dir, transformar adipòcits que emmagatzemen lípids en adipòcits que els oxidem.

Cal destacar PGC1 α , coactivador que presenta una expressió molt més elevada al teixit adipós marró respecte el blanc, i que és capaç d'activar el programa termogènic quan s'expressa ectòpicament en adipòcits blancs; PGC1 α induïx en aquestes cèl·lules l'expressió de proteïnes com UCP1, desiodasa2 (DIO2), de la cadena respiratòria i enzims que participen en la β -oxidació mitocondrial (211;212). Com ja veurem més extensament més endavant, PGC1 α és un coactivador implicat en múltiples processos relacionats amb el metabolisme energètic cel·lular i la capacitat i funcionament mitocondrial.

La generació d'una línia de preadipòcits a partir de TAM de ratolins deficients en PGC-1 α ha mostrat però, que la pèrdua del cofactor no afecta a la diferenciació, però redueix severament la inducció de gens termogènics per AMPc (213). Així, sembla que PGC-1 α és essencial per desenvolupar la resposta termogènica, però no per la diferenciació de l'adipòcit marró (213).

A banda de PGC1 α s'han identificat altres factors que influencien selectivament el fenotip adipós marró. El factor de transcripció FOXC2 (*forkhead box C2*) és capaç d'induir algunes característiques del teixit adipós marró quan s'expressa en el teixit adipós blanc (214). D'altra banda, FOXC2 no s'expressa exclusivament al TAM cosa que fa pensar que el seu paper en la interconversió entre els teixits està probablement lligada a l'estimulació sobre la senyalització adrenèrgica quan és sobreexpressat *in vivo* (215;216).

S'han descrit altres factors, com Rb (*retinoblastoma*), p107 o RIP140 (*receptor interacting protein 140*) que reprimeixen l'expressió del fenotip marró en els adipòcits blancs (217-219).

Més recentment, el grup de Bruce Spiegelman ha identificat PRDM16 (PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16) (193) com un factor clau en la diferenciació del teixit adipós marró.

PRDM16 (o MEL1) és una proteïna de 140 kDa que conté 2 dits de zinc i un domini PR (homòleg a PRD1-BF-1-RIZ1) i va ser clonat per primera vegada per Mochizuki i col·laboradors, identificat en una disrupció cromosòmica que té lloc en la leucèmia mieloide (220) i anomenat MEL1 degut a la seva semblança amb MDS1/Evi1 (*MDS1/Evi1-like*), amb el qual comparteix un 56% d'homologia (220).

PRDM16 s'expressa a cor, fetge, ronyó, cervell i de forma diferencial al teixit adipós marró respecte al teixit adipós blanc. S'expressa en adipòcits madurs i la seva expressió pot incrementar unes 20 vegades amb la diferenciació. No s'observa una inducció de l'expressió de PRDM16 ni per exposició al fred ni pel tractament d'adipòcits marrons en cultiu amb AMPc, la qual cosa suggereix que pot ser un factor més relacionat amb la determinació i diferenciació dels adipòcits marrons que amb la resposta termogènica.

L'expressió ectòpica de PRDM16 en precursors d'adipòcit blanc o mioblasts és capaç d'induir el fenotip marró activant l'expressió de gens característics del TAM com UCP1, PPAR α , DIO2, PGC1 α i gens dels sistema OXPHOS (*oxidative phosphorylation*) i reprimir alguns gens específics de teixit adipós blanc (com la resistina i l'adiponectina) i el múscul (myoD, miogenina, o la cadena pesada de la miosina) . L'efecte repressiu de PRDM16 està regulat a través de la seva associació amb les proteïnes co-repressores C-terminal binding proteins (CtBP1 i CtBP2) .

Sorprenentment, la pèrdua total de PRDM16 a cultius primaris d'adipòcits marrons promou una diferenciació cap a cèl·lula muscular. En el mateix sentit, el teixit adipós marró d'embrions de ratolins deficientes per PRDM16 mostra a dia 17 de gestació una morfologia anormal amb una marcada inducció de gens específics de múscul així com una repressió dels gens termogènics. Aquestes dades suggereixen que PRDM16 és un determinant crític per a la determinació del llinatge de precursors del teixit adipós marró durant el desenvolupament (221).

L'efecte de PRDM16 en la inducció del perfil marró i la biogènesi mitocondrial té lloc de manera independent a la unió al DNA, cosa que suggereix que l'acció de PRDM16 té lloc a través de la interacció amb altres proteïnes. Estudis recents indiquen que PRDM16 forma un complex transcripcional amb C/EBP β , que s'expressa de forma abundant tant a adipòcits marrons com a mioblasts (222). De fet la depleció de C/EBP β impedeix la capacitat de PRDM16 d'induir la diferenciació de l'adipòcit marró i la combinació d'aquests dos factors és suficient per induir un fenotip marró en cèl·lules no adipogèniques com fibroblasts embrionaris i fibroblasts de la pell.

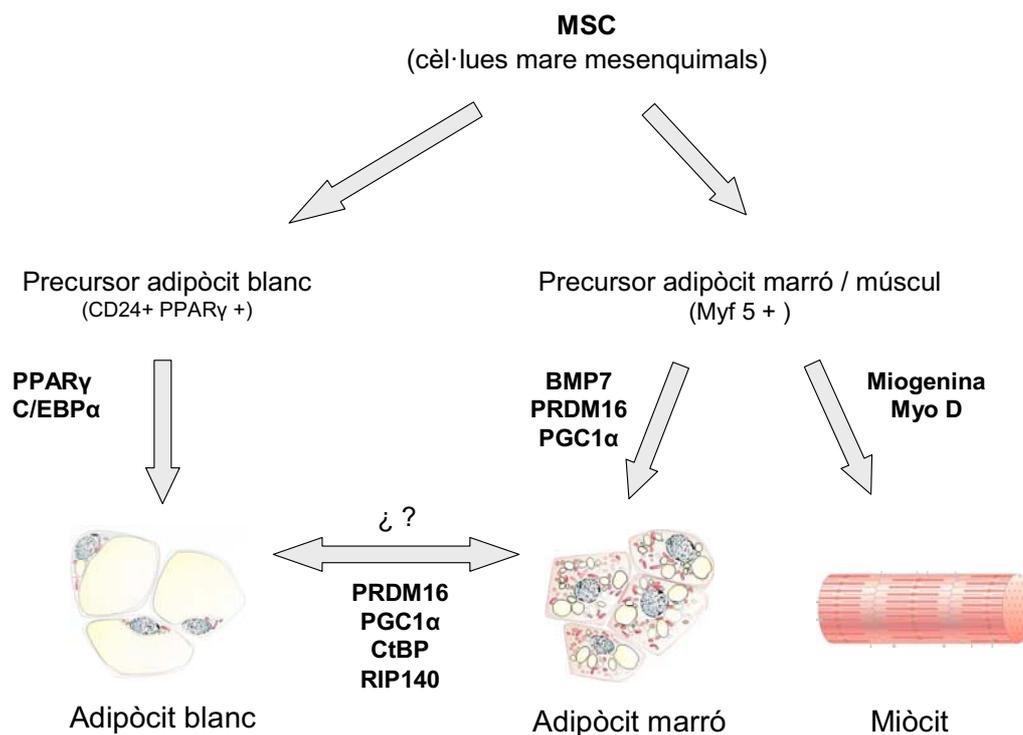


Figura 5. PRDM16 determina la especificitat de la identitat del teixit adipós marró. Els adipòcits marrons i les cèl·lules musculars provenen d'un mateix precursor que expressa Myf5, un gen que era considerat fins fa poc, marcador dels precursors miogènics, mentre que els adipòcits blancs provindrien d'un llinatge independent. En els precursors Myf5 +, la proteïna BMP7 activa l'expressió de

PRDM16, el qual promou la diferenciació de l'adipòcit marró alhora que inhibeix la diferenciació cap a miòcit. La coactivació per part de PRDM16 de C/EBP β induïx l'expressió de PPAR γ i PGC1 α . La coactivació de PPAR γ i PGC1 α per part de PRDM16 dirigeix completament cap al programa de diferenciació de l'adipòcit marró. PRDM16 inhibeix la miogènesi i la diferenciació cap a l'adipòcit blanc a través de la seva associació amb la família de corepressors CtBPs.

Aquestes i altres evidències acumulades al llarg dels darreres anys semblen indicar que els adipòcits marrons que trobem als clàssics dipòsits de TAM tenen un origen més proper als miòcits que als adipòcits blancs. Per exemple, estudis de caracterització de perfils d'expressió gènica indiquen que el TAM de la regió interescapular i el múscul esquelètic, a diferència dels adipòcits blancs, provenen de cèl·lules que expressen Myf5, un gen que fins ara s'havia assumit que s'expressava exclusivament a precursors de cèl·lules musculars (223).

De manera similar cèl·lules del dermomiótoma que expressen Engrailed-1 (En1) són capaces de donar lloc a més de múscul esquelètic i cèl·lules de la dermis a teixit marró interescapular. A més, estudis d'expressió gènica global, realitzats per Cannon i Nedergaard mostren que els precursors d'adipòcits marrons mostren un perfil d'expressió molt semblant al de les cèl·lules del múscul esquelètic, mentre que els precursors de la línia adipocitària blanca, no. Més recentment, s'ha vist que el perfil proteòmic del TAM està també més relacionat amb el muscular que amb el TAB (224). S'ha vist que BMP7 (*Bone morphogenetic protein-7*), membre de la superfamília TGF- β podria ser clau en la determinació cap a adipòcit marró, induïnt l'expressió de PRDM16 i PGC1 α a preadipòcits i fibroblasts multipotencials (225).

És d'important rellevància la presència d'adipòcits marrons dins dels dipòsits de teixit adipós blanc a animals adults. Aquests presenten la capacitat d'activar-se en resposta al fred a través dels receptors β -3 i expressen UCP1 de manera similar als adipòcits marrons que trobem als dipòsits de TAM. Tot plegat fa pensar que podrien jugar un paper termogènic dins del teixit adipós blanc.

Aquests adipòcits *brown-like* però, semblen tenir un origen diferent als precursors Myf5 esmentats anteriorment (223). No s'ha pogut determinar fins al moment la procedència d'aquests adipòcits marrons per tal d'esclarir si provenen d'una línia de preadipòcits comú amb els adipòcits blancs, d'adipòcits blancs totalment diferenciats capaços d'adquirir un fenotip marró, o d'alguna línia de cèl·lules mare desconeguda.

Segons Cinti (226) els adipòcits blancs madurs tindrien la capacitat de transformar-se en adipòcits marrons en resposta a una estimulació termogènica a través d'un procés gradual que passaria per un primer estadi de multivacuolarització dels dipòsits lipídics seguit d'un increment d'UCP1. Malgrat això, la hipòtesi de la trans-diferenciació encara es troba en discussió (227).

La termogènesi adaptativa

La capacitat termogènica del teixit adipós marró depèn de la temperatura ambiental, l'estadi de desenvolupament i de la ingesta; aquests factors influeixen tant en la quantitat de proteïna desacobladora present a la membrana mitocondrial com en la seva activitat.

Regulació de la termogènesi adaptativa.

El principal estímul fisiològic del teixit adipós marró és la disminució de la temperatura ambiental, que s'associa amb un fort increment dels nivells d'UCP1. Animals amb disrupció dirigida d'aquest gen, presenten deficiències en la termogènesi i són intolerants al fred (228). En una exposició aguda al fred es produeix un increment en l'activitat simpàtica, una ràpida resposta termogènica en el teixit adipós marró i un increment en el flux sanguini cap al teixit. Durant un estrès tèrmic perllongat es produeix un increment de la proliferació i diferenciació dels preadipòcits (*recruitment*), la proliferació dels mitocondris i un increment en la síntesi de proteïnes, concretament UCP1, LPL, DIO2 i enzims implicats en la lipòlisi i la β -oxidació (229).

Una altra situació en que s'estimula l'activitat del teixit adipós marró és durant la ingesta d'aliments, aquesta incrementa l'activitat del sistema nerviós simpàtic sobre el teixit adipós marró estimulando l'activitat termogènica del teixit (230). Així, el teixit adipós marró participa en la regulació del pes corporal (231). Animals sotmesos durant llargs períodes a dietes hipercalòriques presenten hipertròfia del teixit amb un elevats nivells de mRNA i proteïna d'UCP1 (232).

Finalment l'activitat termogènica del TAM també pot estar regulada positivament per hormones com la leptina (233) i les hormones tiroïdals (234;235) i disminuïda per temperatures ambientals elevades, durant el dejuni (236), dietes hipocalòriques (237) o bé pels glucocorticoides (238).

Regulació per Noradrenalina. En els adipòcits marrons la noradrenalina interactua amb diferents receptors adrenèrgics associats a diferents vies de senyalització. El TAM expressa els tres subtipus de receptors β -adrenèrgics (β_1 , β_2 , i β_3) tot i que només els subtipus β_1 i β_3 participen en la resposta termogènica sent els receptors els més importants (239). Aquests receptors pertanyen a la família de receptors acoblats a proteïna G (240). Quan són estimulats, es produeix un increment dels nivells d'AMPc a través de l'acció de l'adenilat ciclase. Aquest increment dona lloc a l'activació de la PKA (*protein kinase A*) que es separa de les seves subunitats reguladores. La PKA és capaç d'activar la lipasa sensible a hormones (HSL, *hormone sensitive lipase*) que incrementa la lipòlisi i promou, per tant, la termogènesi afavorint l'activació d' UCP1 (241) a través dels àcids grassos alliberats.

Al mateix temps es dona una inducció de l'expressió d'UCP1 a través d'una sèrie de senyals molt concretes: PKA activa una cascada molt específica de proteïnes quinases (entre elles MKK3, *Map Kinase Kinase 3*) que culmina en l'activació de p38 MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)(242). La p38 fosforila el factor de transcripció ATF-2 (*activating transcription factor 2*) i CREB (*cAMP response element binding protein*) que s'uneixen a elements de resposta en el promotor d'UCP1 i PGC1 α , activant la seva transcripció. La p38 també fosforila PGC1 α , que coactiva a altres factors de transcripció que s'uneixen al promotor d'UCP1 com són els PPAR, RAR (*retinoic acid receptor*) i TR. D'altra banda, PKA pot fosforilar directament CREB.

Tots aquests esdeveniments permeten mantenir la resposta termogènica, per una banda incrementant la mitocondriogènesi depenent de PGC1 α i un augmentant els nivells de proteïna UCP1 (243;244). El CREB fosforilat activa l'expressió d'UCP1 (245;246), així com altres gens relacionats amb la diferenciació (211;247). Els receptors β_1 -adrenèrgics estan involucrats en el fort increment de la divisió cel·lular que s'observa en el teixit adipós marró en resposta al fred (248).

Per altra banda, l'adipòcit marró també expressa 2 subtipus de receptors α -adrenèrgics (α_1 i α_2). L'activació dels receptors α_2 estimula la proteïna G_i i inhibeix l'adenilat ciclase, cosa que provoca una disminució dels nivells d'AMPc produïts durant l'estimulació simpàtica del teixit. L'estimulació dels receptors α_1 -adrenèrgics provoca un increment de la producció d'inositol-trifosfat (249) i un l'augment dels nivells de calci intracel·lular (250). El nombre de receptors α_1 augmenta en situacions d'aclimatació al fred i sota determinades dietes; s'ha demostrat que l'estimulació simultània dels receptors β i α_1 -adrenèrgics té com a resultat un increment de l'efecte provocat per l'AMPc (249).

Regulació per hormones tiroïdals. El teixit adipós marró produeix hormona tiroïdal activa (T₃, 3,3',5-triiodotironina) a partir de tiroxina (T₄) gràcies a l'expressió i elevada activitat de l'enzim DIO2 (235). Aquest enzim, característic del TAM gairebé no s'expressa en teixit adipós blanc. L'hormona T₃ produïda al TAM pot ser fins hi tot alliberada al torrent sanguini (251). La T₃ és necessària per a la termogènesi induïda per fred en el TAM. De fet, els animals hipotiroideus moren quan són exposats a baixes temperatures. A més, la T₃ actua de forma sinèrgica amb la noradrenalina a diferents nivells: en l'activació de l'adenilat ciclase, en l'efecte de l'AMPc sobre la lipòlisi i en l'acció termogènica dels àcids grassos sobre els mitocondris (252). L'efecte del fred sobre l'acció de la DIO2 ve vehiculat per receptors α_1 i β -adrenèrgics (253). L'hormona produïda en aquestes condicions és suficient per a saturar els seus receptors nuclears i activar, juntament amb la noradrenalina, l'expressió d'UCP1(235;254) al unir-se als seus elements de resposta en el promotor (255;256).

Regulació per àcid retinoic. L'àcid retinoic (RA, *retinoic acid*), derivat de la vitamina A, participa en la diferenciació i proliferació cel·lular i morfogènesi de diversos teixits de mamífers (257;258). El 9-*cis* RA i l'*all-trans* RA són els

principals isòmers de l'àcid retinoic amb funcionalitat biològica. La major part de tipus cel·lulars disposen dels dos isòmers per interconversió enzimàtica d'un isòmer a l'altre (259).

L'àcid retinoic actua modificant l'expressió dels seus gens diana a través de factors de transcripció dependents de lligand, els receptors de l'àcid retinoic RAR i RXR (*retinoid X receptor*). Els isòmers presenten una afinitat específica per a cadascun d'aquests receptors: l'*all-trans* RA és el lligand específic de RAR mentre que el *9-cis* RA està considerat un *panagonista* ja que s'uneix tant a RAR com a RXR (260).

Els efectes de l'activació dels receptors RAR en adipòcits marrons són diferents dels que es donen en adipòcits blancs. En l'adipòcit marró activen la transcripció d'UCP1 (261) gràcies als elements de resposta en els seu promotor (262) dins del marc d'un increment de la seva capacitat oxidativa (263). Resulta paradoxal l'efecte de l'àcid retinoic en adipòcits marrons, ja que per una banda és capaç d'activar UCP1 (marcador de diferenciació) un cop iniciat el procés de diferenciació (264) mentre que, tal i com passa en adipòcits blancs, si el tractament té lloc durant els primers estadis de diferenciació de l'adipòcit marró, la reprimeix (265). Així mateix, l'àcid retinoic és capaç d'induir l'expressió d'UCP1 en adipòcits derivats de MEFs (266), que com veurem, mostren una gran capacitat d'inducció termogènica.

Per altra banda, l'àcid retinoic pot tenir efectes positius sobre la diferenciació dels adipòcits quan es tracta de l'isòmer *9-cis*, capaç d'activar RXR, company obligatori del factor de transcripció adipogènica PPAR γ (267-269).

Regulació per insulina i IGF-1. La insulina contribueix al manteniment de la capacitat termogènica del TAM i participa en el metabolisme de l'adipòcit marró estimulant la captació de glucosa i àcids grassos i la seva oxidació. També està implicada en el desenvolupament dels mitocondris. S'ha demostrat que la insulina disminueix en un 25% l'activació β_3 -adrenèrgica (270). Recentment també s'ha descrit que la insulina intervé en la diferenciació dels adipòcits marrons mitjançant la unió als seus receptors. L'activació dels receptors insulina/IGF-1 promou a través de proteïnes IRS (*insulin receptor substrate*), la supressió de l'expressió de neclina, proteïna que controla senyals repressores de diferenciació (271). L'IGF-1 està implicat en la diferenciació de l'adipòcit marró i en l'expressió de la proteïna UCP1 (272). El receptor d'IGF-1 s'expressa constitutivament en el teixit adipós marró i el seu mRNA incrementa al final del desenvolupament fetal, moment en que es dona la diferenciació adipocitària i termogènica, coincidint amb l'aparició del mRNA d'IGF-1. Aquest factor, de manera autocrina o paracrina, podria col·laborar en l'inici o manteniment de l'expressió d'UCP1 abans del naixement, moment en que no hi ha cap estímul termogènic (272).

Regulació per FGF21. Estudis recents realitzats al nostre laboratori, han identificat FGF21 com un nou factor activador de la termogènesi al teixit adipós

marró (273). L' FGF21 (Fibroblast growth factor 21) és un membre de la superfamília FGF, i recentment ha emergit com un regulador important del metabolisme(274). FGF21 és principalment produït al fetge i la seva expressió s'indueix durant el dejuni tant a rosegadors com a humans (275). En aquestes condicions FGF21 té un efecte paracrí sobre el propi fetge induint la cetogènesi hepàtica, i endocrí sobre el teixit adipós blanc induint la lipòlisi i la captació de glucosa. L'expressió d'FGF21 està sotmesa al control de PPAR α i respon als àcids grassos (275;276).

Una de les adaptacions metabòliques que es produeixen immediatament després del naixement és la inducció de la termogènesi al teixit adipós marró per tal de generar calor. Aquesta requereix un gran aport de substrats per a la seva oxidació, principalment lípids de la llet materna, i l'activació de la maquinària oxidativa a través de la inducció de gens que es troben sota el control de PPAR α (277). Precisament PPAR α promou l'expressió d'FGF21 al fetge després del naixement en resposta als àcids grassos de la llet. L'FGF21 alliberat pel fetge activa al TAM la termogènesi a través de l'augment de l'expressió de gens implicats en aquest procés com PGC1 α , UCP1, el citocrom c o GLUT4 (273).

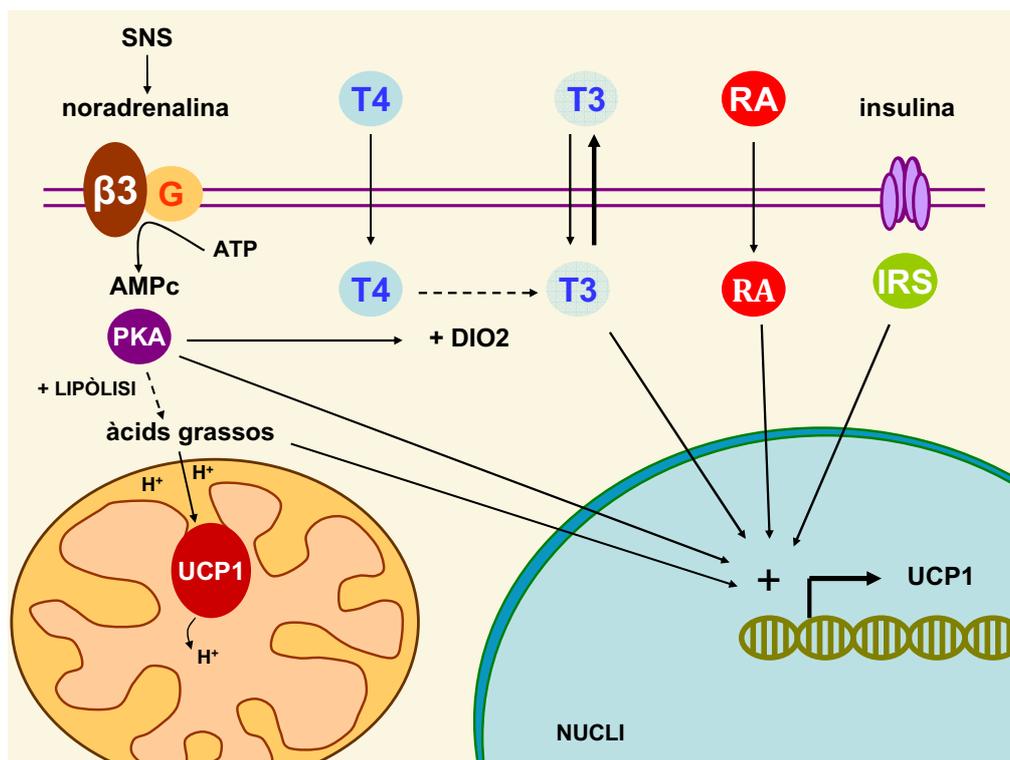


Figura 6. Esquema de les principals vies implicades en la regulació de l'activitat termogènica del teixit adipós marró.

PGC1 α com a regulador central de la termogènesi.

Un elevat nombre de factors de transcripció i coreguladors tenen un paper molt important en la modulació de l'expressió de gens termogènics, especialment d'UCP1. Entre tots aquests factors, PGC1 α hi juga un paper central. L'expressió de PGC1 α s'indueix considerablement en el TAM de ratolins exposats a fred i també en línies cel·lulars d'adipòcits marrons tractats amb isoproterenol (agonista β -adrenèrgic)(211). Aquest efecte està vehiculat per receptors β_3 -adrenèrgics, ja que els ratolins als que els hi manca aquest receptor no presenten la inducció de PGC1 α per fred en el TAM (278). A més a més, la injecció amb un agonista β_3 específic indueix l'expressió de PGC1 α en aquest teixit (279). Per altra banda, adipòcits que no expressen PGC1 α presenten una inducció reduïda dels gens termogènics, però com ja hem esmentat anteriorment es diferencien normalment, cosa que suggereix que PGC1 α és important per a la funció termogènica del teixit adipós marró però no és necessari per a l'acumulació de lípids i diferenciació de l'adipòcit (213). Un altre component important en la termogènesi adaptativa és l'augment de la biogènesi mitocondrial. L'exposició a temperatures baixes indueix la proliferació dels mitocondris i incrementa el desacoblament de la respiració. *Scarpulla* i col·laboradors van identificar i clonar dos factors de transcripció, NRF1 i NRF2 (*nuclear respiratory factor 1 i 2*)(280) que regulen un nombre molt extens de gens mitocondrials codificats pel DNA nuclear. Entre tots aquests gens s'inclou el factor de transcripció TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) essencial per a la replicació, manteniment i transcripció del DNA mitocondrial (281;282). PGC1 α té un impacte molt important sobre el sistema NRF. PGC1 α interactua físicament amb NRF1, augmentant la seva activitat transcripcional sobre els seus gens diana, entre els que es troba TFAM (283). PGC1 α també indueix enzims que participen en la β -oxidació (reacció clau també en la generació de calor ja que és la font de substrats energètics per a la cadena respiratòria) com són la MCAD (*medium chain acyl coA dehydrogenase*) i la CPT1 a través de la coactivació de factors de transcripció que s'expressen abundantment en el TAM com són PPAR α i ERR α (*estrogen related receptor α*)(284). D'aquesta manera, PGC1 α estableix i coordina una xarxa de regulació transcripcional mitjançant la coactivació de factors de transcripció específics que indueixen l'expressió de gens vinculats amb la maquinària implicada en la dissipació d'energia.

Termogènesi a humans.

Recentment el dogma prevalent que assegurava que el teixit adipós marró en humans es perdia gairebé totalment en els primers anys de vida i que no existien a adults humans dipòsits significatius de TAM, s'ha demostrat fals.

La tomografia d'emissió de positrons (PET, Positron emission tomography) s'utilitza per detectar cèl·lules i teixits cancerosos basant-se en la seva capacitat per captar grans quantitats de glucosa marcada. Durant la realització d'aquesta prova de diagnosi en estudis oncològics s'observava puntualment l'aparició de

punts d'alta captació de glucosa distribuïts simètricament al cos i que mostraven una densitat característica del teixit adipós. A més, la incorporació de substrat marcat disminuïa quan els pacients eren mantinguts en temperatures més elevades abans i durant la realització de la prova (285;286) Aquestes dades van ser llargament ignorades per la comunitat de científics dedicats al metabolisme i l'obesitat degut a la seva publicació en revistes mèdiques molt especialitzades, però posteriorment han estat proposades com a prova de l'existència de dipòsits de teixit adipós marró en humans adults (287).

Més recentment, estudis més acurats de PET, realitzats específicament per a l'estudi del TAM a humans així com estudis d'expressió gènica realitzats en biòpsies, han demostrat que aquests nuclis de captació de glucosa corresponen inequívocament a dipòsits de teixit adipós marró. Aquest presenta una distribució supraclavicular, cervical, paravertebral, mediastinal, paraaòrtica i suprarenal i expressa alts nivells de PGC1 α , UCP1 i PRDM16. A més, la seva activitat augmenta dramàticament en resposta al fred.

Aquestes evidències posen de manifest la presència de dipòsits actius de TAM en adults humans i, com comentarem més endavant, obren una porta a l'estudi de la funció d'aquest teixit en el metabolisme energètic a humans i la possibilitat de la seva utilització com a diana terapèutica en trastorns del metabolisme i el balanç energètic (288).

El teixit adipós marró com a òrgan endocrí

El teixit adipós marró també és capaç de secretar una sèrie de molècules i substàncies que el converteixen en un òrgan endocrí o paracrí.

Funció paracrina

Adipsina. L'adipsina (factor del complement D) és una serin proteasa sintetitzada i secretada pels adipòcits marrons (289). La seva expressió és inhibida per agonistes β_3 -adrenèrgics i s'associa negativament amb l'activació del teixit (289). L'adipsina podria funcionar com a senyal d'un TAM termogènica inactiu en situacions anabòliques.

NGF. El *nerve growth factor* és una neurotrofina essencial per a la supervivència i manteniment de neurones simpàtiques (290). La secreció de NGF és elevada durant el període perinatal i sembla que és secretada principalment pels preadipòcits, en fase de desenvolupament del teixit, cosa que promouria el desenvolupament de la innervació simpàtica del teixit (291).

NO. L'òxid nítric és una molècula senyalitzadora àmpliament reconeguda, amb una acció vasodilatadora molt potent. Els adipòcits marrons posseeixen els enzims necessaris per a produir NO. La noradrenalina estimula la producció i secreció de NO tant en explants del teixit (292) com en adipòcits marrons en

cultiu (290). EL NO podria vehicular l'increment ràpid i massiu del flux sanguini que té lloc quan incrementa l'activitat del TAM (293).

Funció endocrina

Àcids grassos. Quan els adipòcits marrons són altament estimulats per la noradrenalina i produeixen més àcids grassos dels que poden oxidar, aquests són secretats (294;295). Es desconeix si aquesta secreció té rellevància fisiològica o simplement representa un desequilibri entre la capacitat termogènica i la lipolítica.

Leptina. La leptina també s'expressa en adipòcits marrons, però només sota condicions d'inactivitat i atrofia. Situacions associades amb l'activació del TAM, com el fred, disminueixen l'expressió de leptina. Es podria considerar la secreció de leptina com una característica d'adipòcits poc diferenciats (respecte a la seva capacitat termogènica).

Adiponectina i resistina. Els adipòcits marrons també s'expressen adiponectina i resistina. Pel que fa a l'adiponectina la seva expressió disminueix sota estimulació adrenèrgica mentre que la regulació de l'expressió de la resistina és poc clara (189).

T₃. Com ja hem esmentat anteriorment el teixit adipós marró és capaç de generar T₃ i aquesta pot tenir una funció tan autocrina com endocrina. L'expressió i secreció de T₃ incrementa 10 vegades sota l'estimulació adrenèrgica del fred i s'inhibeix pel dejuni (251). Dins els adipòcits la T₃ s'uneix als seus receptors i regula directament l'expressió d'UCP1 (234). Pel que fa a la seva funció autocrina, el teixit adipós és responsable de la producció de la meitat de T₃ sistèmica total (296). No es coneix la rellevància fisiològica de la T₃ secretada. Per altra banda, ratolins amb deficiència de l'enzim desiodasa 2 (DIO2) tenen valors normals de T₃ en sèrum (297).

Interleuquines. El TAM és capaç de produir i secretar interleuquines com la IL-1 i la IL-6. La seva expressió és estimulada per LPS (lipopolisacàrid), IL-1 β i TNF- α (298-300). Per altra banda, la seva expressió també és estimulada per la noradrenalina (298;299).

Implicació del teixit adipós marró en l'obesitat i la resistència a la insulina.

Existeixen diversos models animals que semblen indicar una relació entre el TAM i l'obesitat. Ratolins transgènics que no tenen teixit adipós marró per expressió de la toxina diftèrica controlada pel promotor d'UCP1 (ratolins UCP-

DTA) es tornen obesos i hiperfàgics (301). En aquest model, l'absència d'activitat del TAM no només s'associa amb l'obesitat, sinó també amb la resistència a la insulina i la hiperlipidèmia. En un altre model, ratolins als que els hi manquen els tres receptors β -adrenèrgics presenten una taxa metabòlica reduïda i esdevenen severament obesos quan es sotmeten a una dieta hiperlipídica (302). En humans, polimorfismes tant d'UCP1 com dels receptors β_3 -adrenèrgics s'associen amb obesitat i probablement amb la diabetis de tipus 2 (303). Els efectes sinèrgics dels polimorfismes dels dos gens comporten un major risc de patir augment de pes i presentar una taxa metabòlica reduïda (304) cosa que suggereix una relació entre el TAM, el balanç energètic, i l'obesitat en humans. Pel que fa a rosegadors, tant els ratolins obesos ob/ob com les rates obeses Zucker fa/fa presenten nivells baixos d'UCP1 i una major acumulació de lípids, senyal d'una menor termogènesi en el TAM (233). Malgrat això, existeixen algunes dades contradictòries. Els ratolins amb disrupció dirigida del gen UCP1 són sensibles a l'exposició al fred però no són obesos (228).

Pel que fa a la resistència a la insulina, el teixit adipós marró és un teixit amb una elevada taxa d'oxidació de glucosa (representa un 10% de l'oxidació global) i una elevada expressió de GLUT4 (272). La insulina és el regulador principal del transport de glucosa als adipòcits, tant a nivell de la seva transcripció com la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (305). Per altra banda també s'ha demostrat que es necessiten uns nivells adequats d'insulina per mantenir l'expressió normal d'UCP1. A més, s'ha observat que en rates Zucker (obeses) disminueix la resposta del TAM a la insulina (306), dades que semblen indicar un paper del TAM en el control de l'homeòstasi de la glucosa. En adipòcits marrons en cultiu on s'ha induït resistència a la insulina per tractament amb $\text{TNF}\alpha$ s'observa una disminució de la captació de glucosa degut a la inhibició de la translocació de GLUT4 a la membrana així com la seva expressió (307). En el TAM de rates amb resistència a la insulina provocada per tractament amb estreptozotocina s'observa una marcada disminució dels nivells de GLUT4 tant de mRNA com de proteïna (308).

La família de proteïnes morfogèniques de l'ós (bone morphogenetic protein, BMP) pertanyen a la superfamília de TGF- β que participen en la diferenciació de cèl·lules mare mesenquimals i poden promoure l'adipogènesi del teixit adipós blanc com del marró. BMP-7 en concret, com ja hem vist, és un potent inductor de l'adipogènesi del teixit adipós marró i es tracta d'una diana de particular interès donat que la injecció d'adenovirus que expressen BMP-7 en ratolins obesos, incrementa significativament la massa del TAM i la despesa d'energia, fet que es tradueix en una disminució del pes corporal (225).

El recent descobriment de l'existència de dipòsits actius de teixit adipós marró a humans adults ha augmentant sensiblement l'interès en aquest teixit i la seva implicació en el metabolisme energètic com a diana de tractaments antiobesitat. Estudis que recopilen historials de proves de PET, suggereixen que existeix una relació inversa entre el volum dels dipòsits de teixit adipós marró i l'índex de

massa corporal (BMI, *body mass index*) la qual cosa sembla corroborar la importància de la contribució del TAM en el balanç energètic.

L'objectiu final d'una hipotètica teràpia antiobesitat centrada en el teixit adipós marró consistiria en un augment de l'activitat del teixit que impliqués una major despesa energètica. Les dues principals estratègies en perspectiva, encara en un estat molt precari de desenvolupament són, d'una banda el desenvolupament de fàrmacs capaços d'incrementar el creixement i l'activitat del teixit adipós marró i de l'altra la diferenciació *ex vivo* de precursors d'adipòcits marrons per tal de ser reintroduïts en individus obesos adults (309) .

El desenvolupament de fàrmacs capaços d'estimular la despesa energètica és especialment atractiu, donat que la majoria de fàrmacs destinats a tractar l'obesitat existents actualment és centren en la disminució de la ingesta, i no han assolit els resultats desitjats. Per contra, s'ha vist que el tractament farmacològic destinat a potenciar la despesa energètica com l'ús de dinitrofenol (DNP) un desacoblador no selectiu de la cadena respiratòria, es tradueix en una pèrdua de pes significativa. Malauradament, degut a la poca especificitat del DNP, els seus efectes secundaris són diversos, i s'ha desestimat com a teràpia. És per això que calen fàrmacs més selectius capaços d'augmentar l'activitat del TAM com seria el cas de molècules capaces de potenciar l'acció de factors que estimulen l'adipogènesi del teixit com PGC1 α , PRDM16, PPAR γ o FGF21. Degut però als efectes pleiotròpics d'alguns d'aquests factors poder seria més efectiu un tractament més específic destinat a augmentar l'activitat d'UCP1.

4. ERRs (RECEPTORS RELACIONATS AMB ESTRÒGENS)

Els receptors nuclears constitueixen una superfamília de proteïnes que funcionen com a factors de transcripció activats per lligand que regulen l'expressió de gens específics relacionats amb el desenvolupament, la reproducció, l'homeòstasi cel·lular, la diferenciació i el metabolisme. Els receptors nuclears reconeixen i s'uneixen a seqüències específiques del DNA presents en les regions promotores dels seus gens diana exercint un control transcripcional sobre aquests (310).

Els elements de resposta als receptors nuclears (HRE: hormone response element o NRRE: nuclear receptor response element) deriven tots d'un hexàmer consens AGGTCA on poden unir-se com a monòmers, homodímers o heterodímers amb RXR a través d'una estructura de dits de Zinc. En el cas d'unir-se com a dímers la seqüència consens AGGTCA es troba repetida, configurant-se en diferents motius estructurals segons si la repetició és directa (DR: direct repeat), inversa (IR: inverse repeat), o eversa (ER: everse repeat). Aquestes repeticions poden estar, alhora, separades entre si per un determinat nombre de nucleòtids, formant diferents NRRE, cadascun d'ells específic per a cada receptor nuclear (311).

Dins la superfamília de receptors nuclears existeix un grup de receptors amb lligant fisiològic desconegut, denominats receptors orfes. Dins d'aquest grup, trobem els ERRs, receptors nuclears orfes del subgrup NR3B, implicats en l'expressió de gens vinculats a diferents processos cel·lulars com el càncer, la senyalització per estrògens, la diferenciació òssia i el desenvolupament. La seva implicació en la regulació del metabolisme energètic ha estat descrita durant els darrers anys en diferents estudis, on s'ha vinculat l'activitat transcripcional dels ERRs amb el control del metabolisme oxidatiu (312).

El seu nom, es deu a que els dos primers membres de la família, $ERR\alpha$ i $ERR\beta$, van ser identificats en un *screening* dissenyat per identificar receptors d'hormones esteroïdals relacionats amb els receptors d'estrògens (ERs) (313). $ERR\alpha$ (NR3B1) i $ERR\beta$ (NR3B2) van ser els primers receptors nuclears orfes identificats dins la superfamília de receptors nuclears. Més recentment s'ha descrit l'existència d'un nou membre de la família, $ERR\gamma$ (NR3B3).

Estructura i característiques funcionals

Els tres isotips descrits presenten les característiques estructurals típiques dels receptors nuclears:

NTD: un extrem amino terminal que, a diferència de la resta de receptors nuclears, presenta un grau considerable d'identitat entre els tres membres de la

família. Aquest fet suggereix que el NTD juga un paper important en la regulació de l'activitat transcripcional dels ERRs. Diferents estudis han descrit que modificacions posttraduccionals dins aquest domini afecten a l'activitat transcripcional d'aquests receptors nuclears.

DBD: Domini d'unió al DNA. És un domini altament conservat entre els tres isotips de la família. En termes de seqüència aquest domini presenta una alta identitat amb els receptors d'estrògens (un 60% d'identitat en la seqüència proteica entre ERR α i ER α). Aquest domini és el responsable del reconeixement dels elements de resposta a aquests receptor.

LBD: Es tracta d'un domini funcional d'unió a lligand. És el domini responsable de la interacció amb coreguladors dels ERRs. Aquest domini presenta una conformació activada en absència de lligand (314).

Expressió i distribució tissular.

En mamífers tots els teixits expressen almenys un dels isotips d'ERR. ERR α s'expressa de forma ubiqua i es troba en unes quantitats superiors als altres dos membres de la família. Concretament, es detecten alts nivells d'ERR α en aquells teixits amb una elevada taxa metabòlica i que estan implicats en el metabolisme lipídic i l'homeòstasi energètica com el cor, ronyó, múscul esquelètic, tracte intestinal i teixit adipós marró ((315); (316)). ERR α també es troba present durant la diferenciació adipocitària així com en els macròfags derivats de medul·la òssia activats amb LPS o INF- γ . (317); (318). Els altres dos isotips, ERR β i ERR γ , mostren un patró d'expressió més restrictiu i s'expressen, en general, amb nivells inferiors que l'isotip alfa. Malgrat això, cor i ronyons presenten nivells abundants d'aquestes dos isotips, i els seus patrons d'expressió correlacionen amb teixits associats al metabolisme basal (315). Els tres isotips s'expressen en el SNC, concretament, alts nivells ERR α i ERR γ es detecten al hipotàlem, regió anatòmica del cervell que participa en la regulació de l'homeòstasi energètica. (319)

Actualment encara no es coneix massa sobre els mecanismes i senyals que regulen l'expressió dels tres ERRs. S'ha descrit que l'expressió d'ERR α és estimulada per diferents estressos fisiològics com l'exposició a baixes temperatures, l'exercici o el dejuni (313). Aquest increment en els nivells d'expressió es dona principalment en els teixits amb un elevat metabolisme oxidatiu (316). A més, el promotor d'ERR α presenta un element múltiple de resposta a hormones (MHRE) que pot ser reconegut i activat per ER α (receptor d'estrògens α) (320). Aquest element també pot ser diana de les diferents isoformes d'ERRs i servir com a element autorregulador en la resposta induïda pels PGC1s (321).

Element de resposta a ERRs (ERREs)

L'element de resposta a ERRs (ERREs) consisteix en el característic nucli consens de 6 nucleòtids, precedit d'una extensió de tres nucleòtids en 5': TCAAGGTCA. A través del seu DBD, els ERRs poden unir-se als ERREs com a monòmers, homodímers o heterodímers formats per dues isoformes diferents d'ERRs (313). El mecanisme molecular a través del qual els dímers d'ERRs poden reconèixer aquestes seqüències encara no ha estat descrit.

Degut a l'elevada identitat de seqüència en el DBD amb els receptors d'estrògens, els ERRs poden reconèixer EREs (elements de resposta a estrògens) i unir-s'hi, en forma de monòmer o formant dímers, actuant com a activadors *per se* o bé, competint amb els receptors d'estrògens per a la unió a aquests EREs (322). De fet, s'ha descrit que els ERRs comparteixen dianes transcripcionals amb el receptor d'estrògens alfa (ER α), però no amb ER β (323), com per exemple el gen de la lactoferrina, el gen de l'osteopontina o el gen que codifica per pS2 (324) (325).

Control i regulació.

Existeixen diferents factors que modulen l'activitat transcripcional dels ERRs:

Dependència de lligand.

Malgrat la similitud estructural amb els receptors d'estrògens, especialment en el DBD, els ERRs no són activats pels estrògens i fins al moment no s'han identificat compostos naturals que actuïn com a activadors. Estudis cristal·logràfics han descrit que el LBD dels ERRs es troba en una conformació activa de manera independent de lligand i que presenta un lloc hidrofòbic flexible (± 100 Å) que pot ser reconegut per petites molècules sintètiques (326) (314). Diferents treballs han identificat productes de síntesi que actuen com a agonistes inversos dels ERRs. Per exemple, el dietilestilbestrol (DES) inhibeix els tres isotips d'ERRs, mentre que el 4-hidroxitamoxifè (4-OHT) només afecta negativament a l'activitat dels isotips *beta* i *gamma* (327). Recentment, s'han descrit compostos amb una major especificitat contra els ERRs, com és el cas de l'*XCT790* i del *GSK5182*, agonistes inversos selectius d'ERR α i d'ERR γ , respectivament (328) (329) o del *DY131* i el *GSK4716*, molècules amb una estructura relacionada a les acilhidrazones fenòliques i que han demostrat actuar, encara que molt dèbilment, com a agonistes d'ERR β i ERR γ (313). D'aquesta manera, l'activitat transcripcional dels ERRs es pot modular farmacològicament.

Interacció amb coreguladors.

Malgrat que no existeixen lligands naturals coneguts que modulin l'activitat transcripcional dels ERRs, els tres receptors ($ERR\alpha$, $-\beta$ i $-\gamma$) poden ser regulats de manera independent de lligand mitjançant interaccions amb proteïnes coreguladores (PGC1s, RIP140, SRC, Bcl3) (313). D'aquesta manera, els diferents estats fisiològics i els diferents senyals teixit específics que modifiquin l'expressió i/o activitat d'aquests coreguladors, també afectaran als ERRs.

Diferents treballs han descrit la interacció entre els SRCs (*Steroid receptor coactivator*, SRC1, -2 i -3) i els LBD dels ERRs, resultant en un increment de la seva activitat transcripcional (330;331). En el sentit contrari, l'activitat dels ERRs com a factors de transcripció és generalment inhibida per la interacció física amb RIP140, malgrat que, cal considerar treballs que descriuen que en funció del isotip d'ERR i del context del promotor la interacció entre RIP140 i ERRs pot suposar una activació de l'expressió de gens diana a través d'un mecanisme depenent d'Sp1 (332).

La relació funcional entre els ERRs i els PGC1s és d'especial interès ja que aquests coactivadors juguen un paper essencial en la biogènesi mitocondrial i en el metabolisme energètic. $ERR\alpha$ i $PGC1\alpha$ són coexpressats en teixits amb una elevada demanda energètica i la seva expressió es troba induïda de manera teixit específica en resposta a senyals fisiològics com el dejuni, l'exposició a baixes temperatures, la restricció calòrica i l'exercici físic (313).

En l'estructura de $PGC1\alpha$ s'ha identificat l'existència d'un motiu *LLxYL* atípic (L3), responsable de la interacció específica amb els ERRs. L'existència d'aquest motiu L3 suggereix que els ERRs no competeixen amb altres receptors nuclears per la unió a $PGC1\alpha$ (333)-(334). A més, certs mutants de $PGC1\alpha$ que mantenen la interacció amb $ERR\alpha$ però no amb altres receptors nuclears, presenten la mateixa eficiència que $PGC1\alpha$ *wild-type* per induir l'expressió de gens diana d'ERR.

A més, $ERR\alpha$ s'ha descrit com un feble activador de la transcripció en models cel·lulars que presenten baixa activitat dels PGC1s i on altres receptors nuclears són actius. En canvi, es transforma en un potent activador transcripcional quan es sobreexpressen $PGC1\alpha$ o $PGC1\beta$ en el sistema (333)-(334). Per altra banda, la sobreexpressió d' $ERR\alpha$ en cultius primaris de cardiomiòcits, els quals expressen $PGC1\alpha/\beta$ de manera endògena, provoca la inducció de moltes dianes de $PGC1$ implicades en la utilització de substrats energètics i en la producció d'energia. És interessant el fet que la inducció d'aquestes dianes no es dona quan es sobreexpressa $ERR\alpha$ en un model que no té nivells endògens de $PGC1\alpha/\beta$.

Aquesta estreta dependència de cofactors, especialment dels PGC1s, suggereix que l'activitat dels ERRs com a reguladors transcripcionals està principalment

controlada per la interacció amb altres proteïnes que no pas per molècules lligand.

Modificacions posttraduccional

Malgrat que se sap que $ERR\alpha$ és una fosfoproteïna (335);(336;337), el coneixement actual sobre les modificacions posttraduccional que afecten als ERRs és molt limitat. El fet de no tenir lligands naturals coneguts i que la interacció amb els coreguladors sigui independent de lligand, ens pot fer pensar que aquestes modificacions posttraduccional puguin tenir un paper clau en el control de la capacitat transactivadora dels ERRs.

Recentment, s'ha descrit l'existència d'un motiu de sumoïlació depenent de fosforilació (*ΨkxExxSP*) dins l'extrem N-terminal dels ERRs. Aquest motiu, que es troba conservat des de *Drosophila* fins a humans, altera negativament les activitats transcripcionals d' $ERR\alpha$ i $-\gamma$ sense afectar a la seva localització subcel·lular, la seva unió al DNA, ni a la seva interacció amb els PGC1s (338) (336).

Funcions cel·lulars i fisiològiques

Els ERRS es troben conservats evolutivament amb un únic homòleg existent en invertebrats (*Drosophila*, anfibis i tunicats). El fet de no existir lligands naturals ha dificultat l'avaluació de la seva importància fisiològica i patològica, tant en la regulació de la resposta a estrògens com en la regulació del metabolisme energètic. Malgrat tot, en els darrers anys s'han donat grans progressos en el coneixement dels ERRs i les seves funcions com a reguladors de l'homeòstasi metabòlica.

Funcions cel·lulars: regulació de gens implicats en el metabolisme energètic.

El descobriment de què $ERR\alpha$ és activat per $PGC1\alpha/\beta$ ha permès entendre millor el context cel·lular i fisiològic on $ERR\alpha$ exerceix les seves funcions i ha suggerit la seva implicació en la senyalització dels PGC1s. D'aquesta manera, diferents estudis han establert que $ERR\alpha$ no només regula l'expressió de gens del metabolisme energètic, sinó que també es tracta d'un efector clau corrent avall dels PGC1s. En conjunt, els diferents estudis publicats fins a l'actualitat han establert que $ERR\alpha$, activat per $PGC1\alpha$ o $-\beta$, induïx gens relacionats amb el transport de lípids (339); (340), amb l'oxidació dels àcids grassos (*MCAD*, *CPT1B*), amb el cicle de Krebs (*IDH3A*, *ACO2*), amb la fosforilació oxidativa (*CYCS*, *ATP5B*), amb la biogènesi i dinàmica mitocondrial (*TIMM13*, *MFN2*), i amb la protecció davant l'estrès oxidatiu (*SOD2*, *PRDX3*) (312).

Els efectes dels ERRs sobre l'expressió dels seus gens diana poden portar-se a terme mitjançant dos mecanismes: directament a través del reconeixement dels ERREs o mitjançant la unió indirecta a través d'Sp1 a caixes GCs localitzades en els promotors proximals dels gens diana (332). O bé indirectament a través de la regulació de l'expressió d'altres factors de transcripció, com és el cas d'NRF1, de PPAR α , de TR1, de p53, d'SHP, d'RAR α i RXR β (335);(313);(312).

Diferents anàlisis bioinformàtiques i resultats de *Chip-on-Chip* han mostrat que els gens induïts per PGC1 α presenten un enriquiment de seqüències ERRE en els seus promotors. A més, els estudis de *Chip-on-Chip* han permès detectar la unió d'ERR α en les regions promotores de gens considerats sensors energètics, de gens implicats en el catabolisme de carbohidrats i de proteïnes, de gens que participen en l'homeòstasi del calci. (335);(313). Una comparació entre la capacitat d'unio als ERREs dels isotips ERR α i ERR γ ha permès observar que, en gran part, presenten gens diana similars. Aquest fet suggereix un solapament en les funcions dels ERRs i implica a ERR γ , i probablement a ERR β , en la regulació del metabolisme energètic cel·lular. (335)

La majoria dels estudis realitzats s'han centrat en el paper dels ERRs com a activadors transcripcionals. Malgrat això, s'ha descrit que ERR α també pot actuar com a un repressor transcripcional (338). Fins a l'actualitat s'han postulat dos mecanismes de repressió per ERR α dins del context metabòlic. En primer lloc, ERR α pot actuar com a un efector corrent avall del corepressor RIP140 apagant l'expressió de gens descrits com a diana d'ERR, com *Glut4* o *Sdhb* (335). El segon model de repressió s'ha descrit en el cas del gen *Pepck*, on ERR α és capaç d'unir-se a complexos elements de resposta que impedeixen el reclutament de PGC1 α sobre el promotor, impeding la seva activació (219).

Segons totes les dades, els ERRs poden actuar com a sensors de senyals de demanda energètica, mitjançant la interpretació dels nivells relatius o de l'activitat dels PGC1s o RIP140 i, per tant, actuar com a activadors o repressors, possiblement de manera gen específica. El fet que els ERRS regulin l'expressió d'altres factors de transcripció fa que puguin actuar com a iniciadors d'àmplies xarxes de regulació transcripcional implicades en el control del metabolisme energètic cel·lular i que es generin bucles d'autoregulació, positiva i negativa, que permeten una regulació altament controlada de tot aquest procés.

Funcions fisiològiques: models animals.

La generació d'animals *knockout* (KO) dels tres isotips d'ERR i l'estudi dels seus fenotips ha suposat una eina clau per l'enteniment de les funcions fisiològiques que desenvolupen els ERRs dins la regulació del metabolisme.

Els ratolins KO presenten diferents fenotips en funció de l'isotip d'ERR apagat. El ERR β -/- és letal embrionari, mentre que el ERR γ -/- ho és després del naixement. De manera contrària, els ratolins ERR α -/- són viables i no presenten

problemes de fertilitat. Aquest model *KO* per $ERR\alpha$, en condicions normals, no presenta grans alteracions anatòmiques (341). L'únic fenotip aparent en aquest animal és una disminució del pes corporal i dels depòsits grassos perifèrics, tot i que no s'observen canvis en la ingesta, en la despesa energètica, ni en els nivells sèrics dels diferents marcadors bioquímics. Malgrat això, aquests ratolins són resistents a l'obesitat quan són alimentats amb una dieta rica en greixos, suggerint que $ERR\alpha$ juga un paper en el control del metabolisme lipídic a nivell d'organisme sencer.

En els darrers anys s'han publicat diferents treballs que demostren que els animals *KO* per $ERR\alpha$ són incapaços d'adaptar-se a diferents estressos que suposen un increment en les necessitats energètiques com, per exemple, l'exposició a baixes temperatures, una sobrecàrrega cardíaca o una infecció bacteriana (342) (343) (322) . A més, estudis teixit específics han demostrat que aquest model presenta alterades, entre d'altres, la lipogènesi en el TAB (344), l'absorció de lípids a nivell d'intestí, etc. (339) . Conjuntament, aquests fets comprometen la supervivència de l'animal davant determinades situacions.

El fet que els ratolins *KO* per $ERR\alpha$ siguin més primers que els *wild-type* i que presentin resistència a l'obesitat davant una dieta rica en greixos suposa una discrepància amb les evidències descrites anteriorment, on s'ha presentat a $ERR\alpha$ com a un activador del metabolisme oxidatiu. L'explicació a aquest fet no està clara actualment però l'existència de redundància genètica entre els 3 isotips sembla evident i podria ser una possible, encara que parcial, explicació.

Donades les àmplies funcions que juguen els diferents isotips d'ERR en el control transcripcional de l'homeòstasi energètica, els ERRs representen possibles dianes terapèutiques pel tractament de malalties metabòliques com l'obesitat, la diabetis, la fallada cardíaca, així com el càncer.

5. COREGULADORS TRANSCRIPCIONALS.

Els diferents programes metabòlics que controlen l'homeòstasi energètica estan governats a nivell transcripcional per accions coordinades de diferents factors de transcripció. Entre aquests factors de transcripció, els receptors nuclears juguen un paper clau adaptant l'expressió gènica als contextos metabòlics i hormonal, integrant senyals provinents de la dieta, metabòlics o endocrins. Els receptors nuclears confereixen un primer nivell d'especificitat a aquests mecanismes de control transcripcional, però malgrat la seva activitat reguladora necessiten proteïnes coreguladores per modificar i remodelar epigenèticament l'estructura de la cromatina i reclutar la maquinària basal de transcripció. Aquests coreguladors poden tenir efectes positius (coactivadors) o negatius (corepressors) en la transcripció gènica i la seva activitat com la seva expressió es veuen afectades per diferents senyals. Per tant, els coreguladors confereixen un segon nivell d'especificitat a la resposta transcripcional i són de gran importància a l'hora d'integrar senyals per mantenir l'homeòstasi energètica.

Fins a l'actualitat s'han descrit unes 200 proteïnes que actuen com a coreguladores de la transcripció. Aquests coreguladors són compartits per molts factors de transcripció i estan involucrats en el control de diferents vies de senyalització. Malgrat que no es sap amb precisió la funció exacte de molts d'aquests coreguladors cada vegada hi han més evidències que suggereixen que aquest grup de proteïnes són importants en la transcripció gènica, l'embriogènesi, el desenvolupament, i el metabolisme (revisat per (311)).

Coactivadors.

Els coactivadors són proteïnes que tenen la capacitat d'unir-se a factors de transcripció i regular positivament la transcripció dels gens diana. La interacció dels coactivadors amb els receptors nuclears es dona a través de motius rics en leucines altament conservats (LXXLL, on L correspon a una Leucina mentre que X pot ser qualsevol aminoàcid) situats a la seqüència del coactivador, que reconeixen els dominis AF-2 dels receptors nuclears. Aquests motius rics en leucines, anomenats *NR Box* (*nuclear receptor box*), són necessaris i suficients per l'activació transcripcional dependent de lligand. La presència de múltiples motius LXXLL a la seqüència d'un coactivador suggereix que els diferents motius uneixen directament diferents receptors nuclears (311).

Els coactivadors es poden dividir en quatre grups. Un primer grup format per aquelles proteïnes que tenen activitat enzimàtica intrínseca i que modifiquen

epigenèticament la cromatina així com també altres proteïnes. Dins aquest grup hi trobem proteïnes amb activitat histona acetiltransferasa (HAT) i histona metiltransferasa (HMT). CBP/p300, p/CAF (*p300/CBP-associated factor*) i la família de proteïnes p160/SRC (*steroid receptor coactivator*) són proteïnes amb activitat HAT que formen part d'aquest primer grup (345). Un segon grup representat per membres del complex TRAP/DRIP/ARC/PRIC, que són proteïnes sense activitat enzimàtica intrínseca i que serveixen de pont entre el receptor nuclear i la maquinària basal de la transcripció. El tercer grup, dins del que s'inclouen els PGC-1s, el formen coactivadors que no tenen activitat enzimàtica i que requereixen per tant, del reclutament d'altres coactivadors amb activitat enzimàtica per transactivar. Finalment, existeix un quart grup que inclou les proteïnes del complex SWI/SNF, capaces de remodelar la cromatina de manera dependent d'ATP, potenciant la unió de factors de transcripció al DNA (346). D'aquesta manera, l'activació del receptor nuclear provoca el reclutament de tot un conjunt de proteïnes coreguladores que configuren un complex multiproteic d'activació modulable a diferents nivells.

La família dels PGC-1s

Els PGC-1s són activadors de la transcripció induïbles que dirigeixen el metabolisme energètic cel·lular. Aquesta família de coactivadors inclou tres proteïnes: PGC-1 α , PGC-1 β , i PRC (*PGC1 related coactivator*). PGC-1 α i PGC-1 β s'expressen principalment en teixits amb una elevada capacitat oxidativa com són el cor, el múscul esquelètic, TAM, fetge i ronyons, on exerceixen funcions crítiques en la regulació de la capacitat funcional mitocondrial i del metabolisme energètic. El patró d'expressió de PRC és més ubiqü i les seves funcions han estat menys estudiades. De manera contrària a la majoria de coactivadors transcripcionals, l'expressió de PGC-1 α , i en menor extensió la de PGC-1 β , és altament induïble, a través de diverses vies de senyalització en resposta a diferents estats del desenvolupament i davant diferents situacions fisiològiques. Per exemple, l'expressió de PGC-1 α s'indueix, de forma teixit específica en resposta a estats que requereixen un increment en la producció d'energia mitocondrial, com per exemple l'exposició a baixes temperatures, l'exercici físic i el dejuni (347)

En TAM i múscul esquelètic la via β -adrenèrgica/AMPC incrementa la transcripció del gen *PGC1A*, en el múscul estriat la calmodulina A i la CaMK (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*) indueixen l'expressió de PGC-1 α (211;219). L'AMPK també està implicada en el control de l'expressió de PGC-1 α en el múscul esquelètic (348), així com la p38 MAPK. També s'ha descrit que en el múscul esquelètic els radicals lliures d'oxigen (ROS) i la hipòxia indueixen l'expressió de PGC-1 α (213).

La família de PGCs no tenen activitat HAT però medien les interaccions entre els factors de transcripció i la maquinària basal de la transcripció. Un cop units als

factors de transcripció els membres de la família PGC-1 sofreixen un canvi conformacional que permet el reclutament de proteïnes amb activitat HAT com SCR-1 i p300/CBP. Malgrat que aquestes interaccions amb les HAT són necessàries per la transactivació, no són suficients, i és necessari el reclutament del complex TRAP/DRIP/ARC/PRIC per iniciar el procés transcripcional.

Estudis de sobreexpressió de PGC- α i PGC-1 β en cèl·lules de mamífer en cultiu han demostrat que aquests coactivadors són suficients per activar programes de regulació gènica que incrementen la capacitat de produir energia. En aquest sentit, els PGC-1s realitzen funcions biològiques que permeten a la cèl·lula adaptar-se a les necessitats energètiques resultat dels canvis en el context cel·lular, incloent un augment de la biogènesi mitocondrial, de la taxa de respiració cel·lular, i de la incorporació de substrats energètics i la seva utilització. Els PGC-1s exerceixen aquests efectes pleiotròpics mitjançant la coactivació d'una sèrie específica de receptors nuclears i altres factors de transcripció implicats en el control del metabolisme cel·lular. PGC-1 α , per exemple, s'ha descrit que pot unir-se i coactivar molts membres de la superfamília de receptors nuclears entre els que s'inclouen els PPARs (284), TR, els receptors de retinoids (211), GR (349), ER (211) HNF-4 (350), LXR (351), ERRs (334). A més, coactiva altres factors de transcripció com SREBP (348), Mef2 (352), RF-1 i NRF-2 (283) i FoxO1 (353).

S'ha descrit que diferents modificacions posttraduccionals, així com la interacció amb altres proteïnes repressores, com és el cas de p160myb (354) i de RIP140 (219), modula l'activitat coactivadora dels PGC-1s. A nivell de modificacions posttraduccionals s'ha descrit que la fosforilació per diferents cinases, com per exemple la PKA o la p38 MAPK, la metilació i l'acetilació modulen l'activitat d'aquestes proteïnes. La fosforilació de PGC-1 α per p38 MAPK en els residus Treonina 262, 298 i Serina 256 (355) ; (356) promou la seva estabilització a més a més d'incrementar la seva capacitat transactivadora, ja que desplaça a la proteïna p160 myb, un supressor de la transcripció (357) . La metilació de PGC-1 α en residus d'arginines situats a l'extrem C-terminal per la proteïna PRMT1 procova la seva activació, induint un canvi conformacional que afavoreix la interacció amb proteïnes activadores i inhibeix la unió de repressors (358). Finalment, la modificació posttraduccional més destacada en termes control és la modulació de l'estat d'acetilació dels PGC-1s. S'ha vist que l'activitat de PGC-1 α és inhibida per acetilació. El seu estat d'acetilació es troba directament regulat per l'acció combinada de l'aciltransferasa GCN5 i, com ja hem vist, la desacetilasa Sirt1 (21) (24) (359).

A nivell estructural aquests coactivadors presenten un elevat grau d'identitat en els dominis N- i C-terminals. L'extrem N-terminal conté un domini d'activació transcripcional i inclou motius d'interacció (LXXLL) amb receptors nuclears. La regió C-terminal conté un motiu d'unió a RNA (RMM) i un domini ric en serines i arginines (RS) responsables de la interacció amb els components de l'*spliceosoma* i amb el complex mediador TRAP/DRIP. La coexistència de dominis

d'activació transcripcional i de motius de processament de l'RNA són una característica pròpia dels PGC-1s i és inusual en altres coactivadors (360).

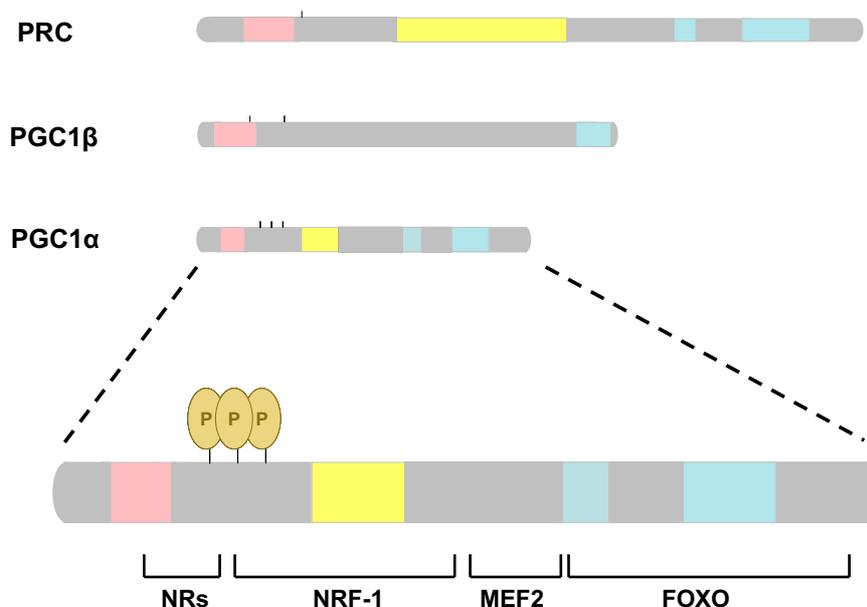


Figura 7. Esquema de l'estructura dels membres de la família PGC-1.
 Rosa: domini d'activació; Grog: domini ric en prolines; Blau: domini de reconeixement d'RNA i d'*splicing*.

Dues línies independents de ratolins deficientes en PGC-1 α (344) (361) i tres deficientes en PGC-1 β (362);(363);(318) s'han generat, a més de diferents ratolins on s'han deletat o sobreexpressat de manera teixit específica aquests coactivadors (347). De la mateixa manera, recentment s'ha creat una línia doble *KO* per PGC-1 α i PGC-1 β que ha permès clarificar els fenotips observats en els *KO* simples i ha evidenciat que, en determinats teixits com el cor o el TAM, ambdós coactivadors presenten dianes transcripcionals comuns i són capaços de compensar la pèrdua de funció d'un dels dos factors en els *KO* simples (360).

Un sorprenent estudi recent afirma que tant PGC1 α com SIRT1 estan presents també dins del mitocondri (364). Com ja hem esmentat, tant PGC1 α com SIRT1 juguen un paper fonamental en la biogènesi mitocondrial a través de la regulació de l'expressió dels gens mitocondrials codificats pel DNA nuclear. En aquest estudi però s'afirma que ambdues proteïnes es troben als mitocondris procedents tant de cèl·lules d'origen tumoral (Hela o HEK293) com de diversos

òrgans de ratolí (fetge, cervell i múscul esquelètic). El present article assegura a més, que tant PGC1 α com SIRT1 interaccionen amb TFAM als nucleoids, les estructures de DNA i proteïnes en les quals s'empaqueta el DNA mitocondrial (mtDNA) dins la matriu. TFAM és el principal factor de transcripció del mitocondri, i està implicat en la transcripció, la replicació i el manteniment del DNA mitocondrial. Degut a que TFAM pot trobar-se acetilat (365), els autors especulen que SIRT1 podria regular l'activitat de TFAM a través de la seva desacetilació com fa amb altres proteïnes fora del mitocondri. Així mateix PGC1 α podria regular la transcripció dependent de TFAM de la mateixa manera que fa amb diversos factors de transcripció nuclears, d'aquesta manera PGC1 α i SIRT1 promourien la biogènesi mitocondrial regulant de manera coordinada l'expressió de les proteïnes mitocondrials codificades pel genoma nuclear i pel genoma mitocondrial (364). Cal però, prendre's aquest estudi amb precaució perquè ni PGC1 α ni SIRT1 contenen cap seqüència coneguda d'import al mitocondri.

Com ja em esmentat extensament el paper dels PGC1s en la diferenciació i la termogènesi adaptativa al teixit adipós marró, a continuació parlarem de la seva rellevància a altres teixits.

PGC-1s en el cor.

En el cor, tant PGC1- α com PGC-1 β comparteixen funcions que són necessàries pel metabolisme postnatal i la correcta maduració funcional d'aquest teixit. De la mateixa manera que succeeix en el TAM, en el cor PGC-1 α i β tenen papers solapats en el control de gens vinculats a l'oxidació d'àcids grassos, el cicle de Krebs, la fosforilació oxidativa i l'oxidació de la glucosa. D'aquesta manera, la pèrdua d'un d'ells és compensada per l'altre. La generació del doble *KO* de PGC-1 ha permès clarificar les funcions d'aquestes proteïnes en el cor. Aquests animals mostren severes anormalitats estructurals i funcionals en aquest teixit així com un arrest en la maduració mitocondrial, fet que provoca la mort dels animals tot just després del naixement (366). Durant el desenvolupament fetal, el cor utilitza principalment glucosa i lactat com a fonts d'energia. La gran demanda energètica del cor adult es supleix, en gran part, per l'oxidació d'àcids grassos en els mitocondris (367). D'acord amb això, per cobrir les necessitats energètiques postnatsals, el cor pateix un "canvi metabòlic" i passa a utilitzar els àcids grassos com a principal font d'energia. Aquest canvi en el substrat energètic va acompanyat d'un gran increment del nombre de mitocondris i de la seva capacitat funcional (367). Les accions conjuntes de PGC-1 α i β suposen un component crític en el circuit molecular que dirigeix la biogènesi mitocondrial perinatal necessària per la maduració metabòlica i funcional del cor (366).

PGC-1s en el múscul esquelètic.

Una de les característiques del múscul esquelètic és la seva plasticitat, és a dir, la seva capacitat per adaptar-se davant diferents situacions fisiològiques que impliquin canvis en la demanda energètica. El múscul s'adapta a aquests canvis modificant l'expressió de gens implicats en el control dels programes metabòlics, incloent aquells que participen en la biogènesi mitocondrial, angiogènesi i en la determinació del tipus de fibra muscular.

El múscul esquelètic presenta uns nivells d'expressió elevats de PGC- α i β . La seva sobreexpressió, tant *in vitro* com *in vivo*, indueix de forma marcada la biogènesi mitocondrial i incrementa la respiració cel·lular. Ratolins transgènics que sobreexpressen aquests coactivadors en el múscul esquelètic mostren que, tant PGC-1 α com PGC-1 β , incrementen la capacitat oxidativa, la resistència a la fatiga, i suposen una millora en la realització de treball aeròbic (368).

PGC-1 i el tipus de fibra muscular: Les propietats metabòliques del múscul esquelètic venen determinades, en major part, pel tipus de fibra que presenten. Així, en el múscul dels ratolins adults, hi ha 4 tipus de fibres musculars predominants amb propietats metabòliques diferents: I, IIa, IIx i IIb. Els PGC-1s s'expressen majoritàriament en els músculs oxidatius, rics en fibres de tipus I i IIa. Aquests coactivadors juguen un paper crític en el manteniment de la composició del tipus de fibra muscular i de la seva integritat després de l'exercici. A més, poden alterar el perfil metabòlic del múscul provocant canvis en la composició del tipus de fibra. D'aquesta manera experiments de guany i pèrdua de funció de PGC-1 α *in vivo* han demostrat que aquest coactivador indueix la conversió de fibres IIb a fibres IIa, incrementant la capacitat oxidativa i una major resistència a la fatiga (369). En canvi, la sobreexpressió *in vivo* de PGC-1 β en el múscul esquelètic provoca un canvi a fibres oxidatives IIx (370). Malgrat que els factors de transcripció que medien la transició en el tipus de fibra no es coneixen gaire bé. S'ha descrit que MEF2s indueix l'expressió de gens propis de les fibres de tipus I, com la *troponina I lenta* i *mioglobina* (369). El fenotip dels ratolins PGC-1 α *-/-* en múscul esquelètic, o en l'animal sencer, suggereixen que pot existir una redundància entre PGC-1 α i β (368). Altres factors, com PPAR δ , també s'ha descrit que participen en la composició del tipus de fibra muscular (371); (372).

PGC-1 i l'exercici físic: L'entrenament físic provoca un increment de la biogènesi mitocondrial, així com un canvi en la composició del tipus de fibra, afavorint la transició de fibres ràpides a fibres lentes o oxidatives. L'expressió de PGC-1 α es veu molt incrementada en el múscul esquelètic d'humans i ratolins en resposta a l'exercici físic, a diferència de la de PGC-1 β que no es veu afectada (368). L'increment d'ambdós coreguladors implica un augment en la capacitat oxidativa del múscul esquelètic i una major resistència a la fatiga (369). Malgrat que els senyals corrent amunt involucrats en aquesta activació de PGC-1 α en resposta a l'exercici no es estan ben definits, hi estan implicades diferents vies de senyalització. S'ha descrit que la via de senyalització del calci a través de

MEF2 incrementa la transcripció de PGC-1 α en el múscul en resposta a l'exercici (373); (374). De la mateixa manera, l'activació de la p38 MAPK i de l'AMPK augmenten l'expressió de PGC-1 α en el múscul esquelètic després de l'exercici (375); (376).

PGC-1 i l'angiogènesi: El múscul oxidatiu conté un elevat nombre de capil·lars degut a les seves elevades necessitats d'oxigen, i aquest nombre augmenta en resposta a l'exercici. Recentment, s'ha descrit que PGC-1 α controla l'angiogènesi, tant en condicions fisiològiques com en resposta a la isquèmia, en el múscul esquelètic. PGC-1 α indueix l'expressió de VEGF, PDGFB, i angiopoietina 2 en cèl·lules en cultiu i en el múscul esquelètic *in vivo*. El mecanisme a través del qual PGC-1 α indueix l'expressió de VEGF no és el canònic, a través de HIF1 (377), sinó que implica a ERR α . D'aquesta manera, PGC-1 α i ERR α controlen, de manera independent a HIF1, l'adaptació del múscul esquelètic a situacions de demanda extra d'oxigen (377).

PGC-1 i el transport de glucosa: PGC-1 α també participa en la regulació del metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic. En aquest sentit, PGC-1 α indueix fortament l'expressió del transportador de glucosa GLUT4, a través de la coactivació de MEF-2c. A més a més, PGC-1 α reprimeix l'oxidació de glucosa en el múscul esquelètic, mitjançant l'activació de l'expressió del gen que codifica per la piruvat deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) a través d'ERR α . La inhibició de l'oxidació de la glucosa combinat amb l'augment del seu transport a l'interior del múscul esquelètic serveix per restablir els dipòsits de glicogen musculars (378).

PGC-1s en el múscul esquelètic.

En el fetge, a diferència del que succeeix en els altres teixits, PGC-1 α i β tenen papers diferents en el control del metabolisme energètic (379). Malgrat que els dos participen en el control de l'oxidació dels àcids grassos (369) presenten funcions independents en el control de la gluconeogènesi hepàtica, així com en la regulació de la lipogènesi i la secreció d'VLDL.

Ratolins normals alimentats *ad libitum* mostren nivells molt baixos d'expressió dels PGC-1s en fetge. Malgrat això, el dejuni incrementa de manera dramàtica l'expressió d'aquests cofactors (360). En models animals de DM1 (ratolins tractats amb estreptozotocina) o DM2 (ratolins ob/ob), l'expressió de PGC-1 α , però no la de PGC1- β , es troba induïda.

PGC-1 α a través de la interacció amb PPAR α , HNF4 i FoxO1 té un efecte directe en l'activació dels gens implicats en la gluconeogènesi. La infecció d'hepatòcits primaris amb un adenovirus que expressa PGC-1 α provoca un increment en l'expressió de *Pepck*, de la *fructosa-1,6-bifosfat* i de la *glucosa-6 fosfatasa*. En canvi, PGC-1 β , segurament degut en part a la seva incapacitat per interaccionar amb HNF4 i FoxO1, no té cap efecte en la regulació d'aquests gens (360); (379).

L'administració d'una dieta rica en àcids grassos saturats resulta en un augment de PGC-1 β , però no de PGC-1 α , en el fetge. La sobreexpressió del PGC-1 β en aquest teixit estimula la producció i secreció de TG, provocant una hipertrigliceridèmia i hipercolesterolèmia. De manera contrària, s'ha descrit que PGC-1 α , disminueix els TGs i la seva secreció. La regió de PGC-1 β que interacciona amb SREBP1c no està conservada entre els diferents membres de la família dels PGC1s, fet que explica aquesta selectivitat d'isotip (378).

Objectius

L'objectiu central de la present Tesi doctoral ha estat conèixer el paper de la sirtuïna SIRT3 en la regulació metabòlica. En el moment d'inici de la mateixa, els coneixements sobre SIRT3 eren mínims, però al llarg dels darrers anys s'ha produït una eclosió d'informació per part de diferents laboratoris i això, juntament amb les dades que s'han anat obtenint al laboratori, ha anat reorientat els objectius de la Tesi. Així doncs, bona part de la recerca realitzada, s'ha orientant específicament al coneixement del paper de SIRT3 en la funció i activitat termogènica del teixit adipós marró. D'altra banda, una eina important en la realització d'aquesta tesi doctoral ha estat la disponibilitat de ratolins dels ratolins SIRT3 -/-.

El objectius concrets de la present tesi doctoral es poden resumir en:

- Establir les alteracions en el metabolisme i l'expressió gènica al teixit adipós marró i altres teixits importants per el metabolisme energètic en situacions d'activació (transició fetal-neonatal, exposició al fred ambiental) o inhibició (dejuni) de la termogènesi en ratolins deficients per SIRT3
- Estudiar el paper de SIRT3 en la diferenciació i resposta hormonal dels adipòcits marrons
- Determinació de mecanismes moleculars de regulació de la transcripció del gen SIRT3 en adipòcits marrons

Resum global i discussió general

En el moment d'iniciar la present tesi doctoral existien molt poques evidències sobre la funció de la sirtuïna mitocondrial SIRT3, i les dades sobre la regulació de la seva expressió eren pràcticament inexistents. L'únic article que proposava un rol per a SIRT3, era el publicat per Shi i col·laboradors l'any 2005, en el qual es descrivia un possible paper de SIRT3 en el control de la funció termogènica en adipòcits marrons. Segons aquest estudi, SIRT3 s'expressava de manera preferent al teixit adipós marró (TAM) respecte al blanc i la seva expressió augmentava al TAM en resposta al fred. Estudis de sobrepressió de la forma de ratolí de SIRT3 en adipòcits HIB-1B comportaven un augment de l'expressió de PGC1 α , UCP1, i altres gens mitocondrials com les subunitats II i IV de la citocrom c oxidasa i l'ATP sintetasa (40).

Degut a l'experiència al nostre laboratori en l'estudi de la biologia del TAM, al interès que començava a despertar entre la comunitat científica la família de les sirtuïnes en el control del metabolisme a mamífers i a que SIRT3, una de les tres sirtuïnes mitocondrials descrites s'expressava abundantment al TAM, vam decidir centrar la present tesi doctoral en l'estudi de la regulació i de la funció de SIRT3 en aquest teixit.

Paral·lelament al desenvolupament del que aquí es presenta, el nombre d'articles sobre la que sembla ser la principal sirtuïna mitocondrial, no ha fet més que créixer i s'han anat acumulant evidències sobre el paper de SIRT3 en la regulació de diverses vies metabòliques en teixits de gran rellevància en el control de la homeòstasi energètica com són el fetge i el múscul esquelètic. No ha aparegut en els darrers anys però, cap nova referència que relacioni SIRT3 amb el teixit adipós. És més, alguns autors han qüestionat les dades presentades per Shi i col·laboradors, ja que la forma de SIRT3 sobreexpressada en el seu estudi era una forma curta descrita inicialment i que no contenia la seqüència d'import al mitocondri. Així, articles posteriors (42;44;45) posaven de manifest que els efectes descrits sobre l'estimulació de gens característics del TAM per part de SIRT3, eren deguts a algun tipus d'artefacte, ja que la forma emprada de SIRT3 no era capaç d'anar al mitocondri i aquesta s'acumulava erròniament al nucli i citosol. Així doncs, en el moment de redacció de la present tesi doctoral, el paper de SIRT3 en la fisiologia del teixit adipós marró es troba en discussió.

Una eina molt potent per tal d'estudiar la funció d'un gen determinat, és l'ús d'animals *knockout*. Degut a l'existència i disponibilitat del model de ratolins SIRT3 $-/-$, vam decidir utilitzar-los com a model d'estudi per tal de esbrinar els possibles rols fisiològics de SIRT3. En el moment de l'adquisició dels ratolins SIRT3 $-/-$, no existia cap referència en la literatura sobre aquest model i les dades de la casa comercial que subministrava els ratolins (*MMRRC, Mutant Mouse Regional Resource Center, USA*) indicaven que no presentaven un fenotip aparentment alterat en condicions normals. Aquesta, és una situació gens infreqüent en els animals *knockout*; sovint es desenvolupen mecanismes de compensació que fan que els efectes deleteris de la pèrdua de funció d'un gen, siguin compensats per altres gens i vies metabòliques. El nostre objectiu inicial, era el d'estudiar els possibles efectes de la manca de SIRT3 en diverses

situacions d'estrès metabòlic per tal d'intentar fer aflorar els efectes de la manca de SIRT3 en l'organisme.

El primer que vam haver de fer però, va ser establir una colònia de ratolins SIRT3 $-/-$. A partir de dos animals SIRT3 $-/-$ inicials, es va realitzar un *retrocreuament* amb ratolins C57BL/6J01a (Harlan) durant un mínim de sis generacions, per tal d'obtenir un rerefons genètic més homogeni, i evitar així els possibles efectes derivats d'una manca d'homogeneïtat en els animals d'estudi. Durant el desenvolupament de la colònia SIRT3 $-/-$, vam poder comprovar que efectivament la manca de la sirtuïna mitocondrial, tant en els individus heterozigots com en els homozigots SIRT3 $-/-$ no comportava un fenotip deleteri evident en condicions normals d'estabulació, que aquests ratolins no tenien problemes de fertilitat apreciables, i que els ratolins SIRT3 $-/-$ naixien normalment seguint les proporcions mendelianes. Així mateix, vam comprovar per Real Time PCR, que els ratolins SIRT3 $-/-$ no expressaven SIRT3 en cap dels teixits analitzats (teixit adipós marró, fetge, cor).

Un cop vam disposar de ratolins amb un rerefons genètic homogeni vam procedir a estudiar l'efecte de la manca de SIRT3 en una situació d'estimulació del TAM en el qual ratolins *wild-type* i ratolins SIRT3 $-/-$ de tres mesos d'edat van ser exposats durant tres setmanes a 4°C de temperatura. Els ratolins SIRT3 $-/-$ no presentaven una termogènesi adaptativa deficient, ja que eren capaços de mantenir estable la temperatura corporal igual que els ratolins *wild-type* i no presentaven diferències de pes significatives al llarg de l'experiment. En el moment del seu sacrifici, no presentaven paràmetres circulants alterats (glucosa, β -hidroxibutirat) ni tampoc hormonals (insulina, leptina, PAI-I). Així mateix, l'expressió de gens termogènics com UCP1, PRDM16, PGC1 α o DIO2 no es trobava alterada, ni tampoc l'expressió hepàtica de gens marcadors de l'oxidació de lípids (Ehhad), de la cetogènesi (HMG-CoA sintasa) o de la gluconeogènesi (PEPCK). Aquesta aparent normal adaptació al fred dels ratolins SIRT3 $-/-$ que observàvem en el nostre experiment de fred crònic està en consonància amb un article publicat paral·lelament per *Lombard* i col·laboradors, en el qual descrivien que els ratolins SIRT3 $-/-$ presenten una termogènesi adaptativa normal en ser exposats al fred en aquest cas de forma aguda, durant 6 hores (83).

La única alteració remarcable que vam poder detectar en els ratolins SIRT3 $-/-$ exposats al fred respecte als animals *wild-type*, va ser una ingesta incrementada significativament. Aquest es tracta possiblement d'un mecanisme adaptatiu dels ratolins SIRT3 $-/-$, tot i que el seu significat no és clar. Per una banda, no es produeix un increment de pes ni de la quantitat de teixit adipós marró en aquests ratolins respecte als animals *wild-type* fet que suggereix que aquest augment de la ingesta no es dona per tal d'augmentar el reclutament de teixit adipós marró als animals *knockout* degut a una ineficiència en la termogènesi. D'altra banda, com hem esmentat en la introducció, mitjançant la regulació de l'enzim LCAD (*Long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), SIRT3 estimula l'oxidació d'àcids grassos (50). Una possible explicació al increment de la ingesta dels

ratolins SIRT3 $-/-$ podria ser precisament una oxidació ineficient que no produís el combustible necessari per la termogènesi al teixit adipós marró i que l'augment de l'aliment ingerit fos un intent de compensar aquesta deficiència. En aquest sentit al teixit adipós marró dels ratolins SIRT3 $-/-$ s'observa certa tendència (malgrat no ser significativa) a l'augment de l'expressió de gens relacionats amb l'oxidació dels àcids grassos com l'Ehhad o PPAR α .

Ens vam plantejar aleshores una situació contrària; un estrès fisiològic en el qual es produís una inhibició de l'activitat del TAM, com és el cas el dejuni. Vam sotmetre ratolins SIRT3 $-/-$ i *wild-type* a 24 hores de dejuni i vam procedir al seu sacrifici. L'anàlisi de paràmetres circulants com la glucosa, els triacilglicèrids o els àcids grassos lliures no mostrava diferències significatives en els ratolins SIRT3 $-/-$ respecte als *wild-type*. Tampoc vam observar diferències en l'expressió gènica hepàtica de gens implicats en l'oxidació de lípids (Ehhad), la cetogènesi (HMG-CoA sintasa) o de la gluconeogènesi (PEPCK) ni al teixit adipós marró, en el qual no s'observa una alteració en l'expressió d'UCP1, PPAR α , Ehhad o PEPCK. Tot i així, vam observar una tendència a la disminució de la concentració en sang de β -hidroxibutirat i acetoacetat als ratolins SIRT3 $-/-$ sotmesos al dejuni en comparació amb els ratolins *wild-type*. Aquesta disminució, tot i que en el nostre cas no era significativa, està en consonància amb un article publicat posteriorment per *Eric Verdin* i col·laboradors, en el qual es mostra un impediment en la producció de cossos cetònics als ratolins SIRT3 $-/-$ degut al paper de SIRT3 en la regulació postranscripcional de l'enzim HGMCoA sintetasa, clau en la producció hepàtica de cossos cetònics (70). Desconeixem per què la disminució de cossos cetònics és significativa en el seu cas i no en el nostre, però podria ser degut a diferències en la soca de ratolí o en el nombre d'animals emprats en cada cas.

Com hem esmentat, sovint en els models de ratolins *knockout* es produeixen fenòmens de compensació que poden emmascarar l'efecte de la pèrdua de funció d'un gen determinat. Aquests fenòmens normalment es troben més consolidats en l'animal adult i a vegades, l'estudi de l'etapa perinatal, és un model òptim per determinar l'impacte de la manca d'un gen determinat. Per exemple, els ratolins PPAR α $-/-$, que gairebé no mostren un fenotip metabòlic en l'etapa adulta en estat d'alimentació, mostren un patró gènic alterat en alguns teixits durant l'etapa perinatal també en estat d'alimentació (277). Per aquest motiu ens vam proposar estudiar l'efecte de la manca de SIRT3 en aquestes condicions. Tant pels experiments de fetus com de l'etapa postnatal, es van comparar animals SIRT3 $-/-$ amb *wild-type* germans per tal d'evitar diferències entre camades.

L'expressió de SIRT3 augmenta significativament al TAM després del naixement en resposta a l'alimentació. Curiosament, aquest efecte no es dona si no deixem mamar els nounats. Aquest fet podria indicar que SIRT3 en el nounat es troba sota el control de detremnants nutrients presents en la llet materna. L'estudi de l'expressió gènica al TAM dels fetus a terme SIRT3 $-/-$ mostrava una disminució significativa en l'expressió de gens implicats en funcions específiques del teixit adipós marró com DIO2, PRDM16 o PGC1 α . Així mateix, UCP1 presentava certa

tendència a disminuir en aquests animals tot i que aquesta disminució no era significativa. Altres gens implicats en el catabolisme lipídic (Ehhad) i un marcador general d'adipogènesi com PPAR γ també presentaven una disminució significativa, mentre que gens gluconeogènics com PEPCK i gens codificants per a proteïnes mitocondrials (UQCRC1 i citocrom b) no es trobaven afectats. Després del naixement (12 hores) si a les cries se'ls impedia mamar, aquesta disminució significativa de gens relacionats amb la termogènesi (UCP1, DIO2, PRDM16) als ratolins SIRT3 -/- es mantenia, mentre que aquestes diferències es perdien si les cries tenien accés a la llet materna, tant a les 12 com a les 36 hores.

Per contra, l'estudi del fetge en l'etapa perinatal, mostra que el fetge dels ratolins SIRT3 -/- no presenta una expressió alterada en gens marcadors de l'oxidació lipídica (Ehhad, Acox1, CPT2B), la cetogènesi (HMGCoAS) o la gluconeogènesi (PEPCK, glucosa 6 fosfatasa). En canvi, s'observa una disminució significativa de l'expressió de gens del metabolisme lipídic (Ehhad, Acox1) a les 12 hores del naixement, així com una tendència a disminuir dels gens cetogènics (HMGCoAS). Aquesta alteració es veu ràpidament normalitzada a les 36 hores després del naixement.

Així, els resultats obtinguts en els estudis perinatals indicaven un efecte deleteri en l'expressió de gens hepàtics i de gens característics del TAM degut a la manca de SIRT3, alhora que suggerien l'existència de forts mecanismes compensatoris als ratolins adults, que en dificultaven l'estudi. Aleshores ens vam plantejar la necessitat de canviar de model i treballar amb models cel·lulars per tal d'aclarir el paper de SIRT3 en el teixit adipós marró i estudiar la seva pròpia regulació en aquest teixit.

És conegut que SIRT3 s'expressa preferentment al teixit adipós marró respecte al blanc (40) però fins ara es desconeixia la regulació de l'expressió de SIRT3 durant la diferenciació de TAM. Com ja hem esmentat l'expressió de SIRT3 al TAM augmenta amb el naixement, a més, mitjançant l'estudi de cultius primaris de TAM, vam determinar per Real Time PCR que SIRT3 s'indueix durant la diferenciació dels adipòcits marrons. Mentre que l'expressió de SIRT3 és baixa als preadipòcits (dia 4 de cultiu), assoleix el seu màxim quan els adipòcits es troben totalment diferenciats (dia 7-9). D'aquesta manera, veiem que SIRT3 segueix un perfil d'expressió molt similar al de gens termogènics característics d'aquest teixit com UCP1 o DIO2. Vam comprovar per *Western Blot* que l'augment del mRNA de SIRT3 durant la diferenciació dels adipòcits marrons efectivament es traduïa en un augment de la proteïna. Tal i com ja està descrit, l'augment dels nivells tant de PGC1 α com d'ERR α , reguladors de l'expressió gènica al TAM, també augmentaven durant la diferenciació del adipòcits, i ho feien abans que els de SIRT3 i UCP1, quelcom compatible amb una possible regulació de SIRT3 per part d'aquests factors de manera similar a la descrita per a UCP1. Cal remarcar però, que a diferència del que succeeix amb UCP1 i altres gens relacionats amb la termogènesi, l'expressió de SIRT3 no augmenta en resposta a noradrenalina en adipòcits ja diferenciats.

Tot i que ja havíem observat en els estudis *in vivo*, que els ratolins SIRT3 *-/-* presenten una quantitat de TAM normal i que aquest presenta una morfologia i uns nivells normals d'expressió de gens termogènics respecte als animals *wild-type*, vam voler determinar si la diferenciació dels adipòcits primaris es trobava afectada en absència de SIRT3. Per tal de fer-ho vam realitzar cultius primaris d'adipòcits marrons a partir de preadipòcits provinents de ratolins SIRT3 *-/-* en paral·lel amb cultius primaris *wild-type*. Vam observar que la diferenciació dels adipòcits SIRT3 *-/-* no es trobava impedida respecte a un cultiu paral·lel de adipòcits *wild-type*, ja que aquests mostraven una morfologia i una acumulació de lípids totalment normal. Així mateix, un cop diferenciats, els adipòcits marrons SIRT3 *-/-*, presentaven nivells basals normals de gens marcadors del teixit adipós marró (UCP1 i DIO2), així com de gens relacionats amb l'adipogènesi en general (FABP4) o amb la mitocondriogènesi (subunitat IV de la citocrom c oxidasa). Semblava doncs que l'absència de SIRT3 no era crítica per a la correcta diferenciació dels adipòcits marrons.

Malgrat que l'expressió basal de gens termogènics no es trobava alterada als adipòcits SIRT3 *-/-*, vam voler estudiar si la resposta a estímuls termogènics estava afectada degut a l'absència de SIRT3. Per fer-ho, vam tractar paral·lelament adipòcits marrons diferenciats *wild-type* i SIRT3 *-/-* amb noradrenalina o AMPc. De manera sorprenent la resposta a aquests estímuls termogènics, traduïda en un augment de l'expressió d'UCP1 i DIO2 es trobava clarament disminuïda als adipòcits SIRT3 *-/-* en els dos casos. Com era d'esperar, en cap dels dos models no veiem canvis en resposta a l'estimulació termogènica, en l'expressió del gen FABP4, marcador general de l'adipogènesi.

Per tal d'intentar reproduir els resultats obtinguts, vam voler utilitzar un altre model d'estudi; el d'adipòcits diferenciats a partir de MEFS, els quals mostren normalment un fenotip intermedi entre un adipòcit marró i un de blanc, i presenten una gran capacitat d'inducció dels gens termogènics (266). Vam realitzar novament cultius paral·lels de MEFS obtinguts de ratolins SIRT3 *-/-* i MEFS *wild-type* i vam obtenir resultats molt similars als del model de cultiu primari d'adipòcits marrons, és a dir; una diferenciació normal dels adipòcits SIRT3 *-/-*, uns nivells basals normals de marcadors termogènics i una resposta significativament disminuïda d'aquests adipòcits a l'estimulació per noradrenalina i AMPc.

Aquestes dades, suggerien que SIRT3, tot i no ser necessària per a la diferenciació dels adipòcits marrons en cultiu, sí que ho és per a una correcta resposta de la maquinaria gènica específica dels adipòcits marrons davant un estímul termogènica. Cal remarcar que en ambdós models d'estudi, els adipòcits SIRT3 *-/-* presenten nivells normals de receptor β 3-adrenergic, de manera que la manca de resposta de la via noradrenèrgica en aquest model no és conseqüència d'una manca de receptor i per tant, depèn d'algun mecanisme corrent avall en el qual SIRT3 juga un paper clau.

Com ja hem vist, SIRT3 té un perfil d'expressió durant la diferenciació de l'adipòcit marró mot similar al de gens característics de la maquinaria termogènica com UCP1 i DIO2 i que aquest es troba lleugerament desplaçat en el temps respecte al de l'expressió d'un regulador clau de la diferenciació i de l'adquisició del fenotip termogènic i de la resposta noradrenèrgica com és el corregulador transcripcional PGC1 α . Aquestes evidències ens van portar a estudiar la possible regulació per part de PGC1 α del gen SIRT3 a adipòcits.

Per fer-ho vam emprar un vector adenovíric per tal de sobreexpressar PGC1 α en diversos models d'adipòcit. Com a control, tant del grau d'infecció a nivell visual, com de l'especificitat de que els efectes observats són deguts la sobreexpressió específica de PGC1 α , varem emprar paral·lelament un adenovirus que codifica per la proteïna GFP.

La sobreexpressió de PGC α , comprovada tant a nivell de mRNA com de proteïna, augmentava al seu torn de manera sistemàtica l'expressió de SIRT3 tant en un model típic d'adipòcits marrons com la línia cel·lular de ratolí HIB-1B, com en la línia d'adipòcits blancs humans SGBS així com ens els adipòcits derivats de MEFS. Aquesta inducció de SIRT3 era paral·lela en els tres models d'estudi a la característica inducció per part de PGC1 α de gens termogènics com UCP1 i DIO2. Així mateix, l'expressió d'un marcador adipogènic no específic d'adipòcit marró i no regulat per PGC1 α com és la FABP4, no es trobava alterada a causa de l'augment de PGC1 α . Els resultats obtinguts suggerien que SIRT3 pertany al conjunt de gens regulats per PGC1 α que determinen el fenotip diferencial entre adipòcits marrons i blancs.

Aquest fet, juntament amb l'impediment de la resposta noradrenèrgica ens els adipòcits SIRT3 $-/-$, ens va portar a estudiar si la inducció de gens termogènics per part de PGC1 α es trobava també afectada en absència de SIRT3. Per fer-ho vam sobreexpressar PGC1 α paral·lelament a MEFS *wild-type* i MEFS obtinguts de ratolins SIRT3 $-/-$. De manera similar al observat anteriorment, la inducció de UCP1 i DIO2 en resposta a PGC1 α , es troba clarament afectada en els MEFS SIRT3 $-/-$. Aquest efecte és degut a algun mecanisme corrent avall de PGC1 α en el qual SIRT3 està implicada i no a efectes derivats d'una eficiència d'infecció disminuïda en els MEFS SIRT3 $-/-$, ja que el grau de sobreexpressió de PGC1 α (comprovat tant a nivell d'mRNA com de proteïna) era similar en els MEFS SIRT3 $-/-$ respecte als *wild-type*.

Un cop vista la possible implicació de PGC1 α en la regulació de l'expressió de SIRT3, vam voler aprofundir en el mecanisme d'aquest efecte per tal d'intentar descriure la resta de factors de transcripció implicats. Per tal de fer-ho, ens vam plantejar un abordatge a nivell d'estudi del promotor de SIRT3 de ratolí. L'estudi *in silico* de la regió 5' corrent amunt del gen, mostrava una estructura característica; l'inici de transcripció del gen SIRT3 es troba molt a prop (concretament a 85 parells de bases) del inici de transcripció d'un altre gen, el PSDM13, un gen del proteosoma poc caracteritzat. Aquesta disposició d'ambdós

gens, es conservava també en rata i en humans i, tot i que la distancia en aquest darrer cas, és bastant més gran, de prop d'una kilobase.

S'ha vist que aquesta estructura de dos gens capicuat compartint una regió 5' no és del tot infreqüent i normalment implica que aquests gens comparteixen elements reguladors. De totes maneres un estudi en el qual es va clonar en vectors reporters aquesta regió intergènica de la forma humana en ambdues direccions, indicava que els dos gens podrien tenir una regulació diferencial (380). En aquest sentit, dades d'mRNA obtingudes al nostre laboratori semblen indicar que en el cas del ratolí, aquesta regulació dels dos gens, per exemple per sobrepressió de PGC1 α , és també diferencial (dades no mostrades).

Així doncs, per tal d'aprofundir en la regulació de l'expressió de SIRT3 vam decidir clonar la regió promotora del gen SIRT3 de ratolí en un plasmidi que contenia la luciferasa com a gen reporter. Vam clonar inicialment un fragment d'aproximadament una kilobase corresponent a la regió 5' del gen (que incloïa per tant, part no codificant del gen PSMD13). En ser transfectat en cèl·lules HIB-1B, mostrava una elevada activitat promotora, comparable, i fins i tot superior, a promotors com el del gen UCP1 i PGC1 α , típicament utilitzats al nostre laboratori.

Posteriorment, mitjançant estudis de cotransfecció amb un vector que expressa la forma murina de PGC1 α vam comprovar que, de la mateixa manera que el que succeïa amb el gen endogen, PGC1 α era capaç d'induir l'activitat promotora del constructe de manera significativa. Degut a que, com ja hem vist PGC1 α és un corregulador de la transcripció que necessita d'altres proteïnes per activar l'expressió gènica, vam testar diversos factors de transcripció y receptors nuclears els quals se sap que són corregulats en diverses situacions per PGC1 α . Entre ells NRF1, NRF2 α , NRF2 β , PPAR α , PPAR γ , ERR α i els receptors de tiroides α i β .

De tots els factors provats, només ERR α era capaç d'augmentar per si sol l'activitat del promotor SIRT3 de manera significativa. A més, en ser cotransfectat amb PGC1 α , s'aconseguia un efecte additiu en l'activitat promotora.

Per tal de localitzar els elements de resposta a través dels quals es produiria l'acció de PGC1 α i ERR α sobre l'expressió de SIRT3, es va procedir a realitzar un escurçament del promotor de SIRT3 a partir del constructe de 956 SIRT3-Luc, de tal manera que només inclogués la regió entre els dos gens. El resultat va ser un fragment d'uns 100 parells de bases (-85/+22) que conservava part de l'activitat promotora i sobretot, la capacitat de transactivació per part de PGC1 α i ERR α , tant per si soles com en combinació de les dues, fet que indicava que en aquesta regió intergènica es trobaven els possibles elements principals de resposta a través dels quals estarien actuant PGC1 α i ERR α sobre l'expressió de SIRT3.

Es va procedir a un anàlisi informàtic d'aquesta regió proximal del promotor i es van identificar dos possibles llocs d'unió de la superfamília de receptors

d'hormones, la qual inclou el receptor $ERR\alpha$. La mutació dels dos elements putatius per separat, produïa una disminució parcial de la inducció de l'activitat promotora per part de $PGC1\alpha$ i $ERR\alpha$, mentre que la mutació conjunta dels dos elements eliminava per complet l'activació, tant per separat com quan actuen conjuntament, fet que feia pensar que havíem identificat els dos principals llocs d'unió a través dels quals $PGC1\alpha$ i $ERR\alpha$ activarien l'expressió de SIRT3 en adipòcits.

Per assegurar-nos que $PGC1\alpha$ i $ERR\alpha$ s'unien a aquesta regió promotora de SIRT3 vam decidir realitzar assajos d'immunoprecipitació de cromatina (Chip). Primerament vam voler comprovar que $PGC1\alpha$ s'unia a aquesta regió proximal en el gen endogen en adipòcits marrons. Per fer-ho, vam immunoprecipitar amb un anticòs específic per a $PGC1\alpha$, extractes provinents de cultius primaris d'adipòcits marrons. Vam dissenyar uns primers específics per tal d'amplificar per PCR la regió 5' proximal de SIRT3 (-107/+18) i efectivament vam comprovar que la immunoprecipitació amb $PGC1\alpha$ comportava un enriquiment específic de la banda corresponent a la regió d'interès respecte a la immunoprecipitació amb un anticòs control (anti IgGs). Com a control negatiu vam amplificar una regió intragènica del gen SIRT3 on teòricament hom no esperaria la unió de $PGC1\alpha$, i efectivament no vam detectar cap enriquiment.

Un cop confirmada la unió del $PGC1\alpha$ endogen a la regió proximal del gen SIRT3, vam voler comprovar si aquesta unió tenia lloc específicament als elements de resposta putatius que havíem identificat anteriorment. Per fer-ho vam co-transfectar cèl·lules HIB-1B amb el vector d'expressió de $PGC1\alpha$ i amb el vector reporter 956 SIRT3-Luc tant en la seva forma *wild-type* com en la que contenia els dos possibles elements de resposta mutats. Posteriorment vam immunoprecipitar novament amb l'anticòs de $PGC1\alpha$ i vam comprovar que la mutació dels llocs d'unió a receptor, comportava una disminució significativa de la unió de $PGC1\alpha$ a aquesta regió.

Volíem detectar també la unió d' $ERR\alpha$ a la regió promotora de SIRT3 però degut a que no existien gaires referències a la literatura de Chip immunoprecipitant l' $ERR\alpha$ endogen, ni d'anticòsos fiables per a aquest propòsit, vam decidir treballar amb un vector que expressés un $ERR\alpha$ amb un tag HA. Així, vam transfectar cèl·lules HIB-1B amb aquest vector $ERR\alpha$ -HA, i vam immunoprecipitar amb un anticòs anti-HA. L'enriquiment específic obtingut per PCR de la zona corresponent a la regió proximal de SIRT3, ens indicava que, efectivament $ERR\alpha$ s'uneix aquesta regió promotora del gen endogen que conté els dos possibles elements de resposta que havíem descrit.

Un cop comprovada la transactivació del promotor de SIRT3 i la unió específica a aquest per part d' $ERR\alpha$, vam voler comprovar que $ERR\alpha$ era efectivament capaç d'activar l'expressió del gen endogen. Per fer-ho vam infectar MEFS amb un adenovirus que dirigeix l'expressió de $ERR\alpha$. La sobreexpressió d' $ERR\alpha$, causava un lleuger però significatiu augment de l'expressió de SIRT3. La infecció conjunta amb l'adenovirus de $PGC1\alpha$, produïa un efecte additiu dels dos factors,

fet que reforçava la idea de la seva acció conjunta en la transactivació de l'expressió del gen.

Per acabar de definir el paper d'ERR α en l'expressió de SIRT3 vam voler veure l'efecte que produïa la seva inhibició. Per fer-ho, vam utilitzar dues estratègies complementàries. Primerament vam infectar adipòcits provinents de MEFS amb un adenovirus siERR α , aconseguint com a resultat reduir fins a un 70% l'expressió de l'ERR α endogen, fet que es traduïa en una disminució de fins a un 30% de l'expressió basal de SIRT3. A més, en combinació amb l'adenovirus de PGC1 α , la inhibició de l'expressió d'ERR α produïa una disminució significativa de l'estimulació de l'expressió de SIRT3 per part de PGC1 α . Una segona estratègia, va ser l'ús de l'inhibidor específic de ERR α , XCT-790. En combinació amb l'adenovirus de PGC1 α , era capaç de disminuir fins un 40% l'activació de l'expressió de SIRT3 per part d'aquest. Ambdues estratègies posaven de manifest el paper d'ERR α en l'activació de l'expressió de SIRT3 per part de PGC1 α .

Com hem esmentat, el coregulador transcripcional PGC1 α és essencial per coordinar la regulació de l'expressió dels gens que determinen què l'adipòcit marró adquireixi la seva capacitat termogènica (213) . És a més també necessària perquè l'adipòcit marró adquireixi la sensibilitat als estímuls termogènics que arriben via noradrenèrgica (278) . Les evidències recopilades en la present tesi doctoral , que suposen el primer estudi sobre la regulació de SIRT3 en adipòcits marrons, indiquen que SIRT3 també es troba sota el control transcripcional de PGC1 α en adipòcits marrons i que la seva expressió, és essencial per a una completa adquisició de la capacitat termogènica de l'adipòcit marró.

El mecanisme a través del qual, SIRT3, una sirtuïna que resideix al mitocondri podria vehicular la inducció de gens nuclears, roman encara per aclarir. Com hem esmentat , existeix certa controvèrsia sobre si SIRT3 podria residir al nucli, i mitjançant la seva activitat desacetilasa, podria estar participant directament en el control de l'activitat de factors de transcripció o en l'estat d'acetilació d'histones nuclears (47). També podria ser que SIRT3 mitjances directa o indirectament en alguna senyal mitocondri-nucli. *Shi* i col·laboradors ja van descriure que la sobreexpressió de SIRT3 era capaç de produir un augment de l'expressió d' UCP1, de manera dependent de l'estat de fosforilació de CREBP (40). Els actors en la cascada de fosforilació de la via noradrenèrgica implicats es desconeixen. A més, com ja hem esmentat, aquests estudis han estat fortament debatuts degut a que la forma de SIRT3 sobreexpressada en aquell article, era la forma curta descrita inicialment, que no contenia la seqüència d'import al mitocondri. Així, articles posteriors posaven de manifest que els efectes observats eren deguts a algun tipus d'artefacte, ja que la forma emprada de SIRT3 no aniria al mitocondri i s'acumulava erròniament al nucli i citosol (43). En qualsevol cas, els nostres estudis amb dos models d'adipòcits que no expressen SIRT3, demostren que SIRT3 és un component essencial de la correcta resposta termogènica de l'adipòcit marró mediada per PGC1 α .

Tot i que PGC1 α pot coactivar multitud de receptors nuclears i factors de transcripció, segons les dades presentades en el present treball, sembla que la seva acció sobre l'expressió de SIRT3 implicaria principalment el receptor nuclear orfe ERR α . Aquest fet és totalment consistent amb el paper conegut d'ERR α en l'adipòcit marró i amb el fet que ERR α està implicat majoritàriament en l'expressió de proteïnes mitocondrials. Així, està descrit que ERR α és essencial en l'adaptació al fred com evidencia el fet que els ratolins ERR α -/- presenten una incapacitat per mantenir la temperatura corporal en ser exposats al fred (322). ERR α és necessari per a garantir l'elevada capacitat oxidativa que precisa l'adipòcit marró per obtenir l'energia necessària per a realitzar la termogènesi. A més, ERR α activa directament, precisament a través de la seva interacció amb PGC1 α , l'expressió de gens termogènics com el propi UCP1 (381). Així, les evidències aportades en aquest treball, posen de manifest que SIRT3 forma part del conjunt de gens necessaris per a la correcta funcionalitat del TAM que es troben regulats per la parella PGC1 α -ERR α .

Precisament durant el període terminal de redacció de la present tesi doctoral ha aparegut un article publicat per Kong i col·laboradors on es descriu que PGC1 α també regula positivament l'expressió de SIRT3 en el context de la cèl·lula muscular i que ho fa també a través de la seva interacció amb ERR α (382). Aquesta regulació de l'expressió de SIRT3 per part de PGC1 α també en el context del múscul esquelètic, és totalment consistent amb el fet que tant SIRT3 com PGC1 α s'expressen preferentment en fibres musculars de tipus I (més oxidatives) i en resposta al exercici (74). Així doncs, sembla que l'eix PGC1 α -SIRT3 seria de rellevància, a més de al teixit adipós marró, en altres teixits.

Un cop establida la relació entre PGC1 α i la regulació de l'expressió de SIRT3, és temptador pensar en un eix SIRT1-PGC1 α -SIRT3 que relacioni les dues principals sirtuïnes implicades en la regulació metabòlica. Nombroses evidències indiquen que SIRT3 i SIRT1 són necessàries per a vehicular les respostes que es donen durant la restricció calòrica. Ja hem esmentat que SIRT1 desacetila PGC1 α , augmentant-ne la seva capacitat d'activar la transcripció (21). En condicions de restricció calòrica es dona un augment de l'expressió de SIRT1 així com dels nivells de NAD⁺, fet que resulta en un increment de la biogènesi mitocondrial mediada per PGC1 α en teixits com el múscul o el teixit adipós blanc (383). Com hem vist, l'expressió de SIRT3 també augmenta en diversos teixits (com el propi TAM) en aquestes condicions (40;66;88) així com ho fa la relació NAD⁺/NADH intramitocondrial (72), fet que augmentaria l'activitat de SIRT3 de forma coordinada amb la seva expressió. Així, en un teòric eix SIRT1-PGC1 α -SIRT3 podria coordinar les respostes del nucli i el mitocondri en alguns teixits en determinades situacions metabòliques com la restricció calòrica. Així ho suggereix una revisió publicada recentment a la revista *Molecular Cell* (384) en la qual es fa referència al nostre treball (385).

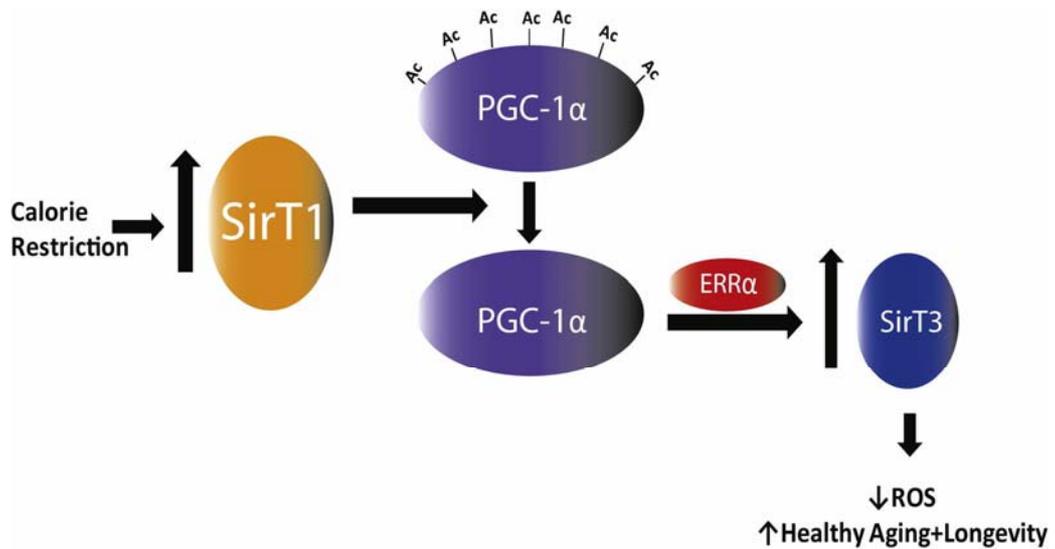


Figura 8. Model a través del qual SIRT1 i SIRT3 cooperarien en condicions d'una disminució del consum de calories. Els nivells de SIRT1 i la seva activitat s'incrementen, fet que porta a la desacetilació i l'activació de PGC1 α . La transactivació de ERR α per part de PGC1 α incrementa la transcripció de SIRT3, fet que resultaria en una disminució de la producció de ROS i els conseqüents efectes beneficiosos sobre l'envelliment. *Mol Cell.* 2011 Jun 10;42(5):561-8. *The SirT3 Divining Rod Points to Oxidative Stress.* Bell EL, Guarente L.

Conclusions

1. En el període perinatal la manca de SIRT3 comporta una alteració en l'expressió de gens marcadors de la termogènesi al teixit adipós marró (uncoupling protein-1, 5'-deiodinasa, PRDM16) així com de diversos gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos al fetge (enoil-CoA, hidratasa/3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa, acil-CoA oxidasa).
2. En ser exposats a un estímul de fred crònic, els ratolins adults SIRT3 $-/-$ no presenten una afectació evident en la seva adaptació al fred ni en l'expressió de gens termogènics al teixit adipós marró.
3. En ser sotmesos a un dejuni de 24 hores, els ratolins adults SIRT3 $-/-$, no presenten alteracions en els paràmetres circulants ni en l'expressió gènica de diversos marcadors del metabolisme energètic al fetge i al teixit adipós marró.
4. L'expressió de SIRT3 està associada a la diferenciació terminal de l'adipòcit marró.
5. SIRT3 és necessària per una correcta inducció de l'expressió dels gens termogènics en adipòcits marrons en resposta a l'activació noradrenèrgica mediada per AMPc.
6. PGC1 α indueix l'expressió de SIRT3 en adipòcits blancs i fibroblasts embrionaris com a part de la inducció global del patró d'expressió gènica específic del teixit adipós marró.
7. En fibroblasts embrionaris SIRT3 $-/-$, PGC1 α no pot induir adequadament l'expressió de gens termogènics específics de l'adipòcit marró.
8. PGC1 α activa la transcripció del gen SIRT3 a través de la coactivació del receptor nuclear orfe ERR α , el qual s'uneix a la regió proximal del promotor del gen SIRT3.
9. ERR α és necessari per a la completa inducció de l'expressió del gen SIRT3 en resposta a PGC1 α .
10. En general es pot concloure que PGC1 α controla l'expressió de SIRT3, essent aquesta acció un component essencial del mecanisme global a través del qual PGC1 α indueix la completa adquisició del fenotip d'adipòcit marró diferenciat.

Bibliografia

1. **Smith JS, Boeke JD** 1997 An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 11:241-254
2. **Bryk M, Banerjee M, Murphy M, Knudsen KE, Garfinkel DJ, Curcio MJ** 1997 Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev* 11:255-269
3. **Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nystrom T** 2003 Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299:1751-1753
4. **Chen D, Guarente L** 2007 SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol Med* 13:64-71
5. **North BJ, Verdin E** 2004 Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* 5:224
6. **Sinclair DA** 2005 Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126:987-1002
7. **Haigis MC, Sinclair DA** 2010 Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253-295
8. **Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, Lamming DW, Souza-Pinto NC, Bohr VA, Rosenzweig A, de CR, Sauve AA, Sinclair DA** 2007 Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* 130:1095-1107
9. **Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de CR, Sinclair DA** 2004 Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390-392
10. **Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, Xuan J, Evans M, Harper ME, McBurney MW** 2008 SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One* 3:e1759
11. **Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L** 2005 Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* 310:1641
12. **Herranz D, Serrano M** 2010 SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer* 10:819-823
13. **Tong L, Denu JM** 2010 Function and metabolism of sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* 1804:1617-1625

14. **Yang T, Sauve AA** 2006 NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J* 8:E632-E643
15. **Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F** 2006 Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:1524-1531
16. **Yang B, Zwaans BM, Eckersdorff M, Lombard DB** 2009 The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell Cycle* 8:2662-2663
17. **Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF** 2008 SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452:492-496
18. **Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L** 2006 Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 20:1075-1080
19. **Tang BL, Chua CE** 2008 SIRT2, tubulin deacetylation, and oligodendroglia differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:179-182
20. **Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E** 2010 Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta*
21. **Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P** 2005 Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118
22. **Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J** 2009 AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458:1056-1060
23. **Canto C, Auwerx J** 2008 Glucose restriction: longevity SIRTainly, but without building muscle? *Dev Cell* 14:642-644
24. **Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P** 2007 Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 26:1913-1923
25. **Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2009 SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem* 284:21872-21880

26. **Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakki C, Elliott PJ, Auwerx J** 2008 Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8:347-358
27. **Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt MA, Imai S** 2005 Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2:105-117
28. **Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L** 2006 Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4:e31
29. **Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De OR, Leid M, McBurney MW, Guarente L** 2004 Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429:771-776
30. **Qiao L, Shao J** 2006 SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem* 281:39915-39924
31. **Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L** 2007 SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28:91-106
32. **Yi J, Luo J** 2010 SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1804:1684-1689
33. **Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y** 2006 Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* 23:607-618
34. **Paik WK, Pearson D, Lee HW, Kim S** 1970 Nonenzymatic acetylation of histones with acetyl-CoA. *Biochim Biophys Acta* 213:513-522
35. **Ramponi G, Manao G, Camici G** 1975 Nonenzymatic acetylation of histones with acetyl phosphate and acetyl adenylate. *Biochemistry* 14:2681-2685
36. **Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E** 2002 The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158:647-657
37. **Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Jr., Weissman S, Verdin E, Schwer B** 2007

- Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27:8807-8814
38. **Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L** 2006 SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126:941-954
 39. **Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L** 2005 Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 280:21313-21320
 40. **Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q** 2005 SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280:13560-13567
 41. **Yang YH, Chen YH, Zhang CY, Nimmakayalu MA, Ward DC, Weissman S** 2000 Cloning and characterization of two mouse genes with homology to the yeast Sir2 gene. *Genomics* 69:355-369
 42. **Cooper HM, Huang JY, Verdin E, Spelbrink JN** 2009 A new splice variant of the mouse SIRT3 gene encodes the mitochondrial precursor protein. *PLoS One* 4:e4986
 43. **Hallows WC, Albaugh BN, Denu JM** 2008 Where in the cell is SIRT3?--functional localization of an NAD⁺-dependent protein deacetylase. *Biochem J* 411:e11-e13
 44. **Jin L, Galonek H, Israelian K, Choy W, Morrison M, Xia Y, Wang X, Xu Y, Yang Y, Smith JJ, Hoffmann E, Carney DP, Perni RB, Jirousek MR, Bemis JE, Milne JC, Sinclair DA, Westphal CH** 2009 Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. *Protein Sci* 18:514-525
 45. **Bao J, Lu Z, Joseph JJ, Carabenciov D, Dimond CC, Pang L, Samsel L, McCoy JP, Jr., Leclerc J, Nguyen P, Gius D, Sack MN** 2010 Characterization of the murine SIRT3 mitochondrial localization sequence and comparison of mitochondrial enrichment and deacetylase activity of long and short SIRT3 isoforms. *J Cell Biochem*
 46. **Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP** 2008 SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 28:6384-6401
 47. **Scher MB, Vaquero A, Reinberg D** 2007 SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev* 21:920-928

48. **Nakamura Y, Ogura M, Tanaka D, Inagaki N** 2008 Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem Biophys Res Commun* 366:174-179
49. **Cooper HM, Spelbrink JN** 2008 The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial. *Biochem J* 411:279-285
50. **Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Jr., Alt FW, Kahn CR, Verdin E** 2010 SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464:121-125
51. **Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T** 2008 A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14447-14452
52. **Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC** 2010 Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 49:304-311
53. **Colman RF, Frieden C** 1966 On the role of amino groups in the structure and function of glutamate dehydrogenase. I. Effect of acetylation on catalytic and regulatory properties. *J Biol Chem* 241:3652-3660
54. **Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E** 2007 Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 282:33583-33592
55. **Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra PV, Isbatan A, Gupta MP** 2010 Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem* 285:3133-3144
56. **Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG** 2010 Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria. *J Cell Sci* 123:894-902
57. **Hallows WC, Lee S, Denu JM** 2006 Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10230-10235
58. **Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E** 2006 Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10224-10229

59. **Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT** 2001 Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 276:11420-11426
60. **Skutches CL, Holroyde CP, Myers RN, Paul P, Reichard GA** 1979 Plasma acetate turnover and oxidation. *J Clin Invest* 64:708-713
61. **Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, MELLEEMGAARD K, MUNCK-PETERSEN S** 1962 Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver. *J Clin Invest* 41:955-961
62. **Leighton F, Bergseth S, Rortveit T, Christiansen EN, Bremer J** 1989 Free acetate production by rat hepatocytes during peroxisomal fatty acid and dicarboxylic acid oxidation. *J Biol Chem* 264:10347-10350
63. **Murthy VK, Steiner G** 1973 Hepatic acetate levels in relation to altered lipid metabolism. *Metabolism* 22:81-84
64. **Seufert CD, Graf M, Janson G, Kuhn A, Soling HD** 1974 Formation of free acetate by isolated perfused livers from normal, starved and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 57:901-909
65. **Sakakibara I, Fujino T, Ishii M, Tanaka T, Shimosawa T, Miura S, Zhang W, Tokutake Y, Yamamoto J, Awano M, Iwasaki S, Motoike T, Okamura M, Inagaki T, Kita K, Ezaki O, Naito M, Kuwaki T, Chohnan S, Yamamoto TT, Hammer RE, Kodama T, Yanagisawa M, Sakai J** 2009 Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. *Cell Metab* 9:191-202
66. **Hallows WC, Yu W, Smith BC, Devires MK, Ellinger JJ, Someya S, Shortreed MR, Prolla T, Markley JL, Smith LM, Zhao S, Guan KL, Denu JM** 2011 Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell* 41:139-149
67. **Bao J, Scott I, Lu Z, Pang L, Dimond CC, Gius D, Sack MN** 2010 SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity. *Free Radic Biol Med*
68. **Kendrick AA, Choudhury M, Rahman SM, McCurdy CE, Friederich M, Vanhove JL, Watson PA, Birdsey N, Bao J, Gius D, Sack MN, Jing E, Kahn CR, Friedman JE, Jonscher KR** 2010 Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochem J*
69. **Shi T, Fan GQ, Xiao SD** 2010 SIRT3 reduces lipid accumulation via AMPK activation in human hepatic cells. *J Dig Dis* 11:55-62
70. **Shimazu T, Hirschey MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP, Verdin E** 2010 SIRT3 Deacetylates Mitochondrial 3-Hydroxy-3-

Methylglutaryl CoA Synthase 2 and Regulates Ketone Body Production. *Cell Metab* 12:654-661

71. **Hirschev MD, Shimazu T, Capra JA, Pollard KS, Verdin E** 2011 SIRT1 and SIRT3 Deacetylate Homologous Substrates: AceCS1,2 and HMGCS1,2. *Aging (Albany NY)*
72. **Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L** 2009 SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560-570
73. **Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M, Inagaki N** 2010 Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 393:73-78
74. **Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Iii JL, Goodyear LJ, Tong Q** 2009 Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)* 1:771-783
75. **Hokari F, Kawasaki E, Sakai A, Koshinaka K, Sakuma K, Kawanaka K** 2010 Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol*
76. **Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, McConnell JP, Nair KS** 2008 Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* 57:2933-2942
77. **Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA** 2004 Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580-1589
78. **Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP** 2009 Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest* 119:2758-2771
79. **Hafner AV, Dai J, Gomes AP, Xiao CY, Palmeira CM, Rosenzweig A, Sinclair DA** 2010 Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)* 2:914-923
80. **Masoro EJ** 2000 Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35:299-305
81. **Balaban RS, Nemoto S, Finkel T** 2005 Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495
82. **Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA** 2010 Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction. *Cell* 143:802-812

83. **Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirsche MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Jr., Weissman S, Verdin E, Schwer B** 2007 Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27:8807-8814
84. **Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, Steegborn C** 2008 Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* 382:790-801
85. **Qiu X, Brown K, Hirsche MD, Verdin E, Chen D** 2010 Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* 12:662-667
86. **Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, Kim HS, Flynn CR, Hill S, Hayes MW, Olivier AK, Spitz DR, Gius D** 2010 Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell* 40:893-904
87. **Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, Singh KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng CX, Gius D** 2010 SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 17:41-52
88. **Perez VI, Van RH, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, Richardson A** 2009 The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8:73-75
89. **Schwer B, Eckersdorff M, Li Y, Silva JC, Fermin D, Kurtev MV, Giallourakis C, Comb MJ, Alt FW, Lombard DB** 2009 Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell* 8:604-606
90. **Sherr CJ** 2004 Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-246
91. **Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L** 2011 SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene*
92. **Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP, Haigis MC** 2011 SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell* 19:416-428
93. **Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De RF, Greco V, Maggiolini M, Feraco E, Mari V, Franceschi C, Passarino G, De BG** 2005 A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human

homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 85:258-263

94. **Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V, Passarino G, Feraco E, Mari V, Barbi C, BonaFe M, Franceschi C, Tan Q, Boiko S, Yashin AI, De BG** 2003 Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol* 38:1065-1070
95. **Cinti S** 2005 The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:9-15
96. **Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R** 1992 Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-233
97. **Himms-Hagen J** 1990 Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J* 4:2890-2898
98. **Gimble JM** 1990 The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* 2:304-312
99. **Klaus S, Keijer J** 2004 Gene expression profiling of adipose tissue: individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition* 20:115-120
100. **Mackay DL, Tesar PJ, Liang LN, Haynesworth SE** 2006 Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J Cell Physiol* 207:722-728
101. **Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW** 2005 Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 183:13-30
102. **Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR** 2006 Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6676-6681
103. **Trayhurn P** 2007 Adipocyte biology. *Obes Rev* 8 Suppl 1:41-44
104. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809
105. **Green H, Kehinde O** 1975 An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27
106. **Green H, Kehinde O** 1976 Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113
107. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H** 2001 Characterization of a human

- preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:8-15
108. **Newell FS, Su H, Tornqvist H, Whitehead JP, Prins JB, Hutley LJ** 2006 Characterization of the transcriptional and functional effects of fibroblast growth factor-1 on human preadipocyte differentiation. *FASEB J* 20:2615-2617
 109. **Pairault J, Green H** 1979 A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5138-5142
 110. **MacDougald OA, Lane MD** 1995 Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64:345-373
 111. **Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA** 1998 The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:30057-30060
 112. **Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P** 1993 Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 268:6823-6826
 113. **Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M** 2002 Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:2045-2055
 114. **Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM** 1999 Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3:151-158
 115. **Rosen ED, Spiegelman BM** 2000 Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145-171
 116. **Levine JA, Jensen MD, Eberhardt NL, O'Brien T** 1998 Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *J Clin Invest* 101:1557-1564
 117. **Gaillard D, Negrel R, Lagarde M, Ailhaud G** 1989 Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J* 257:389-397
 118. **Diascro DD, Jr., Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzenberger SM, Rutledge SJ, Prescott DJ, Rodan GA, Schmidt A** 1998 High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 13:96-106
 119. **Yarwood SJ, Anderson NG, Kilgour E** 1995 Cyclic AMP modulates adipogenesis in 3T3-F442A cells. *Biochem Soc Trans* 23:175S

120. **Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Negrel R, Ailhaud G** 2000 Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* 160:149-156
121. **Rosen ED, MacDougald OA** 2006 Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896
122. **Choy L, Skillington J, Derynck R** 2000 Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 149:667-682
123. **Ohsumi J, Miyadai K, Kawashima I, Sakakibara S, Yamaguchi J, Itoh Y** 1994 Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by interleukin-11/adipogenesis inhibitory factor. *Biochem Mol Biol Int* 32:705-712
124. **Ohsumi J, Sakakibara S, Yamaguchi J, Miyadai K, Yoshioka S, Fujiwara T, Horikoshi H, Serizawa N** 1994 Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135:2279-2282
125. **Gregoire F, De BN, Hauser N, Heremans H, Van DJ, Remacle C** 1992 Interferon-gamma and interleukin-1 beta inhibit adipogenesis in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol* 151:300-309
126. **Stone RL, Bernlohr DA** 1990 The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation* 45:119-127
127. **Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA** 1997 Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17:1552-1561
128. **Muoio DM, Newgard CB** 2006 Obesity-Related Derangements in Metabolic Regulation. *Annu Rev Biochem*
129. **Sivitz WI, DeSautel SL, Kayano T, Bell GI, Pessin JE** 1989 Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature* 340:72-74
130. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
131. **Havel PJ** 2004 Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-S151
132. **Ahima RS** 2006 Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:242S-249S

133. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
134. **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP** 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84:491-495
135. **Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S** 2002 Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110:1093-1103
136. **Coleman RA, Herrmann TS** 1999 Nutritional regulation of leptin in humans. *Diabetologia* 42:639-646
137. **Klein S, Horowitz JF, Landt M, Goodrick SJ, Mohamed-Ali V, Coppack SW** 2000 Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E280-E284
138. **Friedman JM, Halaas JL** 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770
139. **Gorden P, Park JY** 2006 The clinical efficacy of the adipocyte-derived hormone leptin in metabolic dysfunction. *Arch Physiol Biochem* 112:114-118
140. **Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR** 2003 Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26:2442-2450
141. **Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T** 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769
142. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y** 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
143. **Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I** 2004 Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:29-33

144. **Tilg H, Moschen AR** 2006 Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783
145. **Trayhurn P, Beattie JH** 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-339
146. **Duplus E, Forest C** 2002 Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 64:893-901
147. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91
148. **Fain JN, Bahouth SW, Madan AK** 2004 TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:616-622
149. **Ruan H, Lodish HF** 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455
150. **Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R** 2003 Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35:147-152
151. **Do MS, Nam SY, Hong SE, Kim KW, Duncan JS, Beattie JH, Trayhurn P** 2002 Metallothionein gene expression in human adipose tissue from lean and obese subjects. *Horm Metab Res* 34:348-351
152. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB** 2006 Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801
153. **Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Buleon M, Carpene C, Saulnier-Blache JS, Valet P** 2005 Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res* 37:761-767
154. **Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF** 2000 The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275:9047-9054
155. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS** 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336
156. **Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE** 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11:183-190

157. **Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME** 1999 Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J* 18:4633-4644
158. **Kahn BB** 1994 Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J Nutr* 124:1289S-1295S
159. **Goossens GH** 2007 The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*
160. **Frayn KN** 2001 Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 60:375-380
161. **Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH** 1997 Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46:983-988
162. **Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH** 1997 Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 273:E708-E713
163. **Bjorntorp P** 1995 Liver triglycerides and metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19:839-840
164. **Lewis GF, Vranic M, Harley P, Giacca A** 1997 Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes* 46:1111-1119
165. **Lewis GF** 1997 Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* 8:146-153
166. **Wiesenthal SR, Sandhu H, McCall RH, Tchipashvili V, Yoshii H, Polonsky K, Shi ZQ, Lewis GF, Mari A, Giacca A** 1999 Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes* 48:766-774
167. **Frayn KN, Williams CM, Arner P** 1996 Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond)* 90:243-253
168. **Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE** 2000 Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 43:1498-1506
169. **Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB** 2005 Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362

170. **Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB** 1993 Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 268:22243-22246
171. **Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B** 2006 Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12
172. **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM** 1995 Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415
173. **Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G** 2001 Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-E751
174. **Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I** 2007 Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18:240-245
175. **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA** 2001 Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935
176. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
177. **Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I** 2007 Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56:901-911
178. **Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK** 1997 Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177-182
179. **Trayhurn P, Wood IS** 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-355
180. **Murdoch C, Muthana M, Lewis CE** 2005 Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 175:6257-6263
181. **Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS** 2005 Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355

182. **Carriere A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L** 2004 Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem* 279:40462-40469
183. **Kaufman RJ** 1999 Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13:1211-1233
184. **Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG** 2002 Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 22:7405-7416
185. **Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M** 2005 Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 280:847-851
186. **Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B** 2001 UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504:82-106
187. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
188. **Smith RE, Horwitz BA** 1969 Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev* 49:330-425
189. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
190. **Bukowiecki L, Collet AJ, Follea N, Guay G, Jahjah L** 1982 Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am J Physiol* 242:E353-E359
191. **Loncar D** 1991 Development of thermogenic adipose tissue. *Int J Dev Biol* 35:321-333
192. **Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giral M** 2001 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276:1486-1493
193. **Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM** 2007 Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6:38-54

194. **Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J** 2000 Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J* 347 Pt 3:643-651
195. **Ross SR, Graves RA, Choy L, Soleveva V, Spiegelman BM** 1995 Transgenic mouse models of disease: altering adipose tissue function in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 758:297-313
196. **Konishi M, Mikami T, Yamasaki M, Miyake A, Itoh N** 2000 Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. *J Biol Chem* 275:12119-12122
197. **Hernandez A, St Germain DL, Obregon MJ** 1998 Transcriptional activation of type III inner ring deiodinase by growth factors in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology* 139:634-639
198. **Porras A, Alvarez AM, Valladares A, Benito M** 1998 p42/p44 mitogen-activated protein kinases activation is required for the insulin-like growth factor-I/insulin induced proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12:825-834
199. **Carmona MC, Iglesias R, Obregon MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giralt M** 2002 Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277:21489-21498
200. **Valmaseda A, Carmona MC, Barbera MJ, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M** 1999 Opposite regulation of PPAR-alpha and -gamma gene expression by both their ligands and retinoic acid in brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 154:101-109
201. **Mandrup S, Lane MD** 1997 Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272:5367-5370
202. **Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO, Brown HR, Lehmann JM, Kliewer SA, Morris DC, Graves RA** 1996 Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 271:29909-29914
203. **Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K** 2001 Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* 276:3175-3182
204. **Matsusue K, Peters JM, Gonzalez FJ** 2004 PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation. *FASEB J* 18:1477-1479

205. **Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM** 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595
206. **Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, .** 1999 PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609
207. **Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617
208. **Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B** 2005 PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1740:293-304
209. **Klaus S** 1997 Functional differentiation of white and brown adipocytes. *Bioessays* 19:215-223
210. **Kozak UC, Kozak LP** 1994 Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines. *Endocrinology* 134:906-913
211. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM** 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839
212. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D** 2003 Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370-33376
213. **Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM** 2006 Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3:333-341
214. **Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S** 2001 FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106:563-573
215. **Dahle MK, Gronning LM, Cederberg A, Blomhoff HK, Miura N, Enerback S, Tasken KA, Tasken K** 2002 Mechanisms of F. *J Biol Chem* 277:22902-22908
216. **Gronning LM, Baillie GS, Cederberg A, Lynch MJ, Houslay MD, Enerback S, Tasken K** 2006 Reduced PDE4 expression and activity contributes to enhanced catecholamine-induced cAMP accumulation in adipocytes from FOXC2 transgenic mice. *FEBS Lett* 580:4126-4130

217. **Hansen JB, te RH, Kristiansen K** 2004 Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle* 3:774-778
218. **Scime A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, Rudnicki MA** 2005 Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* 2:283-295
219. **Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloso SM, Guilherme A, Tang X, Straubhaar J, Cherniack AD, Parker MG, Czech MP** 2006 Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest* 116:125-136
220. **Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K** 2000 A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood* 96:3209-3214
221. **Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM** 2007 Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6:38-54
222. **Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, Spiegelman BM** 2009 Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460:1154-1158
223. **Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM** 2008 PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967
224. **Forner F, Kumar C, Luber CA, Fromme T, Klingenspor M, Mann M** 2009 Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab* 10:324-335
225. **Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR** 2008 New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454:1000-1004
226. **Cinti S** 2009 Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *Proc Nutr Soc* 68:340-349
227. **Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM** 2010 Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* 11:257-262

228. **Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP** 1997 Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387:90-94
229. **Himms-Hagen J, Hogan S, Zaror-Behrens G** 1986 Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (ob/ob) mice fed a palatable diet. *Am J Physiol* 250:E274-E281
230. **Glick Z, Teague RJ, Bray GA** 1981 Brown adipose tissue: thermic response increased by a single low protein, high carbohydrate meal. *Science* 213:1125-1127
231. **Rothwell NJ, Stock MJ** 1986 Influence of environmental temperature on energy balance, diet-induced thermogenesis and brown fat activity in 'cafeteria'-fed rats. *Br J Nutr* 56:123-129
232. **Champigny O, Ricquier D** 1990 Effects of fasting and refeeding on the level of uncoupling protein mRNA in rat brown adipose tissue: evidence for diet-induced and cold-induced responses. *J Nutr* 120:1730-1736
233. **Commins SP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW** 1999 Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* 140:292-300
234. **Bianco AC, Silva JE** 1987 Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation. *Am J Physiol* 253:E255-E263
235. **Bianco AC, Silva JE** 1987 Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 79:295-300
236. **Trayhurn P, Jennings G** 1986 Evidence that fasting can induce a selective loss of uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria of mice. *Biosci Rep* 6:805-810
237. **Villarroya F, Felipe A, Mampel T** 1986 Brown adipose tissue activity in hypocaloric-diet fed lactating rats. *Biosci Rep* 6:669-675
238. **Arvaniti K, Ricquier D, Champigny O, Richard D** 1998 Leptin and corticosterone have opposite effects on food intake and the expression of UCP1 mRNA in brown adipose tissue of lep(ob)/lep(ob) mice. *Endocrinology* 139:4000-4003
239. **Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, Claus TH** 1994 Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol* 266:R1371-R1382
240. **Granneman JG** 1988 Norepinephrine infusions increase adenylate cyclase responsiveness in brown adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 245:1075-1080

241. **Rousset S, ves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Ricquier D** 2004 The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1:S130-S135
242. **Robidoux J, Cao W, Quan H, Daniel KW, Moukdar F, Bai X, Floering LM, Collins S** 2005 Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 25:5466-5479
243. **Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, Collins S** 2001 beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276:27077-27082
244. **Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S** 2004 p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* 24:3057-3067
245. **Ricquier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arch J, Penicaud L** 1986 Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J Biol Chem* 261:13905-13910
246. **Kopecky J, Baudysova M, Zanotti F, Janikova D, Pavelka S, Houstek J** 1990 Synthesis of mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes differentiated in cell culture. *J Biol Chem* 265:22204-22209
247. **Nedergaard J, Herron D, Jacobsson A, Rehnmark S, Cannon B** 1995 Norepinephrine as a morphogen?: its unique interaction with brown adipose tissue. *Int J Dev Biol* 39:827-837
248. **Bronnikov G, Houstek J, Nedergaard J** 1992 Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J Biol Chem* 267:2006-2013
249. **Nanberg E, Nedergaard J** 1987 Alpha 1-adrenergic inositol trisphosphate production in brown adipocytes is Na⁺ dependent. *Biochim Biophys Acta* 930:438-445
250. **Wilcke M, Nedergaard J** 1989 Alpha 1- and beta-adrenergic regulation of intracellular Ca²⁺ levels in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 163:292-300
251. **Fernandez JA, Mampel T, Villarroya F, Iglesias R** 1987 Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *Biochem J* 243:281-284

252. **Ross SR, Choy L, Graves RA, Fox N, Soleyjeva V, Klaus S, Ricquier D, Spiegelman BM** 1992 Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7561-7565
253. **Raasmaja A, Larsen PR** 1989 Alpha 1- and beta-adrenergic agents cause synergistic stimulation of the iodothyronine deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* 125:2502-2509
254. **Hernandez A, Obregon MJ** 2000 Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E769-E777
255. **Rabelo R, Schifman A, Rubio A, Sheng X, Silva JE** 1995 Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* 136:1003-1013
256. **Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE** 1996 Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 137:3478-3487
257. **De Luca LM** 1991 Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 5:2924-2933
258. **Leid M, Kastner P, Chambon P** 1992 Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17:427-433
259. **Mangelsdorf DJ** 1994 Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32-S44
260. **Villarroya F, Iglesias R, Giralt M** 2004 Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem* 11:795-805
261. **Alvarez R, de Andres J, Yubero P, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 1995 A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 270:5666-5673
262. **Alvarez R, Checa M, Brun S, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2000 Both retinoic-acid-receptor- and retinoid-X-receptor-dependent signalling pathways mediate the induction of the brown-adipose-tissue-uncoupling-protein-1 gene by retinoids. *Biochem J* 345 Pt 1:91-97
263. **Mercader J, Madsen L, Felipe F, Palou A, Kristiansen K, Bonet ML** 2007 All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 20:1061-1072
264. **Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE** 1996 A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis. *Endocrinology* 137:3488-3496

265. **Puigserver P, Vazquez F, Bonet ML, Pico C, Palou A** 1996 In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 317 (Pt 3):827-833
266. **Mercader J, Palou A, Bonet ML** 2010 Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity (Silver Spring)* 18:655-662
267. **Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM** 1997 Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:237-241
268. **Schluter A, Yubero P, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2002 The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1277-1280
269. **Schluter A, Barbera MJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2002 Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 362:61-69
270. **Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR** 2000 Insulin and the beta3-adrenoceptor differentially regulate uncoupling protein-1 expression. *Mol Endocrinol* 14:764-773
271. **Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, Kriauciunas KM, Cypess AM, Niinobe M, Yoshikawa K, Patti ME, Kahn CR** 2005 Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat Cell Biol* 7:601-611
272. **Teruel T, Valverde AM, Alvarez A, Benito M, Lorenzo M** 1995 Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem J* 310 (Pt 3):771-776
273. **Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F** 2010 Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 11:206-212
274. **Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB** 2005 FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115:1627-1635
275. **Galman C, Lundasen T, Kharitonov A, Bina HA, Eriksson M, Hafstrom I, Dahlin M, Amark P, Angelin B, Rudling M** 2008 The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* 8:169-174

276. **Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA** 2007 Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 5:415-425
277. **Yubero P, Hondares E, Carmona MC, Rossell M, Gonzalez FJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2004 The developmental regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in the liver is partially dissociated from the control of gluconeogenesis and lipid catabolism. *Endocrinology* 145:4268-4277
278. **Boss O, Bachman E, Vidal-Puig A, Zhang CY, Peroni O, Lowell BB** 1999 Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1. *Biochem Biophys Res Commun* 261:870-876
279. **Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Martinez JA** 2001 Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 176:85-90
280. **Evans MJ, Scarpulla RC** 1990 NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4:1023-1034
281. **Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA** 1992 DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267:3358-3367
282. **Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA** 1998 Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231-236
283. **Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM** 1999 Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124
284. **Vega RB, Huss JM, Kelly DP** 2000 The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20:1868-1876
285. **Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, Schoder H, Larson SM** 2003 Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med* 44:1789-1796
286. **Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK** 2002 Brown adipose tissue: a factor to consider in

- symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29:1393-1398
287. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-E452
 288. **Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM** 2009 Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev* 23:788-797
 289. **Napolitano A, Lowell BB, Flier JS** 1991 Alterations in sympathetic nervous system activity do not regulate adipon gene expression in mice. *Int J Obes* 15:227-235
 290. **Nisoli E, Tonello C, Benarese M, Liberini P, Carruba MO** 1996 Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology* 137:495-503
 291. **Nisoli E, Tonello C, Carruba MO** 1998 Nerve growth factor, beta3-adrenoceptor and uncoupling protein 1 expression in rat brown fat during postnatal development. *Neurosci Lett* 246:5-8
 292. **Saha SK, Kuroshima A** 2000 Nitric oxide and thermogenic function of brown adipose tissue in rats. *Jpn J Physiol* 50:337-342
 293. **Foster DO, Frydman ML** 1978 Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol* 56:110-122
 294. **Nedergaard J, Lindberg O** 1979 Norepinephrine-stimulated fatty-acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Influence of buffers, albumin, insulin and mitochondrial inhibitors. *Eur J Biochem* 95:139-145
 295. **Ma SW, Foster DO** 1986 Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 64:609-614
 296. **Silva JE, Larsen PR** 1985 Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* 76:2296-2305
 297. **de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC** 2001 The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108:1379-1385
 298. **Burysek L, Houstek J** 1996 Multifactorial induction of gene expression and nuclear localization of mouse interleukin 1 alpha. *Cytokine* 8:460-467

299. **Burysek L, Houstek J** 1997 beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett* 411:83-86
300. **Busbridge NJ, Dascombe MJ, Tilders FJ, van Oers JW, Linton EA, Rothwell NJ** 1989 Central activation of thermogenesis and fever by interleukin-1 beta and interleukin-1 alpha involves different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 162:591-596
301. **Kozak LP, Koza RA** 1999 Mitochondria uncoupling proteins and obesity: molecular and genetic aspects of UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6:S33-S37
302. **Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB** 2002 betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297:843-845
303. **Jia JJ, Tian YB, Cao ZH, Tao LL, Zhang X, Gao SZ, Ge CR, Lin QY, Jois M** 2010 The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Mol Biol Rep* 37:1513-1522
304. **Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M** 1998 Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 41:357-361
305. **Watson RT, Pessin JE** 2001 Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res* 56:175-193
306. **Ferre P, Burnol AF, Leturque A, Terretaz J, Penicaud L, Jeanrenaud B, Girard J** 1986 Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J* 233:249-252
307. **Teruel T, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M** 1996 Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* 319 (Pt 2):627-632
308. **Camps M, Castello A, Munoz P, Monfar M, Testar X, Palacin M, Zorzano A** 1992 Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J* 282 (Pt 3):765-772
309. **Cypess AM, Kahn CR** 2010 Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:143-149
310. **Giguere V** 1999 Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689-725
311. **Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688

312. **Villena JA, Kralli A** 2008 ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab* 19:269-276
313. **Giguere V** 2008 Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev* 29:677-696
314. **Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, Graham A, Strauss A, Geiser M, Fournier B** 2004 Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem* 279:49330-49337
315. **Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ** 2006 Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126:789-799
316. **Ranhotra HS** 2009 Up-regulation of orphan nuclear estrogen-related receptor alpha expression during long-term caloric restriction in mice. *Mol Cell Biochem* 332:59-65
317. **Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Evans RM** 2005 A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19:2466-2477
318. **Sonoda J, Laganriere J, Mehl IR, Barish GD, Chong LW, Li X, Scheffler IE, Mock DC, Bataille AR, Robert F, Lee CH, Giguere V, Evans RM** 2007 Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev* 21:1909-1920
319. **Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le MJ, Auwerx J** 2007 Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell* 131:405-418
320. **Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT** 2003 Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology* 144:4894-4904
321. **Liu D, Zhang Z, Teng CT** 2005 Estrogen-related receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha regulate estrogen-related receptor-alpha gene expression via a conserved multi-hormone response element. *J Mol Endocrinol* 34:473-487
322. **Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V, Kralli A** 2007 Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1418-1423
323. **Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V** 1999 Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J* 18:4270-4279

324. **Yang N, Shigeta H, Shi H, Teng CT** 1996 Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem* 271:5795-5804
325. **Zhang Z, Teng CT** 2000 Estrogen receptor-related receptor alpha 1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene. *J Biol Chem* 275:20837-20846
326. **Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, Bourguet W, van DA, Moras D, Renaud JP** 2002 Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9:303-313
327. **Tremblay GB, Bergeron D, Giguere V** 2001 4-Hydroxytamoxifen is an isoform-specific inhibitor of orphan estrogen-receptor-related (ERR) nuclear receptors beta and gamma. *Endocrinology* 142:4572-4575
328. **Busch BB, Stevens WC, Jr., Martin R, Ordentlich P, Zhou S, Sapp DW, Horlick RA, Mohan R** 2004 Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *J Med Chem* 47:5593-5596
329. **Willy PJ, Murray IR, Qian J, Busch BB, Stevens WC, Jr., Martin R, Mohan R, Zhou S, Ordentlich P, Wei P, Sapp DW, Horlick RA, Heyman RA, Schulman IG** 2004 Regulation of PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) signaling by an estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8912-8917
330. **Hong H, Yang L, Stallcup MR** 1999 Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J Biol Chem* 274:22618-22626
331. **Xie W, Hong H, Yang NN, Lin RJ, Simon CM, Stallcup MR, Evans RM** 1999 Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptors 1 and 2. *Mol Endocrinol* 13:2151-2162
332. **Castet A, Herledan A, Bonnet S, Jalaguier S, Vanacker JM, Cavailles V** 2006 Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol Endocrinol* 20:1035-1047
333. **Huss JM, Kopp RP, Kelly DP** 2002 Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* 277:40265-40274
334. **Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A** 2003 The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity

of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem* 278:9013-9018

335. **Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, Evans RM, Blanchette M, Giguere V** 2007 Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* 5:345-356
336. **Vu EH, Kraus RJ, Mertz JE** 2007 Phosphorylation-dependent sumoylation of estrogen-related receptor alpha1. *Biochemistry* 46:9795-9804
337. **Tremblay AM, Wilson BJ, Yang XJ, Giguere V** 2008 Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol* 22:570-584
338. **Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, Mertz JE** 1997 Estrogen-related receptor alpha 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol* 11:342-352
339. **Carrier JC, Deblois G, Champigny C, Levy E, Giguere V** 2004 Estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a transcriptional regulator of apolipoprotein A-IV and controls lipid handling in the intestine. *J Biol Chem* 279:52052-52058
340. **Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP** 2004 Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 24:9079-9091
341. **Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V** 2003 Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol* 23:7947-7956
342. **Herzog B, Cardenas J, Hall RK, Villena JA, Budge PJ, Giguere V, Granner DK, Kralli A** 2006 Estrogen-related receptor alpha is a repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* 281:99-106
343. **Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, Weinheimer CJ, Courtois M, Kovacs A, Giguere V, Murphy E, Kelly DP** 2007 The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab* 6:25-37
344. **Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM** 2004 Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119:121-135

345. **Bannister AJ, Kouzarides T** 2011 Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381-395
346. **Yu S, Reddy JK** 2007 Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 1771:936-951
347. **Handschin C, Spiegelman BM** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27:728-735
348. **Lin J, Handschin C, Spiegelman BM** 2005 Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1:361-370
349. **Knutti D, Kaul A, Kralli A** 2000 A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20:2411-2422
350. **Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM** 2003 Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4012-4017
351. **Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W** 2003 Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 371:89-96
352. **Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM** 2001 Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3820-3825
353. **Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM** 2003 Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550-555
354. **Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, Lin J, Jaeger S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Spiegelman BM** 2004 Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev* 18:278-289
355. **Knutti D, Kressler D, Kralli A** 2001 Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9713-9718
356. **Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM** 2001 Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8:971-982

357. **Fan W, Imamura T, Sonoda N, Sears DD, Patsouris D, Kim JJ, Olefsky JM** 2009 FOXO1 transrepresses peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes. *J Biol Chem* 284:12188-12197
358. **Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR** 2005 Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* 19:1466-1473
359. **Kelly TJ, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Puigserver P** 2009 GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1beta through lysine acetylation. *J Biol Chem* 284:19945-19952
360. **Puigserver P, Spiegelman BM** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24:78-90
361. **Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP** 2005 PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3:e101
362. **Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P, Zhang D, Litwin SE, Zaha VG, Fountain KT, Boudina S, Jimenez-Linan M, Blount M, Lopez M, Meirhaeghe A, Bohlooly Y, Storlien L, Stromstedt M, Snaith M, Oresic M, Abel ED, Cannon B, Vidal-Puig A** 2006 Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol* 4:e369
363. **Vianna CR, Huntgeburth M, Coppari R, Choi CS, Lin J, Krauss S, Barbatelli G, Tzameli I, Kim YB, Cinti S, Shulman GI, Spiegelman BM, Lowell BB** 2006 Hypomorphic mutation of PGC-1beta causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metab* 4:453-464
364. **Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR** 2010 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 285:21590-21599
365. **Dinardo MM, Musicco C, Fracasso F, Milella F, Gadaleta MN, Gadaleta G, Cantatore P** 2003 Acetylation and level of mitochondrial transcription factor A in several organs of young and old rats. *Biochem Biophys Res Commun* 301:187-191

366. **Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, Medeiros DM, Kovacs A, Kelly DP** 2008 Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev* 22:1948-1961
367. **Taha M, Lopaschuk GD** 2007 Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies. *Ann Med* 39:594-607
368. **Arany Z** 2008 PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev* 18:426-434
369. **Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM** 2002 Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801
370. **Arany Z, Lebrasseur N, Morris C, Smith E, Yang W, Ma Y, Chin S, Spiegelman BM** 2007 The transcriptional coactivator PGC-1beta drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab* 5:35-46
371. **Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* 17:2299-2301
372. **Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM** 2004 Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2:e294
373. **Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN** 2003 Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1711-1716
374. **Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM** 2003 An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7111-7116
375. **Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI** 2002 AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15983-15987
376. **Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z** 2005 Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280:19587-19593
377. **Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH,**

- Rosenzweig A, Spiegelman BM** 2008 HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* 451:1008-1012
378. **Finck BN, Kelly DP** 2006 PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116:615-622
379. **Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, Spiegelman BM** 2003 PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* 278:30843-30848
380. **Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di CF, Passarino G, Rose G, De BG** 2007 Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics* 89:143-150
381. **Debevec D, Christian M, Morganstein D, Seth A, Herzog B, Parker M, White R** 2007 Receptor interacting protein 140 regulates expression of uncoupling protein 1 in adipocytes through specific peroxisome proliferator activated receptor isoforms and estrogen-related receptor alpha. *Mol Endocrinol* 21:1581-1592
382. **Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y** 2010 Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* 5:e11707
383. **Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO** 2005 Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314-317
384. **Bell EL, Guarente L** 2011 The SirT3 Divining Rod Points to Oxidative Stress. *Mol Cell* 42:561-568
385. **Giralt A, Hondares E, Villena JA, Ribas F, Diaz-Delfin J, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F** 2011 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *J Biol Chem* 286:16958-16966

Publicacions

Role of SIRT3 in the metabolic adaptations to physiological conditions of altered thermogenic activity: a transcriptomic approach.

Revista: Endocrinology (sotmès)

Paper de SIRT3 en les adaptacions metabòliques a condicions fisiològiques d'una activitat termogènica alterada: una aproximació transcriptòmica.

SIRT3, membre de la família d'histona desacetilases anomenades sirtuïnes, es troba principalment al mitocondri de teixits com el fetge, múscul, cor i teixit adipós marró i s'ha suggerit que podria jugar un paper en el metabolisme energètic. Per tal d'aclarir el seu rol en la termogènesi, es van analitzar les alteracions en ratolins SIRT3 $-/-$ en dues condicions de termogènesi augmentada: la transició fetal-neonatal i l'exposició crònica al fred en ratolins adults, així com es va estudiar l'efecte del dejuni en adults SIRT3 $-/-$, una situació en la qual la termogènesi es troba inhibida. Es van avaluar els possibles trastorns metabòlics i es va procedir a un anàlisi transcriptòmic de l'expressió de gens marcadors de diverses vies metabòliques en el teixit adipós marró i altres teixits dels ratolins SIRT3 $-/-$. Els resultats obtinguts indiquen alteracions significatives en el període perinatal com a conseqüència de la manca de SIRT3, però no en l'etapa adulta. S'observa una expressió alterada de gens específics de la termogènesi (uncoupling protein-1, 5'-deiodinasa, PRDM16) al teixit adipós marró en l'etapa perinatal així com de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (enoil-CoA, hidratasa/3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa, acil-CoA oxidasa) al fetge durant l'etapa perinatal. Aquests resultats posen de manifest el potencial paper de SIRT3 en aquestes vies metabòliques i evidencien l'existència de mecanismes homeostàtics durant el desenvolupament post-natal capaços de compensar l'absència de SIRT3 en l'animal adult.

Role of SIRT3 in the metabolic adaptations to physiological conditions of altered thermogenic activity: a transcriptomic approach

Albert Giralt, Daniela Taverna, Marta Giralt, Roser Iglesias, Francesc Villarroya*

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 08028 Barcelona, Spain.

Abbreviated title: Altered neonatal gene expression in Sirt3-null mice

Keywords: sirtuin-3, neonate, cold, brown adipose tissue, liver, metabolism, gene expression

* To whom correspondence and reprint requests should be addressed:

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona

Avda Diagonal 645, E-08028-Barcelona, Spain

Tel. 34-93-4021525,

FAX: 34-93-4021559,

E mail: fvillarroya@ub.edu

Supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01896) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI081715), Spain. CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición is an initiative of ISCIII Spain.

Precis : Invalidation of Sirt3 gene causes abnormal expression of thermogenesis-related genes and lipid catabolism genes in brown fat and liver, respectively, in the perinatal period.

Abstract

SIRT3 is a member of the sirtuin family of deacetylases present mainly in mitochondria from tissues such as brown adipose tissue, liver, muscle and heart. It has been suggested to play a role in energy metabolism. To gain insight in the role of SIRT3 in thermogenesis, we determined the alterations in mice with targeted invalidation of the SIRT3 gene (SIRT3^{-/-} mice) in two conditions of enhanced thermogenesis: the fetal-to-neonatal transition and chronic exposure of adult mice to cold, and in fasting of adult mice, a condition of depressed thermogenesis. Assessment of overall metabolic disturbances and a transcriptomic analysis of the expression of marker genes of distinct metabolic pathways were performed in brown fat and other tissues from SIRT3^{-/-} mice in these conditions. Results indicated significant alterations in the perinatal period but not in adulthood. Impaired expression of specific genes of thermogenesis (uncoupling protein-1, 5 α -deiodinase, PRDM16) in perinatal brown fat, and of genes encoding components of the fatty acid oxidation machinery (enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, acyl-CoA oxidase) in perinatal liver were observed in SIRT3^{-/-} mice. Results highlight the potential role of SIRT3 in these pathways and evidence the appearance of homeostatic mechanisms during post-natal development capable to compensate for the absence of SIRT3 in the adulthood.

Introduction

Sirt3 is a member of the sirtuin family of protein deacetylases present in mitochondria and probably also in nuclei (1;2). In liver, several mitochondrial protein that are targets of SIRT3-mediated deacetylation have been identified, among them enzymes involved in lipid oxidative pathways, such as HMG-CoA synthase or long chain acyl-CoA dehydrogenase (3;4) , components of the mitochondrial respiratory complexes, such as Complex I subunit NDUFA9 (5) and Complex II subunit succinate dehydrogenase flavoprotein (SdhA), (6) . In general, it appears the SIRT3-dependent deacetylation promotes an active conformation of these proteins leading to enhanced lipid catabolism. On the other hand, Sirt3 is highly expressed in brown adipose tissue, in contrast with a low expression in white fat. It has been proposed that Sirt3 may be involved in brown aft thermogenic function (7) . In heart, Sirt3 has been recently been reported to be protective against cardiac hypertrophy (8;9).

In the present study we used the Sirt3 ^{-/-} mouse in order to explore the role of Sirt3 in the physiological adaptations to challenges in energy metabolism elicited by enhanced thermogenic needs. For this purpose we specifically analyzed the alterations in Sirt3 ^{-/-} mice in response to the fetal-to-neonatal transition as well as in the adaptation of adult mice to a long-term exposure to a cold environment. In parallel, we explored the response of Sirt3 ^{-/-} mice to starvation, a typical situation of repression of adaptive thermogenesis.

The transition from fetal no neonatal life constitutes one of the major metabolic challenges to be accomplished in life. Fetal energy metabolism is maintained by the supply of glucose to fetal circulation though the placenta. Thus, fetal tissues are adapted to use carbohydrates as their major source of energy. After birth, glucose supply is interrupted and most of the energy requirements of neonatal tissue should be covered by milk, a lipid-rich source of metabolic energy (10). Accordingly, a rapid adaptation in gene expression takes place in most neonatal tissues to enhance the capacity to deal with fat as metabolic substrate and to save glucose to

maintain glycemia. There are evidences that fatty acids themselves induce the pattern of gene expression adaptive to this novel situation via activation of PPARs (11;12). Hormones such as glucocorticoids or glucagon, that rise in neonatal circulation, also act in eliciting the induction of genes encoding hepatic enzymes involved in the maintenance of glucose levels, such as Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (13). However, the mechanisms that provide most of these metabolic adaptations and changes in gene expression are not fully understood. Moreover, the neonatal life constitute a major challenge to energy metabolism because of the dramatic need of thermogenesis due to the sudden shift from thermoneutral environment of fetuses maintained by dam's metabolism to the strong extrauterine environment thermal stress. Brown adipose tissue is the main site of neonatal thermogenesis and, accordingly, adaptive metabolism and gene expression for lipid oxidation and mitochondrial oxidative function machinery is strongly activated in the neonate (14). Here we investigated the role of Sirt3 in the transition from fetal to neonatal life by determining the alterations caused by Sirt3 gene invalidation in mice. Moreover, we also analyzed how Sirt3 $-/-$ adult mice respond to adaptation to a low environment temperature. In this conditions, mice are known to increase heat production by increasing food intake, recruiting brown adipose mass and enhancing the expression of thermogenic genes, as well as by adapting systemic metabolism to enhanced provision of lipid fuels to brown fat in order to sustain thermogenic, uncoupled, mitochondrial oxidation (14). For comparison, we also studied how Sirt3 $-/-$ mice respond to starvation, a condition associated with an opposite adaptation: reduction of energy expenditure (15).

Materials and Methods

SIRT3 $-/-$ mice (Strain name: B6; 129S5-SIRT3 Gt (neo) 218Lex) were obtained from MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center, USA) and had been backcrossed into the C57BL/6J0la Hsd strain (Harlan) for six generations. For the experimental design involving perinatal studies, heterozygous Sirt3 $-/-$ mice were mated and homozygous Sirt3 $-/-$ neonates were analyzed with respect to their littermates wild-type controls. Mice at early stages of development were studied at the following conditions: fetuses at term (obtained after caesarian

sections of dams at day 19 of pregnancy), pups 12 h after birth, either fed by lactating mothers or fasted (not allowed to initiate suckling), and 36h-old fed pups maintained with lactating dams. Fetuses and pups were killed by decapitation. Chronic treatment of adult mice was performed by exposing male 3 month-old Sirt3^{-/-} mice and wild-type controls to a 4°C environment temperature for 3 weeks. Body weight was recorded and mice were also killed by decapitation. For starvation studies, adult Sirt3^{-/-} mice and the corresponding wild-type controls were fasted for 24 hours before sacrifice.

After decapitation, blood was obtained and tissues were dissected and frozen immediately. When indicated, blood was collected in heparinized tubes. Blood was used for assessment of glucose and triglycerides (Accutrend; Roche). Plasma FFA levels were quantified using a colorimetric acyl-CoA synthase and acyl-CoA oxidase-based method (NEFA C; Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma β -hydroxybutyrate and acetoacetate levels were quantified using a spectrophotometric assay (Sigma). Leptin, total plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and resistin, were quantified in 20 μ l of plasma using a multiplex system (Linco Research/Millipore, Saint Charles, MO, USA) and a Luminex100ISv2 equipment. Adiponectin was quantified by ELISA (Linco Research/Millipore).

Tissue extracts for western blot were prepared by homogenization in a buffer containing 20 mM NaHepes, pH 8.5, 25 mM MgCl₂, 1% Igepal CA-630 (Sigma), 1 mM EDTA, a mixture of protease inhibitors (Complete-Mini, Roche Diagnostics), 500 mM TSA (SIGMA) and 10 mM NAM (SIGMA), and 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride, essentially as reported (16). Proteins (30 μ g/lane) were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Immunological detection was performed with specific antibodies against acetylated lysines (Cell Signaling #9441). For detection, an enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Biotech, UK) was employed.

Total RNA was extracted using NucleoSpin (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ l using random hexamer primers (Applied Biosystems) and

0.5 µg of RNA. Real-time quantitative PCR was conducted in 20-µl reaction mixtures containing 1 µl of cDNA, 10 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), probes from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Assays : Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) Mm00440636_m1, PPAR α Mm00440939_m1, Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) Mm00440945_m1, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) Mm00447183_m1, Superoxide Dismutase 2 (SOD2) Mm00449726_m1, SIRT3 Mm00452129_m1, Type II iodothyronine deiodinase (DIO2) Mm00515664_m1, HMG CoA sintase 2 (HMGS2) Mm00550050_m1, Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (EHHADH) Mm00619688_m1, Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (Acox1) Mm00443579_m1, Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex 1 (Uqcrc1) Mm00445911_m1, PR domain containing 16 (Prdm16) Mm00712556_m1, Carnitine palmitoyltransferase II (Cpt2) Mm00487202_m1, Glucose 6-phosphatase (G6pc) Mm00616234_m1, Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) Mm00443325_m1, Uncoupling protein 1(UCP1) Mm00494069_m1, UCP2 Mm00627598_m1, UCP3 Mm00494074_m1, cytochrome b (cit b) CYT-bmm001-cj1, Medium Chain acyl CoA Dehydrogenase (MCAD) Mm00431611_m1, Atrial natriuretic factor (ANF) Mm 012557g1. Acetyl-CoA synthetase 2 (ACeCS2) (made to order), Glucose Transporter 1 (Glut1) Mm00441480_m1. Each assay was performed in duplicate, and the mean value was used to calculate mRNA expression for the gene of interest and the housekeeping reference gene (18S rRNA; Hs99999901). The amount of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative ($2^{-\Delta C_T}$) method following the manufacturer's instructions.

Statistical comparisons were performed using Student's t test.

Results

Altered pattern of tissue protein acetylation due in Sirt3 gene invalidation. First we assessed whether Sirt3 invalidation in mice resulted in the changes in the protein acetylation pattern expected from the deacetylating role of Sirt3. Fig 1 shows an example of electrophoretic analysis of liver protein extracts from Sirt3 *-/-* and wild-type mice immunoblotted with anti Acetyl-Lys antibody. Arrows indicate the main bands with a differential pattern of hyperacetylation status in Sirt3 *-/-* mice. In parentheses, candidate proteins in accordance with available data of protein targets of Sirt3-dependent deacetylation are shown. This assay establishes the impact of Sirt3 invalidation of the deacetylation status of discrete protein, compatible with the reported targets.

Effects of Sirt3 invalidation in perinatal gene expression: tissue- and development-specific alterations. First, we determined developmental regulation of Sirt3 gene expression in the perinatal period. A significant increase in liver SIRT3 mRNA levels after birth (12 or 36 hours) was observed. The induction of expression of SIRT3 in liver was independent from the feeding state. On the other hand, we also observed an increased expression of SIRT3 mRNA in brown adipose tissue after birth, but only in fed conditions. (Fig 2)

Sirt3-invalidation did not cause any significant change in total body weight fetuses at birth respect to wild-type littermates (Fig 3). Concerning circulating parameters, no significant changes were observed in glycemia or plasma β -hydroxybutyrate levels. (Fig 3).

The effects of Sirt3 invalidation on gene expression in liver, brown adipose tissue and heart from fetuses was analyzed. In liver, no changes were observed in the expression of marker genes of lipid oxidation (Ehhad, Acox1, Cpt2b), ketogenesis (HMG-CoA synthase) and gluconeogenesis (PEPCK, Glucose-6-Pase) (Fig 4A). After birth, if pups were not allowed to initiate suckling (12h-old, fasted pups), no changes in gene expression were observed in liver (Fig 4B). In contrast, if pups were allowed to initiate milk intake (12h-old, fed pups), an impaired expression of marker genes of lipid catabolism (Ehhad, Acox1) was found in Sirt3 *-/-*

mice (Fig 4C). These changes in liver from Sirt3 ^{-/-} mice were not present when pups were 36h old (Fig4D).

A marked impairment in gene expression for several specific functions of brown adipose tissue was found in fetal brown fat (Fig 5A). The expression of marker genes of specific brown fat function (Dio2, PRDM16, PGC-1 α) were significantly reduced, and UCP1 expression was also lowered although in this case it didn't achieve statistical significance. Lipid catabolism genes (Ehhad) and overall adipogenic marker genes (PPAR γ) expression was also significantly lowered, whereas no significant changes were found for the expression of PEPCK gene and genes encoding mitochondrial proteins (UQCRC1 and cytochrome b). After birth (12h-old), if pups were not allowed to suckle, expression of brown fat thermogenesis-related genes (UCP1, Dio2, PRDM16) remained significantly impaired in Sirt3-null neonates (Fig 5B). However, if pups were allowed to suckle, either 12h after birth or 36h after birth, they did not show statistically significant changes in the expression of the marker genes studied as a consequence of Sirt3 invalidation (Fig 5C and 5D). In heart, no significant changes on the pattern of gene expression due to Sirt3 invalidation was found at any of the perinatal conditions studied (Fig6).

Effects of Sirt3 invalidation on the metabolic adaptations of liver and brown adipose tissue gene expression to chronic cold exposure. Chronic cold exposure of mice did not cause any differential effect on body weight of Sirt3^{-/-} mice respect to wild-type controls, but this was associated with enhanced food intake in Sirt3^{-/-} mice in response to cold (Fig 7A). Rectal temperature was also unaltered as they were also the metabolic (glucose, β -OH-butyrate) and hormonal (insulin, leptin, PAI-I) parameters determined in blood (Fig 7B). Interscapular brown adipose tissue weight in Sirt3 ^{-/-} mice was unaltered respect to wild-type controls (153,33 \pm 7,16 g in wild type mice and 159,55 \pm 6,94 g in Sirt3 ^{-/-} mice). Concerning gene expression, we also observed no differences in the expression of genes encoding proteins involved in thermogenesis and brown fat recruitment (UCP1, PRDM16, PGC-1 α , Dio2), lipid catabolism (Ehhad, PPAR α) and glucose uptake (Glut1) (Fig 8A). The hepatic expression of marker genes

of lipid oxidation (Ehhad), ketogenesis (HMG-CoA synthase) and gluconeogenesis (PEPCK) were unaltered between cold-exposed Sirt3 ^{-/-} and wild-type mice (Fig 8B).

Effects of Sirt3 invalidation on the metabolic adaptations of liver and brown adipose tissue gene expression to starvation. The analysis of the impact of Sirt3 invalidation on the metabolic (glucose, triacylglycerides, free fatty acids, total ketone bodies, β -OH-butyrate) and hormonal (adiponectin, leptin, PAI-I, resistin) levels in plasma revealed no significant changes in response to starvation when fasted Sirt3 ^{-/-} and fasted wild-type mice were compared (Fig 9A). Concerning gene expression in liver, it was also not significantly modified for genes involved in lipid oxidation (Ehhad), ketogenesis (HMG-CoA synthase) or gluconeogenesis (PEPCK) (Fig 9B). The same happened for brown fat, with no changes in gene expression of UCP1, PPAR α , Ehhad and PEPCK (Fig 9C).

Discussion

The present study indicated that conditions of altered metabolic activity and opposite challenges to energy expenditure such as cold exposure or starvation did not cause relevant metabolic and gene expression changes associated with the lack of Sirt3 in adult mice. Mice exposed to long-term cold maintain unaltered body temperature, circulating parameters and gene expression profiles, much likely due to adaptive mechanisms of compensation of the loss of Sirt3 function. The significant increase in food intake, not associated with any change in body weight, in cold exposed mice is undoubtedly a relevant observation that may account for some of these adaptations. The significance of this phenomenon is unclear. Enhanced energy expenditure due to increased thermogenesis is unlikely, as there are no signs of increased BAT recruitment and activity due to the lack of Sirt3, and, in fact, such a role for Sirt3 would be contradictory with previous observations indicating a positive role of Sirt3 in BAT thermogenic activity (7) . Further research will be needed for a careful assessment of energy expenditure in this mouse model when placed in cold, including the possibility of altered excretory output of metabolic energy or altered mouse activity, although this last possibility was not evident just from the simple observation of the behavior of Sirt3-null mice.

Another remarkable finding in this model concerns the recently reported role of Sirt3 as required for appropriate activity of fatty acid oxidation pathways through the control of the acetylation of Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) (4). Enhanced oxidation of fatty acids in BAT is essential to sustain thermogenesis during cold exposure, and our findings indicate that Sirt3 is not an absolute requirement to attain a rate of lipid oxidation in BAT compatible with a sufficiently active thermogenesis capable of maintaining body temperature when Sirt3-null mice are living at 4°C. Maybe this may be related to previous observation of enhanced food intake in Sirt3 ^{-/-} mice placed in cold. A relatively inefficient process of fatty acid oxidation and deficient transformation of the metabolic energy present in fat foodstuff into heat may explain enhanced food intake to compensate such inefficiency and to produce as much heat as in wild-type animals.

In the second model used, response to fasting, our results were also negative as we could not observe significant alterations due to the invalidation of Sirt3 gene. In addition to the reported impairment in fatty acid oxidation when Sirt3 is not functional (4) during the elaboration of the present studies, Verdin et al. reported that Sirt3 is required for the control of hepatic ketogenesis via the control of HMG-CoA synthase activity through deacetylation of the enzyme (3). When we exposed Sirt3 ^{-/-} mice to starvation during 24 h, a condition of enhanced ketogenesis, we observed systematically reduced levels of ketone bodies in Sirt3^{-/-} mice respect to wild-type ones, but the difference did not achieved statistical significance. However, Verdin et al described a significant decrease in ketone bodies production in mice exposed to 24 hours of starvation (3). Maybe differences in mice strain or the specific targeting of the Sirt3 gene to achieve invalidation could explain that our Sirt3^{-/-} mice had a much moderate impairment of ketogenesis than those in Verdin's lab. In any case, our results point towards the same trend.

In contrast with studies in adult mice, our analysis of the impact of Sirt3 gene invalidation in the perinatal period provided more clues on the role of Sirt3 in metabolic homeostasis. The strong impairment in gene expression of marker genes of thermogenesis in BAT from fetuses and neonates early after birth strongly suggests an important role for Sirt3 in specific thermogenic recruitment of BAT, considering the importance of pre-natal recruitment of BAT and sudden activation of BAT activity after birth (17;18). However, the fast compensation of these alterations just after few days of regular feeding indicates, as noted above, the high capacity of homeostatic mechanisms present in vivo to compensate the specific metabolic deficiencies arising from Sirt3 invalidation.

Similarly, alterations in hepatic gene expression were only observed in mice during the perinatal period, in this case specifically in response to the initiation of milk intake. The initiation of milk intake is a strong metabolic challenge to neonatal liver that should be associated with the induction of genes encoding enzymes of fatty acid oxidation and ketogenesis (10). This process is mediated by the induction of these genes by intracellular derivatives of fatty acids from the high fat content of milk, and ligand-dependent activation of PPAR α by these derivatives of fatty

acids appears as a major mechanism in this process (11;12) . In light to the reported role of Sirt3 in activating Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD), it may happen that the observed impairment in the expression of lipid catabolism, PPAR α -regulated genes in Sirt3 $-/-$ neonatal liver after milk intake could be related to abnormal production of the intracellular fatty acid oxidation intermediates behaving as ligands of PPAR α .

It is worth to mention that the analysis of neonatal metabolic adaptations using gene invalidation rodent models is a powerful tool to investigate the primary role of a given gene, in this case Sirt3, in metabolism (19). Frequently, the powerful homeostatic mechanisms regulating metabolism compensate primary alterations elicited by the invalidation of a given gene in adult rodents. However, the sudden appearance for the first time in life of the challenge to adapt metabolism just after birth is not compatible with the progressive compensatory adaptations appearing in adults, and the perinatal period appears as an optimal model to visualize the primary impact of a given gene. An example of this would be the PPAR α -knockout mice, that exhibit almost no metabolic phenotype in the adulthood in basal conditions but a markedly altered gene expression profile in neonatal life (11;12) (20). In this case, Sirt3 $-/-$ mice have a very mild metabolic phenotype in adulthood. In contrast, our current analysis of Sirt3 $-/-$ neonates allowed us to identify brown adipose tissue and liver as potential targets of Sirt3 action. Cellular “in vitro” approaches based on Sirt3 gene invalidation might be envisaged to better delineate the specific role of Sirt3 in brown adipocyte and hepatocyte specific roles in thermogenesis and metabolism, respectively.

References

1. **Onyango P, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD, Feinberg AP** 2002 SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13653-13658
2. **Scher MB, Vaquero A, Reinberg D** 2007 SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev* 21:920-928
3. **Shimazu T, Hirschey MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP, Verdin E** 2010 SIRT3 Deacetylates Mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Synthase 2 and Regulates Ketone Body Production. *Cell Metab* 12:654-661
4. **Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Jr., Alt FW, Kahn CR, Verdin E** 2010 SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464:121-125
5. **Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T** 2008 A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14447-14452
6. **Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC** 2010 Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 49:304-311

7. **Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q** 2005 SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280:13560-13567
8. **Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP** 2008 SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 28:6384-6401
9. **Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra PV, Isbatan A, Gupta MP** 2010 Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem* 285:3133-3144
10. **Girard J, Ferre P, Pegorier JP, Duee PH** 1992 Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72:507-562
11. **Brun S, Carmona MC, Mampel T, Vinas O, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F** 1999 Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes* 48:1217-1222
12. **Yubero P, Hondares E, Carmona MC, Rossell M, Gonzalez FJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F** 2004 The developmental regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression in the liver is partially dissociated from the control of gluconeogenesis and lipid catabolism. *Endocrinology* 145:4268-4277
13. **Yabaluri N, Bashyam MD** 2010 Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35:473-484

14. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
15. **Champigny O, Ricquier D** 1990 Effects of fasting and refeeding on the level of uncoupling protein mRNA in rat brown adipose tissue: evidence for diet-induced and cold-induced responses. *J Nutr* 120:1730-1736
16. **Hirschey MD, Shimazu T, Huang JY, Verdin E** 2009 Acetylation of mitochondrial proteins. *Methods Enzymol* 457:137-147
17. **Giralt M, Martin I, Iglesias R, Vinas O, Villarroya F, Mampel T** 1990 Ontogeny and perinatal modulation of gene expression in rat brown adipose tissue. Unaltered iodothyronine 5'-deiodinase activity is necessary for the response to environmental temperature at birth. *Eur J Biochem* 193:297-302
18. **Carmona MC, Iglesias R, Obregon MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giralt M** 2002 Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277:21489-21498
19. **Villarroya F, Bocos C, Giralt M, Pilar RM, Herrera E, Sevillano J, Gual M, Rosell M, Iglesias R** 2009 Pharmacological and gene modification-based models for studying the impact of perinatal metabolic disturbances in adult life. *Adv Exp Med Biol* 646:141-148
20. **Pedraza N, Rosell M, Villarroya J, Iglesias R, Gonzalez FJ, Solanes G, Villarroya F** 2006 Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression. *Endocrinology* 147:4695-4704
21. **Hallows WC, Lee S, Denu JM** 2006 Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10230-10235

Abbreviation List

ACeCS2	Acetyl-CoA synthetase 2
Acox1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
ANF	Atrial natriuretic factor
Cit b	Cytochrome b
CPT2	Carnitine palmitoyltransferase II
DIO2	Type II iodothyronine deiodinase
EHHADH	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
G6pc	Glucose 6-phosphatase
Glut1	Glucose Transporter 1
HMGs2	HMG CoA sintase 2
LCAD	Long Chain acyl CoA Dehydrogenase
MCAD	Medium Chain acyl CoA Dehydrogenase
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase 4
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRDM16	PR domain containing 16
SIRT3	Sirtuin 3
SOD2	Superoxide Dismutase 2

UCP	Uncoupling protein
UQCRC1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex 1

Fig 1

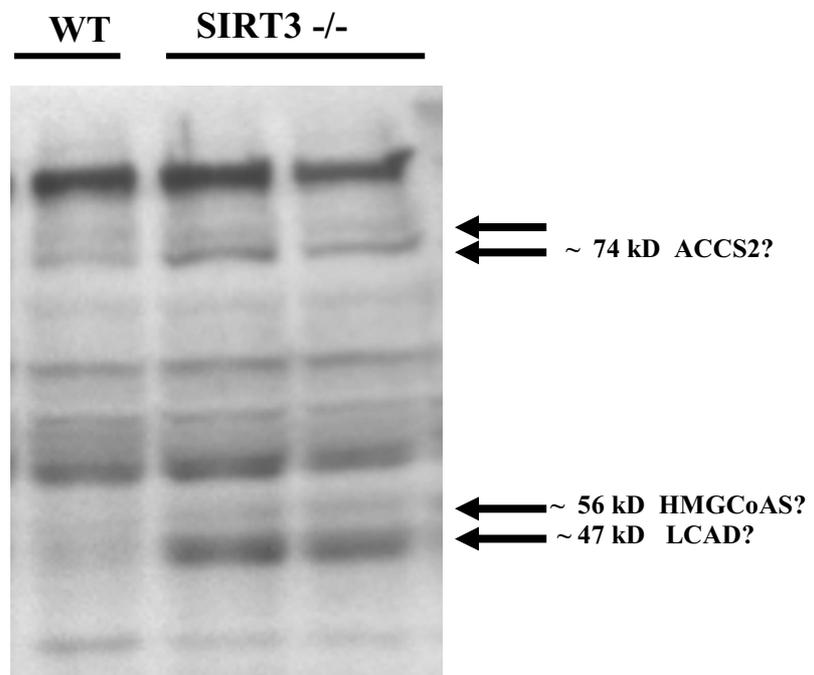


Fig 1. Immunoblot of acetylated proteins in liver extracts from adult wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice. Arrows indicate the bands specifically hyperacetylated in SIRT3^{-/-} extracts, and putative identity in accordance with mobility (3) (4) (21).

Fig 2

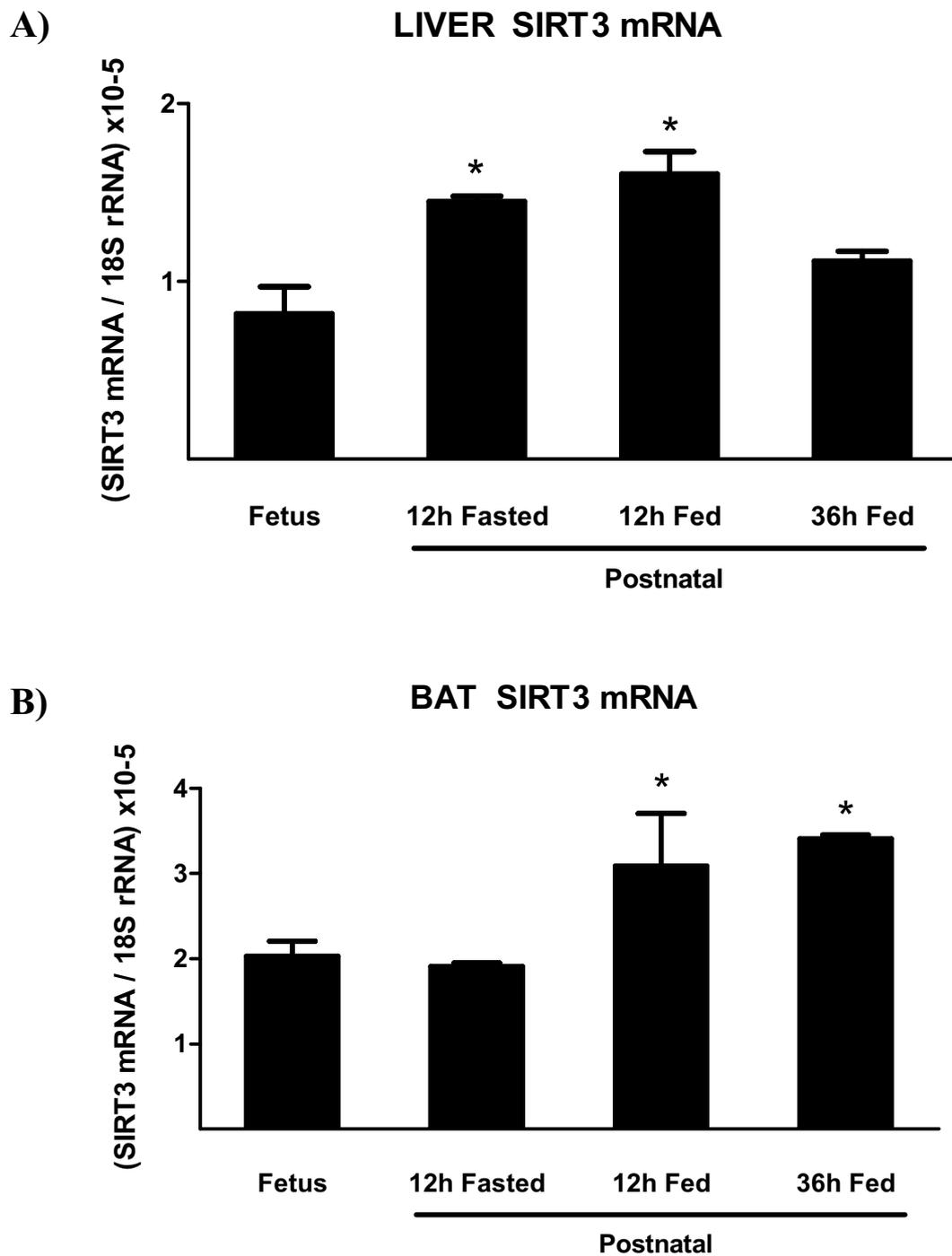


Fig 2. SIRT3 mRNA expression in liver and brown adipose tissue (BAT) in the perinatal period. Bars are means \pm SEM of 5-6 mice from independent litters for each condition. Statistical significance ($p < 0.05$) of comparisons respect to values in fetuses at term are shown as *.

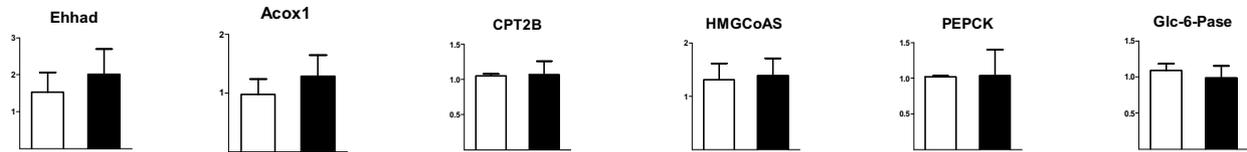
Fig 3



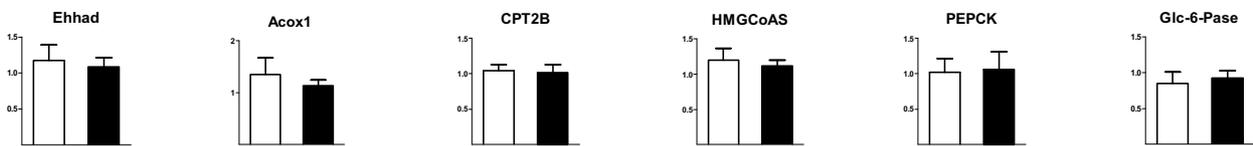
Fig 3. Body weight, blood glucose and plasma β -OH-butyrate levels in wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} fetuses at term. Bars are means \pm SEM of 6-9 fetuses from 4-5 independent litters of WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars)

Fig 4

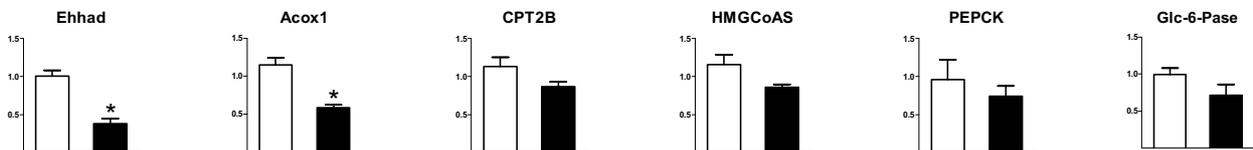
A, Fetuses



B, 12 h-old fasted neonates



C, 12 h-old fed neonates



D, 36-h old neonates

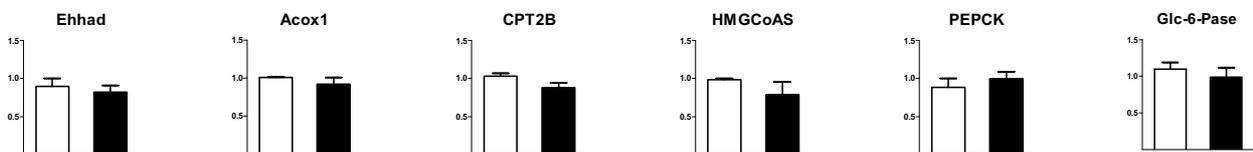
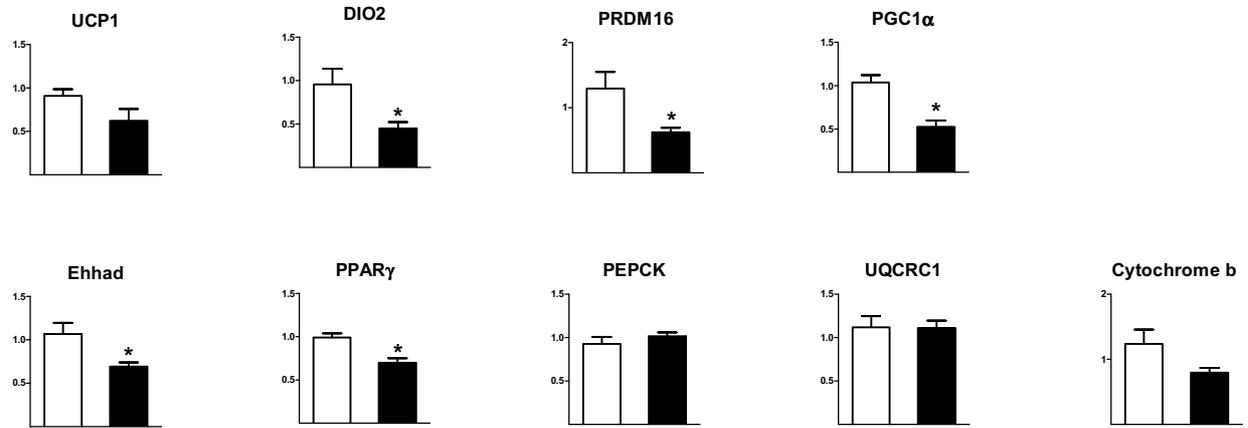


Fig 4. Gene expression in liver from wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice in the perinatal period. Bars are means \pm SEM of relative transcript levels of the indicated genes from fetuses (A) 12h-old neonates either fasted (B) or fed (C) and 36h-old neonates (D) from 6-8 independent litters. Statistical Significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Fig 5 A

Fetuses



12 h-old fasted neonates

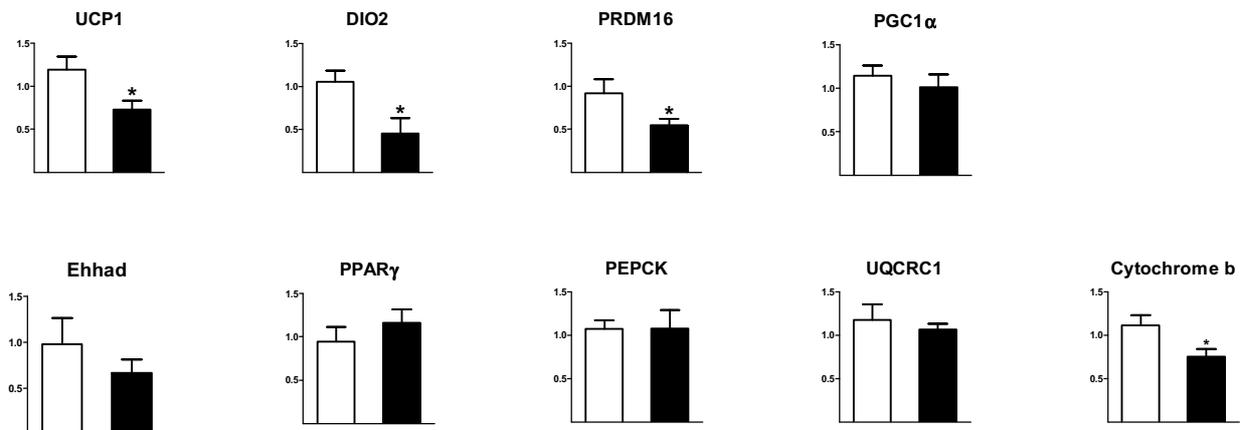
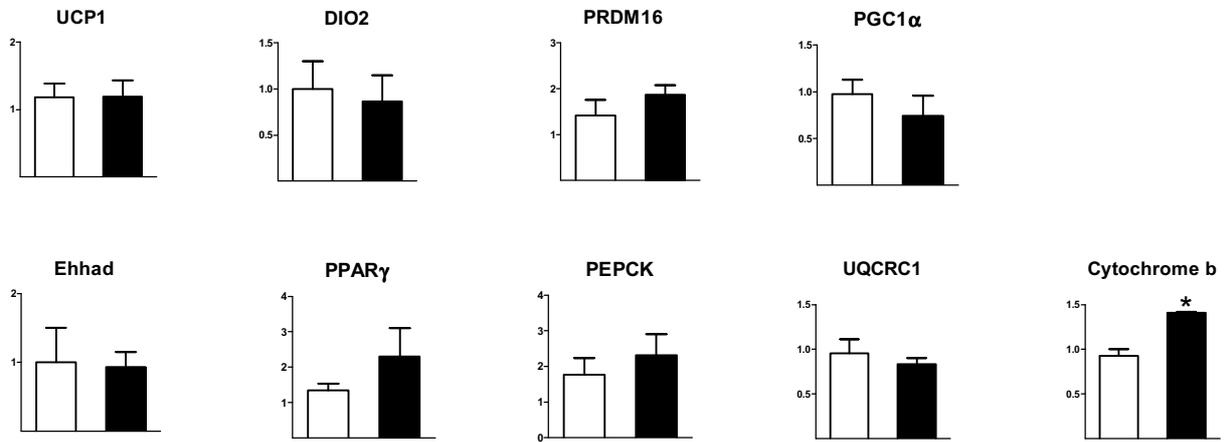


Fig 5. Gene expression in brown adipose tissue from wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice in the perinatal period. Bars are means \pm SEM of relative transcript levels of the indicated genes from fetuses and 12h-old fasted neonates (A), and 12h-old fed and 36h-old fed neonates (B) from 6-8 independent litters. Statistical significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Fig 5 B

12 h-old fed neonates



36 h-old fed neonates

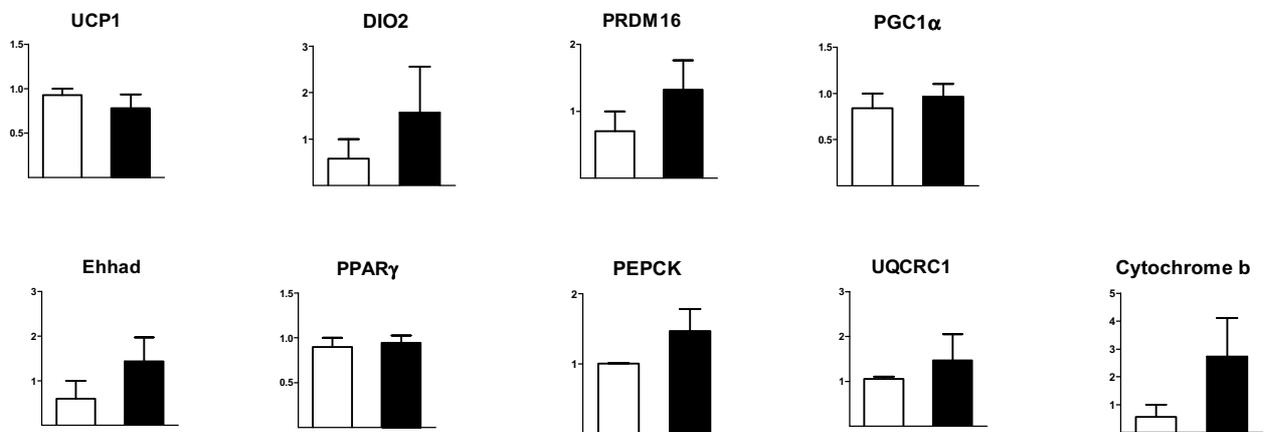
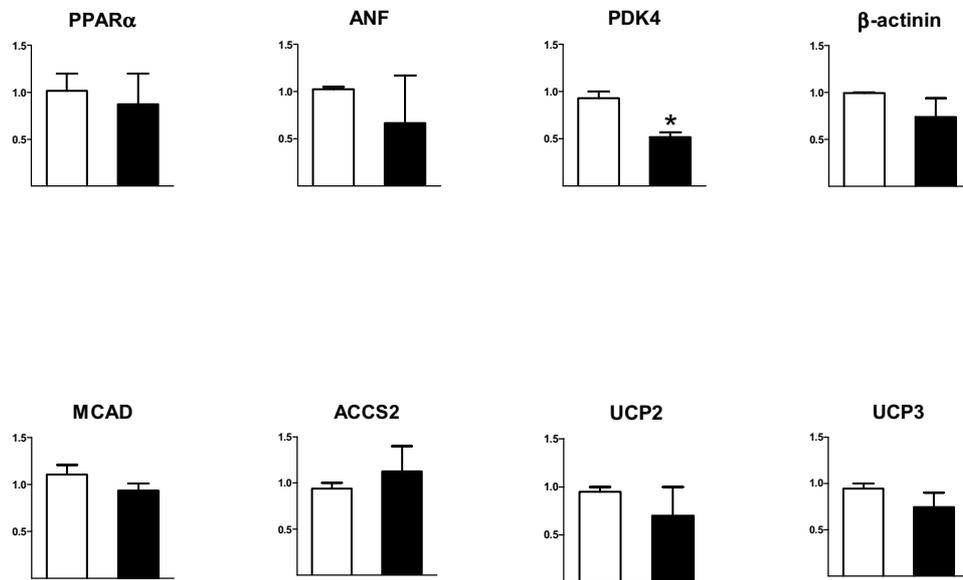


Fig 6

A, 12 h-old fed neonates



B, 36 h-old fed neonates

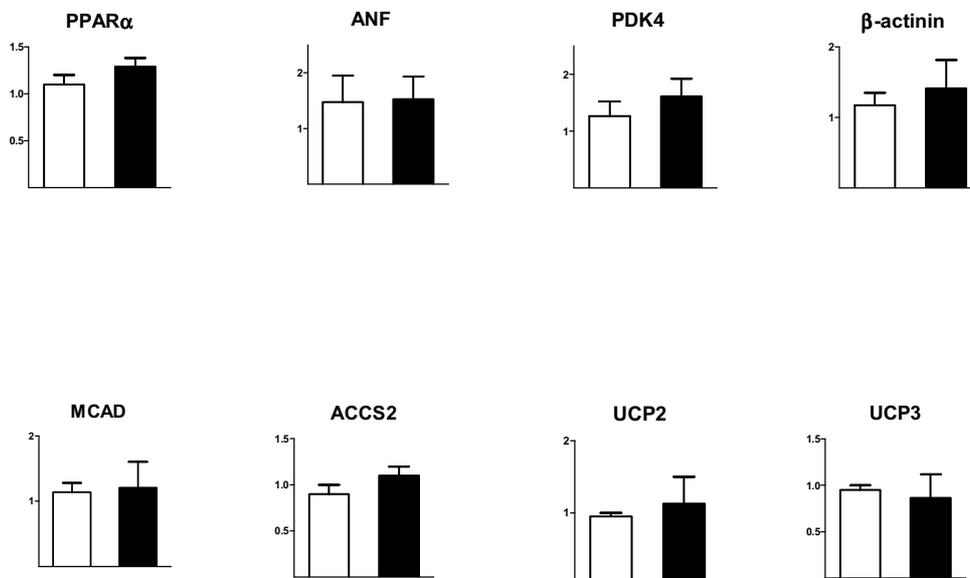
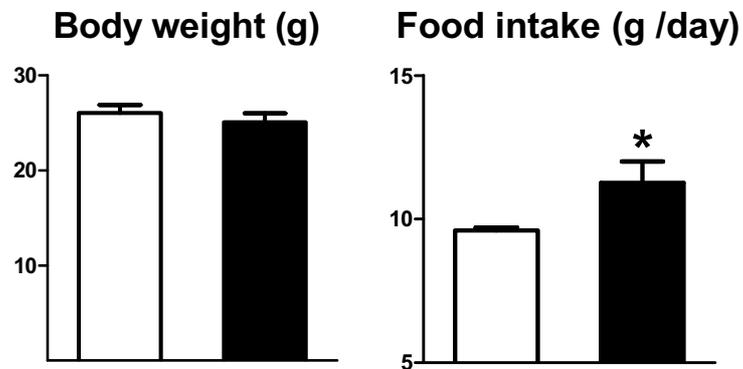


Fig 6. Gene expression in heart from wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice in the perinatal period. Bars are means \pm SEM of relative transcript levels of the indicated genes from 12h-old fed neonates (A) and 36h-old fed neonates (B) from 6-8 independent litters. Statistical significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Fig 7

A)



B)

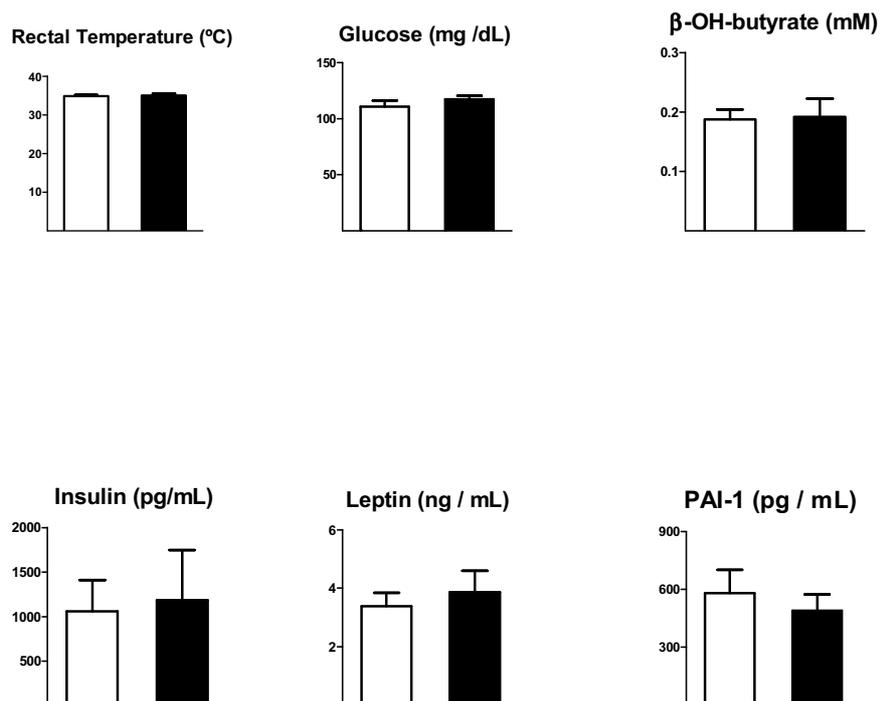
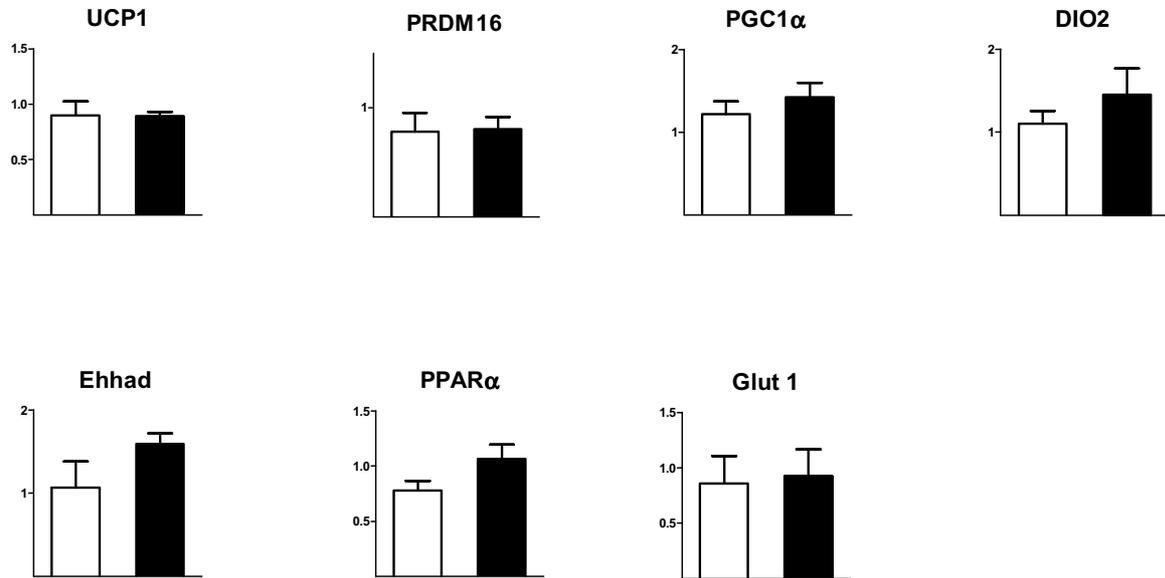


Fig 7. Physiological and circulating parameters in adult wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice exposed to 4°C environment temperature for 3 weeks. Bars are means \pm SEM of body weight, food intake and rectal temperature (A), blood glucose, plasma β -OH-butyrate, insulin, leptin and plasminogen activation inhibitor-I (PAI-I) levels (B) from 6-8 mice/group.. Statistical significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Fig 8

A) Brown adipose tissue



B) Liver

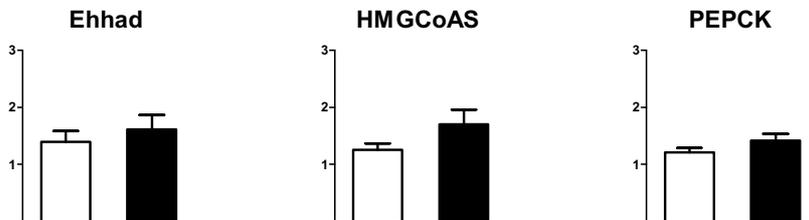
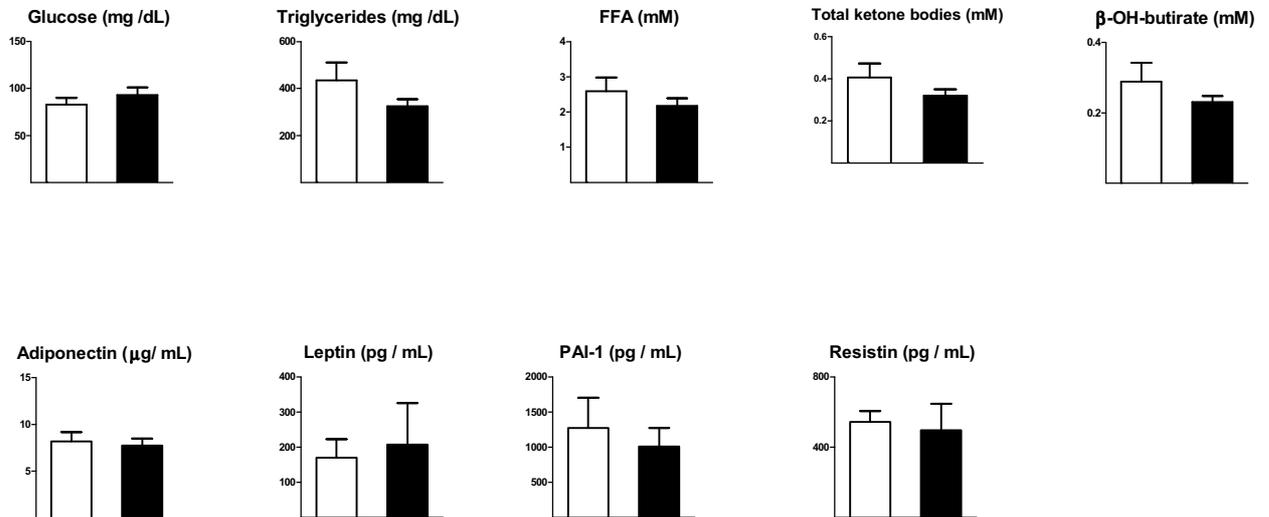


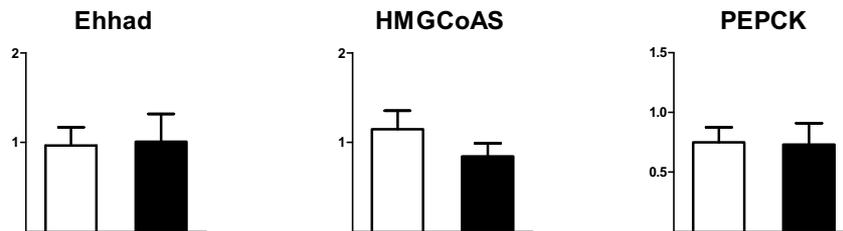
Fig 8. Gene expression in brown adipose tissue and liver from adult wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice exposed to 4°C environment temperature for 3 weeks. Bars are means \pm SEM of transcript levels in brown adipose tissue (A) and liver (B) from 6-8 mice/group. Statistical significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Fig 9

A)



B) Liver



C) Brown adipose tissue

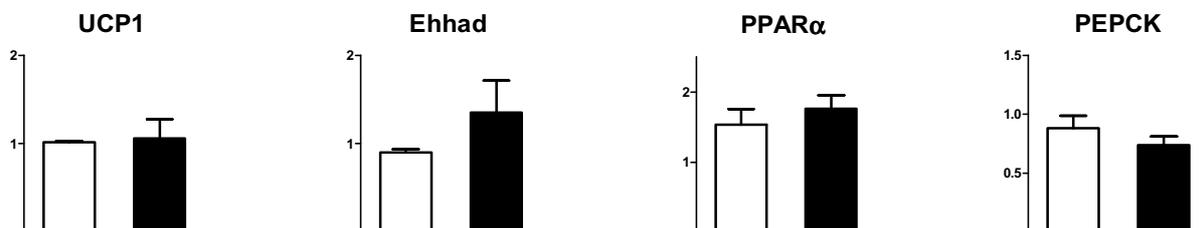


Fig 9. Circulating parameters and gene expression in liver and brown adipose tissue from adult wild-type (WT) and SIRT3^{-/-} mice fasted during 24h. Bars are means \pm SEM of the blood glucose and triglyceride levels, and plasma free fatty acid (FFA), total ketone bodies, β -OH-butyrate, adiponectin, leptin, PAI-I and resistin levels (A), and transcript levels in liver (B) and brown adipose tissue (C) from 6-8 mice/group. Statistical significance ($p < 0.05$) of the values between WT (empty bars) and SIRT3^{-/-} mice (filled bars) is shown as *.

Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α Controls Transcription of the Sirt3 Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype.

Revista: Journal of Biological Chemistry. 2011 May 13;286(19):16958-66

PMID: 21454513

PGC1 α controla la transcripció del gen SIRT3, un component essencial del fenotip termogènic de l'adipòcit marró.

SIRT3 (*silent mating type information regulation 2, homolog 3*), un membre de la família de les sirtuïnes, unes proteïnes desacetilases amb múltiples accions sobre el metabolisme i l'expressió gènica que s'expressa de forma associada a la diferenciació del teixit adipós marró. Mitjançant l'ús d'adipòcits SIRT3 $-/-$, hem determinat que SIRT3 és necessària per una resposta apropiada de les cèl·lules a l'activació noradrenèrgica mediada per AMPc de l'expressió de gens termogènics del teixit adipós marró. El co-activador transcripcional PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) induïx l'expressió de SIRT3 en adipòcits blancs i fibroblasts embrionaris com a part de la inducció global del patró d'expressió gènica específic del teixit adipós marró. A les cèl·lules sense SIRT3, PGC1 α no pot induir completament l'expressió de gens termogènics específics de l'adipòcit marró. PGC1 α activa la transcripció del gen SIRT3 a través de la coactivació del receptor nuclear orfe ERR α (estrogen-related receptor- α) el qual s'uneix a la regió proximal del promotor del gen SIRT3. Assajos de pèrdua de funció d'ERR α , indiquen que aquest és necessari per a la completa inducció de la l'expressió del gen SIRT3 en resposta a PGC1 α . Aquests resultats indiquen que PGC1 α controla l'expressió de SIRT3 i que aquesta acció és un component essencial del mecanisme global a través del qual PGC1 α induïx la completa adquisició del fenotip d'adipòcit marró diferenciat.

Informe del director

Informe del director en relació a la Tesi Doctoral d' Albert Giralt Coll (publicacions i paper del doctorand)

En tant que director de la Tesi doctoral de Albert Giralt Coll, faig constar que, a la memòria de la Tesi, els resultats obtinguts s'estructuren en tres articles científics.

Articles científics que formen part de la Tesi

1)

Giralt A, Taverna D, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F.

Role of SIRT3 in the metabolic adaptations to physiological conditions of altered thermogenic activity: a transcriptomic approach

Endocrinology (Submitted)

Aquest primer article ha estat sotmès a la revista Endocrinology És una revista oficial de la Endocrine Society i té un factor d'impacte de 4,75 essent en el primer quartil de l'àrea Endocrinology & Metabolism. És un revista de referència internacional en el marc dels estudis sobre regulació del metabolisme. El doctorand ha realitzat les tasques experimentals de pràcticament tot l'estudi, que es basa de forma important en l'estudi del model de ratolins amb invalidació del gen SIRT3 (SIRT3^{-/-}).

2)

Giralt A, Hondares E, Villena JA, Ribas F, Díaz-Delfín J, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F.

Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α Controls Transcription of the Sirt3 Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype.

J Biol Chem. 2011 May 13;286(19):16958-66.

Aquest segon article ha estat publicat a la revista Journal of Biological Chemistry. És la revista oficial de la American Society of Biochemistry, i té un gran prestigi internacional en l'àmbit de la Bioquímica i Biologia Molecular. Aquesta revista té un factor d'impacte, segons l'ISI, de 5,33 essent en el primer quartil de l'àrea de Biochemistry and Molecular Biology.

El doctorand, primer autor d'aquesta publicació, ha tingut tot el protagonisme en la obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels experiments, i ha participat amb gran protagonisme en la discussió dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el de investigadors sènior que han participat fonamentalment en donar suport a alguns aspectes experimentals així com en els aspectes intel·lectuals, d'elaboració i contextualització de les dades.

3) A més, es presenta un tercer article:

Hondares E, Iglesias R, **Giralt A**, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, Villarroya F.
Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue.
J Biol Chem. 2011 Apr 15;286(15):12983-90.

Aquest tercer article ha estat publicat a la revista Journal of Biological Chemistry. És la revista oficial de la American Society of Biochemistry, i té un gran prestigi internacional en l'àmbit de la Bioquímica i Biologia Molecular. Aquesta revista té un factor d'impacte, segons l'ISI, de 5,33 essent en el primer quartil de l'àrea de Biochemistry and Molecular Biology. L'estudi es basa en la identificació de nous factors reguladors del teixit adipós marró i el doctorand contribuí en la realització d'experiments "*in vivo*" d'exposició crònica al fred en animals experimentals, un model essencial per a l'activació del teixit adipós marró i la obtenció de les conclusions del treball.

A Barcelona, el 20 de juny de 2011

Signat:

Francesc Villarroya i Gombau
Director

Índex

Contingut	11
Introducció general	15
LES SIRTUÏNES	17
Restricció calòrica.....	18
Mecanisme d'acció i regulació de l'activitat de les sirtuïnes.....	19
Metabolisme del NAD+	21
Localització subcel·lular de les sirtuïnes	22
Regulació de l'expressió i l'activitat de les sirtuïnes	22
Sirtuïnes i metabolisme	23
SIRT3	26
Localització de sirt3.....	27
Funció de sirt3	28
SIRT3 i la producció d'ATP.....	30
SIRT3 i el metabolisme de l'acetat.....	31
SIRT3 i el metabolisme lipídic al fetge.....	33
SIRT3 i la cetogènesi.....	35
SIRT3 i el cicle de la urea.....	35
SIRT3 al múscul esquelètic.....	36
SIRT3 a cor.....	37
SIRT3 i ROS.....	39
SIRT3 i càncer.....	41
EL TEIXIT ADIPÓS	44
El teixit adipós blanc	45
La diferenciació adipocitària	46
Desenvolupament del teixit adipós blanc.....	46
Cascada d'activació de la diferenciació	46
Senyalització extracel·lular en l'adipogènesi.....	47
El teixit adipós blanc com a òrgan de reserva i mobilització de lípids	48
El teixit adipós blanc com a òrgan endocrí.....	49
Implicació del teixit adipós blanc en l'obesitat i la resistència a la insulina	51
El teixit adipós marró.....	53
La diferenciació adipocitària.....	54
Desenvolupament del teixit adipós marró.....	54
Cascada d'activació de la diferenciació.....	54

La termogènesi adaptativa	59
Regulació de la termogènesi adaptativa.	59
PGC1α com a regulador central de la termogènesi.	63
Termogènesi a humans.	63
El teixit adipós marró com a òrgan endocrí	64
Implicació del teixit adipós marró en l'obesitat i la resistència a la insulina.	65
ERRs (RECEPTORS RELACIONATS AMB ESTRÒGENS)	68
Estructura i característiques funcionals	68
Expressió i distribució tissular.	69
Element de resposta a ERRs (ERREs)	70
Control i regulació.	70
Dependència de lligand.	70
Interacció amb coreguladors.	71
Modificacions posttraduccionals	72
Funcions cel·lulars i fisiològiques	72
Funcions cel·lulars: regulació de gens implicats en el metabolisme energètic.	72
COREGULADORS TRANSCRIPCIONALS.	75
Coactivadors.	75
La família dels PGC-1s	76
PGC-1s en el cor.	79
PGC-1s en el múscul esquelètic.	80
PGC-1s en el múscul esquelètic.	81
Objectius	85
Resum global i discussió general	91
Conclusions	107
Bibliografia	111
Publicacions	147
Role of SIRT3 in the metabolic adaptations to physiological conditions of altered thermogenic activity: a transcriptomic approach.....	149
Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α Controls Transcription of the Sirt3 Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype.....	181
Informe del director	195
Índex	201

Apèndix	207
Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue.	209

Apèndix

Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue.

Revista: Journal of Biological Chemistry 2011 Apr 15;286(15):12983-90

PMID: 21317437

L'activació termogènica indueix l'expressió i l'alliberament d'FGF21 al teixit adipós marró.

FGF21 és un nou regulador metabòlic implicat en el control de l'homeòstasi de la glucosa, la sensibilitat a la insulina i la cetogènesi. Es considera el fetge, com el principal lloc d'alliberament de FGF21 a la sang. En el present article, demostrem que després de l'activació termogènica, el teixit adipós marró esdevé una font d'FGF21 sistèmic. Això és degut a una forta regulació per part de la via mediada per AMPc de la transcripció del gen d'FGF21. La noradrenalina, que actua a través de la via β -adrenèrgica mediada per AMPc, donant lloc a l'activació de la proteïna cinasa A i de la p38 MAPK, indueix la transcripció del gen FGF21 així com l'alliberament d'FGF21 per part del teixit adipós marró *in vivo*. La unió d'ATF2 al promotor del gen FGF21 media la inducció dependent d'AMPc de la transcripció de FGF21. L'alliberament d'FGF21 per part del teixit adipós marró *in vivo*, es va comprovar mitjançant l'anàlisi de les diferències arteriovenoses en la concentració d'FGF21 a través del teixit adipós marró interescapular en combinació amb el flux sanguini al teixit adipós marró i del càlcul de la vida mitja d'FGF21. Aquest anàlisi demostra que l'exposició de rates al fred, indueix l'alliberament d'FGF21 per part del teixit adipós marró *in vivo*, de forma associada a una reducció de la vida mitja del FGF21 sistèmic. Aquests resultats comporten el descobriment d'una nova via de regulació del gen d'FGF21 i d'una funció endocrina del teixit adipós marró com a font d'FGF21 que podria ser especialment rellevant en condicions d'activació de l'activitat termogènica.

