



## Regulació de FGF21 en la cèl·lula muscular

Francesc Ribas Aulinas

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.





# **Regulació d'FGF21 a la cèl·lula muscular**

Francesc Ribas Aulinas, 2014



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Grup de Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes  
Mitocondrials i Patologies Associades

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia

Programa de doctorat de Biomedicina

# **Regulació d'FGF21 a la cèl·lula muscular**

Memòria presentada per

**Francesc Ribas Aulinas**

Per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau del director

**Dr. Francesc Villarroya Gombau**

Professor titular de Bioquímica  
i Biologia Molecular



## **Agraïments**





Primer de tot m'agradaria donar les gràcies a en Francesc i la Marta per donar-me una de les poques oportunitats que se t'ofereixen a la vida per fer el que a un li agrada, o pel que simplement un hi aposta. La veritat és que són uns cracs amb el tema i no perquè els hi hagi caigut del cel, sinó perquè s'ho han treballat durant anys, fet que de ben segur que puc confirmar amb la resta de becaris que han caigut a les seves mans. De la mateixa manera, també m'agradaria fer menció tant a l'Octavi, com a la Teresa i evidentment a la Roser a la qual li dec molts dels coneixements que he adquirit amb la colònia de ratolins. La veritat és que, si bé en alguns moments tot semblaven flors i violes, n'hi ha hagut d'altres que han estat, diguem que, més durs de superar. Per això m'agradaria agrair tota l'ajuda que he rebut per part de la gent del laboratori i de la mateixa manera els que hi ha passat alguna temporada. Finalment, també vull agrair el suport i els milers d'històries compartides amb tota la gent del departament, tant del món científic com no, també a la família i evidentment a tots els amics (aquests de tots els àmbits), amb qui he compartit grans moments de la "millor" època de la meva vida i dels quals m'emporto un grandíssim record.

De la manera més sincera, moltíssimes gràcies a tots.



**Contingut**



## **CONTINGUT**

La present tesi doctoral s'estructura segons la normativa vigent pel que fa a format de tesi clàssica establert per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per tant consta de la següent estructura:

1. Abreviatures
2. Introducció
3. Objectius
4. Metodologia
5. Resultats
6. Discussió
7. Conclusions
8. Bibliografia
9. Apèndix:
  - a. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype.
  - b. FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation.



# Índex





<b>CONTINGUT</b>	9
<b>ABREVIATURES</b>	19
<b>INTRODUCCIÓ</b>	25
<b>1. LA REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ GÈNICA</b>	25
1.1 Generalitats de la regulació gènica	25
1.2 La maquinària de regulació transcripcional	25
1.3 Factors de regulació genòmica, els factors de transcripció	26
1.4 Els coreguladors	26
PGC-1 $\alpha$	27
Sirt1	27
1.5 Els receptors nuclears	28
Els PPARs	30
<b>2. ELS FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFs)</b>	31
2.1 Evolució dels FGFs	32
La família FGF en vertebrats	32
2.2 Classificació	33
2.3 Característiques estructurals	34
2.4 Els receptors FGF (FGFRs)	35
Tipologia dels receptors d'FGFs	35
Interacció amb els proteoglicans heparan sulfat i especificitat de receptor	36
Dimerització del receptor	36
2.5 El cofactor $\beta$ -Klotho	37
2.6 Mecanisme d'acció d'FGF21	39
2.7 FGFs endocrins circulants	40
<b>3. FGF21</b>	42
3.1 Distribució i expressió d'FGF21	42
3.2 Regulació de l'expressió gènica d'FGF21 al fetge i paper d'FGF21 en el metabolisme hepàtic	42
3.3 Paper d'FGF21 en el metabolisme de la glucosa i dels lípids al teixit adipós	46
Metabolisme de la glucosa	46
Metabolisme lipídic	46
3.4 Paper d'FGF21 al múscul esquelètic	48
3.5 FGF21 al múscul cardíac	49
3.6 Paper d'FGF21 en la termogènesi	49
3.7 FGF21 al pàncrees	50
3.8 Altres funcions d'FGF21	50
Increment del <i>lifespan</i>	50
FGF21 en creixement	50

<i>Torpor</i>	51
Inhibició de l'osteoblastogènesi	51
3.9 FGF21 en humans	52
3.10 FGF21 com a tractament terapèutic	53
<b>4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC</b>	<b>56</b>
4.1 Anatomia i tipus de fibres	56
Tipus de fibres i composició	56
4.2 La miogènesi	57
MyoD i MRFs	57
Factors de transcripció MEF2	58
Reclutament de comoduladors de la miogènesi	58
4.3 La regulació transcripcional al múscul esquelètic	59
Sirt1 com a modulator transcripcional al múscul esquelètic	59
PGC-1 $\alpha$ com a modulator transcripcional al múscul esquelètic	60
Els PPARs com a moduladors transcripcionals al múscul esquelètic	61
4.4 El metabolisme al múscul esquelètic	62
4.5 Importància de la funció mitocondrial en la síndrome metabòlica	63
4.6 L'activació de cinases al múscul esquelètic	64
4.7 Concepte de mioquina i relació entre l'exercici físic i els nivells d'FGF21 circulants	65
<b>5. EL MITOCONDRI I LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL</b>	<b>68</b>
5.1 Estructura i fisiologia mitocondrial	68
5.2 La cadena respiratòria mitocondrial i la fosforilació oxidativa	69
5.3 Les espècies reactives d'oxigen	70
5.4 Els efectes cel·lulars de les ROS	71
5.5 El mitocondri com a un orgànel de sensibilitat energètica que participa en la regulació de gens nuclears	72
5.6 La relació de les ROS al múscul esquelètic, fisiologia i patologia	73
5.7 Les disfuncions mitocondrials	73
Disfunció mitocondrial i malalties metabòliques	75
5.8 Les miopaties	76
<b>OBJECTIUS</b>	<b>81</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>85</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>117</b>
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>161</b>

<b>APÈNDIX</b>	183
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype	185
FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation	197



## **Abreviatures**



**ABREVIATURES**

<b>ADP</b>	Adenosine diphosphate	<b>IGFBP1</b>	IGF-1 binding protein 1
<b>Akt</b>	Protein Kinase B (PKB)	<b>IL-6/8/15</b>	Interleukin-6/8/15
<b>AMP</b>	Adenosine monophosphate	<b>IR</b>	Inverted repeat
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase	<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>ANT</b>	Adenine nucleotide translocase	<b>JNK1</b>	c-Jun N-terminal kinase 1
<b>AP-1</b>	activator protein 1	<b>KLB</b>	$\beta$ -Klotho
<b>ASNS</b>	Asparagine synthetase	<b>KO</b>	Knockout
<b>ATF 2/4</b>	Activating transcription factor 2/4	<b>LBD</b>	Ligand binding domain
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate	<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>BAT</b>	Brown adipose tissue	<b>LIF</b>	Leukemia inhibitor factor
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor	<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>bHLH</b>	basic helix-loop-helix	<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>BMI</b>	Body mass index	<b>MEF2</b>	Myogenic enhancer factor 2
<b>BMMSCs</b>	Bone marrow mesenchymal stem cells	<b>MRFs</b>	Myogenic regulatory factors
<b>C/EBP <math>\alpha/\beta</math></b>	CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha/\beta$	<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>cAMP</b>	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate	<b>mtDNA</b>	Mitochondrial DNA
<b>ChIP</b>	Chromatin immunoprecipitation	<b>MTHFD2</b>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate-responsive element-binding protein	<b>Myc</b>	Myelocytomatosis oncogene
<b>COX</b>	Cytochrome c oxidase	<b>Myf5</b>	Myogenic factor 5
<b>COX</b>	Cytochrome c oxidase	<b>MyoD</b>	Myogenic differentiation 1
<b>CR</b>	Caloric restriction	<b>MyoG</b>	Myogenin
<b>CRE</b>	cAMP response element	<b>NAD<sup>+</sup></b>	Adenine dinucleotide
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein	<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<b>DAG</b>	Diacyl-glycerol	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>DBD</b>	DNA binding domain	<b>nDNA</b>	Nuclear DNA
<b>DHA</b>	Docosahexaenoic acid	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>DR</b>	Direct repeat	<b>NR</b>	Nuclear receptor
<b>Ebox</b>	Enhancer Box	<b>NRF 1/2</b>	Nuclear respiratory factor
<b>ERK 1/2</b>	Extracellular-signal-regulated kinase	<b>OXPPOS</b>	Oxidative phosphorylation
<b>ERR<math>\alpha</math></b>	Estrogen-related receptor $\alpha$	<b>P/CAF</b>	P300/CBP-associated factor
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavin adenine dinucleotide	<b>p38 MAPK</b>	p38 Mitogen-activated protein kinase
<b>FFAs</b>	Free fatty acids	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>FGF21</b>	fibroblast growth factor 21	<b>PDK4</b>	Pyruvate dehydrogenase kinase 4
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor receptor	<b>PGC-1<math>\alpha/\beta</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor coactivator 1a
<b>FGFs</b>	Fibroblast growth factors	<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
<b>FOXO</b>	Forkhead box O	<b>PKA</b>	Protein kinase A
<b>FRS2<math>\alpha</math></b>	FGFR substrate 2 $\alpha$	<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>FSTL1</b>	Follistatin	<b>PPAR <math>\alpha/\delta/\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor $\alpha/\delta/\gamma$
<b>GH</b>	Growth hormone	<b>PPRE</b>	Peroxisome proliferator response element
<b>GLUT 1/4</b>	Glucose transporter type 1/4	<b>PSAT1</b>	Phosphohydroxythreonine aminotransferase
<b>GPX</b>	Glutathione peroxidase	<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>HAT</b>	Histone acetyltransferase	<b>RNApol</b>	RNA polymerase
<b>HDAC</b>	Histone deacetylase	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein	<b>RXR</b>	Retinoid X receptor
<b>HEB</b>	bHLH E-protein family	<b>Sir2</b>	silent information regulator 2
<b>HFD</b>	High fat diet	<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus	<b>Sirt1</b>	Mammalian ortholog silent information regulator 2
<b>HRE</b>	Hormone response element		
<b>HSGAG</b>	Heparan sulfate glycosaminoglycan		
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1		

## Abreviatures

---

<b>SOCS2</b>	Suppressor of cytokine signaling 2	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase	<b>TZD</b>	Thiazolidinediones
<b>SREBP-1</b>	Sterol regulatory element binding protein-1	<b>UCP 1/2/3</b>	Uncoupling protein 1/2/3
<b>STAT5</b>	Signal transducer and activator of transcription 5	<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>SWI/SNF</b>	SWitch/Sucrose NonFermentable	<b>WAT</b>	White adipose tissue
<b>T2D</b>	Type 2 diabetes	<b>Wt</b>	Wild-type
<b>TCA</b>	Tricarboxylic acid cycle		



# **Introducció**



## 1. LA REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ GÈNICA

### 1.1 Generalitats de la regulació gènica

La regulació de l'expressió gènica dins la cèl·lula eucariota, inclou un ampli rang de mecanismes per tal d'incrementar o disminuir la producció d'un determinat producte gènic (proteïna o **RNA (Ribonucleic acid)**) en funció de les seves necessitats fisiològiques o bioquímiques. D'aquesta manera, els programes d'expressió gènica són la base de la diferenciació cel·lular, de la morfogènesi i de la versatilitat i adaptabilitat de qualsevol organisme, fets importants en qualsevol canvi evolutiu. Aquesta regulació gènica es pot donar a qualsevol dels passos que conformen l'expressió d'un gen, de manera que podem tenir modificacions a nivell de cromatina, de transcripció, de processament de l'RNA o mitjançant la regulació a través de modificacions postraduccionalment a nivell de proteïna.

En termes genètics, aquests canvis es produeixen a partir de la regió promotora d'un gen, la qual inicia la transcripció d'aquest. Els **promotors** són regions del **DNA (Deoxyribonucleic acid)** entre 100 i 1.000 parells de bases que estan situats *upstream* i a la mateixa cadena dels gens que es transcriuen. Aquests, contenen seqüències específiques de DNA i elements de resposta que permeten que s'hi uneixin diferents proteïnes per iniciar el procés de transcripció per part de l'RNA polimerasa.

### 1.2 La maquinària de regulació transcripcional

La regulació transcripcional d'un gen concret determina el moment en el qual es dona la transcripció d'aquest i la quantitat de RNA que es crearà a través del procés. Cal tenir en compte que el nivell de transcripció per acció de l'RNA polimerasa, pot ser regulat per diferents mecanismes:

- Per l'**especificitat de determinats factors**, que alteren l'especificitat de l'RNA polimerasa per un promotor concret o un set de promotors, fent que aquesta s'hi uneixi en menor o major grau.
- Per l'acció dels **repressors**, que s'uneixen a les regions no codificants de la cadena de DNA, els quals són propers o es troben solapats a la regió promotora, i impedeixen que s'hi pugui unir l'RNA polimerasa per iniciar el procés de transcripció i d'expressió gènica.
- Pels **factors de transcripció generals**, que són els responsables de posicionar l'RNA polimerasa al començament de l'origen de transcripció del gen, per tal que aquesta pugui iniciar la transcripció de l'mRNA (*Messenger RNA*).
- Pels **activadors**, els quals són molècules que potencien la interacció entre l'RNA polimerasa i un determinat promotor, incrementant l'expressió d'aquell gen. Bàsicament, incrementen l'atracció de la polimerasa pel promotor, a través de la creació d'interaccions amb les subunitats de l'enzim o canviant l'estructura del DNA.
- Pels **potenciadors** o *enhancers*, que són zones de la doble hèlix del DNA que s'uneixen per acció dels activadors, per tal d'aproximar zones promotores al complex d'iniciació.

En eucariotes, la regulació transcripcional acostuma a involucrar múltiples interaccions entre els diferents factors de transcripció, ja siguin activadors o repressors, fet que permet a la cèl·lula tenir una regulació molt precisa en funció de les seves necessitats i condicions ambientals.

### 1.3 Factors de regulació genòmica, els factors de transcripció

L'expressió gènica és un procés molt complex i altament regulat a nivell transcripcional. El primer pas d'aquesta passa per la unió d'un determinat lligand a un receptor el qual pot iniciar una via de senyalització. Aquesta pot iniciar l'activació de proteïnes anomenades factors de transcripció, els quals poden ser reclutats per la maquinària de transcripció. Els **factors de transcripció** són proteïnes que s'uneixen específicament a les seqüències de DNA, controlant la transcripció de la informació genètica de DNA a mRNA. Aquests poden dur a terme la seva funció per si sols o formant part d'un complex proteic més gran i promovent (com a activador) o inhibint (com a repressor) el reclutament de l'RNA polimerasa a certs gens. Una característica clau dels factors de transcripció és que contenen un o més DBDs (*DNA binding domain*), cosa que no posseeixen altres proteïnes que també intervenen en el procés de regulació transcripcional, com ara els coactivadors, les histones acetilases i desacetilases, les cinases i les metilases, i que per això no es poden classificar com a tals. Tanmateix, en aquests factors de transcripció s'hi poden unir altres molècules que incrementen el grau de complexitat de la regulació. Els factors de transcripció i els cofactors també poden ser regulats per l'acció d'alteracions estructurals reversibles com ara les fosforilacions o inactivats per processos de proteòlisi, entre altres.

### 1.4 Els coreguladors

Com ja s'ha comentat abans, l'expressió gènica és un procés molt complex i altament regulat, entre altres, a nivell transcripcional, el qual inclou la unió de factors de transcripció de manera coordinada a elements específics del DNA, permetent així la modulació de la transcripció dels gens. D'altra banda, els coreguladors o cofactors són proteïnes que intervenen en el control de la transcripció gènica a través de la unió amb factors de transcripció sense unir-se directament al DNA. Segons l'efecte d'amplificació o de repressió de la transcripció es denominen coactivadors o corepressors respectivament. A nivell de la cèl·lula eucariota, els **coactivadors** són proteïnes que incrementen l'expressió gènica a través de la unió a un activador o factor transcripcional, el qual es pot unir al DNA. Tot i que els coactivadors no s'uneixen al DNA, ajuden a estabilitzar el complex transcripcional a la zona promotora del gen, així com també poden controlar diferents subpassos de la transcripció com ara l'RNA *splicing*. Els **corepressors** són proteïnes que inhibeixen l'expressió gènica, sense unir-se directament al DNA, sinó que ho fan a través dels factors de transcripció. Sovint competeixen per els mateixos lloc d'unió que els coactivadors i també poden reclutar diferents desacetilases d'histones les quals fan que el DNA estigui menys accessible a tota la maquinària de transcripció.

Dins aquest context de regulació transcripcional, a continuació esmentem alguns dels actors moleculars implicats en els estudis que formen part de la present Tesi.

### PGC-1 $\alpha$

**PGC-1 $\alpha$**  (*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* ), pertany a la família de coactivadors transcripcionals PGC (PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  i PGCR), els quals interactuen amb diferents receptors nuclears i altres factors de transcripció, regulant la maquinària de transcripció. PGC-1 $\alpha$  va ser identificat originàriament per la seva interacció amb PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) i s'expressa preferentment als teixits amb una gran capacitat oxidativa com ara al cor, al BAT (*Brown adipose tissue*) i al múscul esquelètic (Kressler et al., 2002; Puigserver et al., 1998). En aquests teixits, PGC-1 $\alpha$  desenvolupa el seu rol regulant la capacitat i funcionalitat mitocondrial, tot coactivant els factors de transcripció nuclear NRF1 i NRF2 (*Nuclear respiratory factor 1 i 2*) (Wu et al., 1999). Que sigui capaç d'interaccionar amb un gran nombre de proteïnes, fa que també estigui involucrat en el control d'altres aspectes del metabolisme energètic cel·lular. També s'ha descrit que PGC-1 $\alpha$  coactiva receptors nuclears com ara PPAR $\alpha$  i PPAR $\delta$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  i  $\delta$* ), exercint així el control sobre l'oxidació dels àcids grassos (Vega et al., 2000; Wang et al., 2003).

### Sirt1

**Sirt1** (*Mammalian ortholog silent information regulator 2*), forma part de la família de proteïnes desacetilases que, juntament amb la resta de sirtuïnes, es van descobrir com a homòlegs de Sir2 (*Silence information regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae* a mamífer, anomenats de Sirt1 a Sirt7 (Frye, 1999). Després de les primeres investigacions, es va veure que tot i la seva homologia en el domini central, aquestes tenien bastants diferències en els seus dominis carboxi i amino terminal (C- i N-terminal), fet que els hi conferia activitats enzimàtiques diferents així com també diferent distribució intracel·lular i tissular. Aquesta família de proteïnes està implicada en la regulació de diverses vies metabòliques i de l'expressió gènica, modulant les activitats d'aquestes vies en funció del grau d'acetilació dels seus components (Bao and Sack, 2010).

Sirt1 s'expressa en multitud de teixits i es localitza al nucli. Aquesta, actua desacetilant proteïnes histones, així com també multitud de factors de transcripció, modulant-ne la seva activitat i regulant processos com l'apoptosi, la supervivència cel·lular, la reparació del DNA, el desenvolupament i la inflamació. També es coneix que és activa en condicions de manca de nutrients, de manera que intervé en el metabolisme energètic cel·lular. En el múscul esquelètic, aquesta exerceix un control transcripcional positiu sobre el gen PGC-1 $\alpha$ , principalment a través de la interacció amb factors miogènics com MyoD (*Myogenic differentiation factor 1*) i MEF2 (*Myogenic enhancer factor 2*) en la seva regió promotora (Amat et al., 2009). En cultius cel·lulars de C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> es va observar que Sirt1 inhibia la diferenciació miogènica (Fulco et al., 2003; Fulco et al., 2003) i en mioblasts, on es sobreexpressa Sirt1, aquesta

impedeix la diferenciació, exercint un efecte repressor sobre la coactivació de factors miogènics tipus MyoD. D'aquesta manera, sembla que Sirt1 actuï modulant l'activitat del factor de transcripció miogènic MyoD a través de la potenciació d'un *auto-regulatory loop* de PGC-1 $\alpha$  que permet a aquest últim incrementar l'activitat coactivadora sobre el seu propi promotor (Amat et al., 2009). D'altra banda, Sirt1 també modula negativament l'activitat de la histona desacetilasa p300, coregulador transcripcional implicat en l'augment de la transcripció de determinats gens diana com és el cas del gen UCP3 (*Uncoupling protein 3*) en el context muscular (Amat et al., 2007). Tanmateix, el rol de Sirt1 en el context muscular no es limita només a la inhibició de la diferenciació miogènica, sinó que intervé en altres processos com la contracció muscular, així com també en la regulació de l'activitat de membres de la família de les proteïnes FOXO (*Forkhead box O*), les quals s'ha descrit que estan implicades en la supervivència cel·lular (Motta et al., 2004).

### 1.5 Els receptors nuclears

La **superfamília dels NR** (*Nuclear receptors*) participa en molts processos biològics com ara el creixement, el desenvolupament, la diferenciació, la morfogènesi, etc. Aquests intervenen en els efectes biològics de les hormones i altres compostos com ara vitamines i àcids grassos, així com també altres molècules sintètiques (que s'uneixen als NRs), modulant-ne la seva activitat. També participen en la regulació de diferents funcions implicades amb la homeòstasi i el desenvolupament.

Aquestes proteïnes es caracteritzen pel fet que quan se'ls uneix un lligand, esdevenen actives i poden exercir la seva funció, que és la de modular l'expressió gènica (Mangelsdorf et al., 1995). Els NRs regulen l'expressió gènica mitjançant la unió a seqüències específiques del DNA anomenades HREs (*Hormone response elements*), situades dins la regió promotora dels gens en qüestió. Aquests elements de resposta als receptors nuclears són seqüències de pocs nucleòtids, altament conservades, i normalment es troben rodejades per altres seqüències reconegudes alhora per altres factors de transcripció (exemple: AP-1 (*Activator protein 1*), FOXO1, CREB (*cAMP response element-binding protein*), Myc (*Myelocytomatosis oncogene*) i C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$* )) (Carroll and Brown, 2006; Cheng et al., 2006; Laganieri et al., 2005). La seqüència de DNA reconeguda, la orientació de la seqüència i l'especificitat de les bases nucleotídiques poden ser de vital importància pel fet que la resposta al lligand sigui de repressió o d'activació gènica. Aquest fet explicaria el diferent rol que pot jugar un mateix NR sobre distints promotors. D'altra banda, la unió dels NRs també comporta l'associació i unió de diferents coreguladors que potencien i regulen el reclutament de l'RNAPol II (*RNA polimerase II*) i altres factors de transcripció generals (Orphanides et al., 1996; Dilworth and Chambon, 2001; Metivier et al., 2006). De la mateixa manera, la unió del lligand als NR provoca un canvi conformacional que estabilitza l'estructura dels receptors i facilita el reclutament de coreguladors de transcripció positius o negatius (Perissi and Rosenfeld, 2005).

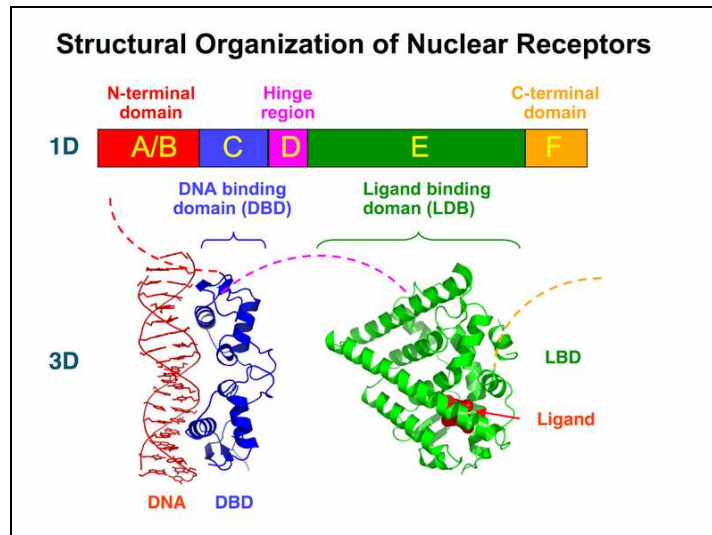
Tot i que alguns d'aquests NRs es poden unir com a monòmers a la seva seqüència consens, la majoria d'ells ho fan com a dímers, ja siguin homodímers o heterodímers. Aquesta superfamília es classifica en quatre tipus en funció de les

característiques del lligand, del tipus de dímer que formen i de les seves propietats d'unió al DNA (Mangelsdorf et al., 1995):

- **Receptors esteroïdals o de tipus I:** S'uneixen com a homodímers a seqüències palindròmiques del DNA IR (*Inverted repeats*). Es caracteritzen per ser receptors d'hormones esteroïdes (estrògens, glucocorticoides, andrògens) localitzats al citoplasma i que es transloquen al nucli un cop s'hi ha unit l'hormona.
- **Receptors no esteroïdals o tipus II:** S'uneixen a seqüències en repetició directa del DNA DR (*Direct repeat*) com a heterodímers amb el receptor de l'àcid 9-cis retinoic RXR (*Retinoid X receptor*). En aquesta família s'hi troben els receptors d'hormones tiroïdals, retinoics, de vitamina D i els receptors activats per proliferadors peroxisomals (PPARs). La localització nuclear d'aquests receptors és independent de l'activació per part del lligand.
- **Receptors de classe III:** Aquests són similars als de tipus I pel fet que s'uneixen a repeticions directes del DNA DR com a homodímers i inclou receptors com el RXR.
- **Receptors de classe IV:** S'uneixen al DNA com a monòmers o dímers, però només un dels dominis d'unió del receptor s'uneix a una de les meitats dels HREs. Aquests receptors regulen positivament la transcripció de determinats gens de manera constitutiva.

Pel que fa a la seva estructura, els receptors d'aquesta superfamília dels receptors nuclears es caracteritzen per tenir uns dominis amb unes funcions ben definides:

- **Domini d'unió al DNA (DBD):** És un dels dominis més conservats i està format per 2 dits de zinc localitzats a la part C-terminal, la qual també participa en la dimerització (Mangelsdorf et al., 1995).
- **Domini d'unió al lligand (LBD):** El domini LBD (*Ligand binding domain*), està format per 12 hèlix  $\alpha$  antiparal·leles organitzades en forma de butxaca hidrofòbica, fet que permet unir el lligand (Uppenberg et al., 1998). Aquest també participa en la dimerització.
- **Dos dominis de transactivació:** AF-1 a l'extrem N-terminal i AF-2 (dependent de lligand) en el LBD (Nagpal et al., 1993).
- **Domini frontissa:** Permet els canvis conformacionals de la proteïna.



**Figura 1.** Esquema de l'estructura 1D i 3D dels receptors nuclears. Imatge de wikipedia.org.

### Els PPARs

Els **PPARs** (*Peroxisome proliferator-activated receptors*) formen part de la família de receptors tipus II, els quals actuen com a factors de transcripció dependents de lligand. Els PPARs estan involucrats en la regulació de l'activitat transcripcional de gens implicats en el metabolisme lipídic, proteic i de carbohidrats, en el balanç energètic, en la resposta inflamatòria, en la diferenciació cel·lular, en l'adipogènesi i en la tumorigènesi. Aquests receptors nuclears s'activen a través de la unió de lligands naturals o sintètics i, algun d'ells provoca la proliferació dels peroxisomes, fet que atribueix el nom a la família. Actualment es coneixen tres tipus de PPARs codificats per tres gens independents: **PPAR $\alpha$** , **PPAR $\beta/\delta$**  i **PPAR $\gamma$** , tots ells amb diferent distribució tissular i activats alhora per lligands diferents. Un cop els lligands s'uneixen a aquests tipus de receptors nuclears, els PPARs dimeritzen amb el receptor RXR (Keller et al., 1993) i desencadenen la seva via de senyalització. Un cop dimeritzats, aquests PPARs es poden unir als elements **PPRE** (*Peroxisome proliferator response elements*) en els seus gens diana i així poder modular la transcripció. Els PPREs estan constituïts per unes seqüències de DNA de repetició directa separada per un nucleòtid (DR-1) tipus 5'-AGGTCAnAGGTCA-3'. En la meitat 5' s'hi uneix el PPAR, mentre que a la regió més cap a 3' s'hi uneix el receptor RXR.



## **2. ELS FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFs)**

Els **FGFs** (*Fibroblasts growth factors*) formen una gran família de factors de creixement polipeptídics que es troben en un ampli rang d'organismes, des dels nematodes fins als humans. Els FGFs es van observar per primera vegada a l'any 1939 degut a la seva activitat mitogènica (O.A.Trowell and E.N.Willmer, 1939) i el primer d'ells es va aïllar a la dècada dels anys setanta (Gospodarowicz, 1974). D'ençà, s'han identificat molts més membres d'aquesta família. En vertebrats, els 22 membres de la família FGF comparteixen entre ells una identitat aminoacídica entre el 13 i el 71%, es troben en un ventall de pesos moleculars que van des dels 17 als 34 kDa i estan caracteritzats per posseir un domini central conservat d'uns 120 o 130 aminoàcids (aa). Concretament, entre les espècies de vertebrats, els FGFs estan altament conservats tant pel que fa a l'estructura dels gens, com pel que fa a les seqüències d'aminoàcids. Una altra característica a destacar dels FGFs és la seva alta afinitat pel glicosaminoglicà HSGAG (*Heparan sulfate glycosaminoglycan*), el qual és requerit per activar un dels quatre receptors dels FGFs de la superfície cel·lular durant la transmissió del senyal per acció d'aquests factors de creixement. La transducció del senyal per part del FGFs tradicionals (paracrins) es dona a través de receptors tirosina-cinases d'alta afinitat anomenats **FGFRs** (*Fibroblast growth factor receptors*) i mitjançant la presència d'heparan sulfat com a cofactor. Aquest procés no requereix d'una gran afinitat per tal que es duguin a terme les interaccions FGF/FGFR. Per contra, la subfamília de FGF19 (FGFs endocrins) requereix la presència d'unes proteïnes transmembrana anomenades **Klotho** que funcionen com a coreceptors, per tal que es pugui activar la senyalització del FGFR (Goetz et al., 2007).

Pel que fa a les funcions més rellevants, s'ha d'esmentar que durant el desenvolupament embrionari, els FGFs tenen diversos rols en la regulació, la proliferació, la migració i la diferenciació cel·lular. Per contra, en l'organisme adult, els FGFs són factors homeostàtics involucrats en la reparació tissular i en la resposta al dany cel·lular, malgrat que quan aquests s'expressen inadequadament en determinats teixits, alguns FGFs també poden contribuir en la patogènesis de càncers. Algun subgrup de la família FGF expressat en teixits d'adults és important per la transducció del senyal en el sistema nerviós central i perifèric (Ornitz and Itoh, 2001).

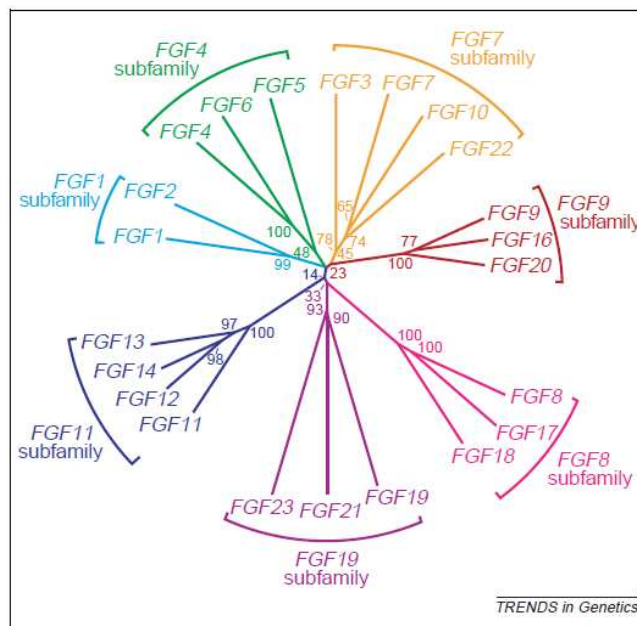
Alguns dels FGFs han estat aïllats com a factors de creixement cel·lulars, altres s'han identificat per homologia basada en PCR (*Polimerase Chain Reaction*) o mitjançant cerques en les bases de DNA, mentre que d'altres també s'han identificat com a gens responsables de malalties hereditàries i de càncer (Ornitz and Itoh, 2001; Itoh and Ornitz, 2011). **FGF21** (*Fibroblast growth factor 21*) va ser descrit per primera vegada l'any 2000 (Nishimura et al., 2000) i un any més tard es va poder comprovar que estructuralment formava part de la família dels FGFs (Ornitz and Itoh, 2001).

## 2.1 Evolució dels FGFs

Els FGFs dels vertebrats poden classificar-se en diferents subgrups o subfamílies. Dins dels membres d'un mateix grup, aquests comparteixen una alta similitud de seqüència aminoacídica, així com també altres propietats bioquímiques i de desenvolupament dins els organismes. A l'any 2005, Popovici i alguns col·laboradors van proposar la divisió de la família de gens FGFs en vuit subfamílies, basant-se en anàlisis de filogenètica molecular i de conservació de seqüència en: **subfamília A** (incloïa els ortòlegs FGF1 i 2), **subfamília B** (ortòlegs FGF3,7,10 i 22), **subfamília C** (ortòlegs FGF4,5 i 6), **subfamília D** (ortòlegs FGF8, 17,18 i 24), **subfamília E** (ortòlegs FGF9, 16 i 20), **subfamília F** (ortòlegs FGF11, 12, 13 i 14), **subfamília G** (ortòlegs FGF15/19, 21 i 23) i la **subfamília H**, la qual era específica d'artròpodes (Popovici et al., 2005). Aquesta classificació va ser àmpliament acceptada, fins que Oulion va proposar una nova classificació on es confirmava la relació entre els membres de la subfamília FGF4/5/6, però on suggeria la creació d'una nova subfamília pels ortòlegs de FGF3 en mamífers (Oulion et al., 2012). Per altra banda, s'ha observat que els membres dels diferents subgrups dels FGFs no estan estretament lligats en el genoma, fet que suggereix que les diferents subfamílies estaven generades a partir de translocació o duplicació gènica entre els diferents llinatges i no per efectes de duplicació local (Itoh and Ornitz, 2004).

### La família FGF en vertebrats

Una anàlisi filogenètica de la família d'FGF21 humana identifica fins a **7 subfamílies** en vertebrats (Itoh and Ornitz, 2004; Itoh and Ornitz, 2011), les quals comprenen **22 membres** (de FGF1 a FGF23). Si bé en ratolins s'ha identificat FGF15 com a un d'ells, s'ha vist que aquest no es troba en humans, sinó que el seu ortòleg correspon a FGF19.



**Figura 2.** Les relacions evolutives entre els gens de la família dels FGFs humans. FGF15 és un gen de ratolí, el qual té el seu ortòleg FGF19 en humans (Itoh and Ornitz, 2008).

S'han trobat ortòlegs de la major part dels FGFs humans en altres vertebrats, fet que indica que cap gen FGF ha estat adquirit en el llinatge dels mamífers després de la seva separació de la resta de vertebrats. En ratolins, les subfamílies són idèntiques a la dels humans (Itoh and Ornitz, 2008). Els membres de cadascuna de les 7 subfamílies tenen una alta similitud de seqüència, així com de característiques estructurals i de propietats bioquímiques. La majoria dels gens FGFs humans es troben disseminats pel genoma, fet que també indica que s'han generat a partir de duplicacions i translocacions durant l'evolució. Altres, en canvi, sí que es troben agrupats en el genoma i separats per poques quilobases, suggerint que s'han generat a partir de models de duplicació local, seguits per duplicacions gèniques més globals. Pel que sembla, hi va haver un parell d'ones d'expansió dels FGFs al llarg de l'evolució, una present en els metazous primitius i l'altra a partir de l'aparició dels cordats. Bàsicament existeixen dues teories: la primera hipòtesi diu que les 8 subfamílies d'FGFs provenen d'un primer grup de dos gens en un ancestre eumetazou i que la diversitat de la subfamília es va assolir a través de duplicacions específiques de cordats, mentre que la segona hipòtesi diu que la diversitat de la subfamília es va adquirir en els primers estadis de l'evolució dels metazous, amb la presència ja de les 8 subfamílies en l'ancestre eumetazou i que després es van produir múltiples pèrdues gèniques en els llinatges posteriors (Oulion et al., 2012). Anàlisis filogenètiques indiquen que **la subfamília de FGF15/19, 21 i 23** pot derivar d'un gen ancestral relacionat amb FGF4, generada per duplicacions gèniques locals, seguides per una divergència en la seqüència aminoacídica (Itoh and Ornitz, 2004).

## 2.2 Classificació

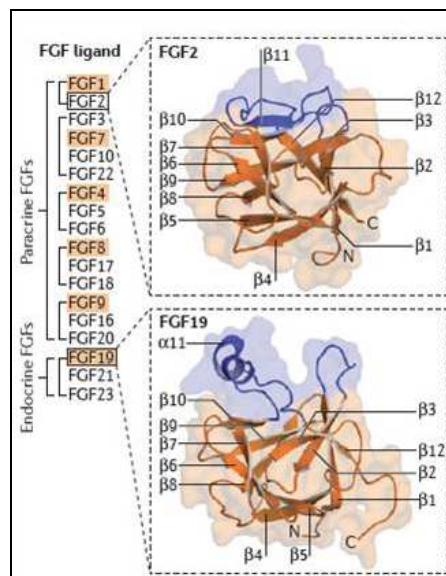
Els 22 membres de la família dels FGFs en mamífers s'expressen diferencialment en molts, o en tots, els teixits. Aquests poden ser classificats segons els seus mecanismes d'acció en: intracrins, paracrins o endocrins (Itoh and Ornitz, 2011):

- **Intracrins:** En formen part FGF11/12/13/14 i aquests no són secretats extracel·lularment. Actuen com a molècules intracel·lulars d'una manera independent dels FGFRs, interactuant amb els dominis intracel·lulars de canals de sodi dependents de voltatge i amb proteïnes MAPKs (*Mitogen activated protein kinases*) neuronals, entre altres. L'únic rol conegut d'aquests FGFs és la regulació de l'excitabilitat elèctrica de les neurones i possiblement d'altres tipus cel·lulars.
- **Paracrins:** Els comprenen les famílies de FGF1/2/5, FGF3/4/6, FGF7/10/22, FGF8/17/18 i FGF9/16/20. La majoria són proteïnes secretades juntament amb pèptids senyals N-terminals i amb un lloc d'interacció amb molècules *heparin-like* (necessari per la correcta interacció amb els FGFRs). Aquests FGFs intervien en respostes biològiques com a proteïnes extracel·lulars, unint-se als receptors FGFRs tirosina-cinases de la superfície cel·lular amb heparin/heparan sulfat com a cofactor. La interacció amb els receptors induïx la dimerització funcional, la transfosforilació i l'activació de diverses vies de senyalització *downstream*. Tanmateix, alguns d'ells poden translocar-se directament a nucli i actuar d'una manera intracrina.

- **Endocrins:** Compostos pels FGF15/19, FGF21 i FGF23, els quals intervenen en respostes biològiques d'una manera dependent dels receptors d'FGFs. Aquests s'uneixen a heparin/heparan sulfat (altament present a la membrana cel·lular) amb baixa afinitat, fet que els permet actuar d'una manera endocrina. Els FGFs d'aquest grup actuen com a factors de diferenciació en embrions i com a hormones en adults.

### 2.3 Característiques estructurals

Molts FGFs comparteixen una regió nuclear interna homòloga d'uns 120 aminoàcids, els quals es pleguen en una estructura en forma de trèvol- $\beta$  ( $\beta$ -*trefoil*). Els FGFs paracrins tenen un domini  $\beta$ -*trefoil* regular compost per 12 làmines  $\beta$ , mentre que els FGFs endocrins tenen un domini  $\beta$ -*trefoil* atípic, ja que només està format per 11 làmines  $\beta$  (Goetz et al., 2007; Goetz and Mohammadi, 2013). Aquest domini nuclear altament conservat es troba flanquejat per seqüències amino i carboxi terminals altament divergents, les quals juguen un paper importantíssim a l'hora de conferir les diferents propietats funcionals als FGFs. En els FGFs paracrins, els residus dels *loops* que connecten les làmines  $\beta$  1-2 i els que hi ha entre la regió 10 i 12, conformen el lloc d'unió per l'heparan sulfat. En el cas dels endocrins, aquest lloc d'unió difereix completament, fet que els hi atribueix característiques especials lligades a la seva funcionalitat (Goetz and Mohammadi, 2013).



**Figura 3.** Estructura tridimensional dels diferents FGFs (Goetz and Mohammadi, 2013).

Els estudis de modelització estructural han permès revelar que FGF21 està format per un nucli estructural de 120 aa disposats en una estructura de trèvol- $\beta$ . Però aquest, de la mateixa manera que en la resta dels integrants de la seva família, té uns nuclis N- i C-terminal amb unes seqüències significativament diferents a la resta dels FGFs paracrins (Yie et al., 2009; Micanovic et al., 2009). Aquests estudis han demostrat que els FGFs endocrins, a part del nucli central altament conservat, també posseeixen un domini de 14 aa a la part C-terminal el qual està poc estructurat, però que és de vital importància per la interacció amb el cofactor  $\beta$ -Klotho i per la funció d'FGF21 (Yie

et al., 2009). S'ha comprovat que la deleció d'uns 5 aa en aquest extrem comporta la disminució de l'afinitat per a  $\beta$ -Klotho i de la força de senyalització *downstream*, així com també de la seva resposta funcional (Micanovic et al., 2009). Així mateix, els FGFs també posseeixen una regió N-terminal no involucrada en la unió de  $\beta$ -Klotho (veure més endavant), però molt important per l'eficiència de l'activació del receptor dels FGFs. En el cas dels FGFs de la família FGF19 (entre els que hi ha FGF21) s'ha observat que aquest domini té una afinitat més baixa pels FGFRs de la que ofereixen els FGFs paracrins, fet que explicaria una dimerització menys òptima del receptor, un assemblatge més dèbil de tots els components de la transducció de senyal i en última instància facilitaria els efectes endocrins biològics d'aquesta subfamília (Micanovic et al., 2009).

## 2.4 Els receptors d'FGF (FGFRs)

Els FGFs duen a terme els seus efectes unint-se als **FGFRs** presents en les superfícies cel·lulars. Aquests són receptors tirosina-cinasa (~800 aminoàcids) que contenen tres dominis extracel·lulars immunoglobulina-*like* d'unió a lligand (D1-D3), un domini d'unió a heparan sulfat, un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic tirosina-cinasa. Un tret distintiu important d'aquests FGFRs és la presència d'una seqüència àcida rica en serines en el lloc d'unió entre D1 i D2, anomenada caixa àcida. El fragment exterior D2-D3 és suficient per unir específicament el lligand, mentre que s'ha postulat que el fragment D1 i la caixa àcida tindrien un paper d'autoinhibició (Wang et al., 1995).

### Tipologia dels receptors d'FGFs

Aquests receptors tirosina-cinasa estan codificats per 4 gens diferents: **FGFR1-FGFR4** (Itoh and Ornitz, 2004). Algunes isoformes dels FGFRs existeixen com a resultat d'un *splicing* exònic que elimina el domini D1 o la caixa àcida en els FGFR1-FGFR3. Una altra opció és que es doni un *splicing* alternatiu en la segona meitat del domini D3 dels FGFR1-3 donant lloc a dues **isoformes**: la **b (FGFR1-3b)** i la **c (FGFR1-3c)**, que difereixen en el seu domini extracel·lular i per tant, tindran diferents especificitats d'unió (Beenken and Mohammadi, 2009). Les isoformes b es trobaran predominantment en teixits epitelials, mentre que les isoformes c seran presents bàsicament en teixits mesenquimals (Johnson et al., 1991). S'ha observat que no hi ha cap relació entre les localitzacions cromosomals dels gens que codifiquen pels FGFs i els que codifiquen pels receptors d'aquests. De la mateixa manera que passava amb els FGFs, l'expansió de la família dels FGFRs es va aconseguir a partir d'un ancestre comú (a partir de duplicacions gèniques durant els inicis de l'evolució dels vertebrats) i cohetàniament amb l'expansió dels FGFs. Aquest fet, va contribuir a incrementar la combinatòria d'especificitats entre lligand i receptor. A més a més, cal sumar-hi el fet que els fenòmens d'*splicing* en van incrementar la diversitat funcional (Itoh and Ornitz, 2004).

### Interacció amb els proteoglicans heparan sulfat i especificitat del receptor

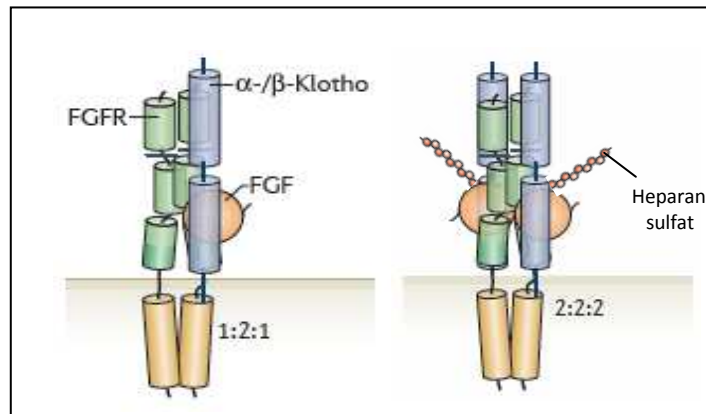
Una característica biològica important dels FGFs és precisament la seva capacitat d'interacció amb els proteoglicans heparin o heparan sulfat, els quals són abundants a les superfícies cel·lulars i a la matriu pericel·lular i extracel·lular, fet que els estabilitza enfront la desnaturalització tèrmica i la proteòlisi. A més, aquest heparan sulfat evita la difusió i alliberament dels FGFs a l'espai intersticial. Els FGFs paracrins tenen una alta afinitat pels heparan sulfat, a diferència dels FGFs endocrins. Així doncs, com que aquests primers queden immobilitzats a la matriu pericel·lular i extracel·lular, propers al seu lloc de secreció, només poden actuar entre les cèl·lules del mateix òrgan. La unió dels FGFs clàssics als complexos **FGFR/heparan sulfat** provoca la dimerització dels receptors i una autofosforilació que comporta la fosforilació de substrats *downstream*, com ara el FGFS2 $\alpha$  (*FGFR substrate 2 $\alpha$* ), la PLC (*Phospholipase C*) i altres elements de la seva cadena de transducció de senyal, que inclouen a MAPKs com ERK1 i ERK2 (*Extracellular signal regulated kinase 1 i 2*), entre altres, processos que finalitzen amb diferents respostes cel·lulars (Itoh and Ornitz, 2004; Kharitononkov et al., 2008; Itoh and Ornitz, 2011; Goetz and Mohammadi, 2013).

A part de la seva funció de facilitar el segrest del lligand a prop del lloc d'acció, proporcionant l'estabilitat del lligand i limitant el radi de senyalització d'aquest, els heparan sulfat també intervenen en la formació dels gradients d'FGFs (fent que s'adhereixin més a uns determinats FGFs respecte a altres) en la matriu extracel·lular. Això determina diferents processos cel·lulars com ara la migració cel·lular, la proliferació o el destí cel·lular durant la morfogènesi tissular o el desenvolupament embrionari (Goetz and Mohammadi, 2013). En el cas concret d'FGF21, tot i que no es coneix com contribueix l'heparan sulfat en la formació del complex del receptor, també s'ha postulat que és important a l'hora de determinar l'especificitat lligand-receptor, ja que la seva presència en potencia la resposta (Suzuki et al., 2008). En canvi, els membres de la subfamília de FGF19 (15 en ratolins) que inclou FGF21 i FGF23, tenen una baixa afinitat pels proteoglicans heparan sulfat de la membrana extracel·lular (Goetz et al., 2007) i són capaços de difondre lliurement per la membrana, passar a la circulació i actuar lluny de la cèl·lula de secreció, en altres teixits diana (Goetz and Mohammadi, 2013). El fet de no tenir afinitat pels heparan sulfats fa que, per compensar-ho, els FGFs endocrins necessitin com a cofactors els membres de la família de proteïnes Klotho per tal de poder dur a terme la seva unió FGF-FGFR (Itoh, 2010).

### Dimerització del receptor

Com ja s'ha comentat, els FGFs paracrins requereixen els heparan sulfats com a cofactors per tal d'unir-se fortament als FGFRs i per promoure la formació d'un complex o **dímer** de transducció de senyal **FGF-FGFR-HSGAG** en una relació 2:2:2, el qual és més estable que el complex 1:1:1. En el complex, cada lligand interacciona amb ambdós receptors i els dos receptors també interaccionen directament l'un amb l'altre. Tot plegat, estabilitzat per l'heparan sulfat, el qual fa d'engranatge entre el lligand i el receptor. La dimerització dels receptors incrementa l'afinitat d'unió dels

l·ligands per l'heparan sulfat, restringint la difusió del l·ligand a la matriu extracel·lular i, com a conseqüència, limitant el radi de senyalització del l·ligand (Goetz and Mohammadi, 2013). En el cas dels FGFs endocrins, aquests requereixen la presència del cofactor  $\beta$ -Klotho per tal de formar un **complex ternari FGF-FGFR- $\beta$ -Klotho**, en una relació 1:2:1 per tal de transmetre el senyal a l'interior cel·lular.



**Figura 4.** Estructura dels complexos de senyalització dels *fibroblast growth factors* endocrins (esquerra) i paracrins (dreta) modificat de (Goetz and Mohammadi, 2013).

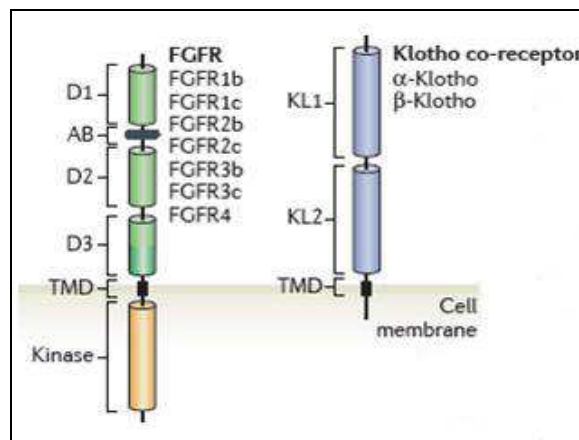
FGF21 s'uneix preferentment als receptors FGFR1, 2 i 3, però no pot senyalitzar gaire eficientment a través de FGFR4. Alguns grups, mitjançant experiments d'immunoprecipitació, han demostrat que existeix una interacció específica entre FGFR1c i  $\beta$ -Klotho a la via de senyalització d'FGF21 (Ogawa et al., 2007; Kurosu et al., 2007; Kharitononkov et al., 2008). Els treballs realitzats per Suzuki demostren que aquesta senyalització es dona bàsicament a través de FGFR1c i FGFR3c. Malgrat que aconseguix detectar la unió a FGFR4 en cèl·lules L6 transfectades, aquest autor no aconseguix veure'n canvis d'activitat en la senyalització *downstream* d'FGF21 (Suzuki et al., 2008). Altres estudis suggereixen que es poden formar interaccions directes 1:1 entre  $\beta$ -Klotho i FGFR1c, però que l'addició d'FGF21, tot i no provocar canvis d'agregació de  $\beta$ -Klotho, provoca la formació dels dímers de FGFR1c (Ming et al., 2012).

## 2.5 El cofactor $\beta$ -Klotho

Com s'ha comentat anteriorment, els membres de la família dels *fibroblast growth factors* endocrins, en lloc d'unir-se a heparan sulfat, s'uneixen a la família de proteïnes transmembrana Klotho. D'aquestes, n'existeixen de 3 tipus:  $\alpha$ ,  $\beta$  i *lactase-like*. La primera d'elles,  $\alpha$ -Klotho, s'uneix a FGF23 i, en canvi, FGF19 i FGF21 s'uneixen a la **proteïna transmembrana  $\beta$ -Klotho**. En el cas d'FGF21, aquesta actua com a cofactor i facilita l'activació i la dimerització dels FGFRs, determinant així la seva especificitat d'acció a nivell tissular, tal com ja s'havia suggerit uns anys abans (Ogawa et al., 2007; Kharitononkov et al., 2008). Així doncs, el mecanisme de senyalització d'FGF21 depèn de la capacitat per formar el complex **FGFR/ $\beta$ -Klotho** en els seus teixits diana (Ryden, 2009) i que permetrà propagar el senyal *downstream* (Kharitononkov et al., 2008). Alguns estudis han demostrat que l'absència de  $\beta$ -Klotho en ratolins KLB-KO ( $\beta$ -Klotho *Knockout*) o mitjançant la utilització de siRNAs (*Small interfering RNAs*), s'impossibilita

l'acció d'FGF21 en aquest animals i per tant, els seus efectes beneficiosos en el metabolisme i en l'adaptació termogènica (Adams et al., 2012; Ding et al., 2012).

Els 3 tipus de coreceptors Klotho, d'uns 130 kDa, són membres de la família 1 $\beta$ -glucosidases. Aquests contenen: dos dominis  $\beta$ -glucosilase-like per  $\alpha$  i  $\beta$ -Klotho i un per  $\gamma$ -Klotho, un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta. L'expressió dels dos primers ( $\alpha$  i  $\beta$ ) es restringeix als teixits diana dels FGFs endocrins, on es troben constitutivament associats amb els FGFRs. S'ha observat que  $\alpha$ -Klotho (també anomenat simplement Klotho) funciona d'una manera selectiva com a coreceptor per FGF23 i en canvi  $\beta$ -Klotho és coreceptor per FGF19 i FGF21 (Long and Kharitonov, 2011). Per contra,  $\gamma$ -Klotho funciona com un coreceptor addicional per la senyalització de FGF19 (Fon et al., 2010).



**Figura 5.** Esquema comparatiu de l'estructura dels dominis dels FGFRs (esquerra) i dels dominis de Klotho (dreta) (Goetz and Mohammadi, 2013).

Si bé els FGFRs presenten una distribució extensa per tots els teixits, els coreceptors  $\alpha$ -Klotho i  $\beta$ -Klotho són més restrictius pel que fa a la seva distribució, fet que determina l'especificitat tissular dels FGFs endocrins. De la mateixa manera, sembla que  $\beta$ -Klotho és bastant menys abundant dins els mateixos teixits que els FGFRs. A part, si hi sumem el fet que cada isoforma de FGFR té una afinitat diferent per a  $\beta$ -Klotho, no només la quantitat relativa de  $\beta$ -Klotho i de FGFR és important per la formació dels complexos ternaris a nivell de superfície cel·lular i per transmetre el senyal, sinó que també dependrà de la isoforma del receptor (Kurosu et al., 2007).  $\alpha$ -Klotho i  $\beta$ -Klotho s'uneixen preferentment a les isoformes c en la butxaca hidrofòbica del domini D3, emascarant així la possible unió d'altres famílies d'FGFs que no siguin els FGFs endocrins (Goetz and Mohammadi, 2013).

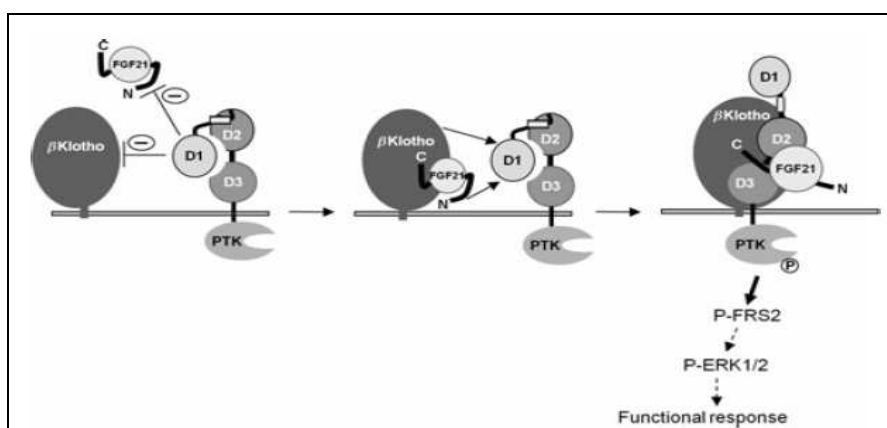
$\alpha$ -Klotho apareix en òrgans com els ronyons, el cervell i en òrgans reproductors. En canvi, el cofactor  $\beta$ -Klotho es pot trobar en quantitats rellevants en teixits metabòlicament actius, incloent el pàncrees, el fetge, el sistema nerviós central i els teixits adiposos blanc i marró (Kurosu et al., 2007; Fon et al., 2010).



## 2.6 Mecanisme d'acció d'FGF21

L'activitat dels FGFs es regula a través de múltiples mecanismes com ara la interacció amb els heparan sulfats, l'*splicing* alternatiu de la zona N-terminal, la homodimerització o el lloc específic d'unió dels lligands. De totes maneres, la interacció amb els heparan sulfats és el més transcendent sobre l'activitat biològica del lligand, ja que és el que determina si un FGF actua de manera endocrina o paracrina. La combinació de l'expressió específica de  $\beta$ -Klotho i el subtipus de FGFR és el que determinarà la selectivitat específica tissular de l'acció d'FGF21 i dels altres membres de la seva família (Urakawa et al., 2006; Ogawa et al., 2007; Kharitonov et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Cuevas-Ramos et al., 2012).

Com ja s'ha comentat en subapartats anteriors, l'FGFR prototípic conté tres dominis extracel·lulars immunoglobulina-*like* (de D1 a D3), un domini transmembrana que la travessa i un domini intracel·lular tirosina-cinasa. La regió exterior compresa pels dominis D2 i D3 i la unió entre aquestes dues és necessària i suficient per la unió del lligand. L'especificitat del lligand ve determinada per l'*splicing* alternatiu del domini D3, el qual genera dues isoformes i estableix una direcció diferent entre la senyalització dels teixits epitelials o mesenquimals per part dels FGFs (Goetz and Mohammadi, 2013). Quan  $\beta$ -Klotho o FGF21 es troben sols, el domini inhibitori D1 del FGFR1 inhibeix la interacció d'aquests amb la regió D2-D3 del receptor. Però un cop FGF21 s'uneix a  $\beta$ -Klotho, el complex FGF21- $\beta$ -Klotho pot vèncer sinèrgicament l'efecte inhibitori de D1 amb la zona on està unida i així poder unir-se a la regió D2-D3 del receptor, permetent la dimerització d'aquest, la formació del complex ternari **FGF- $\beta$ -Klotho-FGFR** i la transducció del senyal (Yie et al., 2012). Després de la dimerització del receptor, aquest juxtaposa els dominis intracel·lulars tirosina-cinasa dels receptors de l'un amb els de l'altre, de manera que es pot donar una activació de la cinasa per transfosforilació. Aquest fet provoca l'activació dels seus substrats intracel·lulars i desencadena diverses vies de senyalització, generant diferents respostes cel·lulars, entre elles la transcripció de gens nuclears (Goetz and Mohammadi, 2013).



**Figura 6.** Esquema representatiu del mecanisme d'acció d'FGF21 (FGF endocrí) sobre el receptor (FGFR1c) en presència del cofactor  $\beta$ -Klotho (Yie et al., 2012).

## 2.7 FGFs endocrins circulants

Els nivells sèrics d'FGFs endocrins determinats fins al moment mostren que, en individus humans perfectament sans i després del dejuni nocturn, tenen una àmplia variació interindividual entre els diferents membres de la família de FGF19, essent el rang de concentracions  $FGF21 > FGF19 > FGF23$ . L'alta variabilitat interindividual és normal perquè són molècules altament bioactives, que tenen un ampli rang en individus sans i on s'ha especulat que els nivells absoluts d'aquestes no són crítics per l'homeòstasi. Malgrat tot, encara queda molt camp per recórrer en aquest vessant del coneixement. La mida molecular d'aquestes proteïnes (de 32 a 36 kDa, dependent del seu estat de glicosilació) els permet passar les barreres glomerulars i, per tant, poden ser eliminades pels ronyons (Angelin et al., 2012). En el cas d'FGF21, s'ha observat que la injecció d'aquest en primats té una vida mitjana en sèrum de trenta minuts aproximadament (Kharitonov et al., 2007). També s'ha vist que factors com l'edat o el gènere tenen poca importància en els nivells circulants dels FGFs. En general però, els nivells circulants són més alts al matí i més baixos al vespre (Galman et al., 2008; Yu et al., 2011; Lee et al., 2012).

Com ja s'ha comentat anteriorment, com que els FGFs endocrins no tenen afinitat per l'heparan sulfat, la seva capacitat de resposta depèn de la presència dels membres de la família de proteïnes Klotho, per tal que es puguin unir al receptor FGFR. En el cas d'FGF21, per tal que aquest pugui exercir els seus efectes en un determinat teixit, dependrà de la presència del seu receptor FGFR1 (tot i que FGFR4 també hi pot interaccionar) en conjunció amb el seu coreceptor  $\beta$ -Klotho. FGF19 utilitza el mateix cofactor, mentre que FGF23 requerirà la presència de  $\alpha$ -Klotho per a la seva senyalització. En humans, FGF19 es detecta principalment en cervell, cartílag, pell, retina, vesícula biliar i sobretot a l'intestí. Si bé en general els FGFs es troben altament conservats entre ratolins i humans, FGF19 dista un 50% en la seqüència aminoacídica del seu ortòleg FGF15 de ratolí (Inagaki et al., 2005). Aquest FGF té implicacions en la regulació de l'homeòstasi dels àcids biliars i en l'homeòstasi energètica (Fu et al., 2004). A diferència d'FGF21, FGF19 té molta més afinitat per FGFR4. Pel que fa a FGF23, aquest està implicat principalment en el metabolisme del fosfat (Fukumoto, 2008). FGF23 és produït pels osteòcits i actua bàsicament a nivell de ronyó, on controla la reabsorció i excreció del fosfat.

FGF21 té uns efectes metabòlics positius en animals amb afectacions metabòliques, incloent la reducció de sobrepès, la baixada dels nivells circulants de glucosa i triglicèrids i l'increment de la sensibilitat a la insulina. Alguns estudis han determinat que els efectes d'FGF21 sobre adipòcits o miotubs humans es detecten a partir d'una concentració superior a  $1\mu\text{g/mL}$  (Arner et al., 2008; Mashili et al., 2011). Inicialment es va veure que l'expressió hepàtica d'FGF21 estava regulada per PPAR $\alpha$  en condicions de dejuni o de dieta cetogènica, fet que va portar a descriure a l'FGF21 com a un "*master switch*" per la resposta metabòlica al dejuni. S'han descrit varis teixits que poden ser diana d'FGF21 com ara el fetge, el teixit adipós marró i blanc, el pàncrees o el cervell. Malgrat tot, en humans s'ha vist que els nivells d'FGF21 circulants només varien significativament al cap de set dies de dejuni i no en situacions més quotidianes. Si tenim en compte aquest fet, juntament amb el fet que es

necessiten concentracions bastant altes d'FGF21 a nivell local per tal d'activar les vies de senyalització, tant a nivell paracrí com en altres òrgans que no siguin la pròpia font d'aquesta proteïna, ens podríem preguntar si els canvis que es produeixen en els increments d'FGF21 en sèrum en condicions normals són o no prou importants per provocar canvis fisiològics. S'ha suggerit que la clau de l'efecte d'FGF21 podria estar a la barrera hematoencefàlica. Estudis fets amb rates han demostrat que part de l'FGF21 administrat es relocalitza al cervell, lloc on hi ha una forta presència del seu receptor i lloc de gran rellevància per la regulació de diferents estímuls com la sensació de gana, la termogènesi i la taxa metabòlica (Sarruf et al., 2010). Per contra, els estudis i resultats en humans són molt limitats.

Sembla ser que existeix una correlació entre els nivells d'FGF21 circulants i la presència i la severitat de determinades patologies associades a la síndrome metabòlica. Aquest fet ha portat a hipotetitzar un possible estat de resistència a FGF21 en aquestes situacions (Fisher et al., 2010), fet similar al que s'observa a l'obesitat en condicions de hiperleptinèmia i hiperinsulinèmia. Si bé s'assumeix que aquest FGF21 circulant es produeix principalment al fetge, no es pot menysprear el que pot derivar d'altres teixits, entre ells, el múscul esquelètic (veure més endavant) el qual exerceix un efecte protector sobre la càrrega metabòlica en la modulació del metabolisme glucídic i lipídic. Juntament amb aquest fet, l'alteració dels nivells d'FGF21 a sèrum en pacients amb afectacions mitocondrials musculars, suggereix que FGF21 pot ser un important marcador de disfunció mitocondrial i desequilibri metabòlic (veure més endavant).

### **3. FGF21**

FGF21 va ser descrit per primera vegada l'any 2000 (Nishimura et al., 2000) i es va poder comprovar que estructuralment formava part de la família dels FGFs (Ornitz and Itoh, 2001). L'FGF21 humà és un polipèptid secretat de 181 aminoàcids amb un 81% d'identitat de seqüència amb el seu ortòleg de ratolí. La regió homòloga del seu nucli forma un domini globular compost per 12 làmines  $\beta$  antiparal·leles conegudes com a motiu trèvol- $\beta$ . Dins de la mateixa família, FGF21 és més similar a FGF19 que a FGF23 (amb un 34% i un 25% d'identitat de seqüència aminoacídica respectivament). FGF21 és un important submembre del **subgrup dels FGFs "hormone-like"** de la superfamília dels FGFs, una classificació basada en la seva incapacitat per unir-se a heparan sulfat (Kharitononkov et al., 2008; Kharitononkov and Larsen, 2011), la qual cosa li permet desenvolupar la seva funció com a factor endocrí tal i com s'ha esmentat abans.

#### **3.1 Distribució i expressió d'FGF21**

La major part dels estudis realitzats sobre el paper d'FGF21 s'han dut a terme en models animals, mentre que en humans existeixen relativament pocs estudis. En rosegadors s'ha vist que, FGF21 s'expressa **principalment al fetge** (Nishimura et al., 2000), a les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques, als testicles (Wente et al., 2006), també al **múscul esquelètic** (Izumiya et al., 2008), al teixit adipós blanc i al marró (Muisse et al., 2008; Hondares et al., 2011). En humans es va descriure per primera vegada a l'any 2008 com a una proteïna circulant (Chen et al., 2008; Galman et al., 2008; Zhang et al., 2008). En general però, la càrrega o la importància de l'FGF21 sobre el metabolisme acostuma a ser més alta en ratolins que no en humans degut a la influència que exerceixen algunes hormones sobre aquesta. En ratolins per exemple, la tiroxina estimula l'expressió hepàtica d'FGF21 i el seu alliberament en plasma (Adams et al., 2010), fet no observat en humans.

#### **3.2 Regulació de l'expressió gènica d'FGF21 al fetge i paper d'FGF21 en el metabolisme hepàtic**

Els FGFs endocrins funcionen com a hormones que mantenen estats metabòlics específics mitjançant el control de l'homeòstasi de múltiples factors com ara els àcids grassos, la glucosa, els àcids biliars i altres. Si bé FGF21 va ser descrit per primera vegada l'any 2000, no va ser fins l'any 2005 quan es va començar a tenir constància de les seves accions metabòliques. Concretament, en un estudi que demostrava la seva capacitat per millorar la sensibilitat a la insulina en ratolins (Kharitononkov et al., 2005). Des d'ençà, han sorgit molts treballs que han permès constatar que FGF21 és un potent regulador del metabolisme lipídic i de la glucosa, ja que és capaç de produir múltiples efectes metabòlics com ara la contribució a l'increment de la lipòlisi al teixit adipós, l'increment de la cetogènesi hepàtica i una reducció dels nivells de glucosa, d'insulina i de colesterol circulants. L'FGF21 es va identificar inicialment com una hormona que estimulava la captació de glucosa en adipòcits (Kharitononkov et al., 2005). En els darrers anys, però, s'ha vist que l'expressió d'FGF21 en ratolins estava fortament induïda a fetge sota condicions de dejuni (12 hores) i per dieta cetogènica, a

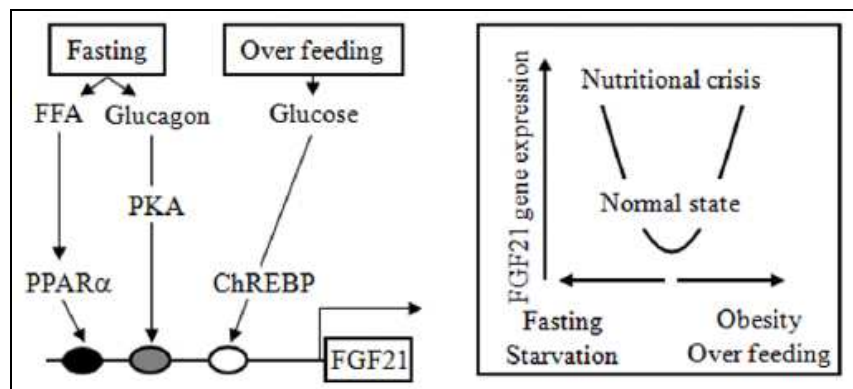
través d'un mecanisme el qual requereix el receptor d'àcids grassos PPAR $\alpha$  (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Lundasen et al., 2007). Alguns estudis han demostrat que, en ratolins, FGF21 juga un paper important en la **cetogènesi** durant un estat de dejuni. D'aquesta manera, ratolins transgènics que sobreexpressen FGF21 específicament en fetge mostren un increment en la producció de cossos cetònics i una conseqüent reducció de les concentracions de triglicèrids, tant a nivell hepàtic com en plasma (Inagaki et al., 2007). Mentre que algun estudi, fet en ratolins FGF21 *knockdown* específics de fetge, demostra la manca d'adaptació d'aquests a la cetosi induïda per una dieta cetogènica (Badman et al., 2007), l'any 2009, un grup japonès va demostrar que en aquests animals s'observava un increment de la cetogènesi després de dejunar-los 24 hores (Hotta et al., 2009), fet que contradiu i afegeix controvèrsia als resultats publicats anteriorment.

FGF21 juga un paper important en la inducció de l'oxidació d'àcids grassos hepàtics a través d'un mecanisme regulat per **PPAR $\alpha$**  (Inagaki et al., 2007). El gen FGF21 té un element de resposta a PPAR $\alpha$  (**PPRE**) que és activat pel complex PPAR $\alpha$ /FFA/RXR durant el dejuni. En aquestes condicions es dona un increment dels nivells de cossos cetònics i d'àcids grassos circulants en sang, els quals són capaços d'unir-se en aquest receptor i estimular la transcripció del gen (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Els estudis fets per Badman i col·laboradors mostraven la importància d'FGF21 en aquest procés, ja que quan se sotmetien ratolins FGF21 *knockdown* específics de fetge a dieta cetogènica, conseqüentment no es produïa cap activació de l'oxidació dels àcids grassos en aquest òrgan ni cap disminució dels seus nivells de triglicèrids (Badman et al., 2007). Aquest mecanisme també s'ha pogut comprovar gràcies a experiments realitzats en ratolins PPAR $\alpha$  *knockout*, on s'ha vist que hi ha una supressió dels efectes del dejuni a l'expressió d'FGF21 (Lundasen et al., 2007). De la mateixa manera, *in vivo* s'ha observat que l'administració intravenosa d'àcids grassos incrementa els nivells d'FGF21 circulants en humans, així com també s'observa una correlació entre el canvi dels nivells circulants d'aquesta amb les variacions dels àcids grassos lliures (Mai et al., 2009).

A mesura que el dejuni es perllonga s'ha vist que FGF21 assoleix un paper important en la regulació de la gluconeogènesi (Potthoff et al., 2009) mitjançant l'activació del coactivador transcripcional PGC-1 $\alpha$ , el qual controla l'expressió dels gens gluconeogènics al fetge. Fins i tot s'ha postulat que l'FGF21 pot actuar directament sobre aquests gens, ja que algun estudi fet en fetges de ratolí que no tenen PGC-1 $\alpha$ , es veuen els mateixos increments de l'expressió d'aquests gens gluconeogènics (Fisher et al., 2011). A diferència del glucagó, però, l'FGF21 no estimula la glicogenòlisi.

En fetges de ratolins i hepatòcits primaris humans es va poder comprovar que lligands artificials de PPAR $\alpha$ , com els fenofibrats, incrementaven l'expressió d'FGF21 i per contra, en ratolins PPAR $\alpha$  *knockdown* específics de fetge se'n perdia totalment la inducció (Badman et al., 2007; Iizuka et al., 2009). D'altra banda, un grup japonès ha observat que, en hepatòcits primaris de ratolí i en el promotor d'FGF21 humà, la resposta al dejuni està regulada de dues maneres independents: mitjançant la senyalització PPAR $\alpha$  i la senyalització glucagó-PKA (*Protein kinase A*). El mateix grup, i segons estudis previs (Iizuka et al., 2009), també ha localitzat una zona de resposta a carbohidrats a través de l'element **ChREBP** (*Carbohydrate-responsive element-binding*

*protein*). Aquest es troba en una zona més proximal del promotor (diferent de l'element de resposta PPRE) i sobre el qual s'ha vist que la glucosa és capaç d'estimular l'expressió d'FGF21 a fetge (Uebanso et al., 2011). La resposta d'FGF21 a la càrrega grassa després de l'alimentació és justament l'oposada i fins i tot es pot observar certa reducció dels nivells d'FGF21 postprandial, denotant una regulació diferent de la que es produeix per part dels FFAs durant el dejuni. Els treballs realitzats per Uebanso amb el promotor del gen FGF21 humà, en hepatòcits primaris de ratolí, han posat de manifest que la producció d'FGF21 a fetge és estimulada pels lligands de PPAR $\alpha$  com ara els FFAs (*Free fatty acids*) durant el dejuni i també per carbohidrats com la glucosa durant o després del procés d'alimentació (Uebanso et al., 2011).



**Figura 7.** Esquema de la regulació del FGF21 humà en condicions de dejuni i de sobrealimentació (Uebanso et al., 2011).

S'ha vist que l'administració d'FGF21 recombinant en ratolins genèticament obesos pot millorar la glicèmia induïda pel dejuni, a través de la regulació del flux de glucosa hepàtic i de la millora de la sensibilitat a la insulina (Berglund et al., 2009). En el cas de la regulació per part de PPAR $\alpha$ , es coneix que els seus lligands indueixen l'expressió de determinats enzims que promouen l'oxidació d'àcids grassos i la cetogènesi. Alhora, en ratolins es poden observar els mateixos efectes positius d'FGF21 durant el tractament crònic amb aquesta proteïna recombinant, així com la reversió de les afectacions de tipus fetge gras i d'altres associades a l'obesitat induïda per dieta, a través de la inhibició d'un factor crític per la lipogènesi com és el SREBP-1 (*Sterol regularoty element binding protein-1*) (Xu et al., 2009). En rates, la seva administració crònica també inhibeix la producció de glucosa hepàtica i l'expressió de gens gluconeogènics. Com que no s'observen canvis en la utilització d'aquesta, es suggereix que FGF21 hi intervé per mitjà del sistema nerviós central (Sarruf et al., 2010).

Durant l'any 2013, el grup de Kliewer i Mangelsdorf va descriure el paper que exerceix **FGF21** en el **sistema nerviós central** sobre la regulació del metabolisme, el comportament circadià i sobre el control de la reproducció. Aquest grup va descriure que els efectes d'FGF21 sobre la resposta al dejuni són mediats a través de l'expressió del coreceptor  $\beta$ -Klotho present al nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem i al complex dorsal vague del romboencèfal, reconeixent així l'existència d'un eix regulatori entre el fetge i el cervell (Bookout et al., 2013). Així doncs, l'FGF21 actuaria tant a nivell de l'hipotàlem com del romboencèfal per incrementar els nivells de corticosterones, fet

que podria explicar l'efecte inductor d'FGF21 en fetge d'una manera no autònoma sobre la gluconeogènesi hepàtica (Potthoff et al., 2009; Owen et al., 2013). En un segon estudi realitzat en femelles transgèniques que sobreexpressen FGF21, o mitjançant l'administració d'FGF21 en concentracions similars a les que es donen en dejuni (per acció de *minipumps*), s'explica que FGF21 actuaria inhibint la fertilitat de les femelles. En condicions que mimetitzen el dejuni, FGF21 actua a nivell d'hipotàlem (afectant a l'eix hipotalàmic-neuroendocrí), suprimint la cascada de senyalització necessària per l'ovulació, provocant hipogonadisme en aquestes femelles enfront a les femelles *Wt (Wild type)* i, per tant, reduint-ne la seva fertilitat (Owen et al., 2013). Aquestes dues referències permeten fer-nos una idea de la importància del paper que juga el sistema nerviós central en la vehiculació dels efectes fisiològics i farmacològics d'FGF21.

Altres estudis recents han revelat la implicació del factor FGF21 en el metabolisme lipídic en resposta a la privació de l'aportació aminoacídica a la dieta. Alguns resultats previs del grup del Dr. Diego Haro, ja havien determinat que el factor **ATF4** (*Activating transcription factor 4*) incrementava en situacions de dietes pobres en aminoàcids i que aquest fet era el desencadenant de l'increment de l'expressió d'FGF21 en el fetge (De Sousa-Coelho et al., 2012). En un treball posterior es va concloure que l'FGF21 era crític per l'adaptació metabòlica en resposta a aquest tipus de dieta, ja que resultava vital per la disminució del pes corporal dels individus i la millora dels paràmetres metabòlics, així com també la disminució dels gens lipogènics en el teixit adipós blanc, l'increment dels lipolítics i l'activació del teixit adipós marró (De Sousa-Coelho et al., 2013).

Els efectes metabòlics d'FGF21 en el metabolisme de la glucosa i dels lipíds involucren una regulació dual per part de **PPAR $\alpha$**  al fetge i per part de **PPAR $\gamma$**  als adipòcits (Woo et al., 2013). Així doncs, el tractament de ratolins obesos amb FGF21 permet un increment de l'oxidació hepàtica d'àcids grassos, reduint-ne els nivells circulants i la inhibició de la lipòlisi al teixit adipós. L'FGF21 també contribueix en la reducció de la resistència a la insulina, tant a nivell hepàtic com a nivell sistèmic (Woo et al., 2013). En humans però, el paper fisiològic d'FGF21 en la regulació de la cetogènesi no està tan clar, ja que no s'ha trobat cap correlació entre els nivells plasmàtics d'FGF21 i els nivells de cossos cetònics després d'una alimentació amb dieta cetogènica, de dos dies de dejuni o fins i tot al cap de dotze dies (Galman et al., 2008; Dushay et al., 2010). S'ha evidenciat que els **nivells circulants d'FGF21** es troben incrementats en individus que presenten resistència a la insulina, com ara en dislipidèmies, en afectacions coronàries (Lin et al., 2010), en malalties de fetge gras no alcohòlic (Dushay et al., 2010; Li et al., 2010) o en casos d'ovari poliquístic (Gorar et al., 2010).

### 3.3 Paper d'FGF21 en el metabolisme de la glucosa i dels lípids al teixit adipós

#### Metabolisme de la glucosa

Al teixit adipós, l'expressió d'FGF21 és estimulada pel receptor **PPAR $\gamma$**  i els seus agonistes; des dels àcids grassos fins als fàrmacs de sensibilització a la insulina com ara les tiazolidindiones: rosiglitazona i pioglitazona. Mentre que la insulina indueix la translocació de les vesícules que contenen el transportador de glucosa GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) a la membrana plasmàtica, en cèl·lules 3T3-L1 s'ha observat que, la funció d'FGF21 en el teixit adipós es basa en l'estimulació de la captació de la glucosa d'una manera independent d'insulina, mitjançant l'increment del transportador de glucosa **GLUT1** (Kharitonov et al., 2005). En ratolins obesos, s'ha vist que quan se'ls administra conjuntament FGF21 i insulina, es produeix una major disminució de la glucosa circulant que en la simple administració d'insulina. Aquest fet suggereix un efecte additiu entre la insulina i l'FGF21, fet que sembla anar associat a una millora de la captació de glucosa al teixit adipós (Kharitonov et al., 2005). D'altra banda, s'ha observat que l'FGF21 pot estimular la captació de la glucosa als adipòcits. En determinats experiments, s'ha constatat que l'element **ChREBP** (element de resposta a carbohidrats) el qual s'estimula durant la diferenciació adipocitària (He et al., 2004), és capaç d'incrementar els nivells d'FGF21 durant el procés de diferenciació (Zhang et al., 2008) de la mateixa manera que es dona durant l'estimulació amb agonistes de PPAR $\gamma$ . Així doncs, sembla que els dos mecanismes podrien actuar de manera coordinada als adipòcits, regulant l'expressió del gen FGF21.

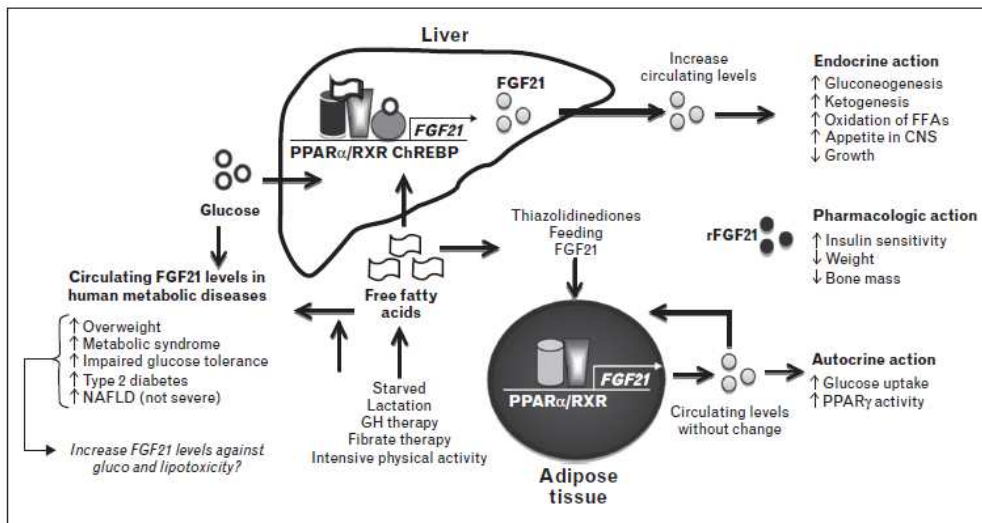
#### Metabolisme lipídic

En les primeres referències que es tenien d'FGF21 la descrivien com una hormona capaç d'estimular la lipòlisi (Inagaki et al., 2007), però investigacions més recents han descrit que en adipòcits humans té un efecte inhibidor o cap efecte sobre aquest procés (Arner et al., 2008). Per tant, l'acció d'FGF21 sobre la lipòlisi a l'adipòcit blanc no està encara ben establerta. A més, en ratolins també s'ha observat que FGF21 pot inhibir la lipòlisi induïda per la hormona GH (*Growth hormone*), alliberada per la pituïtària en resposta a dejuni, a través d'un *loop* de regulació de retroalimentació positiva (Chen et al., 2011).

S'ha observat que, en cèl·lules 3T3-L1, el tractament amb FGF21 és capaç d'incrementar l'activitat transcripcional de **PPAR $\gamma$**  juntament amb l'agonista rosiglitazona, la qual estimula l'expressió de  $\beta$ -Klotho (Chen et al., 2011; Kharitonov et al., 2008), incrementant així la degradació de triglicèrids als adipòcits (Moyers et al., 2007; Cuevas-Ramos et al., 2012). Durant l'alimentació, PPAR $\gamma$  estimula la producció d'FGF21 als adipòcits (però no al fetge) establint un *loop* tancat en el qual el propi FGF21, derivat d'aquest tipus cel·lular, actua d'una manera autocrina amplificant els efectes de l'activació de PPAR $\gamma$  (Dutchak et al., 2012) però sense produir canvis en els nivells d'FGF21 sistèmics (Qiang and Accili, 2012). També s'ha vist que els ratolins **FGF21 KO** tenen deficiències en la via de senyalització PPAR $\gamma$ , fet que fa que no puguin activar els gens lipolítics i per tant no són capaços de disminuir la quantitat total de greix corporal. Estudis posteriors indiquen que en aquests ratolins es produeix una



**sumolització** de PPAR $\gamma$  (on esdevé inactiva la seva senyalització), fet que suggereix que l'FGF21 estaria involucrat en modificacions post-traduccionals que incrementarien l'activitat de PPAR $\gamma$  (Dutchak et al., 2012).



**Figura 8.** Esquema de les principals accions metabòliques d'FGF21 (Cuevas-Ramos et al., 2012).

Així doncs, pel que fa al **teixit adipós**, podem concloure que FGF21 actua com a un **factor autocrí** en el mateix teixit, en un estat d'alimentació, regulant la funció de l'adipòcit (a partir de la modulació de PPAR $\gamma$ ), a diferència del que passa al fetge en situacions de dejuni (Arner et al., 2008; Woo et al., 2013).

FGF21 també s'ha presentat darrerament com un modulador de la regulació coordinada d'adipoquines i sembla ser un actor clau en transmetre les induccions nutricionals, a través de les accions específiques dels adipòcits (Adams et al., 2012; Ding et al., 2012). Tant l'FGF21 com les adipoquines, semblen tenir papers importants i entrelaçats en la mediació dels **efectes antidiabètics** de PPAR $\gamma$  (Kubota et al., 2006; Nawrocki et al., 2006), tot i que la millora en la homeòstasi de la glucosa es dona de manera independent a aquests factors. Diversos grups també han observat que FGF21 està implicat en la regulació dels nivells circulants de leptina i d'adiponectina, disminuint els nivells de la primera i incrementant-ne els de secreció de la segona. Alhora, FGF21 també incrementa els nivells de receptors de leptina, millorant la sensibilitat d'aquesta en teixits com el fetge i contribuint d'aquesta manera a la disminució del pes corporal (Veniant et al., 2012; Holland et al., 2013). Per contra, incrementant els nivells d'adiponectina, s'aconsegueix una millora de la sensibilització a la insulina i a la glucosa (Holland et al., 2013; Lin et al., 2013). FGF21 també és capaç de reduir les ceramides presents al fetge i al plasma, d'una manera dependent d'adiponectina, actuant com un **agent antilipotòxic**.

En ratolins, també s'ha proposat que l'obesitat i la resistència a insulina són la causa d'un **estat de resistència a FGF21**, fet que explicaria els elevats nivells circulats d'aquesta hormona en models d'obesitat i diabetis tipus II en rosegadors (Fisher et al., 2010), mentre que altres estudis suggereixen que es dona una resposta compensatòria que explicaria l'esmentat augment (Hale et al., 2012; Reinehr et al., 2012). A diferència

de les múltiples dades existents en ratolins, hi ha poca informació pel que fa al sistema FGF21 del teixit adipós d'humans. Encara que FGF21 es detecta i s'expressa en models de cèl·lules adiposes humanes en cultiu, els nivells d'expressió d'FGF21 en teixit adipós blanc humà són pràcticament indetectables, a diferència del que passa en ratolins (Dushay et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2012).

### 3.4 Paper d'FGF21 al múscul esquelètic

A diferència del que succeeix en altres teixits com ara al fetge o al teixit adipós, es coneixen relativament poques coses sobre la regulació i la funció d'FGF21 en el context del múscul esquelètic. En ratolins amb obesitat induïda per dieta s'ha descrit que FGF21 incrementa la supressió de la producció endògena de glucosa mitjançada per insulina i la captació de glucosa dependent de insulina en el múscul esquelètic (Xu et al., 2009). Tanmateix, queda poc clar que el múscul sigui una diana important de les accions d'FGF21, sobretot pels baixos nivells d'expressió que es poden detectar del seu coreceptor  $\beta$ -Klotho. D'altra banda, en ratolins també es va reportar que l'FGF21 és alliberat pel múscul gràcies a l'activació de la via de senyalització **PI3K/Akt1** (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/Protein Kinase B (PKB)*) en resposta a l'acció de la insulina o a través d'un procés d'entrenament. Aquest fet es tradueix en l'atenuació de l'obesitat relacionada a alteracions metabòliques i també en una millora dels paràmetres metabòlics en general (Izumiya et al., 2008).

En múscul de pacients humans, s'ha observat que FGF21 incrementa en individus amb **diabetis tipus 2** i també en una situació d'**hiperinsulinèmia** (Hojman et al., 2009). Algun altre estudi, també ha descrit que l'mRNA d'FGF21 s'expressa en el múscul, però que no s'activa per efecte d'una exposició curta a una alimentació amb dieta grassa (Vienberg et al., 2012). Per contra, altres estudis no han trobat diferències entre els individus obesos amb T2D (*Type 2 diabetes*) o amb tolerància normal a glucosa pel que fa a l'expressió d'FGF21 en el múscul esquelètic (Mashili et al., 2011). De la mateixa manera que en rosegadors, en humans l'FGF21 muscular pot ser un marcador dels nivells energètics del múscul esquelètic. En aquesta línia, s'ha especulat que els nivells d'mRNA d'FGF21 poden estar relacionats amb la **disfunció mitocondrial** (Tynnismaa et al., 2010), així com també amb l'administració de tractaments anti-retrovirals en pacients amb HIV (*Human immunodeficiency virus*), ja que aquests tractaments provoquen un envelliment mitocondrial, generant mutacions al mtDNA (*Mitochondrial DNA*) (Payne et al., 2011). Aquest punt referent a les disfuncions mitocondrials però, el tractarem més endavant.

Tanmateix, certs grups d'investigació no han trobat cap correlació significativa entre els nivells circulants d'FGF21 i els nivells d'mRNA d'aquest, expressats al múscul, fet que indueix a pensar que el múscul no és la major font de l'FGF21 circulant. Aquesta manca de relació també els fa pensar que FGF21 actuaria de manera local regulant el metabolisme de la glucosa i/o senyals provinents del teixit adipós que es troben estretament relacionades amb el múscul (Lindgaard et al., 2013). En humans, també s'ha vist que pacients HIV tenen uns nivells d'mRNA d'FGF21 incrementats a múscul esquelètic. Aquests nivells també es troben associats a la lipodistrofia que

pateixen, fet que el correlaciona amb l'estat de resistència a la insulina que pateixen però no amb els nivells en plasma d'FGF21 (Lindegard et al., 2013).

### 3.5 FGF21 al múscul cardíac

A banda del múscul esquelètic, recentment, també s'ha descrit que el múscul cardíac és **diana** de l'FGF21 sistèmic, a part de ser també una **font d'expressió i alliberament d'FGF21** (Planavila et al., 2013), ja que s'ha descobert que el cor té uns nivells d'expressió basal d'FGF21 en condicions fisiològiques normals. De la mateixa manera, diversos estudis fets en cardiomiòcits, intuïen l'efecte cardioprotector d'FGF21 en patologies cardíques (Liu et al., 2011). Ara bé, estudis realitzats en el nostre laboratori, han demostrat que sota condicions d'estrès fisiològic com podria ser en casos d'**hipertrofia cardíaca**, la producció d'aquest factor incrementa com a resposta de protecció. Concretament, es va veure que els ratolins FGF21 *knockout*, mostraven un quadre de patologies cardíques (bàsicament dilatació, hipertrofia, i disfunció cardíaca) que no presentaven els ratolins Wt, fins i tot a partir dels primers estadis de vida. A més a més, aquestes diferències també es podien apreciar a nivell histològic, així com també pel que fa a l'expressió de gens com ara PGC-1 $\alpha$ , el qual s'expressa amb nivells inferiors (Planavila et al., 2013). De la mateixa manera que es dona en altres casos, sota condicions d'estrès cardíac, el cor allibera una sèrie de factors com l'FGF21 (el qual actua de manera autocrina), que actuen com un mecanisme endogen de *feedback*, servint com a mecanisme compensatori per mitigar el dany inicial.

### 3.6 Paper d'FGF21 en la termogènesi

Darrerament, s'ha demostrat que FGF21 també es produeix i es secreta per part del teixit adipós. Nombrosos estudis han revelat que FGF21 és responsable de la inducció del **programa termogènic** en el BAT (*Brown adipose tissue*) a rosegadors, ja que davant una exposició aguda al fred o a estímuls  $\beta$ -adrenèrgics, es produeix una inducció dels nivells d'mRNA d'FGF21 a BAT (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011). Aquest procés es dona a través d'una potent via de senyalització, després de l'estimulació noradrenèrgica i on hi intervé **cAMP** (*3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*), la qual regula la transcripció del gen FGF21 (Hondares et al., 2011). Altres estudis realitzats al nostre grup han demostrat que FGF21 esdevé clau en l'adaptació al fred, per part dels rosegadors nounats, a les noves condicions del medi exterior. L'estímul de la producció d'FGF21 en nounats, vehiculat per PPAR $\alpha$  durant l'alletament, provoca una estimulació dels gens termogènics claus per a aquest procés adaptatiu (Hondares et al., 2010). S'ha vist que el teixit adipós blanc es converteix a "*brown-like*" després d'una exposició prolongada al fred (Wente et al., 2006) i darrerament, al **FGF21 produït** a nivell de **WAT** (*White adipose tissue*) se li ha atribuït la inducció del "**browning**" d'aquest teixit, estimulants l'expressió de diferents gens típics de teixit adipós marró com ara UCP1 i PGC-1 $\alpha$  (Fisher et al., 2012). Pel que sembla, durant l'exposició a fred, l'FGF21 alliberat a la sang també seria capaç de creuar la barrera hematoencefàlica, actuant a nivell de sistema nerviós central (SNC) i un cop allà regularia tant la ingesta de menjar com la despesa energètica i modificant altres hormones involucrades en la ingesta (Coskun et al., 2008; Tan et al., 2011).

### 3.7 FGF21 al pàncrees

Es coneix que FGF21 també es produeix al pàncrees (Nishimura et al., 2000) igual que  $\beta$ -klotho, esdevenint així un teixit productor i diana de la pròpia hormona. S'ha observat que en illots pancreàtics aïllats de rata, FGF21 és capaç d'inhibir la secreció de glucagó i incrementar l'expressió i producció d'insulina, però també d'estimular la secreció d'insulina induïda per glucosa, només en els illots derivats de rates diabètiques (Wente et al., 2006). El tractament d'aquestes cèl·lules amb FGF21 els hi confereix una protecció contra la glucolipotoxicitat, a través de l'activació de les vies de senyalització ERK 1/2 i Akt.

### 3.8 Altres funcions d'FGF21

A banda de tot el seguit de contribucions majoritàries en la regulació del metabolisme de la glucosa i del metabolisme lipídic que té FGF21, així com també d'altres implicacions de rellevància, com ara en la termogènesi o la seva funció en el cas del múscul cardíac, aquesta hormona també exerceix altres funcions dins l'individu. Algunes d'elles poden ser la regulació del *torpor* en ratolins, l'increment del *lifespan*, la implicació en creixement i en la pèrdua de l'ossificació (Melvin and Andrews, 2009; Kliewer and Mangelsdorf, 2010; Zhang et al., 2012; Wei et al., 2012; Nelson et al., 2013), les quals comentarem tot seguit.

#### Increment del *lifespan*

S'ha descrit que l'exposició crònica a l'hormona FGF21 incrementa la supervivència (*lifespan*) en ratolins entre un 30 i un 40%, en funció de si es tracte de mascles o femelles i sense disminuir la ingesta (Zhang et al., 2012), resultat comparable a altres d'obtinguts en situacions de CR (*Caloric restriction*) (Turturro et al., 1999). En el mateix estudi però, s'ha vist que la restricció calòrica no varia els nivells circulants d'FGF21. En l'estudi, on s'utilitzen ratolins transgènics que sobreexpressen FGF21, i mitjançant una anàlisi transcriptòmica, suggereixen que FGF21 actuaria bloquejant la via de senyalització GH/IGF-1 (*Growth hormone/Insulin-like growth factor 1*) al fetge, de la mateixa manera que ho faria la restricció calòrica.

#### FGF21 en creixement

En ratolins, s'ha descrit que la sobreexpressió d'FGF21 genera un fenotip addicional que consisteix en efectes conservadors de l'energia, induint a una mida més petita del cos (Potthoff et al., 2012). L'any 2008, Inagaki va demostrar que la inducció d'FGF21 per efectes del dejuni causava un estat de resistència a l'hormona de creixement (GH), la qual cosa n'incrementava els seus nivells. Al fetge, això passava com un efecte col·lateral de la resposta adaptativa al dejuni, ja que l'FGF21 reduïa les concentracions de STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*), un factor clau de la cascada de senyalització de la GH, provocant així la disminució de l'expressió dels seus gens diana, com ara IGF-1. Per altra banda, també induïa l'expressió hepàtica de la IGFBP1 (*IGF-1 binding protein 1*) i el SOCS2 (*Suppressor of cytokine signaling 2*), el qual desfosforila STAT5, deixant-lo en la forma inactiva i donant com a resultat la

inhibició de la senyalització de la GH (Inagaki et al., 2008). Recolzant aquests resultats, l'any 2010, un article suggeria que en l'anorèxia nerviosa (estat crònic de privació nutricional) es produïa un estat de resistència a l'hormona de creixement per efectes dels alts nivells d'FGF21 en comparació amb els controls, a través del mateix mecanisme proposat per Inagaki (Fazeli et al., 2010).

### Torpor

Un altre dels efectes d'FGF21 és que permet una sensibilització del ratolí a un estat conservador de l'energia anomenat *torpor*, el qual es caracteritza per una disminució de la temperatura corporal i de l'activitat física. A l'any 2007, el grup d'Inagaki va descobrir que FGF21 induïa una varietat enorme de lipases pancreàtiques, les quals contribueien a l'increment de l'oxidació dels àcids grassos vehiculada per FGF21. La contribució de la inducció extrapancreàtica d'aquestes lipases ja es va descriure com a important en altres mamífers durant el procés d'hibernació (Andrews et al., 1998; Chen et al., 2008). Més recentment s'ha vist que aquestes lipases s'indueïen al fetge i en altres teixits durant el *torpor*, en ratolins, fet que equival al procés d'hibernació en altres mamífers (Zhang et al., 2006).

### Inhibició de l'osteoblastogènesi

Estudis de diferenciació de les BMMSCs (*Bone marrow mesenchymal stem cells*) han demostrat que FGF21 inhibeix l'osteoblastogènesi però estimula l'adipogènesi de tipologia BAT, via la potenciació de l'activació del PPAR $\gamma$  (Galman et al., 2008; Christodoulides et al., 2009; Dushay et al., 2010; Schoenberg et al., 2011; Wan, 2013). Mecanísticament s'ha descrit que FGF21 formaria un *loop* de *feed-forward* amb PPAR $\gamma$ , de manera que els lligands d'aquest incrementarien l'expressió d'FGF21 i el seu coreceptor  $\beta$ -Klotho en les cèl·lules BMMSCs. Alhora, tal i com s'ha esmentat, FGF21 incrementaria l'activitat de PPAR $\gamma$ , propiciant la seva inhibició per sumolització (Galman et al., 2008; Dutchak et al., 2012; Wei et al., 2012). D'aquesta manera, als possibles efectes beneficiosos d'FGF21 en el tractament de malalties com la diabetis, a la llarga caldria sumar-hi la possible fragilitat òssia per part de l'administració del propi FGF21 recombinant. Això potenciarà la diferenciació de les cèl·lules precursoras d'ós cap a teixit adipós marró a expenses de diferenciar-se cap a osteoblasts, creant així un desequilibri osteoblastogènic. En humans però, no s'ha vist que nivells elevats d'FGF21 afectin la pèrdua òssia (Lee et al., 2013).

### 3.9 FGF21 en humans

En humans, s'ha observat que els nivells circulants d'FGF21 només varien després de llargs períodes de dejuni (7 dies), sota dietes cetogèniques o sota la lactància (Galman et al., 2008; Christodoulides et al., 2009; Dushay et al., 2010; Schoenberg et al., 2011), suggerint que la **regulació i la funció d'FGF21 és diferent que en rosegadors**. En la majoria dels estudis realitzats s'ha vist que existeix una correlació positiva entre els nivells circulants d'FGF21 i el fet que els individus pateixin sobrepès o tinguin alguna síndrome metabòlica (Zhang et al., 2008; Cuevas-Ramos et al., 2010), diabetis tipus 2 (Chavez et al., 2009; Chen et al., 2011), una reduïda tolerància a la glucosa (Chavez et al., 2009), esteatosi hepàtica no alcohòlica (Dushay et al., 2010; Yang et al., 2011; An et al., 2012) i també correlaciona amb alguna afectació cardiovascular. Així mateix, en humans, les quantitats d'FGF21 en plasma també correlacionen positivament amb els nivells d'adipositat i els nivells d'àcids grassos lliures en plasma (Mai et al., 2009), però negativament amb els nivells de colesterol HDL (*High-density lipoprotein*), anomenat colesterol bo. De tota manera, existeixen fortes discrepàncies en funció dels models utilitzats, com és el cas de pacients amb diferent tipologia anorèxica (Uebanso et al., 2011). Malgrat que en adults s'ha trobat una correlació independent entre els nivells d'FGF21 en plasma i la **síndrome metabòlica** (Zhang et al., 2008; Gallego-Escuredo et al., 2012), aquest fet no s'ha vist en infants (Reinehr et al., 2012). De totes maneres, degut al fet que una pèrdua de pes en aquests pacients joves comportava una reducció dels nivells d'FGF21, es va postular que aquesta era més una conseqüència (i no una causa) de l'obesitat, per tal d'intentar compensar l'estrès metabòlic sofert a causa de l'obesitat.

En humans també s'ha observat una correlació entre els nivells d'FGF21 i l'**activitat física** en pacients amb síndrome metabòlica (Cuevas-Ramos et al., 2010). Tanmateix, els efectes d'FGF21 a nivell sistèmic són complexos i depenen en gran mesura del context fisiològic i patològic. Malgrat tot, el motiu pel qual incrementen els nivells d'FGF21 en malalties metabòliques, encara no es coneix prou bé. Alguns grups suggereixen que la obesitat i la resistència a la insulina causen també una resistència a les accions de l'FGF21 en humans (Reinehr et al., 2012), on es modifiquen els nivells circulants d'FGF21 en funció del **ritme circadià** i, a on segurament es dona algun mecanisme de dessensibilització durant el dia, ja que es poden detectar nivells circulants molt més alts que durant la nit (Yu et al., 2011). Per contra, altres grups defensen la idea d'una resposta compensatòria (Fisher et al., 2010; Hale et al., 2012). Sembla ser però, que sota condicions patològiques, un increment d'FGF21 podria ser un mecanisme que contribuiria a un increment de l'oxidació d'àcids grassos i a la utilització de glucosa per contrarestar els efectes adversos de la lipotoxicitat i la glucotoxicitat (Cuevas-Ramos et al., 2012).

Per afegir-hi més complexitat, existeix poca informació sobre els nivells d'expressió dels coreceptors d'FGFs en humans, tot i que està clara la interacció dels FGFs endocrins amb els FGFRs i els **cofactors  $\beta$ -Klotho**. Un article recent del nostre grup, ha demostrat que en obesitat, on hi ha un estat proinflamatori, de la mateixa manera que es dona en pacients infectats pel virus del HIV (amb i sense lipodistrofia), hi ha una reducció acusada dels nivells de  $\beta$ -Klotho per acció del TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis*

*factor  $\alpha$* ) i on hi ha implicada la via JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*), fet que disminueix l'acció d'FGF21 en aquests adipòcits (Diaz-Delfin et al., 2012; Gallego-Escuredo et al., 2012). Aquest fet porta a pensar que un increment de l'expressió d'FGF21 en el múscul esquelètic podria ser un mecanisme compensatori per la senyalització d'FGF21 en el teixit adipós i que aquest teixit podria ser un teixit diana d'FGF21 en aquests pacients.

Pel que fa als tractaments, algun estudi ha demostrat que el tractament de pacients hipertriglicèrèmics amb fenofibrats (l·ligands de PPAR $\alpha$ ), ha permès dilucidar el paper clau que juga PPAR $\alpha$  en la regulació de l'expressió d'FGF21, de la mateixa manera que en ratolins (Galman et al., 2008), així com també la via de senyalització de dejuni glucagó-PKA (Uebanso et al., 2011). En un altre estudi realitzat en adipòcits humans va permetre veure que, el tractament amb FGF recombinant durant 3 dies és capaç d'inhibir la lipòlisi estimulada per catecolamines i pel pèptid natriurètic atrial (Arner et al., 2008). Juntament a aquest fet i, tenint en compte (tal com s'ha comentat anteriorment) les correlacions positives existents entre els nivells de FFAs circulants i d'FGF21 en funció del cicle circadià, s'ha pogut veure que els nivells d'àcids grassos circulants incrementen 3 o 4 hores abans que ho facin els d'FGF21, indicant que existeix un mecanisme de regulació entre els FFAs i l'FGF21, i que aquests últims juguen un paper en la inhibició de l'excés de lipòlisi en humans (Yu et al., 2011).

### 3.10 FGF21 com a tractament terapèutic

Els efectes positius que té FGF21 sobre l'organisme han fet pensar que podria ser un bon candidat com a fàrmac per tractar diverses malalties metabòliques. A priori, els tractaments amb FGF21 recombinant de diversos models animals que pateixen afectacions metabòliques, s'ha observat que deriven en una millora en la **disminució de la glucosa en plasma**, un **increment de la sensibilitat a la insulina**, la **reversió de l'esteatosi hepàtica** i de la **diabetis**. Tanmateix, l'administració crònica d'FGF21 com a fàrmac per tractar malalties com ara la diabetis de tipus 2 no està exempta d'**inconvenients**. Tan és així que, en ratolins, s'ha observat que aquest tipus de tractament pot causar fragilitat òssia i alhora potenciar l'adipogènesi a partir de cèl·lules òssies mesenquimals (Wei et al., 2012). Per altra banda, hi ha un seguit de publicacions que indiquen que l'administració d'FGF21 en rosegadors diabètics millora la seva glicèmia, en disminueix els triglicèrids i el pes corporal (Kharitononkov et al., 2005; Wente et al., 2006; Coskun et al., 2008; Fisher et al., 2012).

L'any 2007, Kharitononkov va veure que l'administració d'FGF21 exogen, a simis diabètics obesos, promovia una millora dels nivells de glucosa i lípids circulants així com també del pes corporal. A partir d'aquí, molts altres estudis han reportat els efectes metabòlics de l'administració d'FGF21 o altres mimètics en el tractament de la diabetis, tant en rosegadors com en primats no humans (Kharitononkov et al., 2007). En aquests casos, els efectes d'FGF21 consisteixen en una millora en la sensibilitat a la insulina (Berglund et al., 2009) i de millora de la funcionalitat de la cèl·lula  $\beta$ -pancreàtica (Wente et al., 2006), la supressió de la secreció de glucagó (Kharitononkov et al., 2005), una reducció de la lipogènesi hepàtica i una inducció de la despesa energètica a través de l'activació del teixit adipós marró (Kharitononkov et al., 2005; Coskun et al., 2008; Fisher et al., 2012). Malgrat tot, s'ha de dir que hi ha una

**diferència** important entre el **paper fisiològic d'FGF21** i els **efectes farmacològics** de l'FGF21 exogen (Kliwer and Mangelsdorf, 2010; Angelin et al., 2012), de manera que els seus efectes dependran entre altres coses del fenotip de cada individu.

Actualment, encara es disposa de poca informació per tal que el sector públic es fixi amb l'FGF21 com a un possible tractament terapèutic en **humans**. La curta vida mitjana que té FGF21 com a proteïna circulant fa difícil que es pugui mantenir en uns nivells suficientment alts per tal que pugui exercir els efectes desitjats sobre els pacients. Això ha fet que alguns laboratoris ja treballin en la manera d'allargar la seva permanència a la circulació (Kliwer and Mangelsdorf, 2010; Angelin et al., 2012). Així doncs, a partir d'aquests coneixements previs, el grup de Moller, va començar a hipotetitzar que els fàrmacs basats en FGF21, anàlegs d'aquest o altres de mimètics, serien claus pel tractament de les disfuncions metabòliques (Moller, 2012). Els estudis realitzats d'ençà van culminar amb el descobriment d'algun nou compost com és el cas del **LY2405319**. A l'any 2013, Gaich i col·laboradors van sotmetre individus humans amb diabetis tipus 2 a un tractament durant 28 dies amb aquest compost. Com a resultat, es va comprovar que els pacients milloraven els seus perfils lipídics, disminuint els valors de LDL (*Low density lipoprotein*) entre un 20 i un 30%, també disminuïen els valors de colesterol total entre un 15 i un 19%, de triglicèrids entre un 26 i un 46% i incrementaven els nivells de HDL del 15 al 20%. De la mateixa manera, en els pacients sotmesos al tractament, s'observava una tendència a una major pèrdua de pes que en els individus control. A més a més, també presentaven una millora de l'homeòstasi de la glucosa (disminuint els nivells de glucosa i d'insulina circulants) (Gaich et al., 2013).

Name and Reference	Company	FGF21 Modification	Modification Result	Half-Life*	Binding Specificity*
LY2405319 Kharitonov et al., 2013	Lilly	L118C, A134C S167A ΔHPIP	new disulfide to increase stability prevent glycosylation in yeast monodisperse product	unchanged	FGFR1 α/β-klotho FGFR2 α/β-klotho FGFR3 α/β-klotho
PEG FGF21 Mu et al., 2012	Ambrx/Merck	R131pAcF couple to PEG	single reactive site for coupling increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1 α/β-klotho FGFR2 α/β-klotho FGFR3 α/β-klotho
Fc-FGF21(RG) Véniant et al., 2012	Amgen	L98R P171G fusion to Fc	reduce aggregation reduce in vivo degradation increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1 α/β-klotho FGFR2 α/β-klotho FGFR3 α/β-klotho
CVX-343 Huang et al., 2013	Pfizer	A129C couple to Ab	single reactive site for coupling increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1 α/β-klotho FGFR2 α/β-klotho FGFR3 α/β-klotho
FGFR1b/1c agonist antibody Wu et al., 2011	Genentech	not based on FGF21	increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1b, FGFR1c
mimAb1 agonist antibody Foltz et al., 2012	Amgen	not based on FGF21	increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1 α/β-klotho
FGFR1 α/β-klotho bispecific Smith et al., 2013	Amgen	not based on FGF21	increase t <sub>1/2</sub>	increased	FGFR1 α/β-klotho

The table lists published FGF21 mimetics, along with their incorporated modifications, half-life, and binding specificity. Standard one-letter amino acid abbreviations are used; Δ, deletion; pAcF, p-acetylphenylalanine; PEG, polyethylene glycol; t<sub>1/2</sub>, half-life; Fc, antibody constant domain; Ab, antibody. \*Some half-lives and binding specificities are inferred.

**Figura 9.** Taula on es mostren les diferents molècules que mimetitzen FGF21, les seves modificacions, vida mitjana i les especificitats d'unió (Reitman, 2013).

Cal destacar que, aquest fàrmac ha estat el primer **mimètic d'FGF21** que ha arribat a la fase 1 dels assaigs clínics. Si bé és veritat que en alguns casos aquesta molècula ha provocat reaccions immunitàries després de les injeccions a alguns dels pacients i que en determinats casos han desenvolupat anticossos contra aquesta, s'ha vist que aquests no alteren la farmacocinètica del fàrmac. Per tant, suggereixen que



tampoc n'alteren el seu efecte, tot i que encara no s'ha determinat si pot tenir efectes adversos com és el cas d'FGF21 sobre la osteoblastogènesi.

A la taula anterior, també es poden veure resumidament les característiques d'altres mimètics no basats en el propi FGF21, sinó amb anticossos monoclonals que són capaços d'activar exclusivament diferents subtipus de receptors d'FGF21. Aquest fet pot contribuir a dilucidar en un futur els diferents rols que juguen aquests en les vies de senyalització, així com també, el descobriment d'aquests nous compostos prometen nous avanços terapèutics en el camp de la **síndrome metabòlica**.

## **4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC**

### **4.1 Anatomia i tipus de fibres**

El múscul esquelètic és un teixit tou que constitueix al voltant del 40% del pes corporal de l'individu. Aquest és anomenat **teixit muscular esquelètic** de tipus **estriat** i té com a principal característica la propietat de poder contraure's i relaxar-se voluntàriament (generalment) i en resposta als impulsos nerviosos generats pel sistema nerviós. A l'organisme però, existeixen altres tipus de múscul que formen part d'altres òrgans, com per exemple el **teixit muscular cardíac estriat**, el qual és exclusiu de cor o el **teixit muscular llis**, del qual no en controlem la contracció voluntàriament. Aquest està present al tracte intestinal, als bronquis i als vasos sanguinis entre altres, i amb propietats exclusives per cadascun d'ells, de manera que, els permet realitzar les seves funcions. Mentre que aquests dos últims constitueixen el 10% del múscul total de l'individu, el teixit muscular esquelètic representa el 90% restant.

#### **Tipus de fibres i composició**

El múscul esquelètic està format per fibres o cèl·lules allargades i multinucleades les quals, un cop organitzades en fibres, situen els seus nuclis a la perifèria. El diàmetre d'aquestes fibres varia entre els 10 i els 80 micròmetres i cadascuna d'elles està formada alhora, per subunitats successivament més petites: el **sarcolema** que és la membrana cel·lular de la fibra muscular, les **miofibril·les** constituïdes pels filaments d'actina i miosina i el **sarcoplasma** que és la matriu a on hi ha suspeses les miofibril·les i que està constituït per grans quantitats de potassi, magnesi, fosfat i enzims. Aquest últim conté un elevat nombre de **mitocondris**, fet indicatiu de la necessitat que tenen aquestes d'una gran aportació d'ATP (*Adenosine triphosphate*) per tal de dur a terme les seves funcions contràctils. Tanmateix, al múscul esquelètic hi ha dues poblacions mitocondrials ben diferenciades: els mitocondris subsarcoleimals, que es troben localitzats sota el sarcolema i tenen una taxa oxidativa més baixa, i els mitocondris intramiofibril·lars. Les dues poblacions desenvolupen funcions diferents dins el metabolisme del múscul esquelètic i també responen de manera diferent enfront els estímuls fisiològics i patofisiològics (Palmer et al., 1977).

Si ens referim al tipus de fibra, el múscul esquelètic dels mamífers està compost per diferents tipus de fibres musculars, classificades segons les seves propietats bioquímiques i contràctils (Schiaffino and Reggiani, 2011) en:

- **Fibres de tipus I:** Tenen una aparença vermella ja que contenen més mioglobulina, la qual està relacionada amb la densitat mitocondrial i la seva capacitat oxidativa. Aquestes, són de contracció lenta i resistents a la fatiga.
- **Fibres tipus IIa:** Posseeixen un color indeterminat i un metabolisme entre glucolític i oxidatiu. Són bastant resistents a la fatiga.
- **Fibres tipus IIx i IIb:** Són d'aparença blanca i de contracció ràpida. Aquestes, a diferència de les primeres, són més glucolítiques i tenen una baixa densitat mitocondrial, de manera que es fatiguen ràpidament.

Un múscul pot contenir una major proporció d'un determinat tipus fibril·lar o un altre dependent de si el múscul ha estat entrenat per la resistència o per la velocitat. Els músculs tenen una gran capacitat d'adaptació, de manera que poden modificar tant la seva forma com el seu contingut, passant d'una atròfia després d'un període de desús a una hipertròfia després d'un període d'entrenament.

## 4.2 La miogènesi

La miogènesi és el procés que engloba la determinació i diferenciació del múscul. En aquest procés es dona una col·laboració entre els **MRFs** (*Myogenic regulatory factors*), els membres de la proteïna **MEF2** (*Myocyte enhancer factor 2*), altres factors específics de múscul i factors més generals que coordinen el reclutament i funcions de tot un conjunt de coactivadors i corepressors, per tal de dur a terme un control molt acurat de l'expressió gènica durant la miogènesi (Berkes and Tapscott, 2005).

### MyoD i MRFs

El primer factor miogènic que es va descriure va ser el **MyoD** (Choi et al., 1990), el qual pertany a la família de les proteïnes MRFs i conté un domini d'unió al DNA tipus bHLH (*basic-Helix-loop-helix*). Més endavant es van identificar altres membres de la mateixa família i molt relacionats com són: **Myf5** (*Myogenic factor 5*), **MyoG** (*Myogenin*) i **MRF4** (Weintraub et al., 1991). Tots aquests s'engloben en la família dels MRFs i són capaços d'unir-se a seqüències del DNA del tipus CANNTG conegudes com a caixes **Ebox** (*Enhancer box*), les quals es troben presents en promotors de gens que s'expressaran al múscul (Lassar et al., 1989; Blackwell and Weintraub, 1990).

Els MRFs són crítics per la determinació de la diferenciació muscular. D'ençà del seu descobriment, fa més de vint anys, a hores d'ara ja es coneixen els rols específics que juguen MyoD, Myf5, MyoG i MRF4. Diversos estudis han revelat que l'expressió de MyoD i Myf5 sembla ser clau durant els primers estadis de **diferenciació** de la cèl·lula del somita multipotent al llinatge miogènic, ja que la disrupció d'ambdós gens, resulta en l'absència de mioblasts (Rudnicki et al., 1993). Per contra, la miogenina (MyoG) sembla ser més important en els estadis terminals de determinació fenotípica, durant el procés de diferenciació dels mioblasts, però dispensable per establir el llinatge miogènic. Pel que fa a MRF4, tot i expressar-se just després de Myf5, aquest també tindria un paper clau en la determinació inicial del llinatge (Berkes and Tapscott, 2005). Diversos estudis han determinat que **MyoD**, a part de contenir una regió bHLH, presenta tres dominis: l'N-terminal, un domini ric en histidines i cisteïnes i l'hèlix III. El primer jugaria un paper clau com a domini d'activació transcripcional clàssic i seria necessari per la unió cooperativa a fragments de DNA adjacents a les Ebox (Weintraub et al., 1990). La regió rica en histidines i cisteïnes, intervé en la remodelització de la cromatina del locus de la miogenina (Gerber et al., 1997) i la hèlix III és necessària per l'activació de la miogenina. MyoD, a més, s'ha descrit com a un factor important de **regulació** específica de l'**expressió gènica** al múscul, fins i tot quan la cèl·lula muscular es troba ja diferenciada (Amat et al., 2007; Amat et al., 2009).

Els MRFs són bHLHs de tipus II, els quals són teixit específics, i són capaços d'homodimeritzar o d'heterodimeritzar amb membres de la classe I, entre els quals s'inclouen les **proteïnes E**. Aquestes s'expressen ubiqüament en diferents teixits i pel que s'ha vist *in vitro*, sembla ser que alguna d'elles, com ara la proteïna HEB (*bHLH E-protein family*) és essencial en la miogènesi (Conway et al., 2004).

### Factors de transcripció MEF2

La família dels MEFs és una família de factors de transcripció que, de la mateixa manera que els MRFs, participen en el control de l'expressió de gens musculars (Black and Olson, 1998; Kawakami et al., 2000; Buckingham, 2001). D'aquests se n'han descrit 4 membres: **MEF2A**, **B**, **C** i **D**, però cal tenir en compte que no són estrictament musculars. Es caracteritzen per unir-se a seqüències del DNA riques en A i T del tipus C/TTA(A/T)<sub>4</sub>TAG/A (Gossett et al., 1989). A diferència dels MRFs però, els MEF2 no són capaços de determinar el llinatge muscular, malgrat ser indispensables per l'acció dels MRFs. El fet que MEF2 i MyoD tinguin llocs d'unió pròxims sobre promotors naturals, fa que aquests interactuïn directament *in vitro* i activin sinèrgicament construccions reporteres transfectades i dirigides per Eboxs i llocs d'unió de MEF2s (Wasserman and Fickett, 1998). Cal tenir en compte que, malgrat que MEF2C, A i D s'expressen al múscul esquelètic, la seva expressió i *splicing* s'altera en resposta a MyoD (Penn et al., 2004). Aquesta sinèrgia entre MyoD i MEF2 també és possible gràcies al fet que, la família dels MRFs posseeixen un motiu de tres aminoàcids (ATK) dins el domini bàsic (a diferència de la resta de famílies del tipus bHLH) que els confereix la capacitat d'activar els gens específics musculars (Davis et al., 1990; Brennan et al., 1991).

Una altra família de factors de transcripció implicats en la miogènesi són els **Six**, formada per sis membres, cadascun dels quals juga un paper diferent en el context del desenvolupament (Kawakami et al., 2000).

Per resumir-ho, podríem dir que Myf5 i MyoD són requerits per l'adquisició de la identitat miogènica i per jugar un paper clau en la remodelació de la cromatina. A més, aquests juntament amb MEF2 estan involucrats en l'activació transcripcional dels gens musculars (Buckingham, 2001).

### Reclutament de comoduladors de la miogènesi

La miogènesi s'inicia a l'embrió com a resultat de molècules senyalitzadores provinents de diferents teixits del voltant del teixit en qüestió, les quals especifiquen que aquest es derivi cap a una cèl·lula amb característiques miogèniques. Així doncs, cal tenir en compte la importància de la integració entre les senyals miogèniques positives (coactivadors) i negatives (corepressors) a nivell de gens diana.

Les **HATs** (*Histone acetyltransferases*) i les **HDACs** (*Histone deacetylases*) interaccionen amb MyoD tot determinant el paper d'aquest com a activador o repressor en un determinat loci. Les HAT augmenten la seva activitat durant la miogènesi (Polesskaya et al., 2001), gràcies a l'acetilació d'histones, permetent l'accés de MyoD al DNA i iniciar així la transcripció (Bergstrom et al., 2002). En miotubs

diferenciats de cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, s'ha suggerit que MyoD recluta i forma complex amb la proteïna coactivadora p300 i un altre tipus de HAT com és P/CAF (*p300/CBP-associated factor*). Aquest trimer és capaç d'associar-se de forma estable a una Ebox (Puri et al., 1997) i augmentar l'activitat transcripcional dels promotors de gens musculars.

Per altra banda, les HDACs regulen negativament l'expressió de gens musculars mitjançant la interacció amb MyoD i MEF2. Concretament, **Sirt1**, membre de les proteïnes de la família d'histones desacetilases de tipus II o sirtuïnes, també participa en el control de la miogènesi interaccionant amb el complex P/CAF-MyoD. L'activitat desacetilasa de Sirt1 correlaciona amb el paper d'aquest com a repressor de la diferenciació muscular, ja que la seva sobreexpressió retarda el procés de diferenciació en cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Fulco et al., 2003). Tot i això, com que la relació NAD<sup>+</sup>/NADH (*Adenine dinucleotide/Nicotinamide adenine dinucleotide*) varia durant la diferenciació, també disminuiria la seva capacitat desacetilasa i per tant inhibidora.

Durant el procés de la miogènesi, també hi intervé una família de proteïnes remodeladores de la cromatina com són les **proteïnes SWI/SNF** (*SWItch/Sucrose Non Fermentable*). Aquestes són components de complexos que alteren l'estructura de la cromatina en processos ATP dependents i són necessàries per la miogènesi en cèl·lules que expressen MyoD.

### 4.3 La regulació transcripcional al múscul esquelètic

Degut a la complexitat del múscul esquelètic i la importància de la seva contribució en el metabolisme global de l'individu, cal tenir present que dins aquest teixit existeixen uns mecanismes de regulació transcripcional molt precisos i en els quals hi intervenen múltiples factors estretament regulats per l'estatus energètic cel·lular del teixit en qüestió. Alguns d'ells es comenten a continuació:

#### Sirt1 com a modulador transcripcional al múscul esquelètic

El NAD<sup>+</sup> és un transportador electrònic que juga un paper important en el metabolisme cel·lular ja que relaciona la síntesi d'ATP amb la cadena de transport electrònic. La regulació de la família de les sirtuïnes (Sirt) depèn de la relació entre el NAD<sup>+</sup>/NADH, la qual és un indicador de l'estat energètic cel·lular. Aquest fet ha portat a aquesta família de proteïnes a ser un important enllaç entre l'estat energètic cel·lular i el control de l'expressió gènica. A principis dels anys noranta, el grup de Wallace va suggerir, en primer moment, que la **relació NAD<sup>+</sup>/NADH** podia estar involucrada en la regulació de l'expressió de gens nuclears (Chung et al., 1992). Durant l'exercici físic o durant el dejuni, aquesta relació disminueix i activa aquesta família de proteïnes citosòliques, nuclears (Sirt1) i mitocondrials (Sirt3) (Egan and Zierath, 2013).

Molts estudis han relacionat Sirt1 amb la regulació de l'homeòstasi energètica, actuant a diversos òrgans clau del metabolisme glucídic i lipídic. Aquesta proteïna actua com a sensor de la disponibilitat de substrats i du a terme la seva funció unint-se i desacetilant 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. Al múscul esquelètic, Sirt1 desacetila i activa **PGC-1 $\alpha$**  propiciant el canvi de substrat metabòlic. Concretament, promou un augment en la transcripció de gens

involucrats en l'oxidació mitocondrial d'àcids grassos a través de PPAR $\alpha$  i de gens implicats en la fosforilació oxidativa (Canto and Auwerx, 2008; Canto et al., 2009). Això permet preservar la glucosa en condicions de dejuni. Així doncs, alguns grups han demostrat el paper protector de Sirt1 enfront diverses patologies associades a la ingesta de dietes riques en greixos, com ara la intolerància a la glucosa o l'esteatosi hepàtica (Sinclair, 2005).

Sirt1, el qual es pot detectar en molts teixits i en altes quantitats al múscul esquelètic, és el principal regulador de l'**homeòstasi energètica** i de la sensibilitat a la insulina, així com també està involucrat en els processos metabòlics beneficiosos associats amb la restricció calòrica (Wang et al., 2012). S'ha vist que aquesta última, incrementa l'expressió de Sirt1 al múscul esquelètic, millora la sensibilitat a la insulina (inhibint les Thr-fosfatases les quals inhibeixen IRS-1 (*Insulin receptor substrate*)) i també n'incrementa la biogènesi mitocondrial mitjançant la regulació de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  (Amat et al., 2009). Per últim, cal esmentar que la relació NAD<sup>+</sup>/NADH disminueix durant la miogènesi, de manera que en els estadis de mioblast, Sirt1 seria molt actiu, però aniria disminuint el seu paper repressor al llarg del procés, permetent així que els gens que silencia esdevinguessin finalment actius. D'aquesta manera, al múscul esquelètic, Sirt1 té un paper en el control de la transcripció de gens claus del metabolisme energètic muscular, principalment UCP3 i PGC-1 $\alpha$ . També regula l'activitat d'Akt, FOXO1 i 3a (inhibides per l'activació d'Akt i implicades en la regulació de la massa muscular) i el factor de determinació miogènica MyoD. Tots aquests factors, posseeixen papers centrals dins la regulació de l'estat energètic del múscul esquelètic a través de l'acció en vies de senyalització anabòlica o catabòlica (Ryall, 2012).

### PGC-1 $\alpha$ com a modulador transcripcional al múscul esquelètic

PGC-1 $\alpha$  s'expressa majoritàriament en **músculs més oxidatius**, rics en fibres de tipus I i IIa, on juga un paper important en el manteniment de la composició del tipus de fibra muscular i la seva integritat després de l'exercici. PGC-1 $\alpha$ , juntament amb les proteïnes MEF2s, actuen sobre gens involucrats en la determinació del tipus fibril·lar provocant un increment de fibres de tipus I i IIa, més oxidatives, en detriment de les més glucolítiques (Lin et al., 2002; Handschin et al., 2003).

Diferents estudis també relacionen el paper de PGC-1 $\alpha$  en el múscul esquelètic amb el metabolisme de la glucosa. En aquest sentit, PGC-1 $\alpha$ , mitjançant la coactivació amb MEF2C, augmenta l'expressió del transportador de glucosa **GLUT4** (Michael et al., 2001). Per altra banda, reprimeix l'oxidació de la glucosa en determinades línies cel·lulars gràcies a un augment de l'expressió de **PK4** (*Pyruvate dehydrogenase kinase 4*) i mitjançant la coactivació d'ERR $\alpha$  (*Estrogen-related receptor  $\alpha$* ) (Wende et al., 2005). Així doncs, PGC-1 $\alpha$  actua controlant la font d'energia utilitzada pel múscul incrementant l'oxidació d'àcids grassos i reduint l'oxidació de glucosa, que juntament amb l'increment del transport d'aquesta a l'interior cel·lular condueix a les cèl·lules musculars a incrementar les seves reserves de glicògen preparant-lo pel pròxim exercici. Alhora, PGC-1 $\alpha$  també s'indueix per restricció calòrica. Si bé es coneix que la restricció calòrica millora la producció energètica mitocondrial, l'oxidació de

metabòlits i la depuració de ROS (*Reactive oxygen species*) (nocives per la cèl·lula) en el múscul esquelètic, s'ha evidenciat que ni el mateix PGC-1 $\alpha$  ni la biogènesi mitocondrial en aquest teixit, no són necessaris per tal que la CR exerceixi els seus beneficis en el metabolisme global de l'individu (Finley et al., 2012). Això segurament es deu a canvis en altres òrgans distints al múscul, tot i que aquest és el teixit on s'hi acumula més glucosa de l'organisme. Altres estudis han mostrat que l'exercici incrementa l'expressió de PGC-1 $\alpha$  tant a humans com a rosegadors (Baar et al., 2002; Russell et al., 2003; Norrbom et al., 2004). L'entrenament físic provoca un increment de la **biogènesi mitocondrial** vehiculada pel propi PGC-1 $\alpha$  i també afavoreix la transició de fibres ràpides (glucolítiques) a fibres lentes (oxidatives). Malgrat que les vies *upstream* involucrades en l'activació d'aquest coactivador en resposta a l'exercici no estan del tot definides, es coneix que hi intervenen diferents vies de senyalització com ara la del calci, a través de MEF2, el qual incrementa la transcripció del propi PGC-1 $\alpha$  (en situació d'exercici) (Czubryt et al., 2003; Handschin et al., 2003). Per altra banda, s'ha comprovat que les vies d'activació de la p38-MAPK (*p38 Mitogen-activated protein kinase*) i de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) augmenten l'expressió de PGC-1 $\alpha$  després de l'esforç físic continuat (Zong et al., 2002; Akimoto et al., 2005).

#### Els PPARs com a moduladors transcripcionals al múscul esquelètic

A múscul esquelètic, l'expressió relativa d'ells en ordre descendent és PPAR $\beta/\delta$  > PPAR $\alpha$  > PPAR $\gamma$  (Gilde and Van, 2003). Com ja s'ha comentat anteriorment, aquests s'uneixen al DNA als elements **PPRE** com a heterodimers amb el receptor X de retinoic. Nombrosos estudis han mostrat que els àcids grassos, especialment els poliinsaturats, poden unir-se en aquests PPARs amb diferents afinitats, per tal de controlar la transcripció de determinats gens diana. Això ens fa adonar de la importància d'aquests PPARs com a sensors metabòlics. A més, també són els responsables que el múscul pugui utilitzar des de l'oxidació de triglicèrids provinents de les fonts extramusculars, fins als greixos dels dipòsits intramusculars mitjançant la regulació transcripcional dels gens que s'hi veuen implicats i així proveir d'energia a les fibres musculars durant l'exercici físic. A través de l'activació específica de certs gens en els diferents teixits diana, els PPARs controlen varis aspectes del metabolisme dels àcids grassos, el balanç energètic i l'homeòstasi de la glucosa. Els PPARs poden regular l'expressió gènica en resposta als nivells intramusculars d'àcids grassos durant l'exercici, afavorint així una resposta adaptativa a l'increment de demanda energètica (Freysenet, 2007).

**PPAR $\alpha$**  és relativament abundant en teixits amb una alta capacitat oxidativa com ara el fetge, el múscul o el ronyó. El múscul esquelètic és el principal lloc d'oxidació d'àcids grassos en condicions normals, així com en resposta a determinats estímuls. Per tant, tal i com passa al fetge, al múscul esquelètic PPAR $\alpha$  és de vital importància per tal de vehicular el canvi d'utilització d'un substrat, principalment en forma de glucosa, a un substrat a base d'àcids grassos. Durant l'exercici o un moviment muscular, els àcids grassos alliberats a la circulació són capaços d'entrar als teixits perifèrics, on són detectats pels PPARs, els quals incrementaran l'expressió de tota una bateria de gens del catabolisme lipídic. Aquest fet provoca un augment en la captació i l'oxidació d'àcids grassos i també de la lipòlisi de triglicèrids (Horowitz et al., 2000), incrementant així la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina.

L'isotip **PPAR $\beta/\delta$**  s'expressa ubiquament i és l'isotip de PPAR amb més presència al múscul esquelètic. Aquest està implicat en diversos processos: en la regulació de l'homeòstasi energètica, en l'increment del transport i la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos, en l'increment la termogènesi i també un paper clau en la distribució dels diferents tipus de fibres al múscul i manteniment de les seves capacitats oxidatives. S'ha vist que una deleció selectiva de PPAR $\beta/\delta$  comporta un canvi cap a fibres menys oxidatives (Schuler et al., 2006), fet que permet incrementar la capacitat d'adaptació després d'un període d'entrenament. També s'ha observat que els seus lligands són un tractament eficaç contra la síndrome metabòlica ja que prevenen el guany de pes i suprimeixen la inflamació provocada per macròfags (Coll et al., 2009). També s'ha vist que, tal i com passa amb PPAR $\alpha$ , la seva expressió incrementa durant el dejuni.

Si bé **PPAR $\gamma$**  s'expressa de manera molt abundant al teixit adipós, també s'ha observat la presència de dues variants d'*splicing*  $\gamma 1$  i  $\gamma 2$  en el múscul esquelètic (Vidal-Puig et al., 1997). A més, existeix una correlació entre els nivells d'expressió de PPAR $\gamma$  al teixit muscular i l'obesitat en individus amb diabetis tipus 2 (Park et al., 1997). Aquest, també incrementa la sensibilitat a la insulina al múscul esquelètic, incrementant primer la via d'activació de l'oxidació dels àcids grassos (Cha et al., 2001; Ciaraldi et al., 2002), mentre que altres evidències suggereixen una activació directa de la via de senyalització de la insulina (Verma et al., 2004).

#### 4.4 El metabolisme al múscul esquelètic

El múscul esquelètic representa el 40% del total de la massa corporal en els mamífers i també representa el 30% de la taxa metabòlica en els humans adults (Zurlo et al., 1990). Aquest té un paper important en el **control de la glucèmia** i l'**homeòstasi energètica**. També cal destacar que és el teixit predominant pel que fa a la disponibilitat de la glucosa sota condicions d'estimulació insulinèmica (DeFronzo et al., 1981). D'altra banda, sota condicions d'exercici, el múscul és capaç d'estimular la captació de glucosa a través d'un mecanisme independent d'insulina. L'entrenament o l'**exercici físic** indueixen adaptacions al múscul esquelètic que es tradueixen en canvis en les proteïnes contràctils i en la seva funció, canvis en la funció mitocondrial, en la regulació metabòlica, en mecanismes de senyalització intracel·lular i també provoquen **canvis a nivell transcripcional** de determinats gens. Els canvis més immediats després de l'exercici es donen sobretot en gens d'expressió ràpida, en reguladors metabòlics, en gens relacionats amb el metabolisme dels carbohidrats i de la seva mobilització, en el transport i l'oxidació lipídica, en gens involucrats en el metabolisme mitocondrial i en la fosforilació oxidativa, a part de tot un seguit de reguladors transcripcionals de l'expressió gènica i de la biogènesi mitocondrial (Egan and Zierath, 2013).

Una característica clau en el múscul esquelètic és la seva ràpida capacitat per modular la taxa de producció energètica, el reg sanguini i la utilització de substrats en resposta a la locomoció, fet que el converteix en el màxim responsable dels canvis metabòlics induïts i associats a l'exercici. Conseqüentment, aquest es converteix en el teixit majoritari del metabolisme dels carbohidrats i dels lípids durant el procés d'obtenció energètica.

Si entrem a parlar de l'activitat muscular, podem fer la distinció entre diferents tipus d'activitat. Els exercicis aeròbics sotmeten el cos a repeticions d'alta freqüència i



baixa demanda de contracció muscular, mentre que els exercicis de resistència tenen una freqüència més baixa però d'alta demanda contràctil. És per això que el cos ha de tenir **capacitat de canviar d'un substrat** a un altre **en funció del tipus d'exercici** realitzat (Egan and Zierath, 2013). En un exercici d'intensitat baixa o moderada, la primera font d'energia pel múscul esquelètic seran la glucosa (derivada de la ingesta i la gluconeogènesi hepàtica) i els àcids grassos (alliberats per la lipòlisi del teixit adipós blanc). A mesura que incrementa la intensitat d'aquest exercici, va minvant la utilització dels FFAs per part del múscul, mentre que la utilització de la glucosa circulant va incrementant progressivament fins a provenir totalment del glicogen muscular en exercicis d'altres intensitats. Si aquest es prolonga (>60 minuts), es deixa d'utilitzar el glicogen muscular i els substrats utilitzats majoritàriament seran els FFAs circulants derivats de la lipòlisi. Així doncs, el glicogen muscular és la font de carbohidrats utilitzada majoritàriament durant un exercici moderat i aquesta font canvia als triglicèrids intramusculars quan l'exercici esdevé més prolongat i moderat. Ara bé, durant un exercici de resistència, ambdós contribueixen en l'aportació energètica (Koopman et al., 2006).

Després de l'exercici físic es produeix un excés de **consum d'oxigen** que és proporcional a l'estrès metabòlic generat i que ve determinat per la intensitat, durada i tipus d'exercici. Durant les hores posteriors a l'exercici es dona una recuperació de l'homeòstasi cel·lular i més endavant, la pròpia adaptació a l'exercici. Aquest procés de restitució global també va acompanyat de respostes inflamatòries.

#### 4.5 Importància de la funció mitocondrial en la síndrome metabòlica

En els darrers anys s'ha fet evident que l'obesitat i la síndrome metabòlica estan relacionades amb la manca de mobilitat. A més, s'ha posat en evidència que els lípids intracel·lulars que es troben al múscul esquelètic, així com la desregulació de l'oxidació dels àcids grassos en aquests tipus cel·lulars, poden contribuir significativament en aquest tipus de patogènesi (Wells et al., 2008). Si tenim en compte el **metabolisme energètic muscular**, veurem que un 90% de l'energia que aquest requereix s'obté de l'**oxidació dels àcids grassos** i, si a més a més en considerem la seva massa total dins el pes corporal, es pot deduir ràpidament la gran contribució d'aquest en l'estat fisiològic de l'individu. Així doncs, alguns grups d'investigació han observat que els nivells plasmàtics d'FFAs juguen un paper important en el desenvolupament de resistència a la insulina a les cèl·lules del múscul esquelètic (Hirabara et al., 2010; Martins et al., 2012). En humans i rosegadors, la infusió persistent de lípids o l'administració d'una dieta HFD (*High fat diet*), especialment els àcids grassos saturats de cadena llarga com ara l'àcid palmític o l'esteàric, provoquen canvis en gens musculars i en la secreció de factors proinflamatoris com ara TNF- $\alpha$ , IL-6 (*Interleukin-6*), entre altres i que estan relacionats amb un impediment de la **funció mitocondrial**. Així mateix, també es dona una disminució de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  i d'altres gens mitocondrials, reduint la biogènesi mitocondrial i la seva capacitat oxidativa (Hirabara et al., 2010). Com a conseqüència incrementa la producció de ROS, el qual interactua amb lípids, proteïnes i mtDNA provocant modificacions i danys que contribueixen a un empitjorament de l'estat i les capacitats funcionals d'aquest òrganul. Altres laboratoris han observat que l'estrès

oxidatiu sistèmic està relacionat amb una disfunció mitocondrial en pacients amb síndrome metabòlica (Yokota et al., 2013). Alhora, la disfunció mitocondrial comporta una reducció de la capacitat oxidativa dels àcids grassos i incrementa així la proporció de productes derivats com ara les ceramides i els DAGs (*Diacyl-glycerols*), els quals estimulen l'activació de determinades cinases com les Ser/Thr-cinases, inactivant la via de senyalització de la insulina i induint la fosforilació del receptor IRS1. Aquest fet contribueix clarament a la resistència a la insulina al múscul esquelètic (Martins et al., 2012). En la patologia de la resistència a la insulina, el múscul esquelètic també perd la seva capacitat de transició entre la utilització de diferents tipus de substrat, ja siguin els carbohidrats o bé els àcids grassos.

A més a més, cal tenir en compte que l'exercici físic o l'activitat contràctil muscular provoca canvis en les relacions AMP/ATP (*Adenosine monophosphate/ATP*) i també en les de *Creatine/Phospho-Creatine*. L'efecte d'aquestes provoca l'activació de determinades cinases com ara la MAPK, la qual té efectes directes positius sobre l'estimulació de la captació de glucosa, l'oxidació d'àcids grassos i la biogènesi mitocondrial (Wells et al., 2008). Per tant, es tornen a posar de manifest els efectes positius de l'exercici en el tractament de l'obesitat, la síndrome metabòlica i la importància de la contribució del múscul esquelètic en el control metabòlic global de l'organisme. Per altra banda, es fa difícil determinar si la disfunció mitocondrial és una causa o una conseqüència de la resistència a la insulina (Villarroya F, 2005; Alba Gonzalez-Franquesa, 2012; Camara et al., 2005) i, de fet, es manté qüestionada la possibilitat que la pèrdua de funció mitocondrial sigui realment un o "el" factor primari de generar la resistència a la insulina que acaba donant lloc a la diabetis tipus II.

#### 4.6 L'activació de cinases al múscul esquelètic

Un alt nombre d'estudis han suggerit que, la resposta adaptativa del múscul esquelètic a l'exercici pot involucrar el metabolisme energètic a través de la regulació d'una sèrie de molècules senyalitzadores i de factors de transcripció. Els seus efectes es tradueixen en alteracions de l'expressió gènica i contribueixen alhora a la **plasticitat muscular** enfront diferents estímuls.

La pròpia activitat física incrementa tres grans famílies de **MAPKs** al múscul esquelètic: les ERK 1/2, la JNK i la p38-MAPK, aquesta última amb una activitat molt dependent de l'estatus de l'exercici físic. Aquestes MAPKs regulen fenòmens transcripcionals per acció de fosforilacions de diversos substrats localitzats al citosol o al nucli, incloent factors de transcripció, coactivadors i regulant múltiples processos fisiològics com ara la diferenciació, l'hipertrofia, la inflamació o la pròpia expressió gènica. En un exemple concret, es coneix que durant la **contracció** (per efectes de l'exercici), la p38-MAPK és capaç d'estimular altres factors de transcripció *upstream* del gen PGC-1 $\alpha$  com ara ATF2 i MEF2, els quals incrementen l'expressió del propi PGC-1 $\alpha$  i, que contribueixen alhora, a incrementar l'expressió de certs marcadors que faciliten l'**adaptació mitocondrial** al múscul esquelètic (Akimoto et al., 2005). D'altra banda, durant la contracció muscular, el múscul esquelètic també és un teixit on es produeixen altes quantitats de **ROS** a través de la cadena de transport electrònic. Aquestes activen la senyalització MAPK, així com també la del NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor*

*kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) fent de pont entre els senyals de transducció i la regulació dels processos transcripcionals.

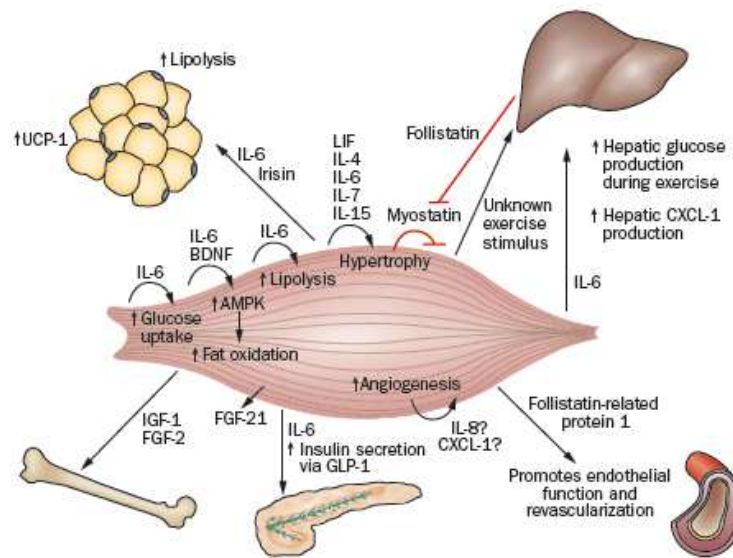
Les cèl·lules eucariòtiques han de mantenir una alta **relació ATP/ADP** (*ATP/Adenosime diphosphate*). La manca d'aquest balanç entre la demanda d'ATP i la síntesi per part del mitocondri incrementa la concentració de lactat i també incrementa finalment la relació AMP/ATP (a través de l'adenilat ciclase). Durant l'exercici físic o l'estimulació elèctrica de la contracció, l'AMPK és capaç de transduir els canvis de l'estatus energètic cel·lular en canvis d'expressió gènica nuclear (Freyssenet, 2007). A partir de la detecció dels canvis en els nivells de molècules d'AMP (provocant la fosforilació de la cinasa), l'AMPK estimula l'expressió de diversos factors com ara PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  i NRF-1. Com a conseqüència de l'activació d'aquests dos últims, s'estimula la biogènesi mitocondrial a les fibres musculars esquelètiques. A més a més, al múscul esquelètic, l'activació aguda de l'AMPK suprimeix la síntesi de glicogen i la síntesi de proteïnes, però promou el transport de glucosa i el metabolisme lipídic. En contraposició, la seva activació crònica altera l'expressió de gens metabòlics i n'indueix la biogènesi mitocondrial (Egan and Zierath, 2013).

#### 4.7 Concepte de mioquina i relació entre l'exercici físic i els nivells d'FGF21 circulants

En les darreres dècades, l'activitat física com a estil de vida s'ha considerat com un factor important per regular el balanç energètic. Tot i que és important per evitar l'obesitat, es va veure que l'activitat física també jugava un paper independent en la protecció contra el desenvolupament de diabetis de tipus 2, de malalties cardiovasculars, de càncer i fins i tot de demència o de depressió. En vista d'aquests resultats, va anar prenent força la idea que el **múscul** pogués actuar com a un **òrgan endocrí** i que l'activitat física pogués induir l'expressió i alliberació d'algunes citoquines i altres pèptids (antigament anomenats "*work factors*") a la circulació, els quals poguessin realitzar una sèrie de canvis en altres òrgans com ara al fetge o al teixit adipós (Pedersen, 2011) i ser de vital importància dins l'homeòstasi metabòlica de tot l'organisme (Egan and Zierath, 2013).

Durant la dècada dels anys noranta ja es va fer evident que existien vies de senyalització provinents dels músculs contràctils, les quals eren independents de la via mitjançada pel sistema nerviós. Així doncs, va sorgir el concepte bàsic de com el múscul es podia comunicar amb els altres òrgans a través d'una via endocrina, o d'una manera més local, a través d'una via paracrina (Pedersen, 2011). Tot i que el concepte de **mioquines** deriva de Pedersen al 2003, durant l'última dècada, s'ha fet més evident que el múscul esquelètic és un òrgan secretor molt important de moltes proteïnes i altres molècules de baix pes molecular. A més, si tenim en compte el concepte de "*cross-talk*" entre diferents òrgans, no és d'estranyar que s'hagi optat per un estudi del secretoma muscular per tal de trobar aquestes molècules, les quals li permeten establir una comunicació entre músculs de forma autocrina/paracrina o amb altres teixits, com ara el teixit adipós d'una manera endocrina (Trayhurn et al., 2011). Aquestes citoquines secretades pel múscul esquelètic van passar a anomenar-se "*mioquines*". A l'any 2003 ja es va fer evident que el múscul esquelètic contràctil alliberava a la circulació quantitats significants d'algunes d'aquestes. Entre elles, hi

havia diferents interleuquines com les IL-6, IL-8 i IL-15, descrites per Pedersen al 2008, i altres com el BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), el LIF (*Leukemia inhibitor factor*), la FSTL-1 (*Follistatin*) i el propi FGF21. Per algunes d'elles com ara les IL-6, IL-15 i el BDNF, es va constatar que incrementaven el seu nivell d'expressió després d'un període d'exercici físic, creant així un ambient antiinflamatori i exercint un efecte endocrí específic sobre el teixit adipós visceral, incrementant-ne la lipòlisi (Brandt and Pedersen, 2010).



**Figura 10.** El múscul esquelètic com a òrgan secretor. Mioquines conegudes i la seva funció biològica (Pedersen and Febbraio, 2012).

El concepte d'FGF21 com a mioquina és bastant nou i es reforça a partir dels treballs realitzats per Walsh amb el model de ratolí "*myomouse*" (Walsh, 2009). En aquest treball, es va observar que, la inducció de la hipertròfia muscular a través d'Akt disminuïa la quantitat de greix corporal i en millorava el metabolisme. Intentant identificar noves proteïnes secretades pel múscul, les quals conferissin els canvis fenotípics que es produïen per la inducció d'Akt, es va descriure a FGF21 com a possible mioquina (Hojman et al., 2009). Si inicialment s'assumia que FGF21 s'expressava majoritàriament al fetge, aquestes dades suggerien un perfil d'expressió molt més ampli. A part del que s'ha esmentat anteriorment, FGF21 també s'expressa i es produeix en altres teixits com ara al teixit adipós marró, al teixit adipós blanc (Muisse et al., 2008; Hondares et al., 2011) i al múscul esquelètic, on s'ha descrit que FGF21 és alliberat gràcies a l'activació de la via de senyalització de la **PI3K/Akt1** en resposta a l'acció de la insulina o després d'un procés d'entrenament. Aquest fet es tradueix en l'atenuació de l'obesitat relacionada a les disfuncions metabòliques, així com també en una millora dels paràmetres metabòlics (Izumiya et al., 2008). Aquests efectes positius, en part, estarien induïts pel fet que un increment d'FGF21 pot donar lloc a canvis de perfil transcripcional al fetge, els quals promourien l'oxidació d'àcids grassos hepàtics i la producció de cossos cetònics. Alhora, FGF21 també indueix la transcripció de gens codificants per enzims i transportadors requerits per aquestes funcions (Lundasen et al., 2007; Coskun et al., 2008). Algun estudi, fins i tot ha demostrat que els nivells de la proteïna d'FGF21 al múscul esquelètic són similars als que hi ha a fetge dejunat,

revelant que l'expressió i alliberament d'FGF21 en el múscul es troba fortament induït per la insulina (Hojman et al., 2009).

Alguns laboratoris han descrit la importància del paper que juguen les mioquines durant l'exercici físic en el metabolisme i en concret en el metabolisme de la glucosa al múscul esquelètic. Sembla ser que l'activitat física estimula l'expressió de moltes citoquines. Concretament, les diferents combinacions d'interleuquines són capaces d'estimular l'increment del transport de glucosa a través d'un increment de la fosforilació d'AMPK, i no via Akt (dependent de la insulina) (Gray and Kamolrat, 2011). En diversos estudis clínics, s'ha vist una correlació positiva entre els nivells d'FGF21 en plasma i alguns paràmetres relacionats amb l'obesitat com ara el BMI (*Body mass index*) entre altres (Zhang et al., 2008), fet que va portar a alguns grups a investigar el paper d'aquesta hormona i els seus efectes positius derivats de l'exercici físic. Els estudis realitzats en humans han demostrat que els individus sotmesos a un programa d'exercici físic, més o menys intens, durant dues setmanes, incrementen significativament els nivells d'FGF21 en sèrum així com també els d'FFAs i de glucosa. Alhora, també s'ha observat una correlació positiva entre la resposta adrenèrgica induïda per l'exercici prolongat i l'increment d'FGF21 en plasma. Aquest fet induïx a pensar que l'alliberament d'FGF21, mitjançant la seva acció inhibidora de la lipòlisi, seria un mecanisme que ajudaria a l'organisme a contrarestar l'exposició crònica als alts nivells d'FFAs al plasma degut al propi exercici (Cuevas-Ramos et al., 2012). Per contra, a l'any 2011, Yang i col·laboradors van determinar que una exposició més perllongada a l'exercici físic, combinant dotze setmanes d'exercici aeròbic i resistència, provocava una disminució dels nivells d'FGF21 al plasma en dones obeses no diabètiques (Yang et al., 2011).

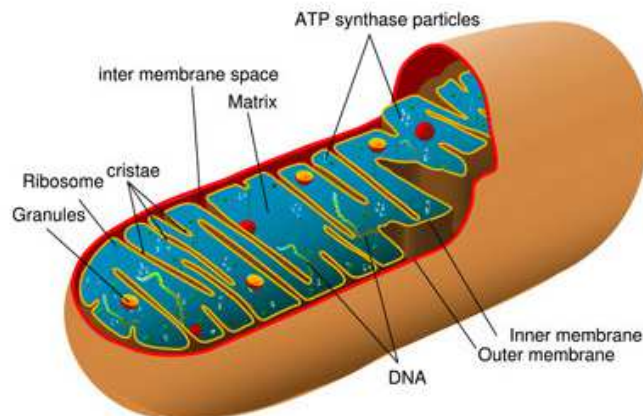
El descobriment de mioquines sembla ser que no té aturador, ja que darrerament també s'ha descrit una nova molècula: la **Irisina**. Aquesta s'ha descrit com a una mioquina dependent de PGC-1 $\alpha$ , la qual dirigeix la transformació del teixit adipós marró a partir del teixit adipós blanc, contribuint així al seu rol d'adaptació a l'exercici (Bostrom et al., 2012). En resum, es considera que una mioquina és tota aquella proteïna que ha estat sintetitzada pel múscul esquelètic (més que per una cèl·lula muscular), codificada per la fibra muscular i secretada per aquest tipus cel·lular. Tanmateix, més de la meitat de les mioquines descrites també són secretades pel teixit adipós, fet que ha portat a anomenar-les "**Adipo-Mioquines**". A diferència del que passa amb algunes d'aquestes, les quals tenen comportaments duals entre senyalització inflamatòria per un costat i efectes beneficiosos després de l'exercici per l'altre, fins al dia d'avui no s'ha descrit cap comportament d'aquest tipus per a FGF21 (Raschke and Eckel, 2013).

## 5. EL MITOCONDRI I LA CADENA RESPIRATÒRIA MITOCONDRIAL

La cèl·lula eucariota és una cèl·lula altament especialitzada. Això és gràcies a la presència de diferents orgànuls subcel·lulars vitals per a realitzar les múltiples funcions fisiològiques que requereix. Dins d'aquests, el mitocondri és un orgànul amb una gran capacitat per adaptar la seva activitat en resposta a les condicions fisiològiques i patològiques de l'organisme (Rojo et al., 1998). Les seves principals funcions estan relacionades amb el metabolisme energètic, la producció de radicals lliures i l'apoptosi, entre altres (Wallace, 2010).

### 5.1 Estructura i fisiologia mitocondrial

Els mitocondris són uns orgànuls subcel·lulars formats per una doble membrana, cadascuna de les quals està altament especialitzada i que delimiten una sèrie de subestructures responsables de la compartimentació dels processos mitocondrials. Consisteix principalment d'una matriu mitocondrial on tenen lloc la majoria de processos enzimàtics del mitocondri i a on es localitza el seu material genètic. També està constituït per una membrana mitocondrial interna (MMI) on s'hi localitza la cadena respiratòria, un espai intermembrana i finalment, la membrana mitocondrial externa (MME).



**Figura 11.** Esquema de l'estructura d'un mitocondri. Imatge de tutorvista.com.

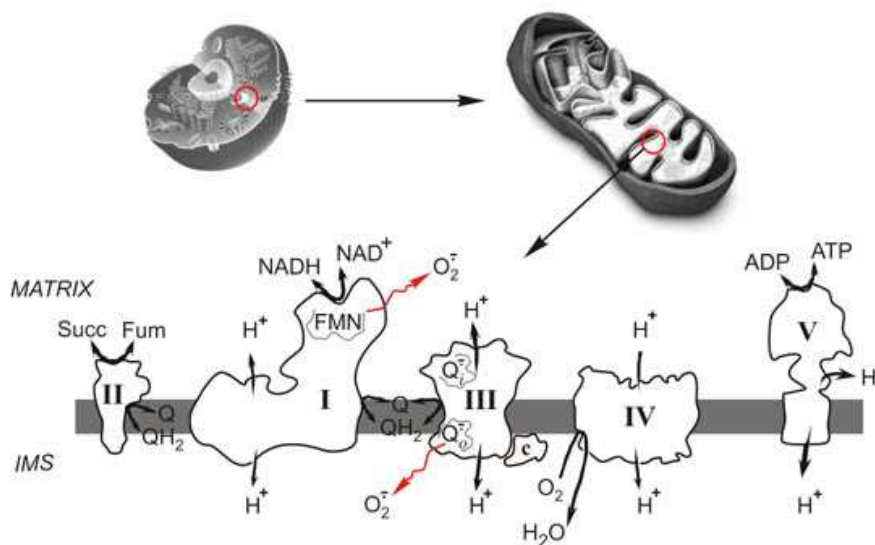
El que veritablement distingeix el mitocondri de la resta d'orgànuls subcel·lulars, entre altres característiques, és la possessió d'un genoma propi: el **DNA mitocondrial** (mtDNA), el qual, segons la teoria endosimbiòtica (L.Margulis, 1970; Margulis, 1981), segurament és una reminiscència del genoma de l'endosimbiont primitiu, com a resultat de la transferència d'aquest DNA al genoma de l'hoste. A canvi, l'hoste en rep un benefici energètic: la respiració aeròbica del simbiont.

Els mitocondris són els orgànuls encarregats de proporcionar la major part de l'energia que necessita la cèl·lula eucariota per dur a terme els diferents processos biològics. En els mitocondris es produeix l'oxidació dels àcids grassos i de piruvat, de manera que l'energia generada s'utilitza per produir **ATP**, el qual serà usat en els diferents processos cel·lulars. Durant la respiració s'oxiden molècules reduïdes, produïdes

durant el metabolisme oxidatiu, com són el NAD(P)H (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) i el FADH<sub>2</sub> (*Flavin adenine dinucleotide*). En aquestes reaccions d'oxidació s'obtenen electrons que són transportats al llarg de la cadena respiratòria fins a l'acceptor final d'electrons que és la molècula d'oxigen.

## 5.2 La cadena respiratòria mitocondrial i la fosforilació oxidativa

La cadena respiratòria, o cadena de transport electrònic, està situada a les crestes mitocondrials del mitocondri i està formada per diferents complexos multiproteics. Aquesta és capaç de transformar l'energia oxidativa provinent de la fosforilació oxidativa (en condicions aeròbiques) en energia química resident al'enllaç fosfodièster de l'ATP. Així doncs, aquest sistema està format per cinc **complexos multienzimàtics** localitzats a la **MMI** i ordenats segons el seu potencial redox: el **complex I** o NADH-ubiquinona oxidoreductasa, el **complex II** o Succinat-deshidrogenasa, el **complex III** o Ubiquinona-citocrom C oxidoreductasa, el **complex IV** citocrom oxidasa, i el complex V o **FoF1-ATP sintetasa** (ATPasa), juntament amb el citocrom C (proteïna soluble de l'espai intermembrana) i el coenzim Q o Ubiquinona. A part, també cal contemplar la presència de l'ANT (*Adenine nucleotide translocase*) (Klingenberg, 1992) i del transportador de P<sub>i</sub> (Walker and Runswick, 1993) per tal que el sistema disposi dels substrats necessaris per la síntesi d'ATP i no es trobi limitat pel producte de la reacció. Tots aquests complexos i transportadors formen part del **sistema OXPHOS** (*Oxidative phosphorylation*) com podem veure a la figura 12.



**Figura 12.** Esquema dels diferents components del sistema OXPHOS del mitocondri dins la membrana mitocondrial interna (MMI). Imatge obtinguda de School of Biological Sciences Queen's University, Belfast.

La fosforilació oxidativa és una via metabòlica que utilitza l'energia alliberada per l'oxidació de nutrients per tal de produir ATP d'una manera molt més eficient que la resta de processos alternatius. Durant la fosforilació oxidativa, en la matriu mitocondrial, els substrats (àcids grassos i piruvat) són transformats a acetil-CoA, el qual és oxidat finalment fins a CO<sub>2</sub> en el cicle de Krebs. Això genera una font de poder reductor en forma de NADH i FADH<sub>2</sub> (anomenats donadors d'electrons) que cedeixen

els electrons als complexos I i II respectivament. Això inicia un seguit de transferències on, els electrons són transferits des dels donadors d'electrons fins els seus acceptors de potencial redox inferior. L'energia alliberada pel flux d'electrons a través d'aquests complexos i, a través d'un procés que s'anomena quimiòsmosi, s'utilitza per transportar protons ( $H^+$ ) de la matriu a l'espai intermembrana. Aquest procés dona lloc a una elevada concentració de protons (gradient electroquímic), en aquest compartiment, els quals podran retornar a la matriu mitocondrial a favor de gradient a través del complex proteic ATP-sintetasa. Aquest complex utilitza l'energia del gradient electroquímic de  $H^+$  per generar ATP a partir de l'ADP +  $P_i$  (fosfat) en una reacció de fosforilació (Mitchell, 1966). Alhora, aquest gradient de  $H^+$  també és necessari pel manteniment del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) i pel transport actiu de metabòlits.

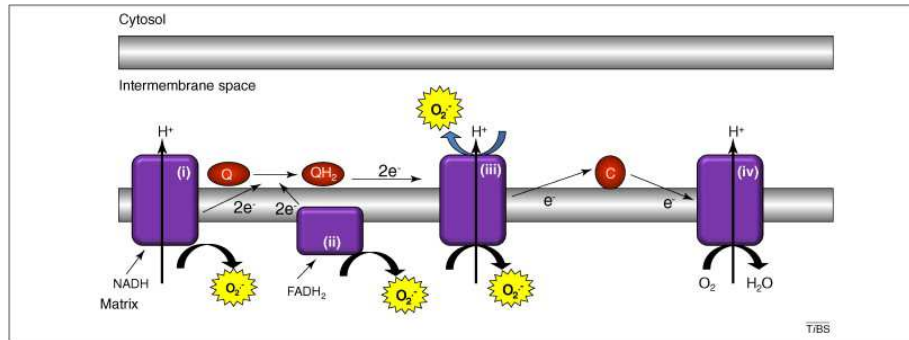
Durant la fosforilació oxidativa, la molècula d' $O_2$  (essencial en el metabolisme energètic aeròbic) es converteix en l'acceptor final dels electrons de la citocrom c-oxidasa, l'últim component d'aquest complex multienzimàtic, la qual catalitza la reducció de l' $O_2$  a  $H_2O$ . Tanmateix, en condicions fisiològiques normals, l'eficiència d'aquest procés no és total i es produeix una reducció incompleta de la molècula d'oxigen, generant-se així els anions superòxid. Recordem que els complexos I i II són els que estan més implicats en la generació de **ROS**, les quals són exponencialment dependent del seu potencial. Els desacobladors químics i les UCPs contribueixen a dissipar el gradient de  $H^+$ , impeding que es dugui a terme la fosforilació oxidativa i reduint així la generació d'espècies reactives d'oxigen.

Una part de les subunitats d'aquests complexos venen codificades pel genoma nuclear i altres venen codificades pel genoma mitocondrial. De manera que, certes afectacions en ambdós genomes poden generar disfuncions mitocondrials (observades sobretot a nivell de la funcionalitat de la cadena respiratòria) i fins i tot miopaties en el cas concret en el que aquestes afectacions es donin al múscul esquelètic.

### 5.3 Les espècies reactives d'oxigen

El mitocondri és la principal font cel·lular d'**espècies reactives d'oxigen (ROS)**. Aquestes es produeixen durant el metabolisme oxidatiu a través de la reducció de la molècula de d'oxigen ( $O_2$ ), formant l'anió superòxid  $O_2^-$ . Aquest finalment dismuta i es converteix en peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) per acció de les SODs (*Superoxide dismutases*) dins del mitocondri i al citosol (Hamanaka and Chandel, 2010). En poca presència de metalls de transició, l'  $H_2O_2$  es pot convertir en el radical hidroxil  $OH^-$ , el qual és altament tòxic. En els complexos I, II i III de la cadena de transport electrònic, és on els electrons poden reduir la molècula d'oxigen, donant com a resultat la formació del superòxid. Tot i que els complexos I i II produeixen ROS dins la matriu mitocondrial, el complex III pot produir ROS als dos costats de la membrana mitocondrial interna. Aquest fet és de vital importància a l'hora de considerar la implicació d'aquestes molècules de **ROS** en vies de **senyalització citosòlica**. A part, existeixen altres enzims que no pertanyen a la cadena respiratòria i que poden contribuir a la formació de superòxid al mitocondri, però són poc importants pel que fa a la producció total de ROS per part del mitocondri.





**Figura 13.** Llocs de generació d'espècies reactives d'oxigen a la cadena respiratòria del mitocondri (Hamanaka and Chandel, 2010).

Durant dècades s'ha estudiat la relació fisiològica entre el desacoblament en la cadena respiratòria mitocondrial, per part de les proteïnes descobladores (UCPs) i la fosforilació oxidativa. Primerament es va descriure la UCP1 com una proteïna implicada en la termogènesi, la qual permetia la permeabilitat de la membrana mitocondrial interna als protons, derivant així l'energia a nivell de mitocondri en forma de calor al teixit adipós marró. Però a partir de l'any 1997, es van descriure altres proteïnes descobladores de la cadena mitocondrial com UCP2 i UCP3, que a diferència d'UCP1, estan més implicades en controlar la producció d'espècies reactives d'oxigen (Camara et al., 2005). Cal destacar que UCP3 s'expressa principalment al múscul esquelètic, tant de rosegadors com d'humans. Com ja hem comentat anteriorment, aquest teixit està altament especialitzat i la seva activitat mitocondrial té una relació molt estreta amb la producció d'aquestes espècies reactives d'oxigen.

#### 5.4 Els efectes cel·lulars de les ROS

Degut a la proximitat del sistema OXPHOS a la MMI, s'ha vist que el mtDNA és una de les majors dianes al dany generat per les ROS. Per tal que una cèl·lula es pugui protegir del **dany oxidatiu**, aquesta ha de ser capaç de controlar el contingut d' $O_2^-$  mitocondrial. Per tant, a nivell intracel·lular, existeixen tot un seguit d'enzims especialitzats (SODs, catalases, glutatió peroxidases) i d'antioxidants que poden reduir els anions produïts a la cadena respiratòria i els seus metabòlits tan bon punt són generats. A principis dels anys noranta, en ratolins ja es va confirmar que el bloqueig del sistema OXPHOS, en ratolins, provocava un increment de la producció de ROS, fet que anava acompanyat d'un increment dels **enzims de detoxificació** als teixits afectats. De fet, s'ha vist que el múscul esquelètic té un bon sistema antioxidant (Esposito et al., 1999). Tanmateix, les **ROS** derivades del mitocondri actuen com a **missatger subcel·lular** en diferents vies de senyalització i de transducció de senyal en diversos tipus cel·lulars (Allen and Tresini, 2000; Sastre et al., 2000). Aquest fet, generalment, implica la regulació de l'estat redox de les proteïnes cinases com ara les MAPKs o les vies de senyalització de TNF- $\alpha$ , així com de vies dependents de NF- $\kappa$ B. L'activació d'alguna d'aquestes vies es tradueix en una regulació a nivell nuclear, a partir de canvis dels nivells d'expressió d'alguns gens.

En condicions fisiològiques, a la cèl·lula existeixen diversos sistemes antioxidants que contraresten la generació de les ROS. Aquests es poden classificar en: sistemes antioxidants primaris i secundaris. Els primers actuen transformant les ROS en molècules no reactives a través d'enzims com les SODs, la catalasa o la GPX (*Glutathione peroxidase*). En canvi, els sistemes antioxidants secundaris, intercepten les molècules de ROS per evitar que es produeixin nous radicals lliures i dany a les estructures cel·lulars. Aquest el componen sistemes no enzimàtics o altres molècules com ara la vitamina E, la vitamina C i l'àcid ascòrbic, entre altres.

### 5.5 El mitocondri com a un òrganul de sensibilitat energètica que participa en la regulació de gens nuclears

L'existència d'una regulació mitocondrial de l'expressió de gens nuclears es va demostrar directament en mioblasts de múscul esquelètic C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> quan, deplecionant el DNA mitocondrial i, conseqüentment impedit el seu potencial de membrana, això comportava l'alteració dels nivells de determinades proteïnes. Per altra banda, quan es revertia aquesta depleció, s'observava que els nivells d'aquestes proteïnes tornaven a normalitzar-se (Amuthan et al., 2001). Així doncs, a banda de generar ATP, el mitocondri inicia i modula un seguit de cascades de senyalització que participen en la regulació de l'expressió nuclear (Kelly and Scarpulla, 2004). Aquesta funció s'ha descrit com a senyalització mitocondrial o **senyalització mitocondrial retrògrada**.

D'aquesta manera, s'ha d'entendre el **mitocondri** com un **òrganul dinàmic** de sensibilitat energètica, que és capaç d'adaptar l'expressió de gens nuclears sota condicions en les quals la demanda energètica o l'homeòstasi cel·lular ha canviat. S'han descrit algunes de les molècules i vies potencialment senyalitzadores generades pel mitocondri i capaces de derivar en aquest tipus de senyalització retrògrada com ara: el Ca<sup>2+</sup> secretat pel mitocondri, l'NO (*Nitric oxide*), l'ATP, la relació NAD<sup>+</sup>/NADH o les ROS, les quals, poden activar altres vies de senyalització on hi ha implicades diverses cinases (AMPK, JNK, MAPK ERK, etc.). Aquestes intervindran, alhora, en la modificació de diferents factors de transcripció nuclears (com ara els NRFs, PGC-1 $\alpha$ , FOXO3A, ATF2, etc.), involucrats en la regulació transcripcional de gens codificats pel nDNA (*Nuclear DNA*), ja siguin relacionats amb funcions fisiològiques globals de la cèl·lula o més relacionats amb la biogènesi i la funció mitocondrial. S'ha observat que en determinades patologies on la funció mitocondrial es veu impedita, afectant per exemple la quantitat i la densitat de l'aparell OXPHOS mitocondrial, existeix una comunicació entre el mitocondri i el nucli. D'aquesta manera, aquest últim pot iniciar l'expressió de determinats gens nuclears, per tal de mitigar o adaptar el mitocondri a aquesta alteració a través de mecanismes compensatoris, com ara l'increment de la biogènesi mitocondrial enfront a aquesta disfunció. Alhora, l'impacte metabòlic de les disfuncions mitocondrials o de l'estrès mitocondrial depèn de la localització mitocondrial d'aquests defectes. Un exemple clar s'ha vist en ratolins KO per autofàgia en múscul esquelètic. La disfunció mitocondrial, induïda per la deficiència autofàgica en ratolins *autophagy-Knockout* múscul específics (*Atg7<sup>Δsm</sup>*), provoca un increment de l'expressió d'FGF21 mitjançant la inducció d'**ATF4**, un regulador màster de la resposta a l'estrès. De manera independent, també s'ha vist que inhibidors de la cadena respiratòria mitocondrial poden induir l'expressió d'FGF21 (Kim et al., 2012).

S'ha vist també que els ratolins *Atg7<sup>Δsm</sup>* amb disfunció mitocondrial, obtenen una millora en la resistència a la insulina, contràriament a resultats anteriors els quals suggerien que la disfunció mitocondrial induïa la intolerància a la glucosa o la resistència a la insulina (Petersen et al., 2003).

## 5.6 La relació de les ROS al múscul esquelètic, fisiologia i patologia

Fins als anys vuitanta es creia que les ROS tenien un paper patogènic inherent en les distròfies musculars. Tanmateix, s'ha demostrat que en condicions i concentracions fisiològiques, les ROS poden tenir un paper positiu en processos fisiològics importants a les cèl·lules musculars (Barbieri and Sestili, 2012).

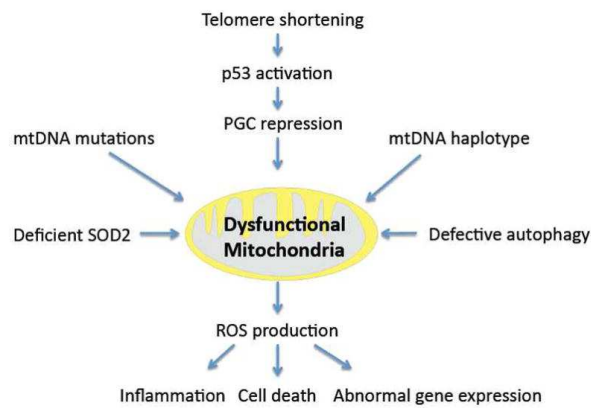
L'estrès oxidatiu s'ha associat a diverses patologies com ara al Parkinson, a l'Alzheimer, a la malaltia de Huntington i a l'Ataxia de Friederich, entre altres. En algunes d'elles és evident que existeix una implicació mitocondrial directa, mentre que en altres es dona de forma més lleu. En el cas de les malalties relacionades amb les disfuncions a la cadena respiratòria mitocondrial, els increments de producció de les ROS i la disminució dels nivells de producció d'ATP poden causar una deficiència en la fosforilació oxidativa, contribuint així a **disfuncions mitocondrials** (Wallace, 1997). A més a més, el primer efecte en aquest tipus de patologia implica un increment de la producció d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, incrementant l'estrès oxidatiu i conseqüentment, el dany al DNA mitocondrial i de retruc també se'n veu afectada la pròpia fosforilació oxidativa.

Des de fa temps, ja s'ha evidenciat que les espècies reactives d'oxigen són moduladors de la funció del múscul esquelètic. En individus sans, la generació de ROS intervé modulant processos que van des del desenvolupament fins al metabolisme. La mateixa activitat contràctil del múscul també es veu acompanyada per un increment en la producció mitocondrial d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, deguda a la pròpia situació d'hipòxia (també en altres teixits) en situacions d'exercici extenuant i a l'increment de la biogènesi mitocondrial. Aquest fet aniria lligat a l'activació de les vies dependents d'AMPK, descrites per Sandstrom (Sandstrom et al., 2006). Sembla ser, però, que la relació de les ROS amb la resposta adaptativa a l'entrenament no està tan clara, ja que en condicions de treball regular, també es dona un increment de l'expressió d'enzims antioxidants al múscul. Alhora, s'ha vist que les ROS estan implicades en la regulació de la diferenciació miogènica, inhibint-la (Freyssenet, 2007). Existeixen altres factors que incrementen les ROS al múscul esquelètic com ara l'edat, que contribueix a incrementar la càrrega oxidant a la que està exposat el propi múscul. El dany muscular o inflamatori, derivat de miopaties hipertoroides, sèpsies o la fallida cardíaca, són una altra de les causes de l'increment de l'estrès oxidatiu (Camara et al., 2005).

## 5.7 Les disfuncions mitocondrials

Les disfuncions mitocondrials representen un conjunt de malalties clínicament heterogènies, en les quals s'hi poden veure implicades tant anormalitats genètiques (ja sigui a nivell de mitocondri o a nivell nuclear) (Schaefer et al., 2001), com també alteracions funcionals mitocondrials provocades per una àmplia gamma de molècules intracel·lulars.

Com ja s'ha comentat, el mitocondri té un paper significatiu en la producció d'ATP i de ROS, així com també promovent altres processos com la mort cel·lular. El dany al mitocondri pot causar diversos desordres a nivell multisistèmic, els quals poden tenir diferents efectes en funció dels teixits o òrgans involucrats. A més a més, la pèrdua d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial a través de la producció de ROS causa **dany oxidatiu**, el qual pot interaccionar amb proteïnes mitocondrials, lípids i el mtDNA, fet que causa disfuncions en la respiració cel·lular, disfuncions bioenergètiques i la inducció de la mort cel·lular, ja sigui per necrosi o apoptosi. El mitocondri però, disposa d'una maquinària de reparació de proteïnes mitocondrials danyades, les quals activaran les **vies de senyalització UPR** (*Unfolded Protein Response*), la qual també forma part de la senyalització retrògrada mitocondrial (Hu and Liu, 2011). Aquesta via pot sobrerregular l'expressió de xaperones mitocondrials codificades pel genoma nuclear que, juntament amb proteases de la matriu mitocondrial, permetran degradar i expulsar les proteïnes danyades i així mantenir l'homeòstasi i la funcionalitat mitocondrial (Hu and Liu, 2011).



**Figura 14.** Exemple de la implicació de diferents processos que contribueixen en la disfunció mitocondrial i els seus efectes (Lotz, 2012).

Una disfunció mitocondrial que comporti l'alteració del sistema OXPHOS, pot comportar la iniciació d'una sèrie de cascades de senyalització que acabin en un augment de la biogènesi mitocondrial, per tal d'arribar a un balanç apropiat d'activitat mitocondrial. Tanmateix, al múscul esquelètic, una estimulació excessiva de la massa mitocondrial pot tenir efectes deleteris, com ara l'aparició de marcadors apoptòtics, contribuint a que la cèl·lula esdevingui més sensible a aquests estímuls, també associats a l'aparició de fibres vermelles disfuncionals (Aure et al., 2006). Així doncs, les disfuncions mitocondrials són bàsicament produïdes per una **alteració** en la **cadena respiratòria mitocondrial**, ja siguin degudes a deficiències enzimàtiques, a mutacions del mtDNA o a altres causes. Per altra banda, aquestes disfuncions també estan implicades en altres processos com l'envelliment, en una gran varietat de malalties neurodegeneratives i també en càncer (Wallace, 1999; Melov et al., 1999).

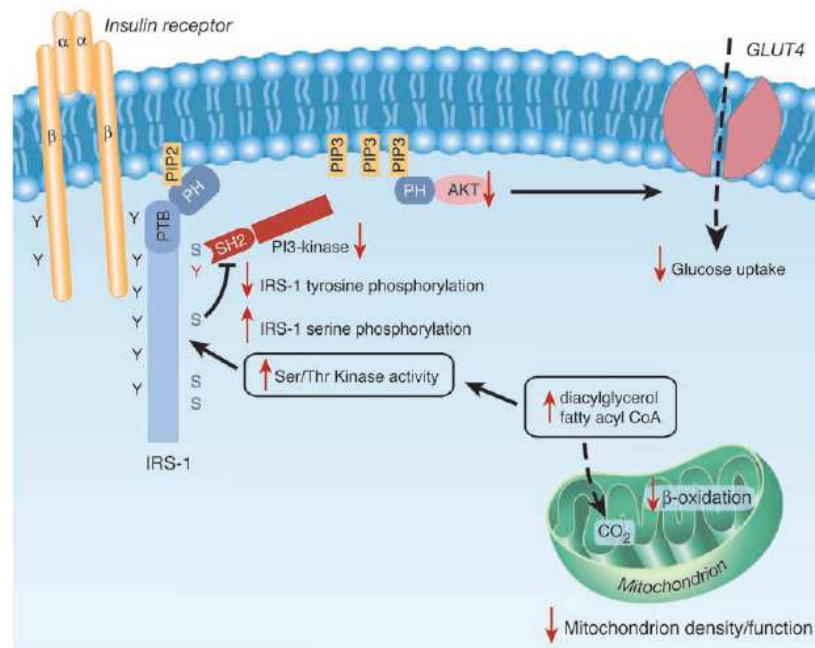
## Disfunció mitocondrial i malalties metabòliques

Les miopaties metabòliques són un grup heterogeni de disfuncions musculars caracteritzades per una sèrie d'impediments en el metabolisme intermediari, deguts a defectes en el metabolisme del glicogen, lipídic, dels nucleòtids o mitocondrial (van Adel and Tarnopolsky, 2009). Van ser descrites per primer cop l'any 1951 per McArdle, però no va ser fins al descobriment i a la comprensió del metabolisme energètic muscular quan es van poder classificar segons el defecte bioquímic involucrat en la producció d'ATP. Segons això, el múscul disposa bàsicament de tres substrats per la producció aeròbica d'ATP: glicogen, àcids grassos lliures i aminoàcids. Segons el tipus d'exercici que dugui a terme el múscul (com ja s'ha comentat en apartats anteriors), aquest utilitzarà un tipus de substrat o altre.

El mitocondri és un component obligat en el metabolisme oxidatiu i es coneix que l'homeòstasi metabòlica és altament dependent d'aquest, ja que canvis en la seva activitat provoquen canvis en les activitats globals de la cèl·lula, com ara el creixement, la proliferació i en definitiva, la supervivència. D'aquesta manera, sota condicions fisiopatològiques (obesitat, alta càrrega de nutrients, etc.) es poden induir diferents mecanismes d'estrès mitocondrial amb efectes similars als produïts pel ROS i que poden induir la resposta retrògrada mitocondrial (Hu and Liu, 2011). En múscul esquelètic, alguns grups ja han descrit que una **disminució** de la **capacitat mitocondrial** deriva en una disminució dels nivells d'ATP i en un increment de la producció de ROS, fet que està implicat en la patogènesi de la **resistència a la insulina** i en la **T2D** (*Type 2 diabetes*) (Kelley et al., 2002; Ritov et al., 2010). Alguns estudis, més o menys recents, han suggerit que la falta o la incompleta oxidació d'àcids grassos pot derivar amb l'acumulació de lípids cel·lulars, impeding la cascada de senyalització de la insulina. Aquesta sobrecàrrega del cicle TCA (*Tricarboxylic acid cycle*), deguda a una incompleta  $\beta$ -oxidació dels FFAs, focalitza en la disfunció mitocondrial bona part de la patogènesi de la resistència a la insulina induïda per l'acció dels FFAs (Hirabara et al., 2010). Els estudis realitzats en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i en cultius primaris de cèl·lules musculars de rata han mostrat que, el tractament d'aquestes amb àcids grassos saturats com ara el palmític o l'esteàric impedeixen la funció mitocondrial. A més, aquest fet va acompanyat d'una disminució de la resposta a la insulina, deguda a una disminució de la fosforilació dependent d'aquesta i a la conseqüent activació d'Akt (important per la translocació de GLUT4). Pel contrari, els àcids grassos lliures insaturats com ara l'oleic, linoleic i el DHA (*Docosahexaenoic acid*) no exerceixen cap efecte negatiu sobre la funció mitocondrial ni tampoc sobre el metabolisme de la glucosa estimulada per insulina, sinó que, com ja se sap (tot i algunes discrepàncies), els àcids grassos poliinsaturats milloren la sensibilitat a la insulina al múscul esquelètic.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la disfunció mitocondrial comporta un increment de les ROS i/o de components **lipídics parcialment metabolitzats**, els quals activen una bateria de proteïnes cinases. Aquestes provoquen un augment de la fosforilació de serines del receptor IRS-1 i una disminució de la fosforilació en tirosines, fet que inhibeix l'activitat de la PI3-K. Aquest fet provoca finalment una disminució del transport de glucosa estimat per insulina (Lowell and Shulman, 2005; Morino et al., 2006; Martins et al., 2012). Aquesta **lipotoxicitat** derivada a partir d'una oxidació

parcial dels àcids grassos ens torna a posar de manifest la importància de la funció mitocondrial.



**Figura 15.** Mecanisme pel qual una disfunció mitocondrial indueix la resistència a la insulina al múscul esquelètic (Lowell and Shulman, 2005).

### 5.8 Les miopaties

El mtDNA codifica per 13 polipèptids que interaccionen amb uns 60 polipèptids codificats pel DNA nuclear i que codifiquen per les diferents subunitats catalítiques dels complexos I, III, IV i V de la cadena respiratòria, els quals faciliten el metabolisme aeròbic cel·lular a través de la fosforilació oxidativa (Schaefer et al., 2001). Així doncs, les cèl·lules que presenten afectacions al mtDNA no són capaces de mantenir el correcte funcionament de la cadena de transport d'electrons i la síntesi d'ATP, fet que genera múltiples problemes cel·lulars i, fins i tot, pot arribar a desencadenar l'apoptosi cel·lular. D'altra banda, el mtDNA és molt susceptible a patir **mutacions** somàtiques, així com també a presentar variabilitat genètica, fet que pot afectar la seva capacitat per a la correcta expressió i per tant, per a la funció mitocondrial (Howell, 1999). D'aquesta manera, a causa de l'acumulació d'errors durant la replicació mitocondrial i per diferents danys que poden provocar l'acumulació de radicals lliures, es poden donar fenòmens d'heteroplàsmia. Aquests, seran majoritàriament presents en teixits on hi hagi una major demanda energètica ja que la replicació mitocondrial també serà major. Així doncs, la **heteroplàsmia** està estretament relacionada amb les malalties mitocondrials.

Una altra de les principals característiques de les miopaties mitocondrials és l'acumulació de **mitocondris anormals** al múscul, els quals es poden detectar per microscòpia mitjançant una tinció especial (Tricròmic de Gomori) o bé per microscòpia electrònica on s'observen inclusions cristal·lines al mitocondri. Aquest tipus de patologia presenta herència mitocondrial, fet que comporta que la herència sigui

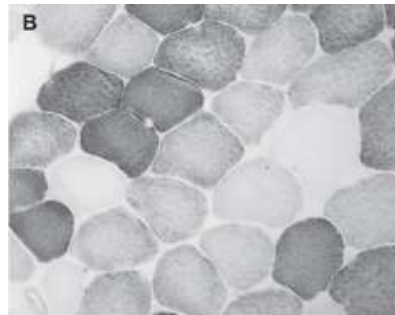
exclusivament materna. Darrerament, també s'ha parlat que una de les causes de les disfuncions mitocondrials seria la conseqüència de l'exposició del material genètic del mitocondri a la producció local de les ROS provinents de l'activitat de la cadena respiratòria o bé per la inefectivitat dels mecanismes de reparació del dany al DNA, durant el procés de replicació del mtDNA, de manera que l'alteració d'aquest pot comportar a afectacions importants per a les cèl·lules i l'individu en qüestió.

Si ens referim a les **malalties mitocondrials**, podem dir que són tot el conjunt de malalties que afecten al mtDNA i als components mitocondrials. Aquestes poden ser causades per alteracions genètiques, ja sigui per mutacions del mtDNA o de gens nuclears que codifiquen per a proteïnes que tenen la seva funció al mitocondri. Aquestes malalties es poden classificar en tres grups segons el seu origen genètic: **(a)** causades per mutacions primàries del mtDNA, **(b)** causades per mutacions del nDNA que afecten a gens directament implicats en la funció OXPHOS, o en gens que codifiquen per factors implicats en l'assemblatge dels complexos de la cadena respiratòria i **(c)** les malalties causades per mutacions del DNA nuclear que afecten a gens implicats en el correcte manteniment del mtDNA (Villarroya J, 2010).

El múscul esquelètic és un òrgan que constitueix la major part de la massa del cos i és el major consumidor d'ATP, alhora que és altament dependent de la funció de la cadena respiratòria mitocondrial. La disfunció d'aquesta cadena és una causa comuna entre totes les **disfuncions mitocondrials** presents al **múscul esquelètic**, anomenades també **miopaties** i, que es donen tant en individus joves com en adults. Les malalties mitocondrials constitueixen una disfunció metabòlica que afecta a persones de totes les edats, amb una prevalença d'1 entre 5000 en països com el Regne Unit o Austràlia. Les característiques clíniques varien des d'un a diversos òrgans afectats i les afectacions que es poden donar són amb o sense acidosi làctica en nounats, joves o individus adults (Suomalainen et al., 2011). Altres estudis epidemiològics demostren que la prevalença de les disfuncions a nivell del mtDNA és de 6,57 per cada 100.000 individus (Chinnery et al., 2000). Moltes d'aquestes miopaties es poden presentar independentment, associades a altres malalties o bé es poden presentar com a part d'una síndrome clínica més àmplia. En les miopaties inicials, el símptoma més clar és majoritàriament una intolerància a l'exercici, abans de percebre la flaqueza. Normalment, i sota situacions de mínim exercici, el pacient experimenta símptomes típics d'haver realitzat un exercici vigorós: vasodilatació, taquicàrdia, taquipnea i fins i tot suor. A més a més, com que els mecanismes oxidatius no són capaços de produir suficient ATP, la respiració anaeròbica que en resulta va acompanyada d'alts nivells de **lactat** en **sèrum** (Schaefer et al., 2001).

Les anàlisis histològiques, bioquímiques i del DNA mitocondrial en la majoria d'aquestes disfuncions es poden fer mitjançant una biòpsia del teixit muscular, per tal d'observar la presència de **fibres COX-negatives**. Aquestes són deficientes en COX (*Cytochrome c oxidase*), que codifica per les tres subunitats catalítiques d'aquest enzim: COXI-III. La tinció d'aquest tipus de fibres suggereix la presència d'una afectació en la síntesi intramitocondrial de proteïnes codificades pel propi mtDNA. Tanmateix, aquesta és una tècnica molt invasiva i que comporta bastants riscos i evidentment, un cost bastant elevat en cas d'utilitzar-se anestèsia. A més a més, l'anàlisi bioquímica de la cadena respiratòria és tècnicament complicada (les activitats del complexos IV i II poden ser analitzades histoquímicament, però d'altres no). Aquests fets, sumats a

l'afectació i a la severitat d'aquestes patologies, ha posat de manifest la necessitat de buscar altres aproximacions per tal de fer el **diagnòstic** de les disfuncions a nivell de cadena respiratòria mitocondrial, les quals permetin un diagnòstic ràpid i el possible tractament durant els primers estadis en els que es manifesta. Aquest seria el cas de la detecció de diferents **biomarcadors** sensibles a aquestes afectacions, a nivell de sèrum, com ara la relació lactat/piruvat, els nivells de diferents aminoàcids o proteïnes, de creatina-cinasa (incrementats en les disfuncions mitocondrials on hi ha dany muscular) i possiblement de creatina en sèrum (Suomalainen et al., 2011).



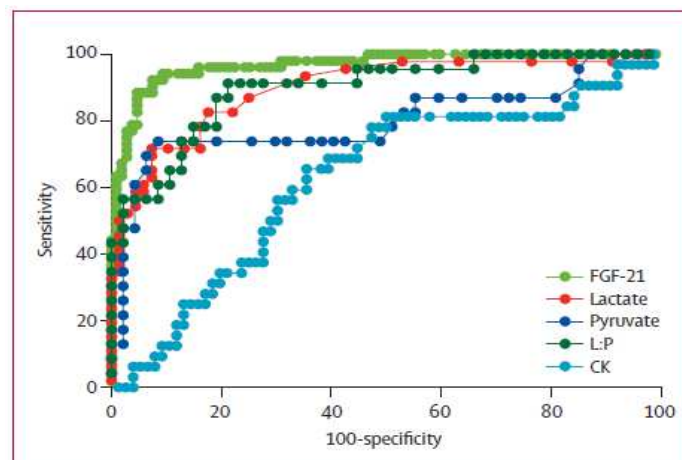
**Figura 16.** Anormalitats en una biòpsia de múscul esquelètic d'una miopatia mitocondrial. Histoquímica on es poden veure les fibres deficientes en COX tenyides diferencialment (Pfeffer and Chinnery, 2013).

És precisament dins d'aquest concepte, on recentment, s'ha descrit que **FGF21** podria ser un **possible biomarcador de miopatia mitocondrial**, ja que en humans s'ha vist que la seva presència al sèrum és molt elevada en els primers estadis d'aquestes miopaties (Suomalainen et al., 2011). En ratolins, també s'ha observat que, deficiències en la cadena respiratòria provoquen un increment dels nivells d'FGF21 al sèrum. A més a més es coneix que, les alteracions genètiques en el DNA mitocondrial muscular donen lloc a canvis en la producció muscular d'FGF21 que podrien repercutir en les alteracions sistèmiques associades a la patologia mitocondrial muscular (Tynismaa et al., 2010). Estudis fets en un model de ratolí transgènic d'expressió de la mutació dominant de la helicasa replicativa Twinkle, al qual se li generaven múltiples delecions al mtDNA i conseqüentment una disfunció mitocondrial (Tynismaa et al., 2005), van revelar un increment de l'expressió d'FGF21 en les fibres musculars COX-negatives, fet que es traduïa en la seva alliberació al medi extracel·lular i al sèrum. A més a més, el patró d'expressió global en aquests ratolins semblava induir l'expressió de diferents gens implicats en la resposta a la inanició, involucrant el metabolisme aminoacídic i de mobilització lipídica. Els resultats indicaven que aquest model patia una reducció de la mida dels adipòcits i de les quantitats de lípids a nivell hepàtic (aquest fet però, podia ser revertit en situacions de dieta HFD). A part, també es va veure que s'induïa la fosforilació d'Akt1 (un regulador *upstream* d'FGF21), activant la seva senyalització i reforçant el fet que Akt1 actua en situacions de resposta a l'estrès generat per la disfunció mitocondrial. En la mateixa línia, també es van observar induccions de gens marcadors d'estrès mitocondrial com ara el MTHFD2 (*Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2*), l'ASNS (*Asparagine synthetase*) i el PSAT1 (*Phosphohydroxythreonine aminotransferase*). Per contra, no es van observar canvis a nivell de PGC-1 $\alpha$  (involucrat en biogènesi mitocondrial) ni d'activació de vies PPARs (Tynismaa et al., 2010).



Recentment, en models de ratolins s'ha descobert que la sobreexpressió transgènica de PGC-1 $\alpha$  pot retardar la progressió de les fibres COX-negatives. De la mateixa manera, l'administració de bezafibrat (un agonista de PPARs) en la dieta pot retardar la progressió de les miopaties i les delecions múltiples al DNA mitocondrial, corregint l'activitat COX i induint la biogènesi mitocondrial (Wenz et al., 2008; Yatsuga and Suomalainen, 2012). Ara bé, aquest tractament també comporta la mobilització lipídica a través de l'expressió hepàtica d'FGF21. En ratolins, aquest tipus de tractament provoca molts efectes secundaris severos a nivell hepàtic, com ara una síndrome hepatoproliferativa i un estat hipermetabòlic. Tanmateix, els humans sembla que tinguin una major tolerància al bezafibrat com a fàrmac. Així doncs, podem observar que en aquest estudi, els nivells d'FGF21 circulants ens serveixen de marcador per indicar-nos l'estat de la síndrome hepàtica i la deficiència en la cadena respiratòria, així com també dels efectes beneficiosos del fàrmac.

En resum podem dir que, els estudis fets en humans, conclouen que la presència d'FGF21 en sèrum pot esdevenir un biomarcador molt sensible. Aquest pot ser fins i tot més sensible que la relació lactat/piruvat (Figura 17). A banda, també es tracta d'un marcador quantitativament important per a una àmplia varietat de disfuncions mitocondrials que es donen en adults i infants, incloent les deficiències en un o més complexos enzimàtics de la cadena respiratòria al múscul esquelètic (Suomalainen et al., 2011). També sembla ser que les concentracions d'FGF21 en sèrum es troben en concordança amb la severitat de la pròpia patologia muscular.



**Figura 17.** Corbes dels diferents biomarcadors (valors continus) en deficiències a la cadena respiratòria muscular manifestades en adults i nens. L:P= ratio Lactat/Piruvat. CK=Creatine kinase (Suomalainen et al., 2011).

Tot i que no es pot excloure del tot la contribució del fetge o del teixit adipós a les concentracions normals d'FGF21 al sèrum, no s'ha vist cap relació entre els seus nivells i una disfuncionalitat a fetge. Ara bé, altres alteracions metabòliques com ara la caquèxia i la flaqueza, normalment associades amb disfuncions mitocondrials, semblen tenir correlacions negatives entre els nivells d'FGF21 alliberats i el BMI.



**Objectius**



**OBJECTIUS**

L'objectiu general d'aquesta tesi fou **determinar els principals processos i mecanismes pels quals la cèl·lula muscular és capaç d'expressar de forma regulada el gen FGF21.**

Els objectius concrets foren:

- Determinar la relació entre l'expressió d'FGF21 i la diferenciació miogènica, així com la implicació d'altres factors miogènics en el control transcripcional del gen FGF21.
- Conèixer com actuen a la cèl·lula muscular alguns factors de regulació del gen FGF21 que se sap que són operatius en altres sistemes cel·lulars coneguts (àcids grassos, PPARs, etc.).
- Determinar els efectes de les alteracions experimentals en la funció mitocondrial sobre l'expressió i la secreció d'FGF21 per les cèl·lules musculars.
- Determinar els mecanismes moleculars intracel·lulars que vehiculen els efectes de les alteracions mitocondrials sobre la regulació de la transcripció del gen FGF21.



## **Metodologia**





## **METODOLOGIA**

### **1. CULTIUS CEL·LULARS**

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral, els diferents models experimentals s'han basat en gran part, en la utilització de diferents línies cel·lulars per tal de realitzar els diferents estudis *in vitro*. Aquestes línies cel·lulars, tant d'origen humà com d'origen animal, ens han permès treballar en un context cel·lular i fisiològic similar al múscul esquelètic i una aproximació a sistemes de regulació més complexos.

#### **1.1 Línies cel·lulars utilitzades**

A continuació es presenten les diferents línies cel·lulars utilitzades amb diferents finalitats dins de l'estudi:

**C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**: Aquesta és una línia cel·lular immortalitzada provinent de teixit muscular esquelètic de ratolí. Es va obtenir de l'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA) (ATTC®-CRL-1772™). Durant el transcurs d'aquest treball s'ha utilitzat tant en forma de mioblasts com de miotubs. Pel creixement dels mioblasts s'ha utilitzat medi *Dulbecco's Modified Eagle's Media* (DMEM) (GIBCO®, Invitrogen – Life Technologies) suplementat amb un 10% d'FBS (*Fetal Bovine Serum*) i un 1% de la barreja a parts iguals dels antibiòtics Penicilina i Estreptomicina (P/S) (GIBCO®, Invitrogen – Life Technologies). Per tal d'induir-ne la diferenciació a miotub, els mioblasts es deixen multiplicar fins arribar a una confluència aproximada del 80%, i llavors es realitza un canvi de medi. Aquest medi, indicat per la diferenciació, conté medi DMEM suplementat amb un 2% de HS (*Horse Serum*) (GIBCO®, Invitrogen – Life Technologies) i un 1% de P/S, i es deixa fins assolir la diferenciació a miotubs, cap als 4 dies.

**L6**: La línia L6 prové de mioblasts derivats de múscul esquelètic de rata. Es va obtenir de l'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA) (ATTC®-CRL-1458™). Aquestes cèl·lules són altament proliferatives, tot i que conserven la seva capacitat de diferenciació espontània a miotubs. Els mioblasts L6 es cultiven en medi de manteniment, que consisteix en DMEM suplementat amb un 10% d'FBS i un 1% de P/S. Després de 48-72 hores de la sembra (en funció del tipus de placa) i, al arribar a un 80% de confluència aproximadament, se'ls hi substitueix el medi de creixement per un medi de diferenciació, consistent en DMEM suplementat amb un 2% d'FBS i un 1% de la barreja d'antibiòtics P/S. Al cap de 4 dies s'obté una diferenciació generalitzada a miotub.

**LHCN-M2**: Clon d'una línia cel·lular provinent de les cèl·lules miogèniques humanes immortalitzades LHCN. La línia es va establir a partir de cèl·lules satèl·lit humanes derivades del múscul pectoral major d'un home caucàsic de 41 anys, donant d'un trasplantament de cor. Van ser-nos cedides per als nostres estudis per part del Dr Woodring E. Wright (Department of Cell Biology, Southern Medical Center Dallas, Texas, USA). Aquest clon, presenta una bona formació de miotubs després de l'exposició a les condicions de diferenciació. Pel creixement, els mioblasts es cultiven amb un medi de creixement basat en els medis DMEM i MEM suplementats amb

glutamina, un 15% d'FBS, un 1% de la barreja a parts iguals de Penicilina, Estreptomocina i Fungizona (P/S/F), Hepes (1M), Sulfat de zinc (60µg/ml), Vitamina B12 (14mg/ml), Dexametasona (55µg/ml) i amb una addició d'HGF (*Human Hepatocyte Growth Factor*) (50µg/ml) i FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (10µg/ml). Als cultius de mioblasts, quan arriben al 70-80% de confluència, se'ls substitueix el medi de creixement per un primer medi de diferenciació que conté 0,5% d'FBS, Hepes (1M), insulina (1mg/ml), Apo-transferrina (10mg/ml), Dexametasona (55µg/ml) i 1% P/S/F, durant un parell de dies. A partir d'ençà, es canvia el primer medi de diferenciació per un segon medi sense la insulina ni l'Apo-transferrina i es continua el cultiu entre 5 i 8 dies més, fins a un total de 7 o 10 dies posteriors a la inducció de la diferenciació.

## **1.2 Manteniment i manipulació dels cultius cel·lulars**

Tots els cultius cel·lulars utilitzats en la realització de la present tesi, s'han mantingut en incubadors de camisa d'aigua, amb sistema de filtració d'aire HEPA (NuAire o Forma *Scientific*), els quals mantenen els nivells d'humitat relativa al 90%, els de CO<sub>2</sub> al 5% i la temperatura a 37 °C. Per altra banda, la manipulació dels cultius cel·lulars durant el seu procés de creixement, diferenciació, tractament o congelació, s'ha realitzat en una campana de flux laminar amb filtrat d'aire HEPA (Telstar o Cytair), per tal de garantir l'esterilitat de la zona de treball. Alhora, tot el material utilitzat ha estat prèviament esterilitzat.

### **1.2.1 Descongelació**

L'inici de totes les línies cel·lulars utilitzades ha partit d'un vial congelat i emmagatzemat prèviament amb N<sub>2</sub> líquid i on hi figurava el número de subcultiu, així com també el nombre aproximat de cèl·lules congelades. La descongelació es duu a terme per xoc tèrmic en un bany a 37 °C i el més ràpid possible, per evitar els efectes citotòxics del DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), utilitzat durant el procés de congelació). Seguidament es dilueix el contingut del vial en 10ml del medi adient per a cada tipus cel·lular i es procedeix a una centrifugació. Aquesta es fa a 1200 rpm durant uns 4 minuts per tal de precipitar les cèl·lules d'interès. Seguidament s'aspira amb compte el sobrenedant (el qual conté restes de DMSO) i finalment ressuspenem les cèl·lules en 10ml de medi i ho aboquem en una placa o flascó de cultius.

### **1.2.2 Subcultiu de manteniment**

Per tal de mantenir les cèl·lules d'interès durant un període perllongat de temps, es realitza un subcultiu. Aquest, consisteix en la transferència d'una fracció de la població cel·lular en estat subconfluent d'un cultiu, en una altra placa de cultiu amb medi fresc. Això ens permetrà mantenir la viabilitat de la població i en unes condicions òptimes per a propers experiments.

Durant la realització de tots els cultius, s'ha treballat en línies cel·lulars adherents, les quals s'han cultivat en plaques de 100mm de diàmetre (784mm<sup>2</sup> d'àrea de creixement) o en flascons de 7500mm<sup>2</sup>. En els casos en què s'ha treballat en altres formats de placa, s'ha dut a terme un escalat proporcional als volums indicats així com també del nombre de cèl·lules sembrades inicialment.

El procediment del subcultiu es detalla a continuació:

- Inicialment es retira el medi de cultiu per aspiració i amb la màxima cura possible.
- Rentar la monocapa de cèl·lules mitjançant l'addició, suaument, de 10ml de tampó PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1x (NaCl 136mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM a pH 7.4) i retirar-lo per aspiració.
- Afegir 1ml de Tripsina 0.05% - EDTA 1x (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen – Life Technologies) temperada prèviament a 37 °C. Introduir-ho a l'incubador a 37 °C durant un parell de minuts, per tal que la tripsina ens disgregui les unions entre les cèl·lules i la superfície.
- Per simple observació o amb l'ajuda de petits cops laterals a la placa, un cop les cèl·lules s'han disgregat, afegir a la placa 10ml del medi corresponent (i suplementat amb FBS) per tal d'inactivar la tripsina.
- A partir d'aquí s'obté una suspensió, de la qual se n'agafa un petit volum, on s'hi afegeix un volum superior de medi fresc fins a un total de 10ml. La dilució d'aquest subcultiu serà normalment de 1/10, tot i que pot variar en funció de la velocitat de creixement cel·lular o de l'interès de l'investigador. Finalment es dispensa en una nova placa o flascó, correctament identificat amb el nom de la línia cel·lular, el número de subcultiu, la data de realització i el nom de l'investigador.

### 1.2.3 Congelació

Un cop iniciada una nova línia cel·lular i per tal de tenir un estoc propi d'aquella línia d'interès, es pot procedir a congelar-ne una fracció més o menys gran en criotubs. Després d'iniciar el cultiu a partir d'un vial prèviament congelat amb N<sub>2</sub> líquid i, un cop aquest ha arribat a un estat proper a la confluència, es pot procedir a l'expansió d'aquest en vàries plaques. Per fer-ho, es duu a terme el mateix procediment utilitzat per a fer un subcultiu. Així doncs, un cop totes les plaques han arribat a l'estat de confluència desitjat, es procedeix a recollir les cèl·lules i a valorar la concentració cel·lular de la suspensió. Aquest procediment es basa en barrejar 10µl de la suspensió amb 10µl de *Trypan Blue* (Invitrogen – Life Technologies) diluït al 10% en PBS 1x. Es dispensen 10µl de la barreja en la cambra d'un portaobjectes especial per a la realització del comptatge automatitzat mitjançant el sistema *Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter* (Invitrogen – Life Technologies). Acte seguit, es centrifuga la suspensió i es resuspèn el precipitat cel·lular amb el volum adient de medi de congelació (DMEM 50%, FBS 40% i DMSO 10% en el cas de les línies cel·lulars C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, L6 i LHCN-M2). Aquest volum, s'haurà calculat prèviament ja que cadascun dels vials de congelació haurà de contenir aproximadament un milió de cèl·lules per mil·lilitre. Immediatament es col·locaran els criotubs (amb el contingut cel·lular) a l'interior d'un recipient d'isopropanol i en un congelador de -80 °C, fet que garantirà un descens gradual de la temperatura dels vials i evitarà la formació de cristalls que podrien lisar les cèl·lules. Al cap de 24 hores es passaran els criotubs en un tanc de N<sub>2</sub> líquid per a la seva conservació a llarg termini.

### 1.2.4 La sembra de cèl·lules

A partir de la placa de manteniment i amb la intenció de realitzar els experiments pertinents, realitzarem la sembra cel·lular en el format més adient a cada experiment, ja sigui en plaques multipous de 6 o 24 pous, en la majoria dels casos. El primer que cal considerar és el número de cèl·lules necessàries per cada cas (conegut amb antelació en funció del tipus cel·lular i el tipus de procediment a realitzar). Així doncs, primer de tot es procedeix a tripsinitzar les cèl·lules de la placa de manteniment i seguidament es fa un comptatge, per tal d'agafar el volum necessari, que contingui el nombre de cèl·lules adient, per a sembrar a la densitat estipulada i segons el número de plaques multipou que vulguem utilitzar en l'experiment. Aquest volum s'haurà de portar fins al volum total necessari de sembra (dependent del format de placa i segons els criteris que s'aconsellen en els prospectes de fabricació), amb el medi adient per a cada tipus cel·lular. Un cop obtinguda aquesta suspensió cel·lular es procedirà a distribuir en cada pou el volum necessari. Les densitats de sembra dependran en última instància del format de la placa i tenint en compte els dies de creixement i el tipus de línia cel·lular ja que, idòniament, es necessitarà una confluència del 70-80% en el moment d'iniciar un procés de diferenciació, transfecció o altres.

## 2. TRANSDUCCIÓ ADENOVÍRICA

La transducció adenovírica és una tècnica que s'utilitza amb la finalitat d'aconseguir la sobreexpressió de gens exògens en cèl·lules en cultiu. Aquesta es basa en la infecció d'aquestes mitjançant vectors adenovírics, els quals són d'utilització relativament senzilla, però que posseeixen una alta eficiència pel que fa a la introducció de material genètic exogen dins els miotubs i altres cèl·lules diferenciades. Tanmateix, aquests factors adenovírics no tenen la capacitat d'integrar el seu material genètic dins el sistema cel·lular i per tant són incapaços de replicar el vector durant les successives divisions cel·lulars, fins que es produeix la desaparició d'aquest. Així doncs, aquest sistema només ens permet una expressió transitòria del gen exogen que hi introduïm. Malgrat tot, aquest sistema ens permet un temps d'expressió una mica més llarg del que podem aconseguir en un sistema de transfecció transitòria de material genètic nu.

A l'hora d'aconseguir una bona reproductibilitat entre els diferents experiments, es tindrà en compte el número de partícules víriques per cèl·lula o MOI (*Multiplicity Of Infection*), la qual ens garantirà l'obtenció d'un grau d'inducció del gen exogen satisfactori i repetitiu als experiments realitzats a posteriori. La inducció del gen desitjat es determinarà principalment, mitjançant la quantificació de l'expressió de l'mRNA per *Real-time PCR* quantitativa o immunoblot, segons els casos.

Durant la realització de la present tesi, s'ha realitzat principalment la transducció de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i de miotubs L6. El procediment és el següent:

- El primer pas de tota transducció serà la sembra del número de cèl·lules adient per cada línia cel·lular. En el cas dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, es sembraran  $4 \cdot 10^4$  mioblasts per pou en plaques de 6 pous (el número de pous vindrà determinat pel número de condicions experimentals, així com també pel número de

rèpliques de cadascuna d'elles). Aquestes es deixaran créixer uns 3 dies fins arribar a confluència, fet que ens permetrà iniciar la diferenciació a miotubs i assolir d'aquesta manera unes  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou en el moment de fer la infecció amb els vectors. En el cas dels mioblasts de rata L6, es sembraran  $7,5 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou en una placa de 6 pous, per tal d'assolir condicions semblants a les dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> abans de començar la transducció adenovírica. La dada del número aproximat de cèl·lules/pou de les que es disposa en el moment de la infecció, ens permetrà calcular la quantitat d'adenovirus per assolir una determinada MOI d'infecció de la següent manera:

$$n^{\circ} \text{ pous} \cdot (n^{\circ} \text{ cèl·lula/pou}) \cdot (n^{\circ} \text{ part. víriques/cèl·lula}) \cdot (\text{ml}/n^{\circ} \text{ part. víriques}) = \text{Virus/ml}$$

On, el (n<sup>o</sup> cèl·lula/pou) és equivalent a la densitat cel·lular, el (n<sup>o</sup> partícules víriques/cèl·lula) és la MOI, i on els (ml/n<sup>o</sup> part. víriques) equival a la titulació vírica.

- Per iniciar el procediment de la infecció, primer de tot ens caldrà barrejar cadascuna de les preparacions de virus en 300µl/pou de DMEM + 1% P/S (temperat prèviament), que serà el volum mínim necessari per cobrir la monocapa de cèl·lules i d'aquesta manera garantir la màxima interacció de l'adenovirus amb els receptors de la membrana cel·lular, els quals faciliten la seva incorporació.
- Un cop preparades totes les barreges, cal retirar el medi de cultiu en el qual s'han diferenciat els miotubs i rentar cadascun del pou amb PBS 1x un parell de cops per tal d'assegurar-se que retirem el medi anterior.
- Afegir la barreja de virus i medi preparada anteriorment (300µl/pou), en funció de les condicions experimentals i les rèpliques i, seguidament retornar les plaques a l'incubador a 37 °C durant una hora. En el transcurs d'aquest temps, s'anirà agitant la placa periòdicament, per tal d'assegurar-se que la solució que conté els vectors vírics es reparteix homogèniament dins el pou (3-4 vegades/hora).
- Afegir 200µl/pou de DMEM + 1% P/S temperat i retornar les plaques a l'incubador durant una hora més, repetint el procediment d'homogeneïtzació del pas anterior.
- Finalment, cal afegir 1,5ml/pou de medi de diferenciació DMEM + 1% P/S i 2% HS en el cas dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i 2% FBS en el cas de les L6, de manera que les cèl·lules puguin tornar a estar en un entorn de medi de diferenciació.
- Mantenir les cèl·lules a l'incubador durant el temps estimat necessari per a l'expressió del gen exogen, abans de processar-les per a la quantificació de la seva expressió i dels paràmetres d'interès. En el nostre cas, aquest període de temps ha estat generalment de 48 hores després de la infecció. En el cas que se'ls hi hagi aplicat un tractament, aquest s'haurà realitzat habitualment unes 24 hores abans del processat.

## 2.1 Adenovirus emprats

Els adenovirus emprats en aquesta tesi doctoral es resumeixen a continuació, en funció de la seva procedència i esmentant el gen pel que codifiquen.

Produïts pel Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG-UAB), tenint com a *background* adenovíric Ad5-CMV:

- **Ad-GFP:** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la *Green Fluorescent Protein*. Referència: CBATEG-359c.
- **Ad-PPAR $\alpha$ :** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió del *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*. Referència: CBATEG-441.

Adenovirus comercials obtingut de Vector Biolabs, tenint *background* adenovíric el *Human Adenovirus-Type 5* (dE1/E3):

- **Ad-MyoD:** Vector adenovíric per a l'expressió del *Myogenic differentiation 1 (Human)*, (Cat. 1492).
- **Ad-Mef2A:** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió del *Myocyte enhancer factor-2A (Human)*, (Cat. 1369).
- **Ad-Mef2C:** Vector víric del tipus adenovirus portador del vector d'expressió del *Myocyte enhancer factor-2C (Human)*, (Cat. 215273).
- **Ad-Mef2D:** Vector adenovíric per a l'expressió de la proteïna *Myocyte enhancer factor-2D (Human)*, (Cat. 1448).

## 3. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA

Un altre mètode emprat per tal d'induir l'expressió exògena de gens és el mètode de la transfecció transitòria de vectors d'expressió nus o plasmidis. Per a aquest tipus de transfecció de vectors d'expressió s'ha utilitzat el sistema *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* (Promega), o bé la *Lipofectamine<sup>™</sup> 2000* (Invitrogen). Aquest mètode l'hem emprat fonamentalment per a la transfecció de mioblasts, tipus cel·lular en què aquest procediment té una eficiència utilitzable, a diferència dels miotubs que són altament refractaris a aquest tipus de transferència gènica. Normalment s'han transfectat plasmidis en què regions gèniques promotores dirigeixen l'expressió del gen reporter luciferasa, com a forma de mesurar l'activitat transcripcional de la construcció transfectada.

El procediment realitzat en el cas del *FuGENE<sup>®</sup> HD* ha estat el següent:

- Caldrà sembrar les cèl·lules unes 24 hores prèvies a realitzar la transfecció. La densitat de cèl·lules haurà de ser adient al format del tipus de la placa (normalment de 24 pous) i segons el tipus cel·lular i les especificacions del fabricant, per tal d'aconseguir una confluència que es trobi entre el 50 i el 80% en el moment en què es faci la transfecció.
- Previ a la transfecció, cal barrejar la quantitat adient de plasmidi/pou en el volum adequat de medi Opti-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen – Life Technologies) o bé medi

DMEM sense suplementar. En el nostre cas, la transfecció s'ha dut a terme majoritàriament en mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i en plaques de 24 pous, on s'han transfectat 0,3µg de la construcció de promotor per pou i en 20µl de medi per pou, afegint en el mateix volum les quantitats de 0,06µg/pou d'altres vectors d'expressió, en funció de les condicions experimentals. Normalment, s'han fet triplicats de cada condició.

- Seguidament, afegir la quantitat adient de *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* pel volum de barreja DNA-medi preparat en una relació 3:1 (µl:µg) *FuGENE<sup>®</sup> HD* : DNA. Barrejar amb intensitat i incubar a temperatura ambient durant uns 20-30 minuts.
- Dispensar el volum adient de la barreja (20µl/pou en placa de 24 pous) directament sobre el medi de cultiu. Prèviament, es pot renovar el medi de cultiu en el qual estan creixent les cèl·lules fins al moment de realitzar la transfecció.
- Mantenir les cèl·lules a l'incubador durant el temps necessari, per tal que s'expressi el vector abans de continuar amb el seu processat, per determinar-ne l'activitat. En el nostre cas, aquest període de temps ha estat de 48 hores post-transfecció. En el cas que se'ls hi hagi aplicat un tractament, aquest s'haurà realitzat unes 24 hores abans de recollir les cèl·lules.
- Passades les 48 hores després de dur a terme la transfecció, cal recollir les cèl·lules. Primer de tot, retirar el medi per aspiració i rentar cadascun dels pous amb PBS 1x.
- Seguidament, aplicar 100µl de tampó de lisi (*Passive Lysis Buffer 5x* (Promega)) diluït 1x i deixar-ho en agitació 20 minuts, abans de congelar la placa a -20 °C durant unes hores.
- La mesura de l'activitat luciferasa dirigida per les regions promotores es fa mitjançant la determinació de l'activitat enzimàtica de la luciferasa, utilitzant un luminòmetre (*Turner Designs Imnometer TD 20/20*) i mitjançant el kit comercial *Dual-luciferase Reporter Assay system* (Promega, Madison, WI). En aquest, l'activitat luciferasa estàndard i l'activitat Renilla luciferasa van acoblades a l'aparició d'un senyal mesurable luminomètricament. Després de col·locar 10µl de mostra (a cadascun dels pous), es prepara el *software* del luminòmetre per tal que primer realitzi una lectura de l'activitat luciferasa i finalment una segona lectura de l'activitat Renilla luciferasa, la qual ens serveix com a indicador de l'eficiència de la transfecció (veure més endavant).

El procediment realitzat en el cas de la *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* ha estat el següent:

- Caldrà sembrar les cèl·lules a la densitat desitjada i segons les indicacions anteriors, segons el format de placa i el tipus cel·lular per aconseguir el % de confluència desitjat, previ a realitzar la transfecció.
- Previ a la transfecció cal barrejar la quantitat adient de plasmidi/pou, en el volum adequat de medi Opti-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen – Life Technologies) i per altra banda, fer la barreja de *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* en un tub a part. La proporció d'aquesta també dependrà de la quantitat de DNA per cada pou, però sempre en una relació 2,5:1 (µl:µg) *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* : DNA. En el nostre cas, la transfecció s'ha dut a terme majoritàriament en fibroblasts de C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i en

plaques de 24 pous, on s'han transfectat 0,3µg de la construcció de promotor en 100µl de medi Opti-MEM® i per pou (50µl per la barreja de DNAs + 50µl per la barreja de *Lipofectamine*), afegint si és necessari en el mateix volum, les quantitats de 0,06µg/pou d'altres vectors d'expressió en funció de les condicions experimentals.

- Aquestes barreges preparades per separat, hauran de restar 5 minuts d'incubació a temperatura ambient. Passat aquest temps, barrejar (els 50µl per la barreja de DNAs + 50µl per la barreja de *Lipofectamine*) i deixar incubar uns 20-30 minuts a temperatura ambient.
- Dispensar el volum adient de la barreja (100µl/pou en placa de 24 pous), directament sobre el medi de cultiu. Prèviament es pot renovar el medi de cultiu en què estan creixent les cèl·lules fins al moment de realitzar la transfecció.
- Mantenir les cèl·lules a l'incubador, durant el temps necessari, per tal que s'expressi el vector abans de mesurar-ne l'activitat, de la mateixa manera com la que s'ha comentat en el cas de la transfecció amb *FuGENE® HD*.
- Pel que fa al processat de les cèl·lules i la posterior mesura d'activitats luciferasa, s'aplicarà el mateix procediment comentat anteriorment.

### 3.1 Construccions utilitzades

Durant la realització d'aquest treball, al laboratori s'han emprat les diferents construccions plasmídiques que es resumeixen a continuació:

- **pUC18-mFGF21**: Vector d'expressió del promotor del gen *Fibroblast Growth Factor 21* de ratolí (-1497-FGF21-Luc), (Inagaki et al., 2007). La quantificació de l'activitat transcripcional del promotor es duu a terme mitjançant la mesura de l'activitat luciferasa, ja que en aquest constructe el promotor dirigeix l'expressió de la luciferasa dins de la construcció.
- **pUC18-mFGF21 Ebox Mut**: Vector d'expressió del promotor del gen *Fibroblast Growth Factor 21* de ratolí (-1497-Ebox Mut-Luc), on tenim la caixa Ebox (*Enhancer box*) proximal (-46/-51) mutada (veure més endavant).
- **pUC18-mFGF21 CRE Mut**: Vector d'expressió del promotor del gen *Fibroblast Growth Factor 21* de ratolí (-1497-Cre Mut-Luc), on tenim l'element CRE (*cAMP Response Element*) (-64/-72) mutat (Hondares et al., 2011).
- **pUC18-mFGF21 66 bp**: Vector d'expressió del promotor del gen *Fibroblast Growth Factor 21* de ratolí (-66-FGF21-Luc), on només tenim 66 parells de bases de la regió proximal d'aquest (-66/+5), havent estat delecionada la resta de la regió 5' (veure més endavant).
- **pcDNA3.1**: Vector plasmídic buit (sense cap gen inserit). Actua com a control de la transfecció, ja que per a certes construccions, s'utilitza aquest vector.
- **PSG5**: Vector plasmídic buit (sense cap gen inserit). Actua com a control de la transfecció en altres construccions plasmídiques.
- **pSG5-PPARα**: Vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*.
- **pSG5-PPARγ**: Vector plasmídic de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*.



- **pCMX-PPAR $\delta$** : Vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta*.
- **pCMV-MyoD**: Vector plasmídic que permet l'expressió de la proteïna *Myogenic differentiation 1*.
- **pCMV-MyoD-RRR**: Forma mutada del vector d'expressió del *Myogenic Differentiation 1* on els residus de lisina, capaços de ser acetilats, han estat mutats a arginines, perdent així la seva capacitat per ser acetilats.
- **pCMV-MEF2A**: Vector plasmídic de l'expressió de la proteïna *Myocyte Enhancer Factor-2A*.
- **pGL3-MEF2C**: Vector d'expressió de la proteïna *Myocyte enhancer factor-2C*.
- **pcDNA I/A-MEF2D**: Vector d'expressió de la proteïna *Myocyte Enhancer Factor-2D*.
- **pcDNA-Myf5**: Vector d'expressió del factor de transcripció miogènica *Myogenic Factor 5*.
- **pCND3-Flag-MKK6 (K82A)**: Constructe dominant negatiu de la forma activa de la MKK6 *MAPK Kinase 6*, que actua immediatament *upstream* de la p38-MAPK.
- **pSV-PGC-1 $\alpha$** : Vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha*.
- **pCMV-SIRT-1**: Vector d'expressió de la proteïna *NAD-dependent Deacetylase Sirtuin-1*.
- **pCMV-SIRT1-H363Y**: Forma mutada del vector d'expressió de la proteïna *NAD-dependent Deacetylase Sirtuin-1*, al qual li manca l'activitat desacetilasa.
- **pRL-CMV-Renilla**: Vector d'expressió de la proteïna luciferasa de *Renilla reniformis*, el qual es cotransfecta amb el vector luciferasa. La mesura de la seva activitat s'utilitza per corregir l'activitat del promotor, ja que l'activitat de la luciferasa de *R. reniformis* dirigida per CMV s'assumeix que sol ser constitucional, i per tant, només dependrà del grau de transfecció. Ens serveix per determinar l'eficiència de transfecció d'un experiment en qüestió.

#### 4. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS, MINIPREP I MAXIPREP

Degut al fet que els procediments de transfecció transitòria de vectors d'expressió necessiten una gran quantitat de DNA plasmídic, aquest s'ha hagut d'obtenir mitjançant la transformació de bacteris competents transformats i seguidament purificats a partir de protocols comercials estandarditzats.

##### 4.1 Transformació de bacteris competents.

Mitjançant aquest mètode podem introduir DNA plasmídic en bacteris de la soca *Escherichia coli*, els quals són capaços d'incorporar DNA exogen mitjançant un xoc tèrmic. A aquests, se'ls anomena competents.

El procediment és el següent:

- Descongelar una alíquota de 50 $\mu$ l d'*E. coli* per a cada transformació i una d'extra per a realitzar un control del procediment de transformació (el qual no contindrà DNA, tot i que se li aplicarà el mateix protocol).

- Afegir entre 1 i 10ng de DNA (en un màxim de 5µl) i agitar intensament sense utilitzar ni vòrtex ni pipeta.
- Incubar les barreges en gel durant uns 20 minuts.
- Aplicar un xoc tèrmic en un bany a 37 °C i en agitació durant 5 minuts.
- Incubar les barreges en gel durant 2 minuts.
- Afegir 1 ml de medi LB-Lennox (*Lysogeny Broth-Lennox*; triptona 10g/l, extracte de llevat 5g/l, NaCl 5g/l), suplementat amb MgSO<sub>4</sub> 20mM.
- Centrifugar a 2000 rpm durant 5 minuts.
- Retirar el sobrenedant i resuspendre el sediment de les cèl·lules amb 200µl de medi LB-MgSO<sub>4</sub>.
- Sembrar la suspensió de cèl·lules mitjançant una nansa de sembra, en plaques de LB suplementat amb l'antibiòtic, pel qual els plasmidis utilitzats en la transformació porten el gen de resistència.
- Incubar a 37 °C durant tota la nit.
- L'endemà, realitzar el cultiu d'una colònia aïllada en 2-3ml de medi LB suplementat amb l'antibiòtic adient. Aquest precultiu, es deixarà incubar a 37 °C unes 6-8 hores i servirà per realitzar els glicerinars bacterians o bé per a fer una miniprep, per obtenir DNA plasmídic, per tal de comprovar que les colònies seleccionades han incorporat el plasmidi que ens és d'interès.  
Per a fer els glicerinars caldrà, barrejar a parts iguals, un volum de precultiu de creixement amb un volum de medi LB + glicerol (1:1) i congelar-lo a -80 °C.

#### 4.2 Miniprep

A partir d'un precultiu bacterià com que el haurem obtingut en el pas anterior serem capaços de purificar fins a 20µg de DNA plasmídic, a partir del qual, podrem comprovar que la colònia seleccionada ha estat transformada amb el plasmidi que conté el nostre gen d'interès. Primer de tot s'haurà de purificar el DNA mitjançant el sistema *QIAGEN® Plasmid Mini Kit* (QIAGEN), el qual consisteix en una lisi alcalina dels bacteris i una unió del DNA plasmídic a una columna de resina d'intercanvi d'anions, a baixes concentracions salines. Això permet rentar aquests plasmidis de totes les impureses a través de la utilització de tampons de concentració salina intermèdia i finalment eluir-los amb un tampó d'alta concentració salina.

Un cop obtingut i resuspès aquest DNA plasmídic, es podrà comprovar si conté el nostre insert d'interès mitjançant una digestió i l'electroforesi corresponent. A partir de 500ng de DNA i mitjançant la utilització dels enzims de restricció adequats (seleccionats d'acord amb el mapa de restricció del plasmidi utilitzat), es podrà alliberar l'insert d'interès i seguidament, dur a terme una electroforesi en gel d'agarosa (agarosa al 0,8% en tampó TAE 1x i a 85V) de la digestió resultant, per tal de separar-ne els diferents fragments i així poder visualitzar l'insert en qüestió.

### 4.3 Maxiprep

Un cop s'ha comprovat que els nostres glicerinat amb els bacteris transformats ja contenen els nostres inserts d'interès, es podrà realitzar una maxiprep per tal d'obtenir una quantitat de plasmidi suficient (de l'ordre de 500µg) per poder realitzar varies transfeccions transitòries. De la mateixa manera que es feia amb la miniprep, la maxiprep s'obté mitjançant el sistema comercial *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN). Partint d'una punta de glicerinat obtingut anteriorment, s'inoculen 250 ml de medi de LB suplementat amb l'antibiòtic adequat i es deixa a 37 °C, i en agitació durant tota la nit. L'endemà al matí, s'obindrà el lisat bacterià i es farà passar per un filtre que ens retindrà el DNA plasmídic, on es netejarà d'impureses després d'aplicar-li diversos rentats i finalment l'eluirà i es precipitarà amb isopropanol. El sediment de DNA que s'obté, es resuspèn amb aigua. Seguidament es valorarà la seva concentració mitjançant el *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) (sistema utilitzat per a la determinació de qualsevol concentració d'àcids nucleics, ja sigui DNA o RNA). Aquesta suspensió ja serà apte per a la transfecció.

## 5. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Amb motiu de la realització dels nostres experiments de transfecció per tal d'intentar esbrinar i mapar els diferents elements reguladors que interaccionen sobre el gen d'interès, hem requerit treballar amb construccions del promotor FGF21 on s'ha realitzat alguna mutació puntual en determinades bases de la seqüència d'interès (veure llistat anterior de construccions plasmídiques).

Per tal de dur a terme aquestes mutagènesis, s'ha utilitzat el kit comercial *QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene).

El procediment es detalla a continuació:

### ***Elecció dels primers***

Primer de tot cal dissenyar els encebadors (*primers*), d'acord amb la mutació desitjada i una sèrie de consideracions:

- Els *primers* han de contenir la mutació desitjada i alhora ser complementaris a les cadenes oposades al plasmidi.
- Els *primers* han de tenir una llargada entre els 25 i els 45 parells de bases i amb una temperatura de *melting* ( $T_m$ )  $\geq 78$  °C. La temperatura de *melting* es calcula amb la següent fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N, és la llargada dels *primers* en número de bases i els % són números enters.

- La mutació desitjada ha de localitzar-se a la meitat del *primer* i ha d'estar flanquejada per 10 o 15 bases.

- Els encebadors òptims, haurien de contenir un percentatge mínim de GC del 40%. A més a més, haurien d'acabar amb una o més bases C o G.
- Els *primers* haurien de ser purificats per cromatografia líquida (HPLC/FPLC) o per electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE), fet que permetrà una millor eficiència de mutagènesi.

Els *primers* dissenyats en les construccions mutants es descriuen a continuació:

Mutació caixa Ebox del promotor FGF21 de ratolí:

*Forward primer:* 5'-GGAGTGGGGAGGGTTCGTGGGCGGGCCTGTCTGGG-3'

*Reverse primer:* 5'-CCCAGACAGGCCCGCCACGAACCCTCCCCACTCC-3'

Per altra banda, al laboratori ja disposàvem d'una construcció del promotor d'FGF21 de ratolí prèviament mutada a l'element de resposta CRE (-72/-65 bp). Veure referència a la bibliografia (Hondares et al., 2011).

**Reacció de síntesi del DNA mutant**

El DNA que serveix com a motlle ha de ser aïllat d'una soca *E. coli* dam<sup>+</sup>. La barreja de reacció per la mostra és la següent:

- 5µl del tampó de reacció 10x
- xµl (50ng) dels DNAs motlle
- xµl (125ng) del *forward primer*
- xµl (125ng) del *reverse primer*
- 1µl de la barreja de dNTPs
- 1,5µl del reactiu *QuikSolution*
- Afegir H<sub>2</sub>O bidestil·lada fins als 50µl
- Seguidament s'afegeix 1µl del QuikChange® Lightning Enzyme

De la mateixa manera, també s'haurà de duu a terme una reacció control, en què s'utilitzarà un plasmidi control (pWhitescript 4.5Kb *control plasmidi* (5ng/µl), per assegurar-nos que la reacció funciona correctament.

Els paràmetres per a la reacció en el termociclador seran:

- 1 Cicle: 95 °C durant 2 minuts
- 18 Cicles: 95 °C durant 20 segons  
60 °C durant 10 segons  
68 °C durant 30 segons/per cada kb de la longitud del plasmidi
- 1 Cicle: 68 °C durant 5 minuts

**Digestió dels productes d'amplificació amb l'enzim Dpn I**

- Afegir 1µl de *Dpn I* (10U/µl) a cadascuna de les reaccions d'amplificació.
- Barrejar suaument i centrifugar 1 minut (*spin*).
- Incubar cada reacció 5 minuts a 37 °C per tal de digerir el DNA parental.

### **Transformació de cèl·lules XL-1 Blue supercompetents**

- Descongelar en fred 45µl de cèl·lules *XL-1 Blue* supercompetents (resistents a tetraciclina) en tubs de 1,5ml.
- Afegir 2µl de β-mercaptoetanol i deixar-ho incubar en gel durant 2 minuts.
- Transferir 2µl dels DNAs digerits amb *Dpn I*, barrejar la reacció i deixar-ho incubar 30 minuts en gel.
- Preescalfem medi LB a 42 °C en un bany (0,5ml per cada tub).
- Realitzar un xoc tèrmic de les reaccions de transformació a 42 °C durant 30 segons i seguidament incubar-les en gel durant 2 minuts.
- Afegir 0,5ml de LB preescalfat en cadascun dels tubs i incubar aproximadament una hora a 37 °C en agitació (225-250 rpm).
- Plaquejar la suspensió en plaques d'agar que continguin l'antibiòtic adequat (en aquest cas, tetraciclina).
- Incubar les plaques a 37 °C durant tota la nit i l'endemà es comprova que han crescut colònies.
- Realitzar un o varis precultius de colònies aïllades (3ml de LB + antibiòtic corresponent), per tal de dur a terme les minipreps corresponents i així poder comprovar quins dels clons contenen les mutacions desitjades.
- Dur a terme la miniprep i acte seguit, valorar la concentració de DNA de cadascun dels clons per poder realitzar una seqüenciació de l'insert d'interès.

### **Seqüenciació dels productes de la mutagènesi dirigida**

Per tal de comprovar que el procés de mutació ha funcionat correctament i que la nostra nova preparació conté el fragment mutat, realitzarem una seqüenciació d'aquest fragment. Així doncs, de la mateixa manera que havíem fet anteriorment, a partir del DNA plasmídic obtingut a partir d'una miniprep, es duu a terme una PCR utilitzant el sistema *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®).

El protocol serà el següent:

- Preparar la barreja de reactius de la PCR i del DNA producte, en aquest cas de la mutagènesi dirigida, en un tub de 20µl:
  - 4µl de *Ready Reaction Premix 5x*
  - 4µl de *BigDye Sequencing Buffer 5x*
  - 500ng del DNA provinent de la mutagènesi dirigida
  - 3,2pmol del *primer* pGL2 1µM
  - H<sub>2</sub>O bidestil·lada fins a 20µl
- Amplificar la mostra en el termociclador mitjançant el següent programa:
  - 1 Cicle: 96 °C durant 3 minuts
  - 25 Cicles: 96 °C durant 10 segons  
55 °C durant 5 segons  
60 °C durant 4 minuts
- Guardar les mostres a 4 °C fins que es realitzi la seqüenciació.

La seqüenciació en si de les mostres es durà a terme per part de la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

## 6. CLONACIÓ

Amb l'objectiu de dur a terme el mapatge dels llocs d'unió de diferents factors de transcripció en el nostre promotor d'FGF21 de ratolí, es va optar per clonar un fragment de 66 bp de la part més proximal d'aquest en un plasmidi buit, de tal forma que es generés un constructe mínim de promotor d'FGF21. Per tal de poder-ho aconseguir es va seguir el següent protocol:

- Sintetitzar els oligonucleòtids pertanyents a un fragment de 66 bp de la part més proximal (-66/+5) a l'origen de transcripció del promotor d'FGF21, el qual ha de finalitzar amb les dianes pels enzims de restricció necessaris i coincidents amb les que es talli el plasmidi (pUC18 de 2686 bp) sobre el qual volguem clonar el nou fragment. Amplificar-lo mitjançant PCR. Aquestes dianes seran *Xho I* i *Hind III* (blau).

*Forward primer:* 5'-CAAGCTTCAGGAGTGGGGAGGGCACGTGGGCGGGCCTGTCTGGGTAT  
AAATTCTGGGTATTTCTGCGTTCACCAGACAGAGCTCC-3'

*Reverse primer:* 5'-GGAGCTCTGTCTGGTGAACGCAGAAATACCCAGAATTATACCCAGACA  
GGCCCGCCACGTGCCCTCCCCACTCCTGAAGCTTG-3'

- Digerir el plasmidi amb els enzims de restricció necessaris, durant 1 hora i mitja, a 37 °C i en agitació per aconseguir una digestió completa. En el nostre cas digerirem la construcció de la qual disposem amb *Hind III* i *Xho I*, per tal d'alliberar vector linealitzat, purificar-lo i així poder-hi unir l'insert. La barreja és la següent:
  - 1µg de mostra
  - 2µl de tampó 10x de *SuRE/Cut Buffer x for Restriction Enzymes* (Roche) (el tampó s'escollirà en funció dels enzims)
  - 1µl *Xho I*
  - 1µ *Hind III*
  - H<sub>2</sub>O lliure de nucleases fins a 20µl
- Digerir el fragment de 66 bp amb els mateixos enzims de restricció i en les mateixes condicions que el vector, per tal d'aconseguir extrems roms que es puguin lligar a continuació.
- Córrer electroforèticament les mostres en un gel del 1,5% d'agarosa a 85V durant una hora. Posteriorment es visualitzaran les bandes mitjançant un transiluminador i es tallaran els fragments corresponents.
- Purificar les bandes aïllades després de l'electroforesi: el vector pUC18 linealitzat per un costat i l'insert tallat per l'altra. La purificació la durem a terme mitjançant el kit *PCR clean-up Gel extraction* (MACHEREY-NAGEL) i de la següent manera:

- Extreure la banda i col·locar-la en un tub *ependorf* amb filtre, amb el pes prèviament tarat.
  - Afegir 200µl de *Buffer NT* per cada 100mg de gel d'agarosa.
  - Incubar uns 10 minuts a 50 °C i agitar amb el vòrtex cada 3 minuts.
  - Centrifugar a 11.000 rcf durant 1 minut. Descartar el *flow-through*.
  - Rentar amb 700µl de *Buffer NT3*.
  - Centrifugar a 11.000 rcf durant 1 minut. Descartar el *flow-through*. Repetir la centrifugació durant 2 minuts per assecar la membrana.
  - Afegir de 15-50µl de *Buffer NE* i incubar a temperatura ambient 1 minut.
  - Centrifugar a 11.000 rcf durant 1 minut per tal d'eluir el DNA.
  - Valorar el DNA i guardar-lo a -20 °C.
- Seguidament, procedir amb la lligació.

La lligació la realitzarem mitjançant l'enzim *T4 DNA Ligase (M0202)* (NEW ENGLAND BioLabs®), la qual permet unir tant extrems roms com cohesius, i seguint el procediment que hi ha a continuació.

- Preparar les diferents mostres a lligar de la següent manera:
  - 50ng de vector linialitzat (DNA)
  - XµL d'insert (utilitzarem una relació molar 3:1 de insert:vector)

$$[\text{ng insert}] = (R \times [\text{ng vector}] \times [\text{kb insert}]) / \text{kb} [\text{vector}]$$

On, R és la relació molar entre el plasmidi i l'insert. El seu valor depèn de la mida de les molècules implicades i de la qualitat i compatibilitat dels seus extrems.

- 2µL 10× *T4 DNA Ligase Buffer*
  - 1µL *T4 DNA Ligase*
  - H<sub>2</sub>O lliure de nucleases fins a 20µl
- Barrejar la reacció pipetejant amunt i avall i microcentrifugant breument.
  - Per a extrems cohesius (que serà el nostre cas), incubar les mostres durant tota la nit a 16 °C.
  - A partir d'aquí utilitzarem de 1-5µg de la nostra mostra de lligació, per tal de poder transformar 50µl de cèl·lules competents.

## 7. PURIFICACIÓ D'RNA, RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

La mesures dels canvis dels nivells d'expressió dels gens d'interès es realitzen mitjançant la quantificació de l'expressió gènica per PCR quantitativa a temps real (*Real-time qPCR*), seguint el següent procediment:

### 7.1 Purificació de l'RNA mitjançant fenol-cloroform

Degut al fet que el nostre objecte d'estudi han estat principalment miotubs provinents de línies cel·lulars musculars, les quals tenen una consistència molt més fibrosa que altres, fet que normalment obstrueix les columnes d'afinitat que permeten purificar del material genètic a partir de kits comercials, ens hem decantat per la utilització del *TriPure Isolation Reagent* (Roche), ja que és molt més eficient que els sistemes basats en columnes d'afinitat. Seguint les indicacions de la casa comercial, aquest sistema d'extracció mitjançant el fenol-cloroform permet obtenir les fases corresponents al DNA, a l'RNA i a la proteïna. El mètode es basa en la lisi cel·lular i la desnaturalització de les nucleases endògenes, l'obtenció de les 3 fases per efecte del cloroform i la posterior obtenció de l'RNA a partir de la fase aquosa superior per precipitació amb isopropanol. Un cop hem obtingut l'RNA resuspès en aigua, podem eliminar la possible contaminació amb DNA genòmic aplicant el protocol de *DNA-free™ Kit, DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambion® - Applied Biosystems). Seguidament, determinarem la concentració de l'RNA mitjançant el NanoDrop (sistema miniaturitzat de mesura espectrofotomètrica).

### 7.2 Retrotranscripció

Per tal de mesurar els nivells d'expressió gènica mitjançant la tècnica de la *qPCR*, necessitem fer-ho mesurant els nivells de transcrits específics. Per fer-ho possible, cal retrotranscriure l'RNA a DNA còpia (cDNA). Aquest procés consisteix en dur a terme una reacció on, cadascuna de les molècules d'RNA, serà utilitzada per la transcriptasa inversa com a motlle. Com a encebadors de la reacció s'utilitzaran hexàmers de composició aleatòria. Per a la reacció de retrotranscripció s'utilitzen uns 500ng d'RNA en un volum màxim de 7,7µl i una barreja dels següents elements del kit *MulyiScribe™ Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems) en un volum de 12,3µl addicionant:

- TagMan RT Buffer 1x
- MgCl<sub>2</sub> 5,5mM
- Barreja de deoxinucleòtids (dNTP) (500µM de cada dNTP)
- Random Hexamers 2,5µM
- Inhibidors d'RNases 0,4 U/µl
- MultiScribe Reverse Transcriptase 1,25 U/µl

Un cop preparada la reacció es realitza la retrotranscripció amb el termociclador, seguint el següent protocol:

- Fase d'incubació: 10 minuts a 25 °C
- Fase de còpia: 30 minuts a 48 °C
- Fase d'inactivació de la transcriptasa inversa: 5 minuts a 95 °C



### 7.3 PCR quantitativa a temps real

La valoració dels canvis produïts a nivell d'expressió gènica, per efectes de les condicions experimentals que hem imposat als nostres cultius cel·lulars, els quantificarem mitjançant la *real-time qPCR*. Aquesta és la tècnica per la qual es pot quantificar a temps real el producte que es genera durant la reacció gràcies a l'activitat d'un fluoròfor, el qual emet una quantitat de fluorescència proporcional al producte específic present en cada moment i que depèn també de la quantitat específica de cadascun dels cDNAs utilitzats com a motlle. Aquest procés només es pot valorar mitjançant un termociclador prou sensible, per tal de poder detectar la fluorescència emesa pel fluoròfor, després d'haver estat alliberat pel seu *quencher* per acció de la polimerasa *TaqMan*<sup>®</sup>. En el nostre cas, realitzarem aquesta valoració amb el *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) i en plaques de 96 pous.

Per a la barreja de la reacció, utilitzarem:

- 10µl de *Platinum*<sup>®</sup> *qPCR Super-Mix-UDG with ROX* (Invitrogen – Life Technologies), que consta de 22 U/ml de la DNA polimersa recombinant de *Thermus aquaticus* complexada amb l'anticòs *Platinum*<sup>®</sup>*Taq*, Tris-HCl 22mM pH 8,4), KCl 55mM, MgCl<sub>2</sub> 165mM i 200µM de cadascun dels dNTPs
- 1µl de *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Assay* (Invitrogen – Life Technologies), únic per cada gen que es vol mesurar, ja que actuen com a encebadors específics i com a sonda marcada amb el fluoròfor
- 8µl d'aigua lliure d'RNases

D'aquesta barreja, la qual se'n prepara un pool comú per totes les mostres que necessitem valorar per cadascun dels gens, se'n dipositen 19µl per pou i seguidament s'afegeix 1µl de la reacció de retrotranscripció contenint el cDNA, obtingut a partir d'RNA segons les quantitats i condicions mencionades anteriorment. En el cas del gen FGF21, degut als seus baixos nivells d'expressió en el context muscular, es col·locaran 18µl de la barreja i 2µl de la reacció de retrotranscripció.

#### Sondes *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Assay* utilitzades:

*Homo sapiens*

Gen	Referència	Nom del gen
18S	Hs99999901_s1	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
MyoG	Hs01072232_m1	<i>Myogenin (or Myogenic factor 4)</i>
FGF21	Hs00173927_m1	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
FGFR1c	Hs00241111_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FGFR4	Hs00608745_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>
KLB	Hs00545621_m1	<i>β-Klotho</i>

*Mus musculus*

Gen	Referència	Nom del gen
18S	Hs99999901_s1	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
MyoG	Mm00446194_m1	<i>Myogenin (or Myogenic factor 4)</i>
FGF21	Mm00840165_g1	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
UCP3	Mm00494074_m1	<i>Uncoupling Protein 3</i>
FGFR1c	Mm00438930_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FGFR4	Mm00433314_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>
KLB	Mm00473122_m1	<i><math>\beta</math>-Klotho</i>

*Ratus norvegicus*

Gen	Referència	Nom del gen
18S	Hs99999901_s1	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
MyoG	Rn00567418_m1	<i>Myogenin (or Myogenic factor 4)</i>
FGF21	Rn00590706_m1	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
Ucp3	Rn00565874_m1	<i>Uncoupling Protein 3</i>
FGFR1c	Rn00577234_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FGFR4	Rn01441812_m1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>

Per tal de fer una valoració adequada dels canvis dels nivells d'expressió, així com també per corregir els possibles errors de càrrega, necessitem referir aquests resultats a un gen endogen que teòricament sigui invariable. En el nostre cas, la sonda 18S, la qual reconeix i amplifica la subunitat 18S de l'RNA ribosomal i que és la forma d'RNA majoritària dins la cèl·lula, ens serveix per aquest propòsit. La sonda de 18S rRNA que utilitzem és capaç de reconèixer tant els gens humans, com els de ratolí i de rata.

Un cop ha finalitzada la reacció de la *real-time qPCR*, el software que registra les mesures a temps real genera una corba, la qual obeeix una funció logarítmica, on l'eix Y correspon al logaritme de la concentració de DNA i l'eix X al número de cicles d'amplificació, i hi determina un llindar comú que intersecciona totes les corbes (una per cada mostra) en la seva fase exponencial. Aquest valor ens informa de quants cicles d'amplificació han estat necessaris per a assolir un determinat grau d'expressió del gen d'interès, on un número més baix de cicles significa que s'ha assolit aquest llindar en menys temps i per tant, que el número de cDNAs que han actuat de motlle en la PCR era més gran, ja que és el factor limitant de la reacció. A partir d'aquesta dada, per obtenir un valor proporcional a la quantitat de cDNA (que és el mateix de l'mRNA) de cadascun dels gens estudiats, el valor de cicles ( $C_T$ ) es corregeix amb la funció  $2^{-(\Delta CT)}$ . Els valors finals es corregeixen dividint-los amb els valors corresponents al 18S rRNA (control endogen o *housekeeping*).

## 8. WESTERN BLOT

Per tal d'intentar dilucidar els canvis de l'expressió gènica a nivell del seu producte final, les proteïnes, així com de canvis post-traduccional d'aquestes (degradació, fosforilació o desfosforilació, etc.) en un moment determinat i en resposta a les determinades condicions d'estudi, ho durem a terme mitjançant la immunodetecció de proteïnes. Aquesta tècnica es basa en la detecció de la proteïna desitjada mitjançant la utilització d'anticossos generats contra epítops concrets de la proteïna d'interès, de manera que la podem distingir enmig de tot el conjunt de proteïnes (obtingudes a partir d'un lisat cel·lular), que separarem segons el seu pes molecular mitjançant una electroforesi desnaturalitzant en un gel de poliacrilamida/SDS i transferides a una membrana de PVDF.

### 8.1 Obtenció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars

L'obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars es pot fer com a extractes totals, a partir d'un homogenat total del cultiu, o bé es pot obtenir la proteïna d'interès que es troba present en una determinada fracció cel·lular, com ara a la citosòlica. Així doncs, els procediments variaran en funció de l'objectiu d'estudi:

#### 8.1.1 Homogeneïtzació total

Per tal d'obtenir un extracte proteic total haurem de fer un lisat total de les cèl·lules, però utilitzant un tampó adequat que ens permeti preservar les proteïnes en el seu estat òptim de fosforilació, acetilació o altres modificacions post-traduccional intactes en funció del que vulguem estudiar. El procediment utilitzat en el nostre cas és el següent:

- Retirar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules amb PBS 1x.
- Afegir 75µl de tampó d'homogeneïtzació per pou de placa de 6 pous, amb la següent composició:
  - Tris-HCl 50mM
  - 0,27M de Sacarosa
  - 1mM EDTA
  - 1mM EGTA
  - 1% Tritó X-100 (w/v)
  - 09% (v/v) 2β-Mercaptoetanol
  - 10mM β-Glicerofosfat
  - *Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets* (Roche). Alternativament podem preparar el nostre cocktail de proteases mitjançant; Apoproteïna A (1µg/ml), Leupeptina (1µg/ml), Pepstalina A (1µg/ml) i PMSF (fluorur de fenilmetilsulfonil) (1mM)
- Incubar en agitació (orbital) a 4 °C durant uns 20-30 minuts.
- Centrifugar a 12.000 rcf a 4 °C durant 5 minuts per tal d'eliminar fraccions grans de membranes.
- Recuperar el sobrenedant i determinar la concentració de proteïna de les mostres.

### 8.1.2 Fraccionament subcel·lular

Segons l'objectiu del nostre estudi, en determinats casos necessitarem determinar la fracció proteica d'interès que està present en certes fraccions cel·lulars, com ara la citosòlica. Aquest fet ens obliga a partir d'una quantitat més gran de cèl·lules per tal d'obtenir un bon rendiment. En el nostre cas partirem de; o bé 4 pous d'una placa de 6 per mostra o bé d'una placa de 10cm per condició experimental.

En aquest cas, el procediment serà el següent:

- Tripsinitzar el total de pous per a cada condició experimental i ajuntar-los en un únic pool, per poder centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Resuspendre el precipitat cel·lular amb 1ml de tampó d'homogeneïtzació (Sacarosa 250mM, Na-Hepes 20mM (pH 7,4), KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, β-glicerofosfat 40mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2mM, PMSF 1mM, cocktail d'inhibidors de proteases 1x). Aquest tampó ens permet realitzar una lisi exclusivament mecànica de les cèl·lules, ja que és isotònic i per tant, permet mantenir l'estructura dels orgànuls cel·lulars intacta.
- Dispensar la suspensió en un homogeneïtzador de vidre i realitzar uns 50 moviments mantenint l'homogeneïtzador en gel per assolir el fraccionament cel·lular. Podem guardar uns 100µl, corresponents a la *fracció homogenat total* i guardar-los a -20 °C.
- Centrifugar la resta d'homogenat a 1500xg a 4 °C durant 5 minuts per tal d'eliminar les cèl·lules no lisades. Recuperar el sobrenedant i resuspendre amb 200µl de tampó i tornar a centrifugar. Ajuntar els dos sobrenedants. El sediment que queda es pot guardar com la *fracció de cèl·lules senceres*.
- Centrifugar els sobrenedants a la màxima velocitat a 4 °C durant 20 minuts.
- El sediment es pot resuspendre amb el tampó d'homogeneïtzació, i així obtenir la *fracció enriquida amb mitocondris*.
- El sobrenedant que en resulta s'ultracentrifuga a 100.000xg a 4 °C, durant 1 hora, per tal d'obtenir la *fracció citosòlica* d'interès.

### 8.2 Valoració de la concentració proteica mitjançant Bradford

Per tal de dur a terme l'electroforesi i la immunodetecció d'una manera comparativa entre les diferents condicions experimentals imposades en el nostre assaig, cal determinar la concentració proteica dels extractes cel·lulars que hem obtingut, per tal de normalitzar la quantitat de proteïna que carregarem a cadascun dels pous del gel. Aquesta valoració, la farem mitjançant el mètode conegut com a Assaig de Bradford, en plaques de 96 pous, i llegint les absorbàncies mitjançant el lector de plaques ELISA; *Benchmark Plus microplate spectrophotometer* (BIO-RAD). Es seguirà el següent protocol:

- Elaborar un banc de dilucions de concentracions conegudes de BSA (*Bovine serum albumin*) a partir d'una solució mare de 2mg/ml, per tal d'elaborar la recta patró. D'aquesta manera s'obtidran les concentracions finals de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 i 1µg/µl.

- Preparar el volum necessari de reactiu de Bradford a partir d'un estoc concentrat de *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories GmbH), sabent que es necessiten 190µl de reactiu diluït per pou i diluint 1/5 en aigua bidestil·lada.
- Del banc de dilucions, col·locar 10µl en un pou i seguidament afegir 190µl del reactiu diluït per pou.
- Col·locar 10µl de mostra a cadascun dels pous i complementar-ho amb 190µl del reactiu diluït.
- Incubar 10 minuts a temperatura ambient.
- Fer la lectura amb un lector d'ELISA a la longitud d'ona de 595 nm i interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró, per tal d'obtenir la concentració de les mostres, tenint en compte que el valor s'ha de corregir pel factor de dilució en cas que sigui necessari.

### 8.3 Electroforesi PAGE, transferència i immunodetecció

Un cop valorada la proteïna, ja ens podem disposar a carregar les diferents fraccions proteïques a cadascun dels pous del gel per córrer l'electroforesi, realitzar la transferència sobre una membrana de PVDF i fer la posterior immunodetecció amb l'anticòs corresponent. De manera breu, a continuació es detallen tots els passos del procés:

- Preparar un gel de poliacrilamida al percentatge adient, segons el pes molecular de les proteïnes a estudiar i consistent en una barreja de:
  - Tris, 375mM – pH 8,8 per a la fase separadora i 63mM – pH 6,8 per a la fase concentradora
  - La quantitat d'acrilamida 40% - bisacrilamida 0,5% per tal d'aconseguir el percentatge final desitjat. Normalment serà entre el 7% per a separar proteïnes d'elevat pes molecular (per sobre dels 100 kDa) i el 15% per a proteïnes més petites (inferiors als 40kDa)
  - SDS 1%
  - TEMED 0,426M
  - Persulfat amònic 0,1%
- Prèviament a carregar el gel, preparar les mostres afegint al volum de mostra necessari per a assolir una determinada quantitat de proteïna: 1/5 parts de tampó de ruptura (Tris-HCl 100mM, pH 6,8, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 2%, SDS 2%, blau de bromofenol 0,1%) i escalfar-les a 95 °C durant 5 minuts. Paral·lelament amb les mostres, carregar al gel 10µl del marcador de pes molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BIO-RAD), el qual servirà per identificar els diferents pesos moleculars de les bandes de les proteïnes detectades durant el procés.
- L'electroforesi del gel d'acrilamida amb les mostres carregades es duu a terme en cubetes que contindran tampó de correguda (Tris base 25mM, glicina 192M, SDS 0,1%) i a un voltatge constant de 85-110V durant unes 2-3 hores per tal que les proteïnes es separin correctament.
- Acabat aquest primer pas, transferir les proteïnes separades en el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF, mitjançant un muntatge tipus sandvitx, en una cubeta refrigerada i que contindrà tampó de transferència

- (Tris base 50mM, glicina 386mM, metanol 20%, SDS 0,1%) a un amperatge constant de 400mA durant 1 hora.
- Seguidament, realitzar el bloqueig de la membrana amb PBS 1x més Tween20 0,1-1% i llet en pols al 5% durant 1 hora, per evitar les possibles unions inespecífiques de l'anticòs, a altres parts de la membrana que han quedat lliures després del procés de transferència.
  - Seguidament, incubar la membrana amb la dilució corresponent d'anticòs primari en PBS 1x – Tween20 0,1% - llet pols al 3%, a 4 °C durant tota la nit i en agitació orbital.
  - A continuació, aplicar una sèrie de rentats amb PBS 1x – Tween20 0.1-1%.
  - Incubar amb la dilució d'anticòs secundari contra IgG específica de l'anticòs primari i conjugat amb l'enzim de la peroxidasa, en PBS 1x – Tween20 0,1% - llet en pols al 3%, a temperatura ambient i durant una hora en agitació orbital.
  - Finalment, revelar utilitzant el substrat de la luciferasa *Immobilon<sup>TM</sup> Western* (Milipore Corporation) o *ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents* (Amersham<sup>TM</sup> – GE Healthcare UK Limited), el qual permet que l'anticòs emeti un producte quimioluminiscent, per exposició sobre un film fotosensible o utilitzant l'aparell *LAS 3000 Imager* (Fugifilm). A partir d'aquí, només s'ha de quantificar la intensitat de la banda de la nostra proteïna d'interès, comparant-la amb una banda d'una proteïna que pugui ser utilitzada com a control de càrrega del gel.

### Anticossos utilitzats durant la realització d'aquesta tesi

#### *Anticossos primaris*

<b>Proteïna diana</b>	<b>Font</b>	<b>Dilució de treball</b>	<b>Casa comercial</b>
p38-MAPK	Conill	1/1000	Cell Signaling
p38-MAPK-P	Conill	1/250	Cell Signaling
ATF-2	Conill	1/50	Cell Signaling
ATF-2-P	Conill	1/250	Cell Signaling
MyoD	Ratolí	1/1000	Santa Cruz
FGF21	Cabra	1/1000	Santa Cruz
β-Actina	Ratolí	1/10000	Sigma
α-Tubulina	Ratolí	1/10000	Sigma

#### *Anticossos secundaris*

<b>Proteïna diana</b>	<b>Font</b>	<b>Dilució de treball</b>	<b>Casa comercial</b>
Ig de Cabra	Ratolí	1/3000	Santa Cruz
Ig de Conill	Cabra	1/3000	Santa Cruz
Ig de Ratolí	Cabra	1/3000	Bio-Rad

## 9. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA LA FGF21 EN MEDIS DE CULTIU

Durant la realització d'aquest treball s'han intentat esbrinar els efectes que, determinats tractaments o altres situacions, produïen sobre els cultius miogènics a base de valorar els seus canvis a nivells d'expressió gènica o bé a nivells de modificacions post-traduccionals com ara la fosforilació. Tanmateix, el fet de treballar sobre una hormona la qual considerem que pot ser secretada al medi extracel·lular en determinades condicions, ens ha requerit utilitzar algun mètode de quantificació de proteïna en medis provinents dels cultius cel·lulars. Així doncs, hem optat per utilitzar el protocol de *Mouse and Rat FGF-21 ELISA* (BioVendor). Segons les indicacions del fabricant, el protocol es pot resumir esquemàticament en els següents passos:

- Preparar una corba patró amb les concentracions finals de 2560, 1280, 640, 320, 160, 80, 40 i 0pg/ml a partir de l'estàndard diluït amb el tampó pertinent.
- Diluir les mostres de medis a incloure a la placa amb el tampó de dilució. Les mostres de ratolí provinents de C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> es diluiran 20 vegades i les de rata L6 es diluiran 3 vegades amb el mateix tampó. Realitzar el mateix procediment pels controls de qualitat que venen amb el kit.
- Incubar la placa a temperatura ambient a 300 rpm i durant una hora.
- Rentar amb 350µl cadascun dels pous amb *Wash solution*. Repetir el procés 3 vegades.
- Afegir 100µl de la *Biotin Labelled Antibody solution* a cada pou, prèviament diluïda.
- Incubar la placa a temperatura ambient a 300 rpm i durant una hora.
- Rentar amb 350µl cadascun dels pous amb *Wash solution*. Repetir el procés 3 vegades. A l'últim rentat, assegurar-nos que no queda solució de rentat.
- Afegir 100µl de la *Streptavidin-HRP Conjugate solucion* a cada pou.
- Incubar la placa a temperatura ambient a 300 rpm i durant 30 minuts.
- Rentar amb 350µl cadascun dels pous amb *Wash solution*. Repetir el procés 3 vegades. A l'últim rentat, assegurar-nos que no queda solució de rentat.
- Afegir 100µl de la *Substrate solution* a cada pou. Cobrir la placa amb paper d'alumini per evitar que hi toqui la llum directament, ja que la reacció és fotosensible.
- Incubar la placa a temperatura ambient, sense agitació i durant 10 minuts.
- Afegir 100µl de la *Stop solution* a cada pou per tal d'aturar la reacció.
- Determinar l'absorbància mitjançant un lector ELISA a una longitud d'ona de 450 nm i a 630 nm de longitud d'ona de referència. És important que aquesta lectura es faci en un temps no superior als 5 minuts posteriors a l'addició de la *Stop solution*.
- Interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró i corregir-los pel factor de dilució, per obtenir la concentració final de les mostres.

## 10. ASSAIG D'IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)

La tècnica de la Immunoprecipitació de Cromatina (ChIP) és un mètode que ens serveix per tal de determinar la localització de certes proteïnes que es troben unides al DNA. La tècnica consta bàsicament en un primer pas de fixació de les interaccions proteïna-DNA en les cèl·lules, mitjançant formaldehid (amb les cèl·lules encara vives), i un segon pas que consisteix en la immunoprecipitació d'aquests complexos. Aquest darrer pas es fa mitjançant la utilització d'anticossos específics a partir d'extractes sonicats, necessari per tal de fragmentar la cromatina. Un cop fet això, les seqüències específiques del DNA d'interès s'amplificaran per PCR i es determinarà si són enriquides o no, amb la proteïna d'interès, la qual serà detectada per mitjà d'un anticòs. Per a la realització d'aquesta tècnica, s'ha utilitzat el kit comercial *Magna ChIP™* (Milipore).

El procediment és el següent:

- Es parteix de plaques de 10cm de diàmetre amb capacitat per a 10ml de medi i amb un equivalent de  $10^6$  cèl·lules/placa (en el nostre cas, s'ha utilitzat un cultiu de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>). El nombre de plaques sembrades estarà determinat per les nostres condicions experimentals i si fos necessari es pot fer un *pool* de més d'una placa per assegurar-nos que es disposa de prou material per fer l'experiment.
- Les cèl·lules es podran processar quan, un cop diferenciades i tractades, assolixin un 80-90% de confluència.

### ***Fixació in vivo i lisat cel·lular***

- Aspirar el medi cel·lular, rentar amb PBS 1x i afegir 1ml de formaldehid al 37% a cada placa per tal de fixar les unions proteïna-DNA, amb les cèl·lules encara vives.
- Deixar les plaques incubant en agitació i a temperatura ambient durant 10 minuts.
- Afegir 1,57ml de glicina 1M per tal d'inactivar el formaldehid i incubar en agitació durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb PBS 1x un parell de cops. Seguidament, afegir 1,5ml de PBS 1x amb *Protease Inhibitor Cocktail II* (5µl/ml).
- Rascar les cèl·lules per recollir-les i a continuació centrifugar-les a 800 rcf durant 5 minuts a 4 °C.
- Descartar el sobrenedant (guardar el precipitat a -80 °C en cas que sigui necessari) i resuspendre el precipitat amb 500µl de *Lysis Buffer*, el qual contindrà 2,5µl de *Protease Inhibitor Cocktail II*.
- Incubar en gel durant 15 minuts, vortejant cada 5 minuts, per assegurar-nos una lisi cel·lular total.
- Centrifugar a 800 rcf durant 5 minuts i a 4 °C. Seguidament, descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el precipitat amb 500µl de *Nuclear Lysis Buffer*, el qual contindrà 2,5µl de *Protease Inhibitor Cocktail II*.



### **Sonicació del DNA**

La potència i el nombre de pulsacions de cada sonicació dependrà de la mida del fragment de DNA que es vulgui aconseguir, així com també del tipus cel·lular. És important però, que es realitzi en gel per evitar la degradació del DNA per excés de temperatura durant el procediment, així com també rentar bé la sonda amb aigua i etanol al 70% per evitar possibles creuaments entre les mostres.

- Realitzar 6 tandes de sonicació de 15 segons cadascuna i per mostra, esperant un minut entre elles. El procediment es farà amb gel en tot moment.
- Centrifugar a 10.000 rcf a 4 °C durant 10 minuts.
- Recuperar el sobrenedant i fer-ne alíquotes de 50µl, guardant 20µl com a *input*. Si és necessari, podem guardar el sobrenedant a -80 °C.

### **Immunoprecipitació dels agregats proteïna-DNA**

- Afegir 450µl d'una solució de *Dilution Buffer*, la qual contindrà 2,25µl de *Protease Inhibitor Cocktail II*, en cadascuna de les mostres.
- Afegir l'anticòs d'immunoprecipitació (entre 1 i 10µl/mostra). La quantitat d'aquest es determinarà empíricament.
- Afegir 20µl de *Protein A magnetic beads*, prèviament resuspeses. Aquesta suspensió també s'utilitzarà com a control negatiu del procediment.
- Incubar durant tota la nit a 4 °C en rotació orbital.
- Col·lectar les *Magnetic beads* (on hi haurà unit el nostre anticòs amb el complex proteïna-DNA d'interès), mitjançant un separador magnètic i descartar el sobrenedant.
- Realitzar una sèrie de rentats amb 0,5ml de diferents tampons freds de concentració creixent de sals (descrites a continuació). Incubar uns 3-5 minuts a l'orbital i seguidament separar les *Magnetics beads*. Per últim, descartar el sobrenedant i seguir amb el següent tampó.
  - 1 rentat amb *Low Salt Immune Complex Wash Buffer*
  - 1 rentat amb *High Salt Immune Complex Wash Buffer*
  - 1 rentat amb *LiCl Immune Complex Wash Buffer*
  - 1 rentat amb *TE Buffer*

### **Elució dels complexos proteïna-DNA i alliberament dels fragments de DNA**

Un cop obtinguts els complexos proteïna-DNA, s'haurà d'eluir i separar el DNA d'interès per tal de poder-lo amplificar mitjançant PCR i determinar-ne l'enriquiment.

- Resuspedre el precipitat aconseguït al pas anterior amb 100µl del *ChIP Elution Buffer*, el qual contindrà 1µl *Proteinase K*. Aquest pas l'apliquem també a l'*input* i al control negatiu.
- Incubar dues hores en agitació a 62 °C.
- Incubar 10 minuts a 95 °C i a continuació refredar les mostres fins a temperatura ambient.

- Separar les *Magnetics beads* mitjançant el separador i col·locar el sobrenedant en un nou tub per procedir amb el protocol.

### **Purificació del DNA**

La purificació del DNA per a l'optimització de la reacció de PCR, en el nostre cas, es realitzarà mitjançant un protocol de purificació de mostres que contenen SDS a partir del *NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel) i seguint les següents indicacions:

- Afegir 5 volums de tampó NTB (ja que les nostres mostres contenen SDS) per cada volum de mostra.
- Centrifugar i filtrar aquests volums mitjançant la columna *NucleoSpin® Extract II* a 11.000 rcf durant 1 minut.
- Rentar amb 700µl de tampó NT3 i a continuació centrifugar a 11.000 rcf durant 1 minut. Repetir el procediment de centrifugació per assegurar-nos que la membrana on hi ha les mostres queda lliure de tampó.
- Eluir el DNA amb 30µl de tampó NE, incubant a temperatura ambient durant un minut i finalment centrifugar a 11.000 rcf durant 1 minut.
- Quantificació del DNA mitjançant el *NanoDrop®*.

### **Reacció de PCR i quantificació de l'enriquiment**

Els paràmetres de la reacció de PCR s'hauran de comprovar empíricament. També cal dissenyar els *primers* adients per tal d'amplificar el fragment desitjat, el qual haurà estat precipitat durant el procés i comprovar-ne així el grau d'enriquiment. En el nostre cas, l'enriquiment es mesurarà per densitometria.

Per a la reacció de PCR utilitzarem la *REDTaq® DNA Polymerase* (Sigma-Aldrich®), on els volums de reactius han estat el següents:

- 2,5µl del 10x *RedTaq® PCR Reaction Buffer*
- 4µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM
- 1µl de la barreja de dNTPs 10mM
- 1,25µl de DNA polimerasa REDTaq®
- 0,25µl del *Forward primer* 100µM
- 0,25µl del *Reverse primer* 100µM
- Afegir H<sub>2</sub>O bidestil·lada fins a un volum final de 25µl

Les seqüències dels encebadors per amplificar el fragment de 126 bp desitjat (situat a la regió entre -143 i -117 parells de bases del promotor d'FGF21 de ratolí), han estat:

*Forward primer:* 5'-CATTGCATCATCCGTCCA-3'

*Reverse primer:* 5'-CCCAGAATTTATACCCAGACAGG-3'

Els paràmetres de la reacció de PCR es detallen a continuació:

- 1 Cicle: 95 °C durant 2 minuts
- 32 Cicles: 95 °C durant 30 segons  
61 °C durant 30 segons  
72 °C durant 30 segons
- 2 Cicles: 72 °C durant 10 minuts

A continuació es carregaran les mostres en un gel d'agarosa al 2% i es correran les mostres mitjançant una electroforesi a 85 V durant una hora aproximadament. Seguidament es procedirà a visualitzar les bandes, a partir d'una tinció amb *GelRed™ Nucleic Acid staining* (LabNet Biotécnica), i a una anàlisi densitomètrica mitjançant el software *Multi Gauge V3.0* (Fujifilm).

## 11. MESURA DE LES ROS INTRACEL·LULARS PER FLUORIMETRIA

Com a resultat de les activitats enzimàtiques que utilitzen oxigen, com és el cas del sistema OXPHOS en els mitocondris, es generen les espècies reactives d'oxigen (ROS). Com ja s'ha comentat en la introducció, aquestes es poden acumular a l'interior cel·lular i tenir un paper rellevant en l'estrès oxidatiu cel·lular, fet que fa interessant quantificar-les per veure'n els efectes en determinades situacions experimentals. En el nostre cas, utilitzarem el sistema *OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence)* (Cell Biolabs, Inc.), el qual es basa en la capacitat fluorogènica que té la molècula 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH) quan és oxidada per les ROS. Com a punt de partida, s'utilitza la molècula 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetat (DCFH-DA) que és capaç de penetrar la membrana plasmàtica cel·lular i, un cop dins és desacetil·lada per esterases cel·lulars, donant lloc a una molècula reduïda no fluorescent, la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), la qual és oxidada per efecte de les ROS, generant la forma fluorescent de la DCF. Així doncs, la intensitat de la fluorescència serà proporcional als nivells de ROS citosòlics.

El procediment que es segueix és el que es descriu a continuació:

- Primer de tot fa falta preparar els medis i reactius que utilitzarem en l'assaig:
  - Diluir la sonda DCFH-DA 20x al 0,1x en DMEM, sabent que necessitem 1ml/pou.
  - Preparar un banc de dilucions de DCF (inclòs en el kit) des de 0,01nM fins a 10µM (incloent un blanc) en DMEM, per tal d'obtenir la recta patró. Es necessiten 75µl/pou de cada punt, tenint en compte les repeticions que considerem necessàries.
  - Preparar una dilució de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10nM (kit) en medi DMEM, per a realitzar els tractaments dels controls positius, sabent que necessitem 1ml/pou.
  - Diluir fins a 1x el *Cell Lysis Buffer 2x* en DMEM, sabent que es necessiten 250µl/pou per a la lisi de les mostres i que necessitem dipositar 75 µl/pou en la placa on es faran les mesures. Aquí també tindrem en compte les repeticions que considerem necessàries en l'experiment, així com també els punts de la recta patró.

- Retirar el medi de creixement de les cèl·lules i rentar amb PBS 1x (2-3 vegades).
- Afegir 1ml/pou de DCFH-DA 0,1x i incubar a les fosques durant 1 hora.
- Retirar el medi de marcatge i rentar amb PBS 1x (2-3 vegades).
- Realitzar el tractament dels pous dels controls positius.
- Retirar els medis i rentar amb PBS 1x.
- Lisar les cèl·lules afegint 250µl/pou de *Cell Lysis Buffer* 1x i agitar les plaques horitzontalment durant 5 minuts.
- Dispensar 75µl/pou, en una placa de 96 pous opaca de color negre amb fons transparent, de cadascuna de les dilucions de la recta patró (duplicat) i afegir 75µl/pou de *Cell Lysis Buffer* 1x.
- Dispensar 150µl/pou de mostra i guardar a -20 °C el volum restant, per a poder quantificar posteriorment la proteïna i corregir així les mesures de ROS.
- Mesurar la fluorescència de les mostres i els punts de la recta patró mitjançant el fluorímetre de placa *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtechnologies), tenint en compte que el pic d'excitació màxim del DCF és de 485 nm i el d'emissió és de 538 nm.
- Interpolar els valors d'absorbància de les mostres en la recta patró i corregir-ho pel factor de dilució, per poder obtenir la concentració final de les mostres.

## 12. MESURA DE LA CITOTOXICITAT CEL·LULAR

El tractament dels cultius de cèl·lules musculars amb diferents compostos inhibidors de la cadena respiratòria, així com també activadors o inhibidors d'altres proteïnes, comporta certa toxicitat cel·lular, la qual podria afectar a la supervivència de les pròpies cèl·lules i conseqüentment als resultats obtinguts durant els experiments. Així doncs, per tal de poder descartar que aquests compostos, per se, puguin tenir efectes deleteris significatius sobre la viabilitat cel·lular, es va procedir a valorar aquesta toxicitat mitjançant el *kit CytoTox96® Assay* (Promega) que mesura quantitativament l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH). Aquest és un enzim citosòlic estable que s'allibera durant la lisi cel·lular. La LDH alliberada, s'acobla a una reacció, en la qual converteix una sal de tetrazoli en un producte formazan de color vermell, del qual se'n podrà mesurar l'absorbància seguint el següent protocol:

- Sembrar les cèl·lules a la densitat desitjada i tractar-les amb els compostos necessaris, amb el procediment que s'utilitza habitualment. Caldrà afegir un punt control on les cèl·lules no hagin estat tractades. Es faran triplicats per a cadascuna de les condicions.
- Finalitzat el cultiu, afegir 10µl de solució de lisi 10x per cada 100µl de medi a cadascun dels pous.
- Incubar durant 45 minuts a 37 °C.
- Centrifugar la placa a 250 rcf durant 4 minuts.
- Transferir 50µl de cada pou en una placa de 96 pous amb el fons transparent.
- Afegir 50µl de *Substrate Mix* reconstituït a cadascun dels pous de la placa.
- Cobrir la placa per protegir-la de la llum (ja que el producte és fotosensible) i incubar a temperatura ambient durant 30 minuts.
- Afegir 50µl de *Stop Solution* a cadascun dels pous.
- Seguidament, mesurar l'absorbància producte de la reacció a 490 nm.

- El càlcul de la citotoxicitat es mesura com a percentatge amb la fórmula que es presenta a continuació. En el càlcul, els diferents valors de les mitjanes de les lectures d'absorbància, se'ls hi resta el *background* de la mesura del medi de cultiu.

$$\% \text{ Citotoxicitat} = \frac{(\text{Valor experimental}) \times 100}{(\text{Valor màxim})}$$

On, el valor experimental és el valor control de cada tractament i el valor màxim, serà un punt control on es provocarà el 100% de lisi cel·lular, o sigui, on tindrem el 100% d'alliberament de LDH.

### 13. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Per tal de comprovar de manera qualitativa l'eficiència del procés de transducció, es procedirà a l'observació per microscòpia de fluorescència de les cèl·lules, sempre i quan haguem cotransfectat amb el vector adenovíric *GFP*, el qual produeix la proteïna de fusió amb *GFP*. Per a l'observació d'aquesta proteïna fluorescent utilitzarem el model de microscòpia *Leica DM IRB* (Leica Microsystems Ltd.) acoblat a una font de fluorescència (bombeta de mercuri) *ebq 100 isolated*.

### 14. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística dels diferents resultats s'ha realitzat amb el paquet estadístic *Prism 5* (GraphPad). Per a les comparacions entre 2 grups de mostres s'ha aplicat un test *t-Student* i per a les comparacions entre més de 2 grups mostrals s'ha utilitzat un test *ANOVA one-way* amb el post-test de *Tuckey* (anàlisi entre tots els grups). Per a les comparacions on intervenen 2 variables s'ha optat per a aplicar un test *ANOVA two-way* amb el post-test de *Bonferroni*, que permet la comparació, un per un, dels diferents grups.

A més a més, s'ha aplicat el *Test de Grubbs* (mètode ESD) per a trobar els valors atípics (*outliers*) de cada grup i poder-los descartar, abans d'aplicar cap test estadístic.

Al representar els nivells de significació, el número de símbols utilitzat en cada cas, 1, 2 o 3, indica  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  o  $P < 0.001$ , respectivament.



## **Resultats**

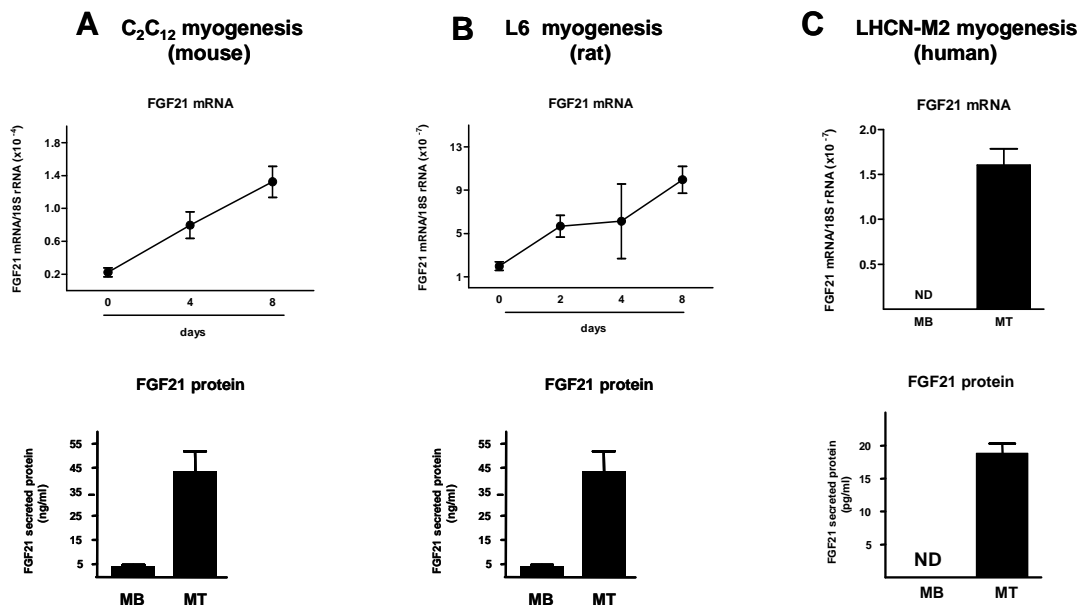




## RESULTATS

### FGF21 s'expressa i es secreta paral·lelament a la diferenciació miogènica.

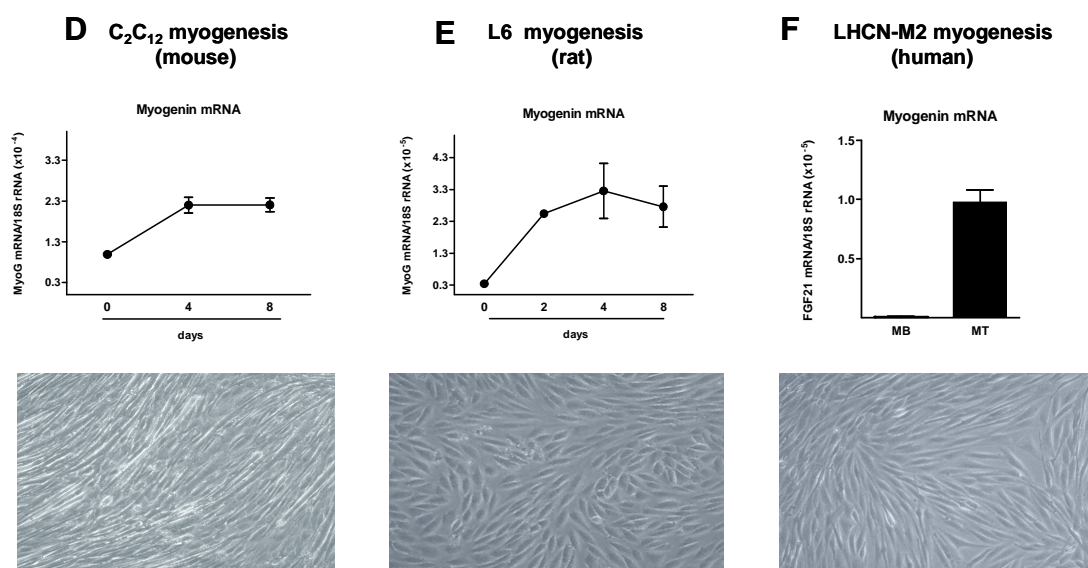
Degut a certs indicis bibliogràfics que ens mostraven que FGF21 es podia expressar al teixit muscular en determinades situacions i per tal d'assolir un major coneixement de la relació que existeix entre l'expressió del gen FGF21 i la miogènesi, es va procedir a determinar els nivells d'mRNA d'FGF21 en la línia miogènica C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, derivada de cèl·lules musculars de ratolí, durant diferents estadis del seu procés de diferenciació, des de mioblasts fins a miotubs diferenciats. Durant aquest primer *screening* es va poder constatar que als mioblasts l'expressió del gen FGF21 és pràcticament indetectable, mentre que aquesta expressió es troba fortament induïda a partir de l'inici del seu procés de diferenciació de manera molt significativa (Fig. 1A). Aquestes dades coincidien plenament amb l'adquisició d'una morfologia típicament de cèl·lula muscular diferenciada, així com amb la inducció dels marcadors coneguts de diferenciació muscular, fet que comprovem en aquest cas amb la mesura dels nivells d'mRNA de la miogenina (*myogenin*), un marcador de la miogènesi (Fig. 1D). Paral·lelament es va observar que aquests increments en els nivells d'expressió d'mRNA anaven acompanyats de la secreció i acumulació d'aquest FGF21 al medi extracel·lular de les cèl·lules en cultiu (Fig. 1A).



**Figura 1.** Nivells d'expressió de l'mRNA i de secreció d'FGF21 durant el procés de diferenciació miogènica de la línia cel·lular de ratolí C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (A), de la línia muscular L6, derivada de rata (B), i de la línia miogènica humana LHCN-M2 (C). Els punts de les gràfiques corresponen a mitjanes de tres experiments independents. MB, mioblasts; MT, miotubs; ND, no detectable. Els nivells de secreció corresponen a les concentracions d'FGF21 acumulades al medi de cultiu durant 3 dies, sigui en l'estadi de mioblast i de fins a 8 dies del cultiu durant la inducció a miotub per les línies cel·lulars C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i L6, i fins a 10 dies en el cas dels miotubs LHCN-M2.

Per tal de confirmar aquestes dades es va realitzar el mateix procediment en línies cel·lulars derivades d'una altra espècie (*Rattus norvegicus*) com les L6, on també es va poder veure un increment de l'expressió del gen FGF21 en funció del seu estat de diferenciació miogènica (Fig. 1B i 1E). Tanmateix, la magnitud de l'expressió de l'mRNA d'FGF21 en aquesta línia miogènica era bastant inferior a l'observada a les C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, fet que també es pot observar en els nivells de secreció de la proteïna al medi extracel·lular, on només va ser possible detectar-la pràcticament quan el cultiu estava ben diferenciat (Fig. 1B).

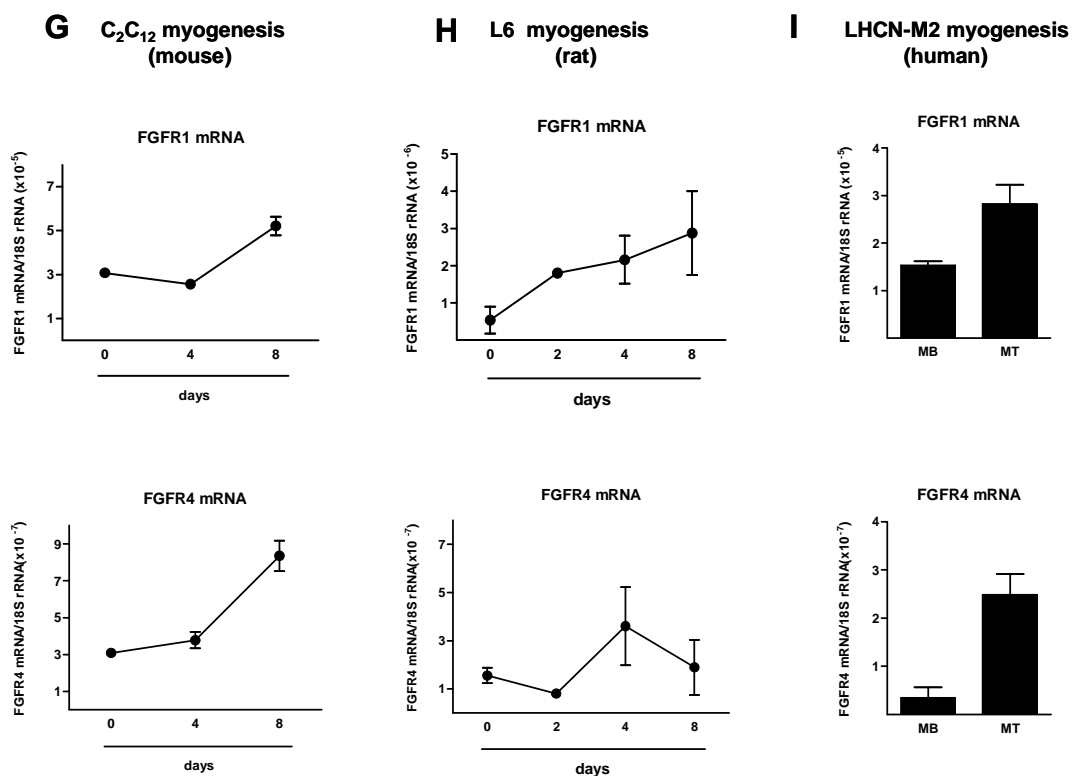
Finalment, i en vistes dels resultats observats a línies cel·lulars musculars derivades de rosegadors, es va optar per comprovar quins eren els efectes de la diferenciació miogènica sobre l'expressió i la secreció del gen FGF21 en el model cel·lular humà LHCN-M2 de diferenciació miogènica. En aquest cas, i de la mateixa manera que vèiem en les cèl·lules musculars de rosegadors, l'expressió de l'mRNA d'FGF21 només és observable en el cas d'un estadi de diferenciació miogènica complet (Fig. 1C), comprovat altre cop mitjançant la valoració dels nivells d'expressió de miogenina, el qual ens és indicatiu del grau de diferenciació que assolim (Fig. 1F). Així doncs, en el cas de les cèl·lules de la línia muscular LHCN-M2, els nivells de la proteïna FGF21 al medi extracel·lular només són detectables quan assolixen el fenotip de miotub diferenciat.



**Figura 1D, E, F.** Nivells d'expressió de l'mRNA de miogenina durant el procés de diferenciació miogènica de la línia cel·lular de ratolí C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (**D**), de la línia muscular L6, derivada de rata (**E**), i de la línia miogènica humana LHCN-M2 (**F**). Els punts de les gràfiques corresponen a mitjanes de tres experiments independents. A sota cadascuna d'elles podem veure les imatges del cultiu diferenciat. MB, mioblasts; MT, miotubs.

Els resultats anteriors van poder constatar que els nivells d'expressió d'FGF21, així com també els nivells de la proteïna secretada al medi extracel·lular incrementen durant el procés de diferenciació de mioblast a miotub, fet que ens permetia concloure que el múscul és una font d'aquesta hormona i classifica a l'FGF21 com una mioquina.

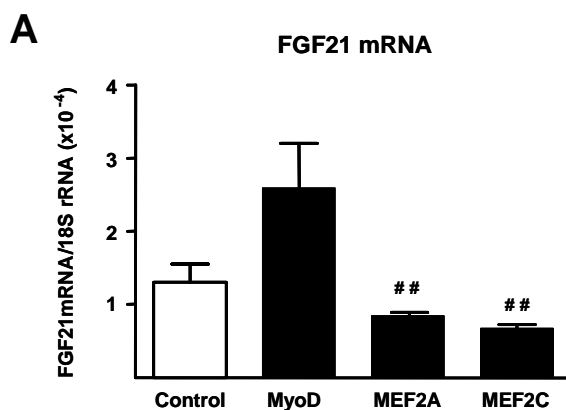
De la mateixa manera, era important saber si aquest teixit podia esdevenir un teixit diana i, per tant, si FGF21 podria actuar de manera autocrina al propi múscul. Per tal d'avançar en aquest aspecte, vam procedir a quantificar els nivells d'expressió dels principals receptors d'FGF21 (FGFR1 i FGFR4) i del seu coreceptor  $\beta$ -klotho durant el procés de diferenciació de mioblast a miotub, en els llinatges C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i L6 murins. Els resultats indicaren que contràriament al que passava amb els nivells d'expressió d'FGF21 i de miogenina durant el procés de diferenciació, no es podien detectar els nivells de coreceptor  $\beta$ -klotho, essencial per la resposta cel·lular a l'FGF21, en cap dels dos tipus cel·lulars ni en cap dels estadis de diferenciació, per més avançat que fos. Pel que fa als nivells d'expressió dels seus receptors FGFR1 i FGFR4 es va poder observar que aquests s'expressaven feblement, en un rang de  $10^{-5}$  i  $10^{-7}$  CTs respectivament, dins les condicions estàndards de RT-PCR emprades (vegeu Metodologia), de forma bàsicament constant, tot i que s'aprecia una lleugera tendència a incrementar els seus valors a mesura que avança el seu procés de diferenciació (Fig. 1G). Bàsicament, es van obtenir els mateixos resultats a les cèl·lules L6 i a les LHCN-M2 humanes: una expressió indetectable de  $\beta$ -klotho i una moderada tendència a la inducció de l'mRNA d'FGFR1 i de l'mRNA d'FGFR4 al llarg de la diferenciació de mioblast a miotub, tot i que en un rang de CTs inferior ( $10^{-6}/10^{-5}$  i  $10^{-7}$  per FGFR1 i FGFR4 respectivament) al de les cèl·lules murines C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Fig. 1H i 1I).



**Figura 1G, H, I.** Perfil d'expressió dels receptors FGFR1 i FGFR4 segons el *time-course* (d0-d8) de diferenciació dels mioblasts a miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (G). Perfil d'expressió dels receptors FGFR1 i FGFR4 segons el *time-course* (d0-d8) de diferenciació dels mioblasts a miotubs L6 (H). Perfil d'expressió dels receptors FGFR1 i FGFR4 segons siguin en l'estat de diferenciació de mioblasts o de miotubs humans LHCN-M2 (I). Els punts de les gràfiques corresponen a les mitjanes de tres experiments independents.

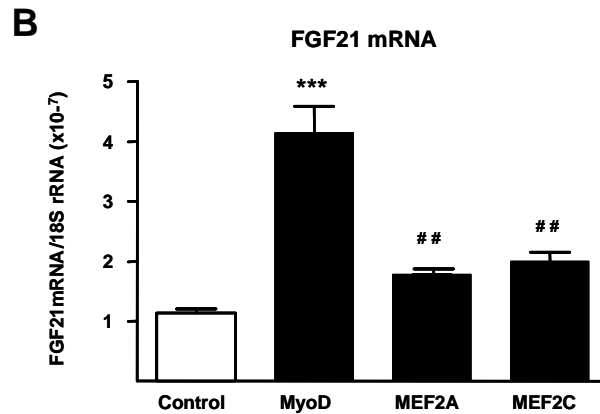
### MyoD controla l'expressió i la secreció d'FGF21 a les cèl·lules miogèniques.

Una vegada comprovada l'associació entre els nivells d'expressió i de secreció d'FGF21 i el grau de diferenciació miogènica a diferents llinatges musculars, ens vam disposar a determinar quins podrien ser els factors miogènics implicats en el control de l'expressió d'aquest FGF21. Així doncs, en una primera aproximació es van determinar els efectes d'alguns factors miogènics com ara el MyoD i altres subtipus de MEF2s sobre l'expressió del gen FGF21 en aquest context cel·lular. Els resultats d'aquests experiments mostraven que la sobreexpressió de MEF2A i MEF2C no provocaven cap canvi significatiu sobre els nivells d'inducció de l'expressió d'FGF21, mentre que la sobreexpressió de MyoD causava un petit increment en la inducció de l'expressió de l'mRNA d'FGF21 a miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Fig. 2A). Tot i que aquest increment no era significatiu respecte els controls, sí que era significatiu respecte els resultats que s'obtenien en sobreexpressar els diferents subtipus de MEF2s a aquests miotubs.



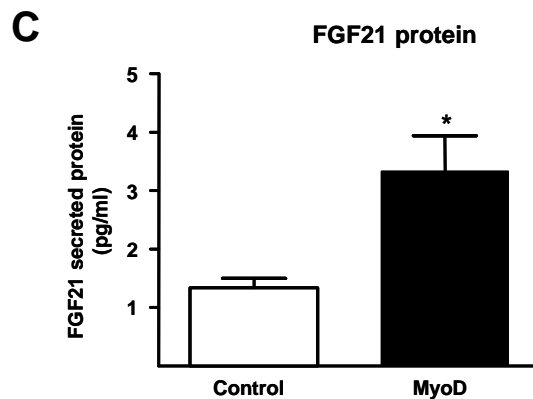
**Figura 2A.** Miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb els adenovirus MyoD, MEF2A, MEF2C o GFP (control). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes ± SEM de quatre experiments independents, on ##p<0.01 respecte MyoD.

Per anar més enllà i intentar obtenir resultats més contundents en la valoració dels efectes de MyoD, vam decidir fer estudis similars amb la línia cel·lular L6 ja que se sap que posseeixen una mínima expressió de MyoD endogen (Solanes et al., 2003), així com també que són especialment útils per fer aquestes aproximacions de guany de funció, fet que ens permetia valorar la regulació dependent de MyoD (Amat et al., 2009). Els resultats de la sobreexpressió de MyoD en miotubs L6 tenen com a conseqüència una inducció significativa de l'expressió de l'mRNA d'FGF21, mentre que ni MEF2A ni MEF2C causen cap tipus d'increment significatiu respecte els controls. Tot i això, aquesta diferència sí que es pot apreciar respecte el factor miogènec MyoD (Fig. 2B).



**Figura 2B.** Miotubs L6 transduïts amb els adenovirus MyoD, MEF2A, MEF2C o GFP (control). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de quatre experiments independents, on la significança estadística serà \*\*\* $p < 0.001$  respecte el control i ## $p < 0.01$  per MEF2A i MEF2C respecte MyoD.

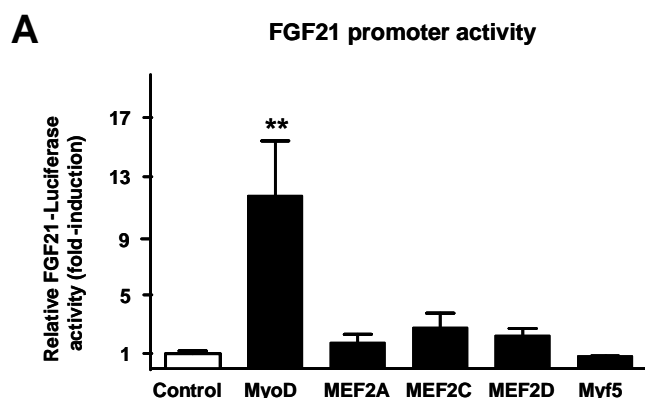
A més a més, la inducció dels nivells d'mRNA d'FGF21 vist en aquest tipus cel·lular per efectes de la sobreexpressió de MyoD, també es tradueixen en un increment de la secreció de la proteïna FGF21 al medi extracel·lular respecte els controls basals (Fig. 2C).



**Figura 2C.** Nivells de proteïna FGF21 a un cultiu de miotubs L6, 24h després de la transducció amb un adenovirus MyoD o GFP (control). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de quatre experiments independents, sent \* $p < 0.05$  respecte el control.

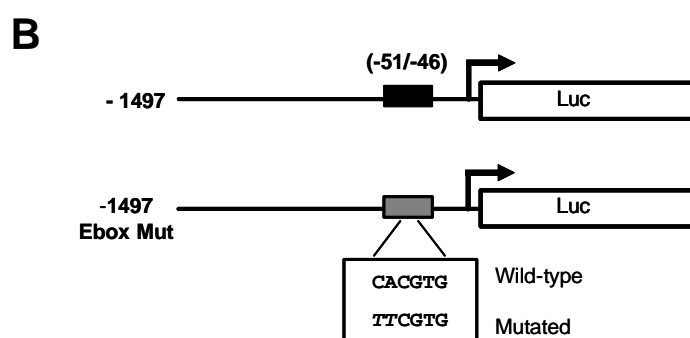
Intentant anar una mica més enllà per tal d'esbrinar les bases moleculars de la regulació transcripcional d'FGF21 vehiculada per MyoD, es va analitzar la capacitat d'aquest per regular la transcripció del gen FGF21. Per tal de dur-ho a terme, en mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, es va cotransfectar una construcció en què l'activitat de la luciferasa és dirigida pel promotor d'FGF21 de ratolí (*Mus musculus*) (-1497-FGF21-Luc) amb presència del vector d'expressió MyoD. Vàrem observar que MyoD donava lloc a un fort increment de l'activitat d'aquest promotor (Fig. 3A). Tanmateix, la cotransfecció del constructe dirigit pel promotor FGF21 juntament amb altres factors de transcripció

miogènics com ara MEF2A, MEF2C, MEF2D o Myf5, no causava cap increment significatiu sobre l'activitat del promotor.



**Figura 3A.** Efectes dels diferents factors de transcripció miogènics MyoD, MEF2A, MEF2C, MEF2D i Myf5 sobre l'activitat del promotor d'FGF21 (-1497-FGF21-Luc) a mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de cinc experiments independents, sent \*\* $p < 0.01$  respecte el control.

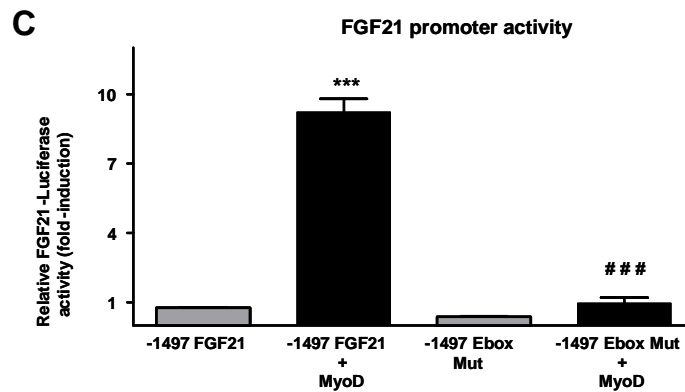
Paral·lelament, vam fer les anàlisis informàtiques, mitjançant el paquet informàtic *MatInspector* (Genomatix), de la seqüència del promotor d'FGF21 amb les quals vam analitzar possibles regions reguladores d'aquest gen, fet que ens van revelar la presència d'un possible lloc Ebox (*Enhancer box*), a la regió -51/-46 del promotor, compatible com a lloc d'unió i resposta per part de MyoD. Així doncs, es va procedir a la disrupció d'aquest lloc en la regió proximal de la construcció del promotor d'FGF21 mitjançant una mutagènesi dirigida (veure Metodologia) (Fig. 3B).



**Figura 3B.** Esquema representatiu del promotor FGF21 de ratolí, on s'hi indica la seqüència *Wild-type* (-1497-FGF21-Luc) i la forma mutada (-1497-Ebox Mut). Les bases mutades apareixen en cursiva.

Els experiments de cotransfecció realitzats a partir de la comparació de la forma original del promotor (-1497-FGF21-Luc) i la nova forma mutada (-1497-Ebox Mut-Luc), mitjançant la presència o no del factor miogènic MyoD, van indicar-nos que aquesta mutació provocava una disminució significativa i molt marcada de la resposta del promotor FGF21 a MyoD (Fig. 3C), indicant que aquest lloc Ebox de la zona

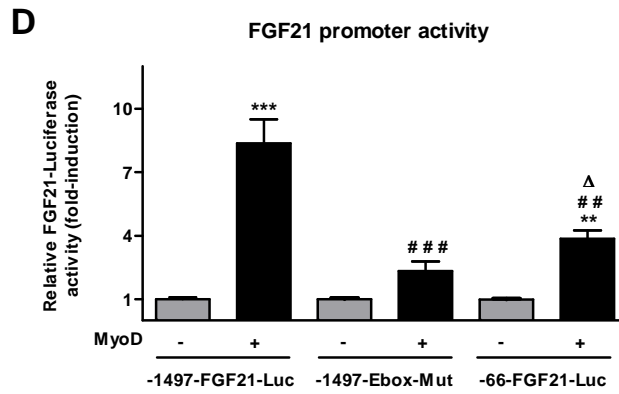
proximal del promotor d'FGF21 vehicula bona part de la resposta del gen FGF21 a MyoD.



**Figura 3C.** Dades relatives d'activitat luciferasa de la construcció del promotor FGF21 *Wild-type* (-1497-FGF21-Luc) i la construcció mutada (-1497-Ebox Mut-Luc) a mioblats C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i cotransfectats amb MyoD. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, on \*\*\* $p < 0.001$  per les cèl·lules cotransfectades amb MyoD respecte els controls i ### $p < 0.001$  per la forma *wild-type* respecte la construcció mutada Ebox.

Per tal de comprovar que efectivament aquesta regió Ebox més proximal regula bona part de la resposta d'FGF21 al factor miogènic MyoD es va procedir a obtenir, per clonació (vegeu Metodologia), una construcció del promotor FGF21 la qual només disposa de la regió -66/+5 de la zona proximal (-66-FGF21-Luc). Així doncs, a mioblats C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> es van dur a terme i en paral·lel experiments de cotransfecció de les tres formes del promotor de les quals disposaven, en presència o no del factor MyoD.

Els resultats mostren la forta davallada de la inducció d'activitat del promotor a la forma mutada (vist també anteriorment, Fig. 3C). Pel que fa a la construcció la qual posseeix únicament la regió proximal, també podem observar una disminució de l'activitat del promotor quan cotransfectem en presència del factor miogènic MyoD respecte al que veiem en la forma *Wild-type*. De totes maneres, la seva activitat es troba incrementada significativament en comparació amb la forma mutada, fet que ens reforça la importància de la regió Ebox en la modulació de l'activitat del promotor FGF21 en resposta a MyoD (Fig. 3D). A part, aquestes dades també ens suggereixen la presència d'altres llocs putatius d'unió a MyoD en la zona més distal del promotor (ja que l'activitat no es perd completament), així com també apunta a la possibilitat que existeixin altres elements reguladors que interaccionin en aquesta regió i que en modulin l'activitat.

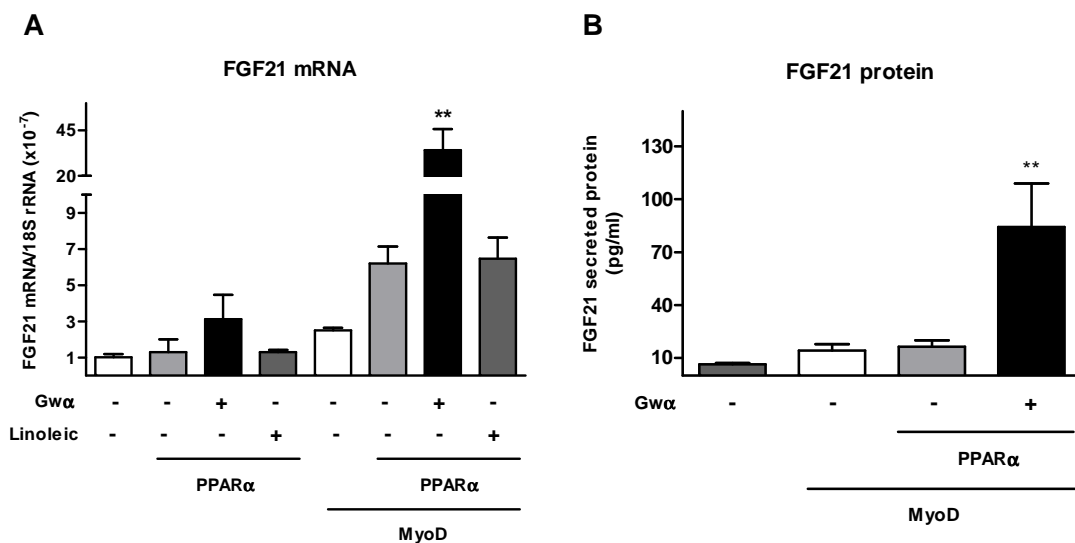


**Figura 3D.** Dades relatives d'activitat luciferasa de la construcció del promotor FGF21 *Wild-type* (-1497-FGF21-Luc), la construcció mutada (-1497-Ebox Mut-Luc) i el constructe de la regió -66/+5 (-66-FGF21-Luc) a mioblats C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i en presència o no de MyoD. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, on la significança estadística és \*\*\* $p$ <0.001 per les cèl·lules cotransfectades amb MyoD respecte els controls i sent ### $p$ <0.001 i ## $p$ <0.01 per la forma *Wild-type* en presència de MyoD respecte les altres construccions i  $\Delta$  $p$ <0.05 respecte la construcció mutada Ebox.



## Efectes dels PPARs, els seus activadors i MyoD sobre el gen FGF21.

Segons la bibliografia i dades prèvies del nostre laboratori, en certs teixits, es coneix que diferents agonistes de PPARs, especialment PPAR $\alpha$ , són capaços de regular l'expressió del propi gen FGF21 (veure Introducció). Mitjançant la utilització de miotubs L6 de rata diferenciats vam determinar les repercussions de la sobreexpressió de MyoD i de PPAR $\alpha$  per tal de veure els possibles efectes inductors sobre l'expressió del gen FGF21, amb i sense la presència dels seus agonistes (lligands naturals i sintètics), fet que vam complementar amb la mesura dels nivells de secreció d'aquesta hormona al medi de cultiu.

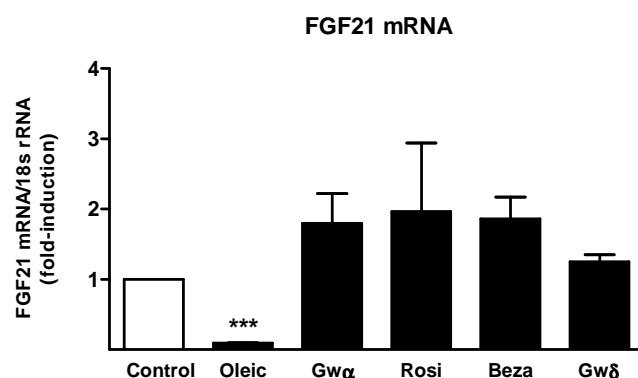


**Figura 4.** (A) Perfil d'expressió d'FGF21 a miotubs L6, infectats o no amb els adenovirus MyoD i PPAR $\alpha$  i amb la presència o no d'activadors de PPAR $\alpha$  naturals (àcid linoleic 150 $\mu$ M) i sintètics (Gw $\alpha$  1 $\mu$ M). (B) Dades de secreció d'FGF21 al medi de cultiu en funció dels tractaments. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, on \*\* $p < 0.01$  respecte els controls.

Hem vist que l'expressió del gen FGF21 està augmentada considerablement per la sobreexpressió conjunta de MyoD i PPAR $\alpha$ , mentre que la sobreexpressió solsament de PPAR $\alpha$  i del seu activador (conjuntament) tenien un efecte inductor moderat. Observem però, que els nivells màxims d'expressió del gen FGF21 s'assoleixen amb la presència conjunta de MyoD i de PPAR $\alpha$  més l'activador sintètic de PPAR $\alpha$ , Gw $\alpha$  (Gw7647) (Fig. 4A). També veiem que en aquestes condicions es dona un màxim en l'alliberament de la proteïna FGF21 al medi per part dels miotubs (Fig. 4B). Per contra, la presència de l'àcid linoleic per si sol, un potencial activador natural de PPAR $\alpha$ , sembla ser que no té efecte sobre el gen FGF21 a les cèl·lules musculars (Fig. 4A).

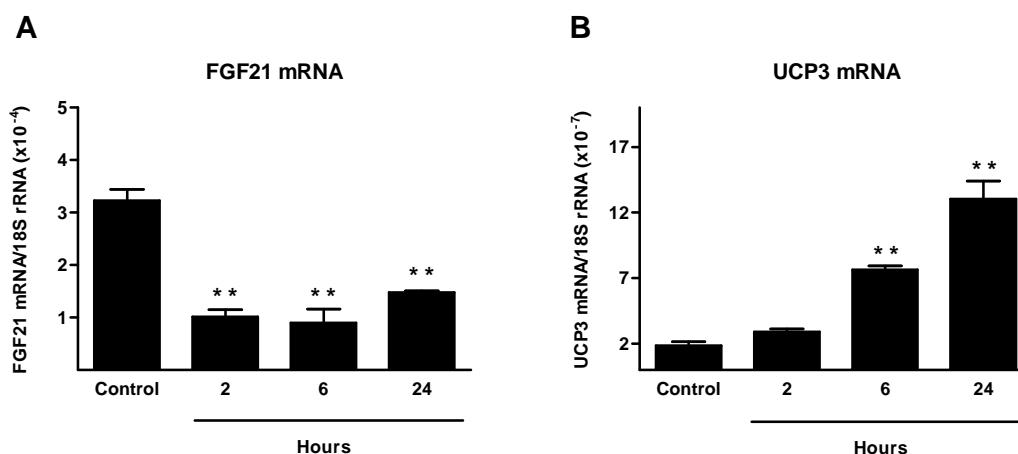
Paral·lelament, es van sotmetre miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a tota una sèrie de tractaments amb activadors naturals dels PPARs com ara l'àcid oleic i d'altres agonistes sintètics per tal de veure els seus efectes sobre l'expressió de l'FGF21 endogen (Fig. 5). Un cop analitzats els resultats es va poder comprovar que els tractaments dels miotubs

amb els agonistes sintètics de PPAR $\alpha$  (Gw $\alpha$ ), de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona), de PPAR $\delta$  (Gw $\delta$ ) i fins i tot un activador de PPARs poc selectiu, com és el cas del Bezafibrat, tenen efectes similars i poc significatius sobre la inducció de l'expressió d'FGF21 per si sols. El més sorprenent però, va ser comprovar que el tractament amb l'àcid oleic no només no donava cap resultat positiu, sinó que per al contrari vam poder observar una forta repressió en l'expressió del gen en resposta a aquest tractament.



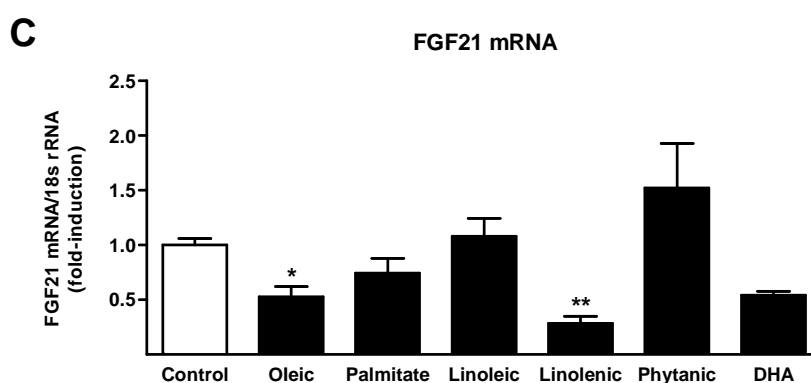
**Figura 5.** Perfil d'expressió d'FGF21 a miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> tractats amb activadors naturals dels PPARs com ara l'àcid oleic (500 $\mu$ M) i activadors sintètics com Gw $\alpha$  (1 $\mu$ M), Rosiglitazona (Rosi) (10 $\mu$ M), Bezafibrat (Beza) (100 $\mu$ M) i Gw $\delta$  (10 $\mu$ M). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents.

Així doncs, en un intent d'aprofundir en els efectes dels àcids grassos com a mitjancers naturals de la via de regulació detectada del gen FGF21 per part de PPAR $\alpha$  i els seus activadors farmacològics a cèl·lules musculars, vàrem voler determinar els efectes de l'àcid oleic en aquest context. Tanmateix, degut a resultats anteriors negatius, es va decidir realitzar un experiment de *time-course* per poder determinar si els seus efectes es donaven en un temps més curt. Malgrat que esperàvem obtenir certs resultats positius, no vàrem observar cap efecte inductor de l'àcid oleic sobre el gen FGF21 a miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, ni a temps curts (2 hores) ni a temps més llargs (24 hores) de tractament. De fet, vam poder comprovar que l'àcid oleic reprimeix l'expressió de l'mRNA d'FGF21. Tanmateix, per tal de comprovar la fiabilitat de l'experiment es va validar que el gen UCP3, un control positiu de la resposta a l'àcid oleic (Weigle et., 1998; Brun et al., 1999), responia de forma positiva al tractament amb àcid oleic en el mateix experiment (vegeu Fig. 6).



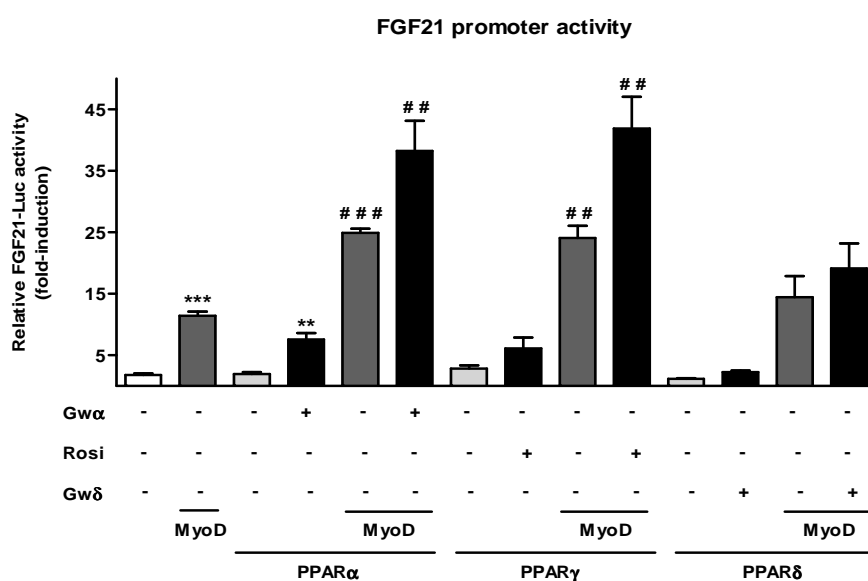
**Figura 6.** Time-course del perfil d'expressió d'FGF21 (A) i UCP3 (B) a miotubs  $C_2C_{12}$ , en resposta al tractament amb l'àcid oleic ( $500\mu\text{M}$ ) a diferents temps; 2, 6 i 24 hores. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, on la significança estadística és  $**p < 0.01$  respecte els controls.

Per complementar aquests estudis de regulació de l'expressió d'FGF21 en resposta a agonistes naturals de PPARs en aquest llinatge cel·lular, es van fer tractaments amb diversos àcids grassos amb característiques diferents com són els àcids palmític, linoleic, linolènic, fitànic i docosahexaènic (Fig. 6C). En tots ells però, els resultats obtinguts van ser negatius malgrat que es mostraven sensibles a la inducció del gen UCP3.



**Figura 6C.** Perfil d'expressió d'FGF21 a miotubs  $C_2C_{12}$ , en resposta al tractament amb àcid oleic ( $500\mu\text{M}$ ), àcid palmític ( $150\mu\text{M}$ ), àcid linoleic ( $150\mu\text{M}$ ), àcid linolènic ( $150\mu\text{M}$ ), àcid fitànic ( $150\mu\text{M}$ ) i àcid docosahexaènic (DHA) ( $150\mu\text{M}$ ) durant 24 hores. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres o més experiments independents. La significança estadística està representada per  $*p < 0.05$  i  $**p < 0.01$  respecte el control.

Dins del nostre afany per identificar els factors hormonals i metabòlics que controlen l'expressió i l'alliberament d'FGF21 en un context muscular i degut als antecedents experimentals de què disposàvem sobre la regulació d'FGF21 en altres teixits, com per exemple al fetge, ens vam disposar a analitzar més profundament el possible paper de PPAR $\alpha$  i altres PPARs sobre la regulació transcripcional del gen FGF21. Amb aquesta finalitat vàrem determinar els efectes de la cotransfecció amb vectors d'expressió dels 3 subtipus de PPARs i els seus activadors específics sobre l'activitat del promotor d'FGF21. En estudis previs havíem observat que, a cèl·lules musculars, els PPARs sovint interactuaven amb el factor miogènic MyoD per tal de regular gens diana (per exemple, als promotors UCP3 i PGC-1 $\alpha$ ) (Solanes et al., 2003). Per tant, vàrem incloure en el disseny experimental els possibles efectes de la cotransfecció amb el vector d'expressió de MyoD.

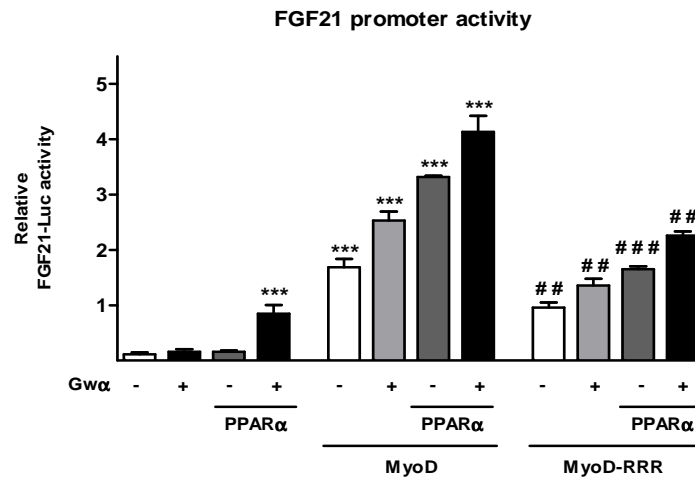


**Figura 7.** Representació de l'activitat del promotor -1497 FGF21-Luc a mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en presència de diferents PPARs cotransfectats i del factor miogènic MyoD. Els mioblasts han estat tractats amb els activadors corresponents; Gw $\alpha$  (Gw7647) (1 $\mu$ M), Rosiglitazona (Rosi) (10 $\mu$ M) i Gw $\delta$  (Gw501516) (10 $\mu$ M) durant 24 hores. Les dades s'han obtingut a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de quatre experiments independents, on la significança estadística està representada per \*\* $p$ <0.01 i \*\*\* $p$ <0.001 respecte el control, i ## $p$ <0.01 i ### $p$ <0.001 respecte MyoD.

Els resultats indicaven que cap dels activadors dels tres tipus de PPARs induïa significativament l'activitat del promotor d'FGF21 en presència dels PPARs corresponents cotransfectats, els quals, tampoc tenien efectes per si sols. No obstant, la presència dels receptors nuclears PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , juntament amb els seus activadors, afavoria clarament l'activitat del promotor quan l'experiment es feia en presència del vector d'expressió MyoD cotransfectat. Pel contrari, l'activador sintètic de PPAR $\delta$  no tenia efecte en cap cas.

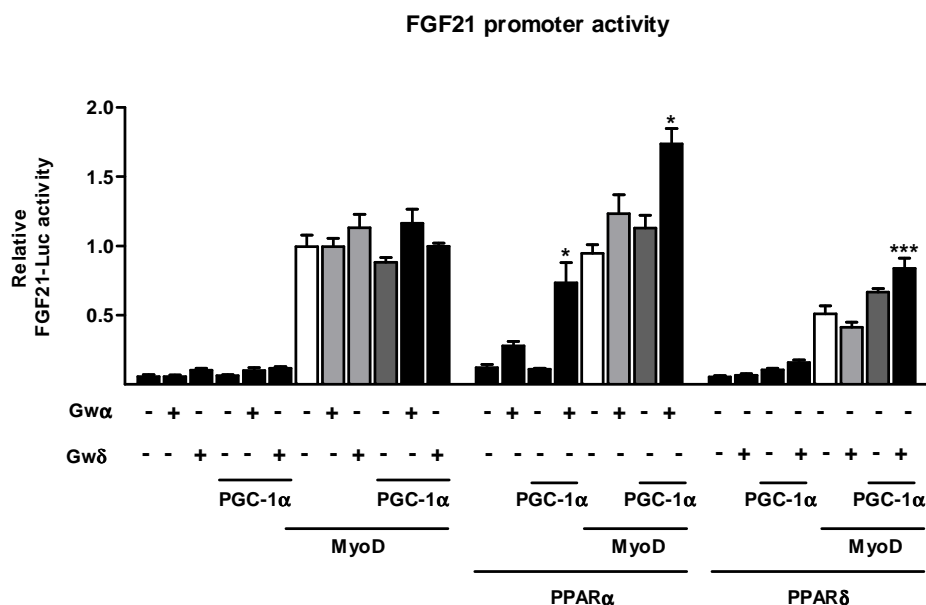
En aquesta línia, intentant aclarir la importància que té MyoD en la regulació de l'expressió d'FGF21, en presència de PPAR $\alpha$  (el qual s'ha presentat com el més essencial en la regulació del gen en el context muscular) i el seu activador, es va realitzar un experiment on es va utilitzar una forma mutada de MyoD, no acetilable

(MyoD-RRR), i, per tant, menys activa. Els resultats demostraven la importància del factor miogènic MyoD en la modulació de l'expressió d'FGF21 ja que la forma mutada, tot i presentar certa activitat, mostrava una forta davallada respecte la forma *Wild-type*.



**Figura 8.** Representació de l'activitat del promotor -1497 FGF21-Luc a mioblasts  $C_2C_{12}$  en presència de les contranfeccions amb PPAR $\alpha$ , el factor miogènic MyoD i la seva forma mutada; MyoD-RRR. Els mioblasts han estat tractats amb l'activador Gw $\alpha$  (Gw7647) (1 $\mu$ M). Les dades s'han obtingut a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, sent \*\*\*p<0.001 respecte el control, i ##p<0.01 i ###p<0.001 respecte els punts contranfectats amb el vector d'expressió MyoD.

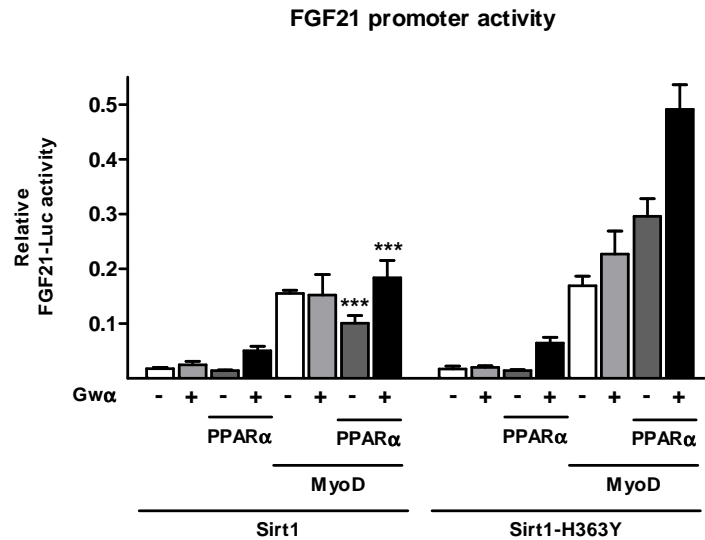
D'altra banda, es coneix que en determinats contextos existeix una coactivació de la resposta a PPAR $\alpha$  per acció de PGC-1 $\alpha$  (Russell et al., 2003; Russell, 2005) en gens clau del metabolisme energètic muscular, fet que també es va voler comprovar per FGF21. Així doncs, per intentar comprendre les bases moleculars d'aquesta regulació es va voler analitzar la capacitat de PGC-1 $\alpha$  per controlar l'expressió del gen FGF21, en presència o no d'altres factors ja descrits i els quals havíem vist que estaven implicats en la seva regulació com són els PPARs i el factor miogènic MyoD. La cotransfecció d'aquests vectors d'expressió es va fer a un cultiu de mioblasts  $C_2C_{12}$  els quals van ser tractats o no amb els activadors corresponents.



**Figura 9.** Representació de l'activitat del promotor -1497 FGF21-Luc a mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cotransfectats en presència de PGC-1α en combinació amb el factor miogènic MyoD, PPARα, PPARδ, i els activadors corresponents Gwα (Gw7647) (1μM) i Gwδ (Gw501516) (10μM) durant 24 hores. Les dades s'han obtingut a partir de les mitjanes ± SEM de tres experiments independents, on \*p<0.05 i \*\*\*p<0.001 pels punts que contenen PGC-1α respecte els seus controls.

Els resultats van permetre concloure que PGC-1α era capaç de coactivar l'expressió d'FGF21 en presència del receptor PPARα i del seu activador, en un context de presència de MyoD, fet que es reproduïa en el cas de PPARδ, tot i que en uns nivells molt inferiors.

Seguint amb la cerca d'altres possibles factors reguladors de l'expressió d'FGF21 en un context muscular i valorant resultats previs del nostre grup, que suggerien que Sirt1 podia actuar com a inhibidor de l'expressió d'FGF21 (en experiments de sobreexpressió de Sirt1 en cèl·lules musculars), es va decidir analitzar els seus possibles efectes a nivell de la regulació transcripcional. Així doncs, es van cotransfectar mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en presència del vector d'expressió Sirt1, així com també amb una forma mutada d'aquest; Sirt1-H363Y (la qual ha perdut la seva capacitat desacetilasa, i és emprat com a control dels efectes de Sirt1) i en presència o absència de MyoD, de PPARα i del seu activador específic, tot plegat amb l'objectiu de veure els efectes sobre l'activitat del promotor d'FGF21.



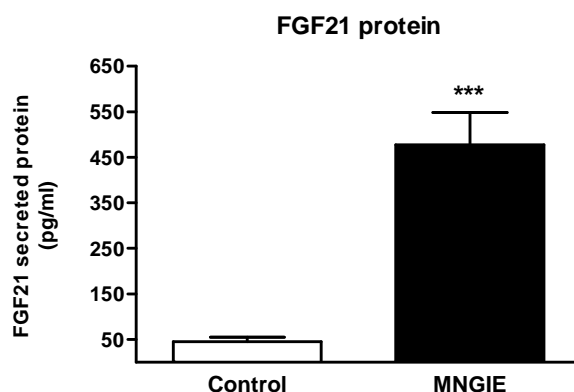
**Figura 10.** Representació de l'activitat del promotor -1497 FGF21-Luc a mioblasts  $C_2C_{12}$  cotransfectats en presència de Sirt1 i Sirt1-H363Y (forma mutant sense activitat desacetilasa), el factor miogènic MyoD, PPAR $\alpha$  i el seu activador Gw $\alpha$  (Gw7647) (1 $\mu$ M) durant 24 hores. Les dades s'han obtingut a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, sent \*\*\* $p < 0.001$  pels punts que contenen Sirt1 respecte els que contenen Sirt1-H363Y (control).

Els resultats d'aquests experiments permetien observar que en un context muscular, el promotor del gen FGF21 es comporta com ja hem descrit prèviament: es troba moderadament induït per PPAR $\alpha$  i el seu activador, respon potentment a MyoD, i la màxima expressió es dona amb la combinació MyoD + PPAR $\alpha$  + lligand. Per contra, el vector Sirt1 funcional, contenint activitat desacetilasa, tot i no bloquejar els efectes de MyoD tot sol, bloqueja la capacitat d'inducció del promotor d'FGF21 per l'acció de PPAR $\alpha$  i del seu activador en presència de MyoD.

### Indicis de regulació mitocondrial d'FGF21 al múscul. Pacients amb patologia mitocondrial d'origen mitocondrial exhibeixen nivells elevats d'FGF21 circulant.

Diversos indicis bibliogràfics mostraven que pacients que patien alguna miopatia associada a alteracions del DNA mitocondrial, mostraven la presència d'alts nivells d'FGF21 circulants (Suomalainen et al., 2011). A partir d'aquí i degut al fet que disposàvem de mostres de sèrum de pacients els quals patien la patologia MNGIE (*Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy*), gràcies a una col·laboració amb el grup dels Drs. Antoni Andreu i Ramon Martí (Hospital Vall d'Hebron), ens vam disposar a comprovar els nivells d'FGF21 circulants d'aquests individus. A diferència de les malalties mitocondrials causades per mutacions al mtDNA, la patologia MNGIE és deguda a mutacions al gen TYMP, el qual codifica per la timidina fosforilasa, fet que inhibeixen la seva activitat. Això fa que degut a un desequilibri en el *pool* mitocondrial de desoxinucleòtids es provoquin mutacions al mtDNA per potenciació d'errors en la seva replicació, alterant-se conseqüentment la seva funcionalitat.

Els resultats ens confirmen que aquests pacients, posseïdors d'una disfunció a nivell de la cadena respiratòria mitocondrial, presenten nivells molt augmentats d'FGF21 circulant, fet que ve a confirmar la correlació positiva trobada pel grup de Suomalainen entre la disfunció mitocondrial i els nivells de proteïna FGF21 al plasma.



**Figura 11.** Nivells d'FGF21 al plasma de pacients amb patologia MNGIE vs. pacients control. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes de tretze pacients, sent \*\*\* $p < 0.001$  respecte els controls.

### La inducció d'una disfunció mitocondrial de forma experimental, incrementa l'expressió i la secreció d'FGF21 a les cèl·lules musculars.

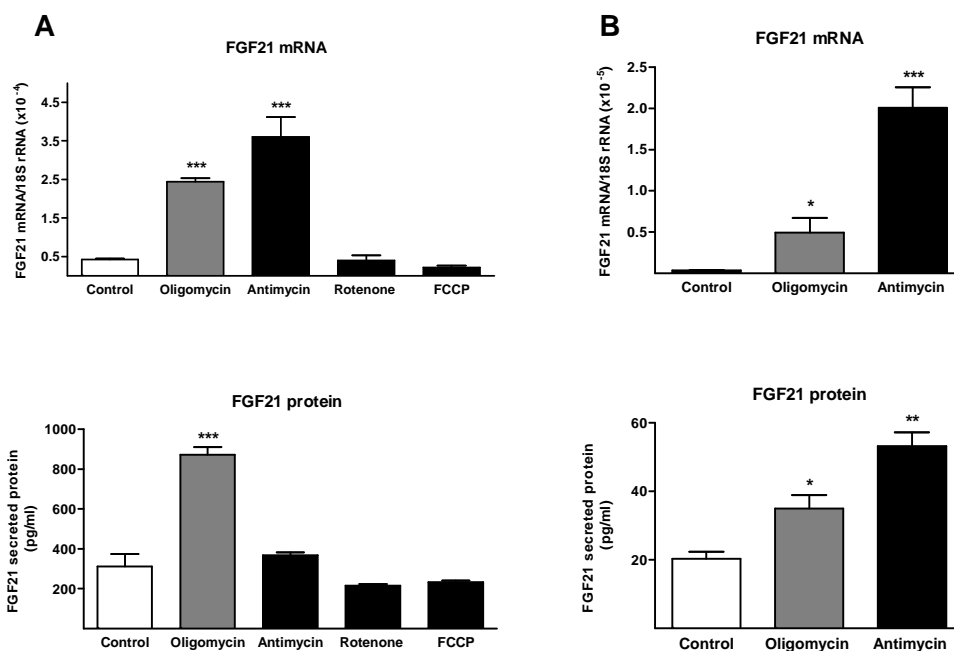
Tal i com ja s'ha descrit anteriorment a la bibliografia i com hem pogut comprovar amb les dades provinents de pacients MNGIE, les disfuncions mitocondrials tenen una clara correlació amb els nivells d'FGF21 circulant. A partir d'aquestes dades vam intentar determinar si les disfuncions a nivell mitocondrial afectaven l'expressió del gen FGF21 en el context de la cèl·lula muscular. Així doncs, amb aquest objectiu en ment es va procedir a tractar miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb diversos fàrmacs, que actuen a diferents nivells de la cadena respiratòria/sistema de fosforilació oxidativa, esperant veure els seus efectes sobre el gen FGF21. Cal destacar que aquests fàrmacs s'han



utilitzat a concentracions que no causaven una citotoxicitat significativa, fet que es va determinar mitjançant una dosi resposta de citotoxicitat (veure Metodologia).

Com a resultat dels nostres experiments es va observar que el tractament amb l'oligomicina (0.1 $\mu$ M), un inhibidor de l'ATP sintasa, així com també amb l'antimicina A (10 $\mu$ M), un inhibidor del complex III de la cadena respiratòria, provocaven una inducció molt significativa de l'expressió del gen FGF21 (Fig. 12A superior). Pel que fa als nivells de proteïna secretada, l'oligomicina provocava un increment bastant significatiu de l'alliberació d'aquesta hormona al medi, fet que no es reproduïa en la mateixa magnitud en el cas de l'antimicina A, on es veu que aquest fàrmac provoca una alliberació d'FGF21 molt més minsa al medi extracel·lular (Fig. 12A inferior). De la mateixa manera, el tractament amb rotenona (0.2 $\mu$ M), un inhibidor del complex I, o de FCCP (1 $\mu$ M), un desacoblador de la cadena respiratòria, no provocaven cap tipus d'alteració pel que fa a l'expressió del gen, així com tampoc en variaven els nivells de proteïna excretada.

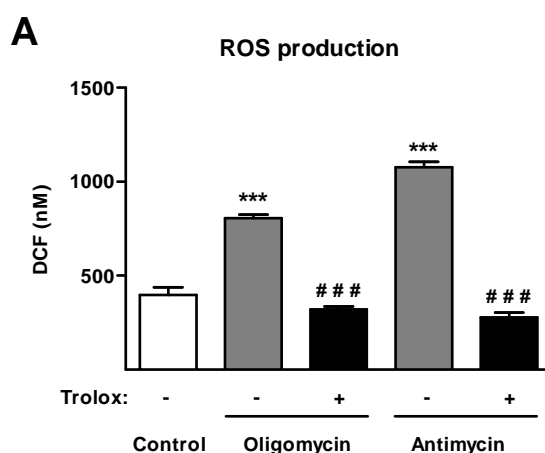
En paral·lel, també es van fer experiments per determinar els efectes de l'oligomicina i l'antimicina A en el model de miotubs humans LHCN-M2 (Fig. 12B). En aquests es van observar resultats similars als de les cèl·lules miogèniques de ratolí, on la oligomicina i l'antimicina A provocaven un increment significatiu de l'expressió de l'mRNA d'FGF21 a les cèl·lules LHCN-M2, acompanyat en ambdós casos d'un increment de la secreció de la proteïna al medi extracel·lular. En aquest cas però, la secreció per efectes de l'antimicina A és molt superior a la detectable pel tractament amb l'oligomicina.



**Figura 12.** Nivells d'expressió d'mRNA d'FGF21 i de secreció de la proteïna al medi de cultiu 24h després del tractament de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (A) i als miotubs LHCN-M2 (B), amb oligomicina (0.1 $\mu$ M), antimicina A (10 $\mu$ M), rotenona (0.2 $\mu$ M) i FCCP (1 $\mu$ M). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de quatre experiments independents, on la significança és representada per \*p<0.05, \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001 respecte els controls.

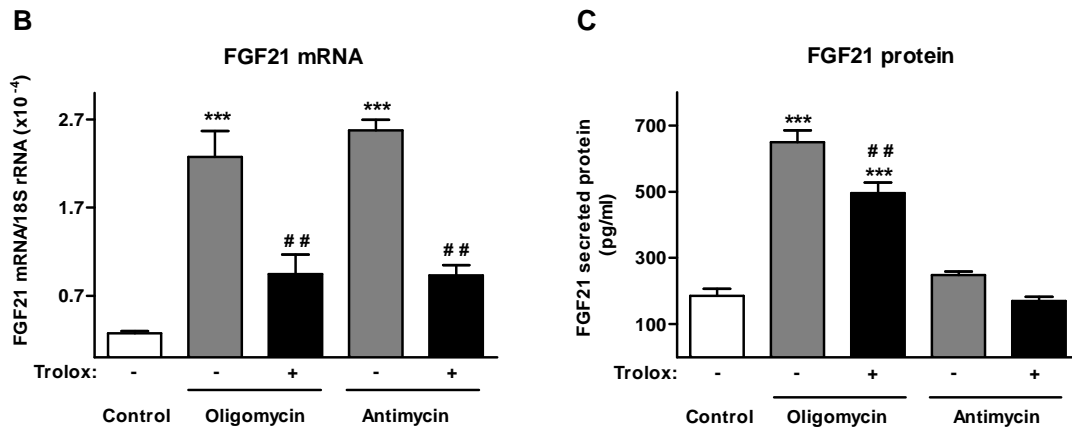
### Les espècies reactives d'oxigen estan implicades en la inducció de l'expressió i la secreció d'FGF21 en resposta a les alteracions mitocondrials en el context d'una cèl·lula muscular.

Si bé ja es coneixia que l'oligomicina i l'antimicina A eren capaces d'induir la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) d'origen mitocondrial (Camara et al., 2005), vàrem comprovar aquest efecte en el nostre sistema de cultiu i segons diferents dosis de tractament i, efectivament, vàrem poder observar la inducció de les ROS esperada (Fig. 13A). Seguidament vam voler esbrinar si un *scavenger* de les ROS podria influir en la capacitat que tenien aquests fàrmacs a l'hora d'induir l'expressió del gen FGF21 en un cultiu de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Per tal de testar aquesta hipòtesi es va utilitzar un compost anomenat Trolox, una forma soluble de la vitamina E, el qual és capaç de segrestar les ROS.



**Figura 13A.** Nivells de ROS presents al medi de cultius de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> després del tractament durant 24h amb oligomicina (0.1μM) i antimicina A (10μM), en presència o absència de Trolox (2mM). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes ± SEM de quatre experiments independents, sent \*\*\*p<0.001 respecte el control i ###p<0.001 respecte els tractaments amb oligomicina i antimicina A.

Així doncs, en un cultiu de miotubs podem veure els efectes inductors de l'expressió de l'mRNA d'FGF21 per acció de l'oligomicina i l'antimicina A (ja descrit a figures anteriors), fet que es veu clarament disminuït i de manera significativa per l'addició del Trolox al cultiu (Fig. 13B) i que repercuteix conseqüentment als nivells de proteïna FGF21 alliberada al medi (Fig. 13C). En aquest cas, es pot observar que el Trolox disminueix significativament la secreció de la proteïna al medi, en comparació amb el tractament on s'utilitza exclusivament oligomicina. Pel que fa a l'antimicina A, tot i que per si sola no produeix una secreció de proteïna FGF21 al medi que sigui significativa, sí que s'observa la tendència que l'addició de Trolox al medi en fa disminuir la quantitat alliberada per acció de l'antimicina A.



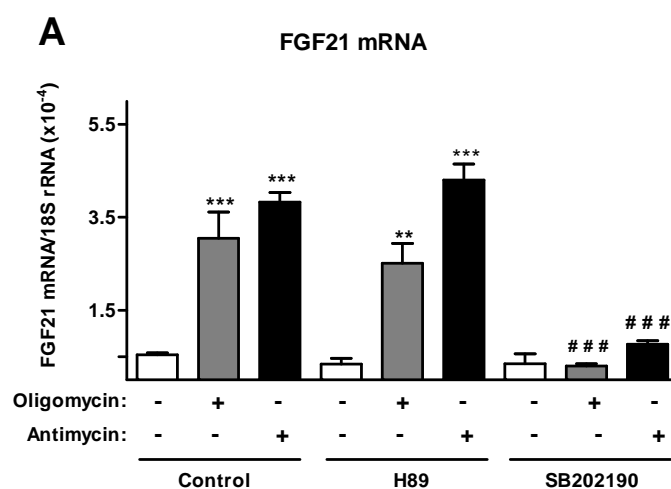
**Figura 13.** Nivells d'expressió d'mRNA d'FGF21 a un cultiu de miotubs  $C_2C_{12}$  (B) i de proteïna secretada al medi (C), després del tractament durant 24h amb oligomicina (0.1 $\mu$ M) i antimicina A (10 $\mu$ M), en presència o absència de Trolox (2mM). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, on \*\*\* $p$ <0.001 respecte el control i \*\* $p$ <0.01 respecte els tractaments amb oligomicina i antimicina A.

Per altra banda, en experiments paral·lels també es va utilitzar N-acetilcisteïna (2mM), un altre segrestador de ROS, obtenint uns efectes similars als vistos amb el Trolox, fet que demostrava l'important paper que juguen les ROS en la inducció de l'expressió del gen FGF21 resultant de la inducció experimental de la disfunció mitocondrial.

A més a més, també es van explorar altres vies que potencialment poguessin modificar la inducció del gen FGF21 vehiculada pel mitocondri. En aquest sentit es va excloure la implicació de l'AMPK, la qual podria esperar-se que s'indueís com a conseqüència de les alteracions a nivell de la bioenergètica mitocondrial, ja que el tractament dels miotubs  $C_2C_{12}$  amb el compost AICAR, un activador d'aquesta, només produïa una inducció de  $1.3 \pm 0.4$  folds respecte el control. Per altra banda, la utilització del Compost C, un inhibidor d'aquesta AMPK, a miotubs tractats amb oligomicina o antimicina A tampoc tenia efectes significatius sobre l'expressió de l'mRNA d'FGF21. Alhora, degut al fet que una disfunció mitocondrial podria alterar el balanç redox ( $NAD^+/NADH$ ) i, per tant, podria modificar l'activitat de Sirt1, ens vam proposar esbrinar la implicació de Sirt1. Amb aquest propòsit es van tractar els miotubs amb NAM (5mM), un inhibidor de la via Sirt1, però tanmateix, no es van observar efectes significatius sobre l'expressió de l'mRNA d'FGF21 induït per l'oligomicina o l'antimicina A, sent de  $1.4 \pm 0.2$  folds i  $1.4 \pm 0.4$  folds respectivament i versus els controls. Seguint amb l'*screening* de les possibles vies que podien vehicular aquest increment de les ROS derivades del mitocondri, es va explorar si l'estrès de reticle endoplasmàtic, conegut per ser un inductor de l'expressió del gen FGF21, podia estar relacionat amb la inducció de l'expressió per efectes de l'oligomicina o l'antimicina A. Però el tractament de miotubs  $C_2C_{12}$  amb aquets dos compostos no alterava significativament l'expressió del marcador gènic d'estrès de reticle GRP78, resultant pel cas del tractament amb l'oligomicina (0.1 $\mu$ M), una variació de  $0.8 \pm 0.3$  folds i pel cas de l'antimicina A (10 $\mu$ M), la inducció va ser de  $1.2 \pm 0.4$  folds respecte els controls.

### L'activitat de la p38-MAPK és necessària per la inducció del gen FGF21 en resposta a les alteracions mitocondrials que es produeixen a la cèl·lula muscular.

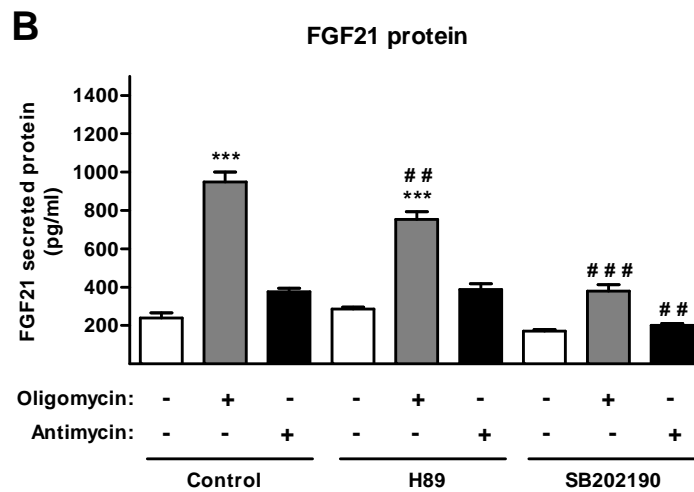
Amb la intenció d'anar una mica més enllà per tal de conèixer els mecanismes intracel·lulars que podien relacionar la disfunció mitocondrial i l'expressió d'FGF21 a les cèl·lules musculars, es van buscar els efectes que produïen els inhibidors de diferents cinases en la resposta a l'oligomicina i l'antimicina A sobre l'FGF21. D'aquesta manera, es van tractar cèl·lules musculars C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de ratolí diferenciades amb el compost comercial H89, un inhibidor de la proteïna cinasa A (PKA), en presència o no d'oligomicina (0.1µM) o d'antimicina A (10µM). Aquest no mostrava cap efecte sobre els nivells d'expressió del gen FGF21 respecte els controls. Tanmateix, el tractament d'aquest tipus de cultiu amb el compost SB202190, un inhibidor de la p38-MAPK, inhibia completament l'expressió d'FGF21 en resposta tant a l'oligomicina com a l'antimicina A (Fig. 14A).



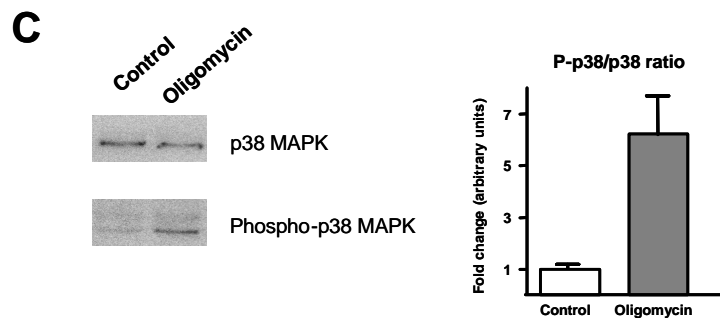
**Figura 14A.** Nivells d'expressió d'mRNA d'FGF21 en un cultiu de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, després del tractament durant 24h amb oligomicina (0.1µM), antimicina A (10µM), en presència o absència de H89 (10µM) o SB202190 (10µM). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes ± SEM de tres experiments independents. La significança estadística correspon a \*\*\*p<0.001 respecte el control i ##p<0.001 respecte els tractaments amb oligomicina i antimicina A.

Pel que fa als resultats obtinguts a nivell de secreció de proteïna al medi, es pot apreciar que el compost SB202190 provoca uns efectes molt similars als que provoca en l'expressió del gen FGF21. Si bé l'alliberació de la proteïna és molt significativa en el cas del tractament amb oligomicina, aquesta es veu totalment bloquejada per l'acció de l'inhibidor específic de la p38-MAPK. Mentre que el tractament amb l'antimicina A no és capaç d'incrementar els nivells de proteïna FGF21 alliberada de manera significativa (resultats ja vistos anteriorment), sí que es pot apreciar una reducció significativa un cop el cultiu és tractat amb el compost SB202190. Per contra, el compost H89 no té efectes significatius (Fig. 14B).

Finalment, vam poder observar que el tractament dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb l'oligomicina es traduïa amb una forta inducció de la fosforilació de la p38-MAPK, tal i com esperàvem, comprovat mitjançant *western blot* (Fig. 14C). El tractament amb l'antimicina A provocava efectes similars.



**Figura 14B.** Nivells de proteïna FGF21 secretada a un cultiu de miotubs  $C_2C_{12}$  després del tractament durant 24h amb oligomicina ( $0.1\mu\text{M}$ ) i antimicina A ( $10\mu\text{M}$ ), en presència o absència de H89 ( $10\mu\text{M}$ ) o SB202190 ( $10\mu\text{M}$ ). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de tres experiments independents, sent \*\*\* $p < 0.001$  respecte el control i ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$  respecte els tractaments amb oligomicina i antimicina A.

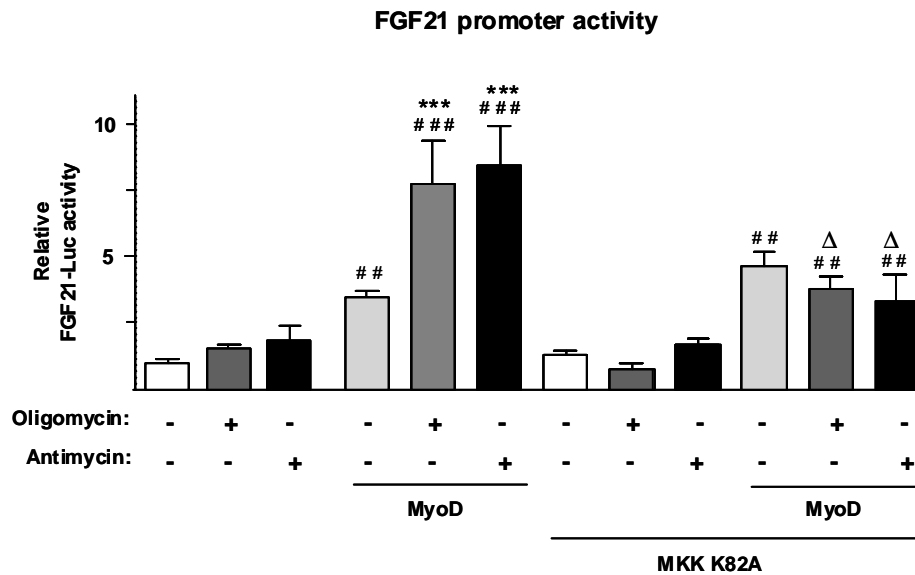


**Figura 14C.** Anàlisi *western blot* i quantificació relativa dels nivells de p38-MAPK i de fosfo-p38-MAPK, a un cultiu de miotubs  $C_2C_{12}$ , després del tractament durant 24h amb oligomicina ( $0.1\mu\text{M}$ ). Com a control de càrrega es va utilitzar  $\beta$ -actina.

**La transcripció gènica d'FGF21 està induïda en resposta a la disfunció mitocondrial. El factor transcripcional MyoD és necessari per la resposta i la p38-MAPK està implicada en la vehiculació dels efectes.**

Intentant dilucidar els mecanismes moleculars pels quals s'indueix l'expressió d'FGF21 en condicions de disfunció mitocondrial, es van determinar els efectes de l'oligomicina i l'antimicina A sobre l'activitat de la transcripció del promotor FGF21 en mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, així com els diferents elements que en podien modular i vehicular l'efecte. Com a resultat dels experiments de transfecció es va observar que, en mioblasts, l'oligomicina i l'antimicina A no eren capaces de produir un increment significatiu de l'activitat del promotor, tot i que sí que se'n podia observar la tendència (Fig. 15). Tanmateix, en cultius de mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cotransfectats amb MyoD, l'oligomicina i l'antimicina A sí que induïen d'una manera significativa l'activitat del promotor d'FGF21. Es conclou doncs que MyoD era necessari per tal que el promotor del gen FGF21 tingués una resposta transcripcional a l'oligomicina i a l'antimicina A com la observada pel gen FGF21 endogen.

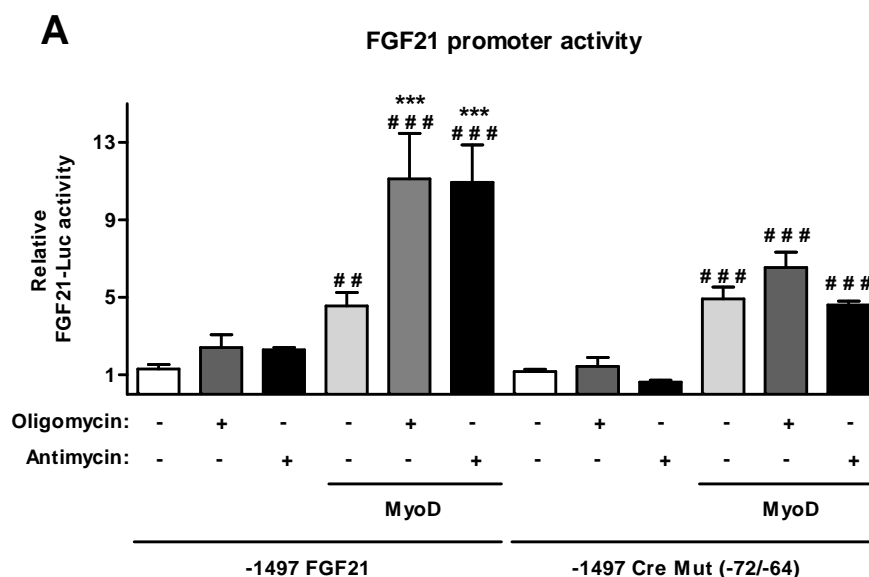
Així doncs, i considerant les evidències prèvies que la inhibició de la p38-MAPK reduïa la inducció de l'expressió endògena d'FGF21 en situacions de disfunció mitocondrial, es va determinar la implicació de la p38-MAPK en l'activitat transcripcional del promotor d'FGF21. D'aquesta manera, vàrem cotransfectar la construcció del promotor FGF21 *Wild-type* amb el plasmidi MKK6(K82A), un vector d'expressió que dirigeix l'expressió d'una forma dominant negativa de MKK6 que actua immediatament *upstream* de la p38-MAPK. Vàrem observar que l'oligomicina i l'antimicina A veuen impedita la seva funció d'incrementar l'activitat del promotor FGF21 en presència de la cotransfecció del vector MKK6(K82A), demostrant-se la importància de posseir la p38-MAPK intacta per la resposta a la disfunció mitocondrial. De la mateixa manera, es pot observar que tot i la presència de MyoD, la cotransfecció del promotor en presència del dominant negatiu, l'oligomicina i l'antimicina A perden tota la capacitat per induir l'activitat d'aquest promotor, provocant-ne fins i tot una disminució (Fig. 15). Aquest fet ens confirma que l'activitat transcripcional d'FGF21, en el context d'una disfunció mitocondrial, requereix la presència del factor transcripcional MyoD i a més a més, revela que la p38-MAPK s'hi veu fortament implicada.



**Figura 15.** Efectes del tractament durant 24h amb oligomicina (0.1 $\mu$ M), antimicina A (10 $\mu$ M), en l'activitat del promotor d'FGF21 (-1497-FGF21-Luc) a mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en presència i absència dels factors de transcripció cotransfectats MyoD i/o el dominant negatiu MKK6(K82A). Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes  $\pm$  SEM de sis experiments independents. La significança estadística és #  $p < 0.01$  i ##  $p < 0.01$  per les diferències degudes a la cotransfecció amb MyoD, \*\*\*  $p < 0.001$  per les diferències degudes a oligomicina i antimicina A, i  $\Delta p < 0.05$  per les diferències degudes a MKK6(K82A).

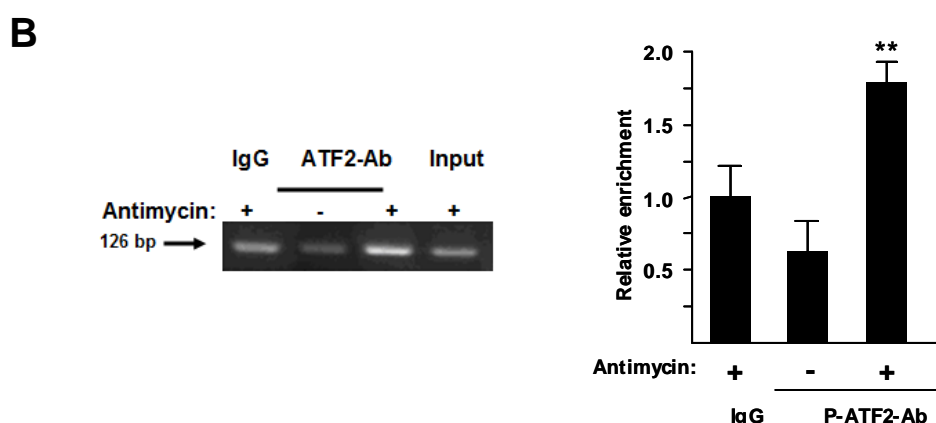
### Els efectes de la disfunció mitocondrial sobre la transcripció del gen FGF21 estan vehiculats pel lloc d'unió ATF2 localitzat a la regió proximal del promotor FGF21.

Estudis previs realitzats a adipòcits marrons, duts a terme al nostre laboratori, havien demostrat la presència d'un lloc d'unió al factor de transcripció ATF2 (-72/-64) al promotor d'FGF21, el qual vehiculava la resposta a AMPc a través d'una via intracel·lular que implicava la p38-MAPK (Hondares et al., 2011). D'aquesta manera, i per intentar veure els efectes d'aquest element regulador sobre el promotor d'FGF21 en un context muscular, es van cotransfectar cultius de mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb les construccions de la forma *Wild-type* del promotor (-1497-FGF21-Luc) i una forma mutada en la regió del lloc de resposta a ATF2; (-1497-Cre Mut(-72/-64)-Luc), en presència o no del factor miogènic MyoD. Alhora, aquestes construccions van ser tractades o no amb oligomicina i antimicina A per tal de simular experimentalment una disfunció mitocondrial. Els resultats d'aquesta anàlisi mostraven una lleugera inducció de l'activitat transcripcional de la forma *Wild-type* d'FGF21 per efectes dels tractaments d'oligomicina i antimicina A (tot i que no era significativa). Per altra banda, tal i com ja havíem observat en experiments anteriors (veure Fig. 3), la presència del factor MyoD incrementa significativament l'activitat transcripcional d'FGF21, la qual es veu incrementada encara més amb els tractaments d'oligomicina i d'antimicina A. Per contra, la forma on hi havia mutat el lloc d'unió de ATF2, en el promotor d'FGF21, es va veure que era insensible a l'acció que provocaven l'oligomicina i l'antimicina A, fins i tot en presència del factor MyoD (Fig. 16A) i malgrat el fet de mantenir la resposta a aquest factor.



**Figura 16A.** Efectes del tractament durant 24h amb oligomicina (0.1µM) i antimicina A (10µM), en l'activitat del promotor d'FGF21 (-1497-FGF21-Luc) i la construcció mutada (-1497-Cre Mut (-72/-64)-Luc) a mioblasts C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en presència i absència del factor de transcripció cotransfectat MyoD. Les dades s'obtenen a partir de les mitjanes ± SEM de sis experiments independents, on <sup>##</sup>p<0.01 i <sup>###</sup>p<0.001 per les diferències degudes a la cotransfecció amb MyoD, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 per les diferències degudes a oligomicina i antimicina A.

Conseqüentment, vam voler determinar si la disfunció mitocondrial induïda experimentalment podia afectar a la unió de la forma fosforilada d'ATF2 (forma que s'uneix al promotor) al lloc d'unió en el promotor FGF21 en els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Així doncs, mitjançant un assaig de *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) vàrem poder observar un increment significatiu de la unió d'aquest factor fosforilat, al promotor d'FGF21, a un cultiu de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> que prèviament havien estat tractats amb antimicina A (Fig. 16B).



**Figura 16B.** Anàlisi ChIP de la unió d'ATF2 fosforilat a la regió del promotor de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en resposta a antimicina A (10µM). A l'esquerra podem veure el producte d'amplificació de la PCR que correspon a un fragment de 126 bp de la regió del promotor del gen FGF21, on l'*input* correspon al producte de la PCR obtingut a partir de la cromatina neta abans de la immunoprecipitació



---

(correspon a un 3% del total de càrrega dels carrils experimentals). A la dreta, podem veure les mitjanes  $\pm$  SEM s'obtenen a partir de triplicats i com a *folts* d'inducció de la intensitat del producte amplificat per PCR i relatiu al de les IgG, utilitzat com a control de la immunoprecipitació, sent \*\*p<0.01 respecte el control.



**Discussió**



## DISCUSSIÓ

Tot i que el fetge és considerat com el principal lloc de producció de l'FGF21 sistèmic, sobretot en condicions de dejuni i sota el control de PPAR $\alpha$  (Inagaki et al., 2007; Badman et al., 2007; Hondares et al., 2010; Mai et al., 2009), en els últims anys s'han acumulat diverses evidències que indiquen que l'FGF21 també pot actuar com a mioquina, un factor hormonal que pot ser produït i alliberat a la circulació pel múscul esquelètic. Darrerament s'ha observat que pacients que pateixen malalties musculars, causades per alteracions en la funció mitocondrial, com ara mutacions al DNA mitocondrial (Suomalainen et al., 2011) o bé deplecions en les acumulacions de ferro-sofre (Crooks et al., 2014), presenten valors d'expressió d'FGF21 incrementats, així com també els de la seva secreció a la circulació. A més a més, diversos models murins de disfunció mitocondrial muscular, incloent un ratolí transgènic que sobreexpressa una mutació dominant de l'helicasa replicativa Twinkle (Tynismaa et al., 2010), un segon model d'alteració mitocondrial induïda per autofàgia (Kim et al., 2012) i un ratolí transgènic amb sobreexpressió de la proteïna *uncoupling protein-1* del teixit adipós marró a múscul esquelètic (Keipert et al., 2013), mostren de la mateixa manera una inducció de l'expressió d'FGF21 similar a l'observable al múscul d'aquests pacients.

Durant la realització d'aquesta tesi, hem trobat que l'expressió i la secreció d'FGF21 en un context de cèl·lula muscular, estan íntimament associades amb la diferenciació miogènica, tant en rosegadors com en models humans. Així doncs, hem pogut constatar que en aquests models, mentre que els estadis de mioblasts no presenten expressió del gen FGF21, aquest va incrementant els seus nivells d'expressió en consonància amb el seu estat de diferenciació fins assolir un fenotip de miotub. Paral·lelament, aquests tipus de cultius també ens han mostrat que el procés de diferenciació i d'expressió d'FGF21 va acompanyat d'una secreció al medi extracel·lular i, per tant, reforça la idea de poder considerar l'FGF21 com una mioquina i el múscul com un òrgan secretor d'aquesta i altres hormones com la Irisina, recentment descoberta (Bostrom et al., 2012), o altres factors prèviament identificats com a tals, com la *interleukin-6* (Pedersen and Febbraio, 2008).

Considerant el paper autocrí que té l'FGF21 en altres teixits de tipus muscular com pot ser el cor (Planavila et al., 2013) o en teixits com l'adipós marró (Hondares et al., 2010), podria ser que passés el mateix en el cas del múscul esquelètic. Tanmateix, però, hem pogut constatar que aquest teixit mostra baixos nivells d'expressió dels principals receptors d'FGF21 (FGFR1 i FGFR4), fet que dificultaria la formació del complex ternari, si tenim en compte que la dimerització del receptor es dona en una proporció 1:2:1 (FGF-FGFR- $\beta$ -Klotho). Per contra, en la bibliografia es documenta que FGFR1 al múscul esquelètic posseeix uns nivells d'expressió moderats en comparació amb altres teixits (Fon et al., 2010). Ara bé, tot i que els nivells de receptor a la cèl·lula siguin baixos, el factor limitant per a la correcta senyalització intracel·lular d'FGF21 és el cofactor  $\beta$ -Klotho, ja que els receptors FGFRs poden vehicular la resposta del múscul a FGFs diferents a l'FGF21. Tot i que està descrit que en determinats teixits com el fetge o els teixits adiposos blanc i marró tenen alts nivells d'expressió d'aquest cofactor, al múscul ja se n'havia documentat una expressió molt dèbil (Fon et al., 2010). Els nostres resultats indiquen de manera contundent que el transcrit de  $\beta$ -

Klotho és, de fet, indetectable tant en cèl·lules musculars de rosegador com en humanes. Això no sembla ser degut al fet d'estar treballant en cultius, ja que ha estat descrit que l'expressió de  $\beta$ -Klotho al múscul esquelètic *in vivo* és mínima (Kurosu et al., 2007). De totes maneres, sabent que  $\beta$ -Klotho es troba present a teixits metabòlicament actius (Kurosu et al., 2007; Fon et al., 2010), també es fa estrany pensar en la seva absència al múscul esquelètic degut a la forta implicació d'aquest teixit en el metabolisme sistèmic. Aquests resultats estarien d'acord amb alguns dels que ja s'han reportat en la bibliografia, on s'ha descrit per exemple la unió FGF21-FGFR4 a cèl·lules L6, però on no s'observen canvis d'activitat en la senyalització *downstream* (Suzuki et al., 2008), segurament per la manca del seu cofactor en aquest tipus cel·lular.

Malgrat que els nivells d'expressió i de secreció d'FGF21 per l'acció del múscul puguin semblar minsos en comparació amb els que es detecten al pàncrees, als testicles, al fetge, al teixit adipós o a l'ós (Nishimura et al., 2000; Wente et al., 2006; Fon et al., 2010; Wu et al., 2012), sembla evident que la seva secreció a la circulació pot contribuir al *pool* d'FGF21 sistèmic de forma positiva, ajudant a millorar molts paràmetres metabòlics en determinades situacions fisiològiques on es produeixen canvis adaptatius (Badman et al., 2009; Hondares et al., 2011; Hondares et al., 2010; De Sousa-Coelho et al., 2013). A més a més, cal tenir en compte que el teixit muscular és el més extens de l'organisme i que representa fins a un 40% del pes total, fet que ens suggereix que petits canvis al múscul poden tenir una repercussió significativa a nivell sistèmic, mantenint el paral·lelisme amb el que passa amb altres mioquines com la IL-6 o la IL-15 (Pedersen, 2011; Raschke and Eckel, 2013).

Els nostres descobriments més recents ens han permès identificar el factor miogènic MyoD com un regulador transcripcional essencial de l'expressió del gen FGF21 a la cèl·lula miogènica, en acord amb un increment de l'expressió d'FGF21 a la cèl·lula muscular diferenciada. Val la pena destacar però, que els nivells d'expressió, tant basals (en estats de mioblasts) com en miotubs ja completament diferenciats, els models L6 i LHCN-M2 es troben en uns nivells bastant inferiors als que trobem en el model de miotubs de ratolí. Aquestes diferències es podrien explicar per la manca de MyoD endogen, si més no en el model L6, fet ja constatat (Solanes et al., 2003). Per altra banda, també hem pogut comprovar que en experiments de guany de funció, on als miotubs se'ls hi sobreexpressa aquest factor miogènic, les cèl·lules responen amb un increment de l'expressió del transcrit d'FGF21, així com també passa amb la secreció de la proteïna FGF21 al medi extracel·lular. Aquest darrer fet ens confirma el que ja havíem vist durant els diversos experiments de perfils de diferenciació en cèl·lules musculars, ja que cal recordar que MyoD (igual que Myf5) també és un factor que actua en les primeres fases de la determinació mioblàstica, mentre que la miogenina s'activa en la diferenciació terminal (Rudnicki et al., 1993). Malgrat tot, cal esmentar que MyoD també s'ha descrit com a important en la regulació de l'expressió gènica al múscul un cop la cèl·lula ja està diferenciada (Amat et al., 2007; Amat et al., 2009).

Per contra, s'ha observat que altres factors miogènics de la família dels MEF2s (*Myocyte enhancer factor-2*) no són capaços de produir aquests efectes sobre el gen FGF21. Ara bé, val la pena comentar que el grau d'inducció de l'expressió d'FGF21 als

miotubs en resposta a MyoD depèn del tipus de cèl·lula utilitzada ja que en el cas dels miotubs L6 de rata, aquests efectes eren molt superiors degut al fet que és un sistema que posseeix menor quantitat de MyoD endogen (Amat et al., 2009). Aquest resultat ens ratifica la importància de MyoD com a regulador essencial de la transcripció d'FGF21. Així mateix, els experiments duts a terme en sistemes de transfecció en cultius C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb constructes del promotor d'FGF21 de ratolí ens van permetre validar aquestes aproximacions i constatar l'eloqüent importància del factor MyoD, així com també la no implicació d'altres factors miogènics de la família MEF2 i Myf5 en la regulació de la regió promotora del gen. Aquest fet també podria lligar amb el canvi d'expressió de múltiples gens que es produeix durant la miogènesi o en altres situacions com l'exercici, precisament quan el múscul ha de fer front a canvis metabòlics adaptatius (Horowitz et al., 2000; Lin et al., 2002; Wende et al., 2005; Freyssenet, 2007; Egan and Zierath, 2013).

Com ja hem comentat, a la bibliografia existeixen múltiples referències al fet que el promotor humà d'FGF21 en cultius d'hepatòcits de ratolí respon als FFAs i als cossos cetònics (Uebanso et al., 2011). Inagaki i Badman a l'any 2007 també havien descrit que el gen FGF21 posseeix un element de resposta PPRE que li permet respondre als increments dels nivells de cossos cetònics i d'àcids grassos circulants en sang durant el dejuni, fet que provocava un fort increment dels nivells d'FGF21 produït a nivell hepàtic i vehiculat per PPAR $\alpha$  (Inagaki et al., 2007; Badman et al., 2007; Lundasen et al., 2007). Es proposà que aquest fet els permetia adaptar-se a les noves condicions incrementant la lipòlisi a teixit adipós blanc i la cetogènesi a fetge (Inagaki et al., 2007), tot i que l'efecte d'FGF21 en aquestes vies metabòliques actualment és controvertit. En humans també s'ha observat una correlació positiva entre els nivells circulants d'aquesta i els d'àcids grassos lliures (Mai et al., 2009). La resposta del gen FGF21 als àcids grassos al fetge via PPAR $\alpha$  no es restringeix en situacions de dejuni, sinó que també esdevé quan els àcids grassos provenen de la dieta, com és el cas d'una dieta rica en greixos (Diaz-Delfin et al., 2012; Nygaard et al., 2014) o en resposta als àcids grassos procedents de la llet a l'inici de la lactància (Hondares et al., 2010). Malgrat tot, els nostres resultats sobre la resposta del gen FGF21 a la presència d'àcids grassos han estat negatius en el context de la cèl·lula muscular. En les primeres aproximacions que es van realitzar amb àcid oleic, ja no poguérem detectar cap efecte potenciador de l'expressió de l'mRNA d'FGF21 als miotubs, sinó més aviat el contrari. En un intent d'anar una mica més enllà i intentar comprovar si l'efecte es podia donar a més curt termini pel que fa a la regulació de l'expressió, vam confirmar aquesta tendència a la inhibició de l'expressió d'FGF21 malgrat comprovar que els experiments seguien una metodologia fiable i els cultius eren sensibles a l'activació transcripcional d'altres gens sensibles als àcids grassos (veure apartat resultats corresponent (Solanes et al., 2003)). En la mateixa línia també hem pogut veure que molts altres àcids grassos, ja siguin polinsaturats com ara l'àcid linoleic, el linolènic, el DHA, o bé saturats com ara el fitànic i el palmitat, tampoc ens generen cap tipus de resposta sobre l'expressió d'FGF21 a nivell de la cèl·lula muscular, sinó al contrari, en alguns casos fins i tot reprimint la seva expressió. Aquests fets ens suggeririen que, ni en un context de dejuni ni de sobrealimentació lipídica, la cèl·lula muscular no respondria a aquest increment dels àcids grassos circulants amb un increment d'expressió d'FGF21. Per altra banda, a l'any 2011 Uebanso ja parla d'una modulació paradoxal en la regulació

de l'FGF21 hepàtic, on apunta una certa reducció dels nivells d'FGF21 postprandial per efectes dels carbohidrats, diferent el que es dona en el dejuni per part dels FFAs (Uebanso et al., 2011). D'aquesta manera, en un cultiu de miotubs, on ja tenim glucosa en excés, podria ser complicat veure qualsevol efecte degut als àcids grassos sobre els nivells de transcripció del gen.

Com que en altres sistemes cel·lulars els efectes dels àcids grassos sobre el gen FGF21 eren mitjançats per PPARs, especialment per PPAR $\alpha$ , ens vam plantejar exposar directament aquesta via en el context de la cèl·lula muscular. Les nostres observacions en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ens indicaren que aquests eren poc sensibles als tractaments amb els activadors sintètics dels diferents PPARs pel que fa als canvis d'expressió d'FGF21. Sembla doncs que, a diferència del que passa en altres tipus cel·lulars com ara els hepatòcits *in vitro*, on els fibrats indueixen l'expressió d'FGF21 (Badman et al., 2007), així com també ho fan les tiazolidinediones (TZD) (Oishi and Tomita, 2011), els miotubs no responien a aquests tractaments. No obstant, aquest resultat negatiu calia interpretar-lo amb compte, especialment per a PPAR $\alpha$ , ja que se sap que l'expressió endògena d'aquest receptor és feble en els sistemes de miotubs en cultiu, a diferència del múscul *in vivo* (Muoio et al., 2002). Tanmateix, el resultat negatiu per a PPAR $\delta$  sí que podia ser significatiu, ja que PPAR $\delta$  s'expressa amb nivells elevats en els cultius de miotubs, semblantment al múscul esquelètic *in vivo* (Muoio et al., 2002). Per contra, degut als antecedents de què disposàvem al laboratori, així com també a la bibliografia d'altres teixits, on vèiem que FGF21 es trobava fortament regulat per diferents PPARs i no només en models murins (Badman et al., 2007; Lundasen et al., 2007; Galman et al., 2008), vàrem realitzar una segona aproximació experimental emprant una construcció del promotor d'FGF21 transfectada a cèl·lules miogèniques, combinant-ho amb una cotransfecció de diferents vectors d'expressió per a PPARs i en presència de diferents lligands. Aquests experiments permeten constatar que, en un context muscular, els PPARs tenien una gran importància en el control de l'expressió gènica d'FGF21 i, en general, que interactuaven amb el factor miogènic MyoD de manera semblant a altres gens amb expressió muscular com és el cas d'UCP3 (Solanes et al., 2003). Vam observar que tant PPAR $\alpha$  com PPAR $\gamma$ , juntament amb els seus activadors i en un context en presència de MyoD, produïen una inducció de la resposta en l'activitat transcripcional del promotor FGF21. Aquest fet però, no es donava per part de PPAR $\delta$ , tot i que en aquest tipus de teixit s'expressa en majors quantitats (Gilde and Van, 2003), tal i com s'havia constatat en els experiments anteriors de regulació del transcrit d'FGF21. Cal destacar que aquesta inducció la vèiem únicament i exclusiva en presència del factor miogènic MyoD, fet que torna a posar de manifest la rellevància d'aquest en la regulació de la transcripció del gen FGF21 en el context muscular.

Tot i l'existència de la potencialitat del gen FGF21 per respondre a l'activació de PPAR $\alpha$  (però no de PPAR $\delta$ ) en el context de la cèl·lula muscular, evidenciada en els experiments de transfecció, l'operativitat de la via *in vivo* és poc clara. Els resultats recentment obtinguts pel grup de Suomalainen mostren que el bezafibrat és capaç d'incrementar l'expressió d'FGF21 al fetge i conseqüentment la seva presència al sèrum, però no al múscul (Yatsuga and Suomalainen, 2012), aquest fet seria coherent amb els nostres resultats obtinguts a nivell de miotubs.



Segons alguns precedents experimentals en el nostre grup, així com també el que es descriu en algunes publicacions, existeixen certs elements reguladors com ara PGC-1 $\alpha$ , Sirt1, receptors nuclears com ara els PPARs i múltiples factors de transcripció com ATF4, NRF2 o ChREBP, entre altres (veure introducció), els quals són capaços de modular l'activitat transcripcional del gen FGF21 per part de diversos coactivadors. Dins el context muscular i coneixedors de la implicació que té aquest teixit en l'homeòstasi de l'organisme, durant la realització de la present tesi es va dur a terme una cerca sobre el rol d'alguns d'aquests possibles elements en el control transcripcional d'FGF21.

El fet que PGC-1 $\alpha$  tingui la capacitat de coactivar la resposta a PPARs en gens clau del metabolisme energètic muscular (Russell et al., 2003; Russell, 2005) deixava entreveure la possibilitat que fos un coactivador clau en la regulació d'un gen amb una repercussió tan important en l'homeòstasi sistèmica com és el cas d'FGF21. PGC-1 $\alpha$  s'expressa majoritàriament als músculs més oxidatius, rics en fibres de tipus I i IIa. PGC-1 $\alpha$  afavoreix aquest tipus de fibres en detriment de les més glucolítiques (Lin et al., 2002; Handschin et al., 2003) i s'ha vist que indueix la biogènesi mitocondrial en diferents línies cel·lulars musculars (Wu et al., 1999). Tanmateix, el fet que no s'hagi observat que PGC-1 $\alpha$  sigui clau per provocar canvis en la biogènesi mitocondrial en el múscul esquelètic *in vivo*, però que tampoc sigui necessari per tal que la restricció calòrica exerceixi els seus beneficis en el metabolisme global de l'individu (Finley et al., 2012), fa pensar en altres mecanismes que contribueixen a la millora de paràmetres com ara la millora en l'oxidació de substrats o l'eliminació de les ROS.

Els nostres resultats indiquen que dins un context muscular en presència de MyoD, com podria ser durant la miogènesi o després d'un període d'entrenament on incrementa la transcripció del gen MyoD (Rudnicki et al., 1993; Yang et al., 2005; Legerlotz and Smith, 2008), PGC-1 $\alpha$  podria tenir certa rellevància i seria capaç d'activar l'expressió del gen FGF21 a través de la coactivació de PPAR $\alpha$ . Si ens fixem amb el que descrivia Russell, on deia que els increments dels nivells de PGC-1 $\alpha$  i PPAR $\alpha$  jugaven un paper important en els canvis adaptatius que es produïen al múscul després de l'exercici, pel que fa al contingut mitocondrial muscular, al metabolisme oxidatiu i a la sensibilitat a la insulina (Russell et al., 2003), podríem suggerir que part d'aquests canvis podrien estar relacionats amb el sistema de FGF21. De manera paral·lela al que passa en el cas d'altres mioquines, on l'expressió de PGC-1 $\alpha$  al múscul (induïda per l'exercici) estimula l'expressió i l'alliberament de la Irisina a la circulació, provocant certs efectes beneficiosos en teixits perifèrics (Bostrom et al., 2012), és possible que passi el mateix en el cas d'FGF21.

El paper de la desacetilasa Sirt1 en la regulació de l'homeòstasi energètica ha estat discutit àmpliament en diverses revisions i sembla ser que actua en varis teixits clau del metabolisme glucídic i lipídic, ja que aquesta proteïna actua com a sensor de l'estat metabòlic de la cèl·lula. Sirt1 s'activa en condicions de manca de nutrients. Per tant, juntament amb altres membres de la seva família modulen diverses vies metabòliques així com l'expressió de diversos gens a través de l'estat d'acetilació de diferents factors moduladors (Bao and Sack, 2010). Entre les respostes metabòliques que s'ha vist que són capaces de modular, hi ha la sensibilitat a la insulina, la gluconeogènesi i l'oxidació d'àcids grassos. Al múscul esquelètic, Sirt1 desacetila i activa PGC-1 $\alpha$  propiciant el canvi de substrat metabòlic. Concretament, promou un

augment en la transcripció de gens involucrats en l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos a través de PPAR $\alpha$  i de gens implicats en la fosforilació oxidativa (Canto and Auwerx, 2008; Canto et al., 2009). Això permet preservar la glucosa en condicions de dejuni. Paral·lelament, també n'incrementa la biogènesi mitocondrial mitjançant la regulació de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  a través de la interacció amb els factors miogènics MyoD i MEF2 (Amat et al., 2009). Tenint en compte tots aquests coneixements i dins el context de la regulació de l'expressió gènica d'FGF21, hem pogut observar que en un entorn de la cèl·lula muscular on hi hagi presència de MyoD, Sirt1 no és capaç d'inhibir els efectes inductors que té aquest factor miogènic sobre l'activitat del promotor gènica d'FGF21. Ara bé, el fet que el factor actiu Sirt1 (amb capacitat desacetilasa intacta) ens bloquegi la capacitat d'inducció del promotor FGF21 per part de PPAR $\alpha$  i el seu activador en presència de MyoD, respecte del que veiem sobre una forma mutada que ha perdut la capacitat desacetilasa (Sirt1-H363Y), ens confirma el paper repressor de la forma intacta de Sirt1 sobre la modulació del promotor FGF21, especialment en resposta a la via PPAR $\alpha$ .

Diversos indicis bibliogràfics mostraven que pacients que patien alguna miopatia associada a alteracions del DNA mitocondrial revelaven la presència d'alts nivells d'FGF21 circulants (Suomalainen et al., 2011). No fou l'objectiu d'aquesta tesi estudiar els nivells d'FGF21 en pacients humans de patologia mitocondrial, ara bé, el fet de poder disposar de mostres de sèrum de pacients els quals patien la patologia MNGIE (mutació al gen TYMP que provoca en darrer terme mutacions al mtDNA), ens portà a avaluar-ne els nivells d'FGF21 circulant. Els nivells observats d'FGF21 en aquests pacients foren molt elevats, clarament més alts que en altres patologies humanes estudiades al nostre laboratori i altres patologies com són l'obesitat i la diabetis tipus II (Gallego-Escuredo et al., 2014) o la lipodistròfia en pacients HIV (Domingo et al., 2010). Aquesta observació va ser el punt de partida d'un seguit de procediments experimentals els quals ens havien de permetre en darrera instància la determinació de la via de senyalització que associava una alteració a nivell mitocondrial amb una modulació dels nivells d'expressió d'un gen nuclear com és el cas d'FGF21, en un context muscular.

L'oligomicina, un inhibidor específic de l'ATP sintetasa, i l'antimicina A, un inhibidor del complex III de la cadena respiratòria, són un parell de fàrmacs que són capaços de mimetitzar una disfunció mitocondrial, alterant el sistema OXPHOS, fet que permet induir l'expressió d'FGF21 a les cèl·lules musculars. Generalment, aquestes observacions són consistents amb resultats obtinguts anteriorment (Tynismaa et al., 2010; Kim et al., 2012; Crooks et al., 2014). Tanmateix, nosaltres treballem amb concentracions més baixes respecte altres grups, ja que hem observat que en aquestes concentracions els miotubs ja es mostraven suficientment sensibles i sense presentar citotoxicitat, fet importantíssim que podria confondre la interpretació de part dels nostres resultats. Malgrat tot, en contraposició amb aquests estudis anteriors, els quals mostraven que l'FCCP també induïa l'expressió del gen FGF21 (Keipert et al., 2013), els nostres resultats no han permès observar cap efecte al respecte degut a aquest desacoblant de la cadena respiratòria. Per contra, cal destacar que l'estudi esmentat utilitza concentracions de FCCP molt superiors a les que nosaltres hem utilitzat en el nostre estudi.

Tot i que els tractaments dels cultius de miotubs murins amb els fàrmacs oligomicina i antimicina A provocaven una clara resposta d'increment dels nivells d'expressió d'FGF21, aquesta només es traduïa amb un increment observable dels nivells de la proteïna secretada al medi extracel·lular per part de l'oligomicina. En el cas de l'antimicina, tot i poder-se observar aquests canvis en els nivells d'expressió, fins i tot d'una manera més acusada que en el cas de l'oligomicina, sembla ser que no es tradueix amb una alliberació d'aquesta hormona al medi. Els nostres reiterats intents de realitzar separacions per fraccionament cel·lular per tal de veure si aquests nivells d'expressió es tradueixen en acumulació d'aquest FGF21 a la fracció citosòlica, que no pogués ser excretat pel mateix efecte del fàrmac, no han obtingut resultats concloents en aquest aspecte, fet que ens podria fer pensar també en impediments en la maquinària de traducció de la proteïna causats indirectament per l'antimicina A.

També s'ha identificat a la producció de ROS com la major mediadora de la senyalització entre el mitocondri i el nucli, la qual indueix l'expressió del gen FGF21. Aquesta també involucra la inducció de la p38-MAP-kinasa i la conseqüent activació d'un lloc ATF2 en la regió reguladora del promotor del gen FGF21. Alguna referència anterior proposava que la unió de ATF4 al promotor d'FGF21 vehiculava la transcripció d'FGF21 en resposta a la disfunció mitocondrial provocada per la inhibició de l'autofàgia (Kim et al., 2012). Tot i que les nostres descobertes no descarten una contribució potencial del factor ATF4 en la regulació d'FGF21, les dades que hem pogut obtenir, a partir d'un constructe del promotor FGF21 mutat, posen de manifest la importància de posseir la regió d'unió a ATF2 intacta per tal de vehicular l'activació transcripcional del promotor d'FGF21 en resposta a la senyalització mitocondrial. És possible que la inducció d'FGF21 vehiculada per ATF4, reportada anteriorment en resposta a una disfunció mitocondrial induïda experimentalment, estigués vehiculada per la resposta a l'estrès de reticle (*ER-stress*) (Keipert et al., 2013). En el nostre estudi en miotubs però, hem pogut comprovar que aquest procés no es trobava activat a les baixes concentracions de fàrmacs amb les quals treballàvem i és possible que les concentracions d'inhibidors de la cadena respiratòria/OXPHOS en els estudis esmentats estiguin justament activant l'*ER-stress* i, per tant, ATF4. Per altra banda, els resultats que hem observat sobre la capacitat que tenen les ROS induïdes pel mitocondri d'activar la p38-MAP-kinasa en les cèl·lules musculars estan en consonància amb les dades obtingudes per altres grups d'investigació (Lim et al., 2006), fet que lliga la funció mitocondrial amb la transcripció d'FGF21.

Així doncs, dins la capacitat que posseeixen les ROS com a mitjanceres subcel·lulars, val la pena destacar l'associació d'alts nivells de ROS amb la seva capacitat per fosforil·lar algunes cinases com ara la p38-MAPK. Tant és així que altres treballs realitzats en el nostre laboratori han revelat que l'activació d'aquestes cinases per la via  $\beta$ -adrenèrgica pot induir la transcripció de gens nuclears com ara l'FGF21 als adipòcits marrons (Hondares et al., 2011). Aquest fet suggereix que la generació d'elevats nivells de ROS al mitocondri per afectacions a la cadena respiratòria, i la conseqüent activació de la p38-MAPK, podrien estar involucrats en la regulació d'aquests gens a nivell nuclear, els quals podrien actuar com a mecanisme compensatori davant de situacions d'estrès cel·lular. Aquesta situació podria ser similar a la que es donés després de dues setmanes d'exercici físic, on una pujada dels

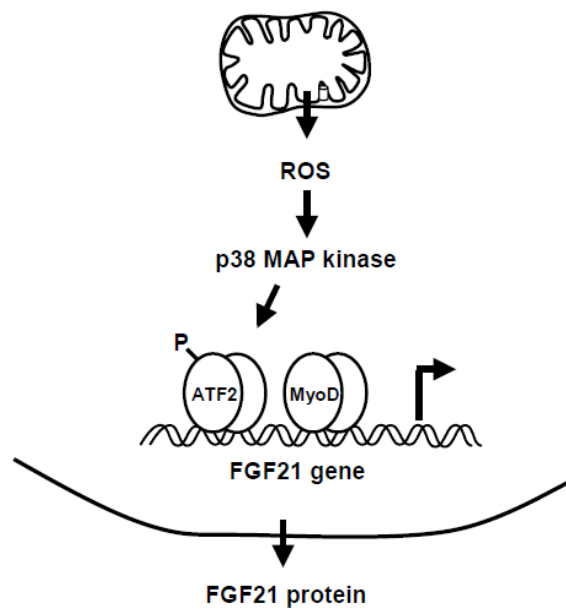
nivells de ROS podria contribuir de manera substancial a un increment de l'expressió d'FGF21 en el múscul esquelètic, tal i com ha estat prèviament documentat (Cuevas-Ramos et al., 2012), fet que podria lligar alhora amb la disminució dels seus nivells d'expressió en exercicis més perllongats (Yang et al., 2011), precisament quan el múscul pogués adaptar el seu sistema de detoxificació de ROS.

Durant el desenvolupament de la present tesi també hem trobat que, en el context de la cèl·lula muscular, la capacitat de les disfuncions mitocondrials d'activar la transcripció del gen FGF21 requereix la presència del factor MyoD. En conjunt, les nostres dades suggereixen un escenari en el qual MyoD dona suport a l'activitat transcripcional basal del gen FGF21, així com també el fet que la regulació impulsada pel mitocondri provoca una àmplia resposta d'expressió a la senyalització dependent de l'activitat mitocondrial. El control de l'expressió del gen FGF21 en una cèl·lula miogènica constitueix un exemple clar del que s'anomena senyalització retrògrada mitocondrial (Kelly and Scarpulla, 2004), per la qual els diferents esdeveniments moleculars associats a la funció mitocondrial respiratòria provoquen un senyal que controla l'expressió de diversos gens nuclears. En el cas del control del gen FGF21, aquest fenomen sembla tenir una rellevància fisiològica considerable ja que FGF21 és alliberat a la circulació, influint així al metabolisme sistèmic. D'aquesta manera, en darrera instància, els esdeveniments mitocondrials intracel·lulars, influenciarien a múltiples processos metabòlics a nivell sistèmic a través de canvis en els nivells d'FGF21.

Com s'ha descrit anteriorment, sota grans demandes d'ATP, el múscul esquelètic secreta mioquines que permeten comunicar-se amb altres teixits com el fetge o el teixit adipós per tal d'aconseguir les fonts d'energia necessàries. En aquesta línia, també s'ha vist que FGF21 s'indueix al múscul esquelètic sota condicions que causen un estrès metabòlic local i sistèmic (Izumiya et al., 2008; Chavez et al., 2009; Hojman et al., 2009; Yang et al., 2011; Cuevas-Ramos et al., 2012; Lindegaard et al., 2013; Crooks et al., 2014), incloent també pacients amb deficiències a la cadena respiratòria i en ratolins deficients d'autofàgia/mitofàgia muscular (Suomalainen et al., 2011; Kim et al., 2012; Crooks et al., 2014).

Tot i el comportament anormal dels sistemes mitocondrials al múscul esquelètic en pacients que presenten mutacions al DNA mitocondrial o altres malalties mitocondrials que mostren elevats nivells de secreció d'FGF21, l'existència d'una via de senyalització mitocondrial retrògrada hauria de ser contemplada com un sistema homeostàtic en el qual el múscul acabaria actuant a través d'FGF21 per comunicar-se amb el metabolisme sistèmic i respondre així a l'estatus bioenergètic mitocondrial d'aquest teixit. Considerant el paper conegut d'FGF21 en la regulació del metabolisme energètic a nivell sistèmic (Potthoff et al., 2009; Hondares et al., 2011; Mashili et al., 2011; Uebanso et al., 2011; De Sousa-Coelho et al., 2012; Veniant et al., 2012; De Sousa-Coelho et al., 2013), és d'esperar que un increment de l'expressió d'FGF21 i de la secreció per part del múscul provoqui una senyalització de "dejuni" (Tynjismaa et al., 2010) al global de l'organisme que serveixi per afavorir diversos processos homeostàtics adaptatius (Uebanso et al., 2011; Keipert et al., 2013).

Els trastorns mitocondrials del múscul esquelètic produïts per algun tipus de patologia són susceptibles d'agreujar aquesta resposta fisiològica i d'induir els alts nivells de secreció d'FGF21 que es poden trobar en aquests tipus de malalties musculars (Suomalainen et al., 2011). En tot cas, caldria investigar més profundament en aquest sentit per tal de poder establir la contribució real de l'FGF21 produït pel múscul en el *pool* de l'FGF21 sistèmic en situacions fisiològiques (no patològiques), en les quals l'activitat mitocondrial es troba modulada al múscul esquelètic, com ara en condicions d'exercici (Cuevas-Ramos et al., 2012), tot i que altres autors proposen que aquest increment és degut a altres teixits (Kim et al., 2013).



**Figura 1:** Esquema representatiu de la regulació del gen FGF21 i la seva secreció al medi extracel·lular en resposta a la senyalització mitocondrial, en el context de la cèl·lula muscular.



## **Conclusions**





## **CONCLUSIONS**

- L'expressió del gen FGF21 s'indueix en associació a la diferenciació miogènica en diferents models de cèl·lules musculars en cultiu.
- MyoD és un factor clau de la regulació transcripcional del gen FGF21 a la cèl·lula miogènica. Aquest, actua sobre una regió proximal (E box) del promotor del gen FGF21.
- Referent a les vies PPAR-dependents, es constata que principalment PPAR $\alpha$  i la seva activació poden induir l'expressió del gen FGF21 a la cèl·lula muscular, especialment en presència de MyoD. No obstant, el gen FGF21 no és sensible a l'acció d'àcids grassos naturals a miotubs en cultiu.
- L'activitat transcripcional del promotor FGF21 es veu afectada per coreguladors com PGC-1 $\alpha$  (positiu) o Sirt1 (negatiu).
- L'alteració de la funció mitocondrial mitjançant dosis subtòxiques d'inhibidors del sistema de la cadena respiratòria/fosforilació oxidativa, com l'antimicina A o l'oligomicina, causa una inducció de l'expressió del gen FGF21. Establint la seqüència d'esdeveniments intracel·lulars que causa aquest efecte observem que:
  - a) L'augment de les ROS induït per la disfunció mitocondrial és un factor clau de la inducció del gen FGF21.
  - b) L'activació de la p38-MAP-cinasa és necessària per a aquesta inducció del gen FGF21.
  - c) La fosforilació del factor ATF2 i la seva unió a una regió proximal del promotor del gen FGF21 està implicada en la resposta transcripcional en la disfunció mitocondrial.

Es conclou en general que la regulació de l'expressió i l'alliberament d'FGF21 al medi per part de la cèl·lula muscular en resposta a canvis mitocondrials podria ser un mecanisme de comunicació interòrgans entre el múscul i la resta de l'organisme per tal de promoure adaptacions sistèmiques a canvis en l'estatus del metabolisme energètic muscular. Es confirma, per tant, el paper d'FGF21 com a mioquina.

Els elevats nivells circulants d'FGF21 d'origen muscular en patologies mitocondrials, observats en diferents laboratoris i també observats en aquesta tesi, serien una manifestació patològica d'aquesta via de regulació.



## **Bibliografia**



**BIBLIOGRAFIA**

**A**Adams,A.C., Astapova,I., Fisher,F.M., Badman,M.K., Kurgansky,K.E., Flier,J.S., Hollenberg,A.N., and Maratos-Flier,E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPARalpha-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **285**, 14078-14082.

Adams,A.C., Cheng,C.C., Coskun,T., and Kharitonov,A. (2012). FGF21 Requires betaklotho to act in vivo. *PLoS. One* **7**, e49977.

Akimoto,T., Pohnert,S.C., Li,P., Zhang,M., Gumbs,C., Rosenberg,P.B., Williams,R.S., and Yan,Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 19587-19593.

Alba Gonzalez-Franquesa,V.D.N.C.L.a.P.M.G.-R. (2012). Skeletal Muscle Mitochondrial Function/Dysfunction and Type 2 Diabetes. *Arch. Physiol Biochem.* **117**, 257-292.

Amat,R., Solanes,G., Giralt,M., and Villarroya,F. (2007). SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription. *J. Biol. Chem.* **282**, 34066-34076.

Amat,R., Planavila,A., Chen,S.L., Iglesias,R., Giralt,M., and 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.

Amuthan,G., Biswas,G., Zhang,S.Y., Klein-Szanto,A., Vijayasathy,C., and Avadhani,N.G. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* **20**, 1910-1920.

An,S.Y., Lee,M.S., Yi,S.A., Ha,E.S., Han,S.J., Kim,H.J., Kim,D.J., and Lee,K.W. (2012). Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **96**, 196-203.

Andrews,M.T., Squire,T.L., Bowen,C.M., and Rollins,M.B. (1998). Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 8392-8397.

Angelin,B., Larsson,T.E., and Rudling,M. (2012). Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators-a critical appraisal. *Cell Metab.* **16**, 693-705.

Arner,P., Pettersson,A., Mitchell,P.J., Dunbar,J.D., Kharitonov,A., and Ryden,M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett.* **582**, 1725-1730.

Aure,K., Fayet,G., Leroy,J.P., Lacene,E., Romero,N.B., and Lombes,A. (2006). Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* **129**, 1249-1259.

**B**aar,K., Wende,A.R., Jones,T.E., Marison,M., Nolte,L.A., Chen,M., Kelly,D.P., and Holloszy,J.O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* **16**, 1879-1886.

Badman,M.K., Pissios,P., Kennedy,A.R., Koukos,G., Flier,J.S., and Maratos-Flier,E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* **5**, 426-437.

Badman,M.K., Koester,A., Flier,J.S., Kharitonov,A., and Maratos-Flier,E. (2009). Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology* *150*, 4931-4940.

Bao,J. and Sack,M.N. (2010). Protein deacetylation by sirtuins: delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. *Cell Mol. Life Sci.* *67*, 3073-3087.

Beenken,A. and Mohammadi,M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 235-253.

Berglund,E.D., Li,C.Y., Bina,H.A., Lynes,S.E., Michael,M.D., Shanafelt,A.B., Kharitonov,A., and Wasserman,D.H. (2009). Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology* *150*, 4084-4093.

Bergstrom,D.A., Penn,B.H., Strand,A., Perry,R.L., Rudnicki,M.A., and Tapscott,S.J. (2002). Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol. Cell* *9*, 587-600.

Berkes,C.A. and Tapscott,S.J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 585-595.

Black,B.L. and Olson,E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 167-196.

Blackwell,T.K. and Weintraub,H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* *250*, 1104-1110.

Bookout,A.L., de Groot,M.H., Owen,B.M., Lee,S., Gautron,L., Lawrence,H.L., Ding,X., Elmquist,J.K., Takahashi,J.S., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat. Med.* *19*, 1147-1152.

Bordone,L. and Guarente,L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 298-305.

Bostrom,P., Wu,J., Jedrychowski,M.P., Korde,A., Ye,L., Lo,J.C., Rasbach,K.A., Bostrom,E.A., Choi,J.H., Long,J.Z., Kajimura,S., Zingaretti,M.C., Vind,B.F., Tu,H., Cinti,S., Hojlund,K., Gygi,S.P., and Spiegelman,B.M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* *481*, 463-468.

Brandt,C. and Pedersen,B.K. (2010). The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*:520258.

Braun,T., Bober,E., Buschhausen-Denker,G., Kohtz,S., Grzeschik,K.H., and Arnold,H.H. (1989). Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J.* *8*, 3617-3625.

Brennan,T.J., Chakraborty,T., and Olson,E.N. (1991). Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 5675-5679.

Buckingham,M. (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 440-448.

**C**amara,Y., Duval,C., and Villarroya F (2005). New frontiers in Mitochondrial Biogenesis and Disease. *Research Signpost.* *9*, 189-213.

Canto,C. and Auwerx,J. (2008). Glucose restriction: longevity SIRTainly, but without building muscle? *Dev. Cell* *14*, 642-644.

- Canto,C., Gerhart-Hines,Z., Feige,J.N., Lagouge,M., Noriega,L., Milne,J.C., Elliott,P.J., Puigserver,P., and Auwerx,J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Carroll,J.S. and Brown,M. (2006). Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol. Endocrinol.* 20, 1707-1714.
- Cha,B.S., Ciaraldi,T.P., Carter,L., Nikoulina,S.E., Mudaliar,S., Mukherjee,R., Paterniti,J.R., Jr., and Henry,R.R. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia* 44, 444-452.
- Chartoumpekis,D.V., Habeos,I.G., Ziros,P.G., Psyrogiannis,A.I., Kyriazopoulou,V.E., and Papavassiliou,A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med.* 17, 736-740.
- Chau,M.D., Gao,J., Yang,Q., Wu,Z., and Gromada,J. (2010). Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 12553-12558.
- Chavez,A.O., Molina-Carrion,M., Abdul-Ghani,M.A., Folli,F., Defronzo,R.A., and Tripathy,D. (2009). Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 1542-1546.
- Chen,C., Cheung,B.M., Tso,A.W., Wang,Y., Law,L.S., Ong,K.L., Wat,N.M., Xu,A., and Lam,K.S. (2011). High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of type 2 diabetes: a 5.4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care* 34, 2113-2115.
- Chen,W., Hoo,R.L., Konishi,M., Itoh,N., Lee,P.C., Ye,H.Y., Lam,K.S., and Xu,A. (2011). Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 34559-34566.
- Chen,W.W., Li,L., Yang,G.Y., Li,K., Qi,X.Y., Zhu,W., Tang,Y., Liu,H., and Boden,G. (2008). Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, 65-68.
- Cheng,A.S., Jin,V.X., Fan,M., Smith,L.T., Liyanarachchi,S., Yan,P.S., Leu,Y.W., Chan,M.W., Plass,C., Nephew,K.P., Davuluri,R.V., and Huang,T.H. (2006). Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters. *Mol. Cell* 21, 393-404.
- Chevillotte,E., Giral,M., Miroux,B., Ricquier,D., and Villarroja,F. (2007). Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes.* 56, 1042-1050.
- Chinnery,P.F., Johnson,M.A., Wardell,T.M., Singh-Kler,R., Hayes,C., Brown,D.T., Taylor,R.W., Bindoff,L.A., and Turnbull,D.M. (2000). The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48, 188-193.
- Choi,J., Costa,M.L., Mermelstein,C.S., Chagas,C., Holtzer,S., and Holtzer,H. (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7988-7992.
- Christodoulides,C., Dyson,P., Sprecher,D., Tsintzas,K., and Karpe,F. (2009). Circulating fibroblast growth factor 21 is induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonists but not ketosis in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3594-3601.

Chung,A.B., Stepien,G., Haraguchi,Y., Li,K., and Wallace,D.C. (1992). Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences. *J. Biol. Chem.* 267 , 21154-21161.

Ciaraldi,T.P., Cha,B.S., Park,K.S., Carter,L., Mudaliar,S.R., and Henry,R.R. (2002). Free fatty acid metabolism in human skeletal muscle is regulated by PPARgamma and RXR agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 66-70.

Coll,T., Rodriguez-Calvo,R., Barroso,E., Serrano,L., Eyre,E., Palomer,X., and Vazquez-Carrera,M. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 46-55.

Conway,K., Pin,C., Kiernan,J.A., and Merrifield,P. (2004). The E protein HEB is preferentially expressed in developing muscle. *Differentiation* 72, 327-340.

Cortassa,S., Aon,M.A., Winslow,R.L., and O'Rourke,B. (2004). A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species. *Biophys. J.* 87, 2060-2073.

Coskun,T., Bina,H.A., Schneider,M.A., Dunbar,J.D., Hu,C.C., Chen,Y., Moller,D.E., and Kharitonov,A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* 149, 6018-6027.

Crescenzi,M., Fleming,T.P., Lassar,A.B., Weintraub,H., and Aaronson,S.A. (1990). MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 8442-8446.

Crooks,D.R., Natarajan,T.G., Jeong,S.Y., Chen,C., Park,S.Y., Huang,H., Ghosh,M.C., Tong,W.H., Haller,R.G., Wu,C., and Rouault,T.A. (2014). Elevated FGF21 secretion, PGC-1alpha and ketogenic enzyme expression are hallmarks of iron-sulfur cluster depletion in human skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 23, 24-39.

Cuevas-Ramos,D., Almeda-Valdes,P., Gomez-Perez,F.J., Meza-Arana,C.E., Cruz-Bautista,I., Arellano-Campos,O., Navarrete-Lopez,M., and Aguilar-Salinas,C.A. (2010). Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *Eur. J. Endocrinol.* 163, 469-477.

Cuevas-Ramos,D., meda-Valdes,P., Meza-Arana,C.E., Brito-Cordova,G., Gomez-Perez,F.J., Mehta,R., Oseguera-Moguel,J., and guilar-Salinas,C.A. (2012). Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS. One* 7, e38022.

Cuevas-Ramos,D., guilar-Salinas,C.A., and Gomez-Perez,F.J. (2012). Metabolic actions of fibroblast growth factor 21. *Curr. Opin. Pediatr.* 24, 523-529.

Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (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.

**D**avis,R.L., Cheng,P.F., Lassar,A.B., and Weintraub,H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60, 733-746.

De Sousa-Coelho,A.L., Marrero,P.F., and Haro,D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* 443, 165-171.

De Sousa-Coelho,A.L., Relat,J., Hondares,E., Perez-Marti,A., Ribas,F., Villarroya,F., Marrero,P.F., and Haro,D. (2013). FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation. *J. Lipid Res.* 54, 1786-1797.



DeFronzo,R.A., Jacot,E., Jequier,E., Maeder,E., Wahren,J., and Felber,J.P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000-1007.

Diaz-Delfin,J., Hondares,E., Iglesias,R., Giralt,M., Caelles,C., and Villarroya,F. (2012). TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 153, 4238-4245.

Dilworth,F.J. and Chambon,P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.

Ding,X., Boney-Montoya,J., Owen,B.M., Bookout,A.L., Coate,K.C., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2012). betaKlotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab.* 16, 387-393.

Domingo,P., Gallego-Escuredo,J.M., Domingo,J.C., Gutierrez,M.M., Mateo,M.G., Fernandez,I., Vidal,F., Giralt,M., and Villarroya,F. (2010). Serum FGF21 levels are elevated in association with lipodystrophy, insulin resistance and biomarkers of liver injury in HIV-1-infected patients. *AIDS* 24, 2629-2637.

Dushay,J., Chui,P.C., Gopalakrishnan,G.S., Varela-Rey,M., Crawley,M., Fisher,F.M., Badman,M.K., Martinez-Chantar,M.L., and Maratos-Flier,E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 139, 456-463.

Dutchak,P.A., Katafuchi,T., Bookout,A.L., Choi,J.H., Yu,R.T., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 148, 556-567.

**E**gan,B. and Zierath,J.R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 17, 162-184.

**F**azeli,P.K., Misra,M., Goldstein,M., Miller,K.K., and Klibanski,A. (2010). Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 369-374.

Ferri,P., Barbieri,E., Burattini,S., Guescini,M., D'Emilio,A., Biagiotti,L., Del,G.P., De,L.A., Stocchi,V., and Falcieri,E. (2009). Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J. Cell Biochem.* 108, 1302-1317.

Finley,L.W., Lee,J., Souza,A., Squiret-Dumas,V., Bullock,K., Rowe,G.C., Procaccio,V., Clish,C.B., Arany,Z., and Haigis,M.C. (2012). Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 2931-2936.

Fisher,F.M., Chui,P.C., Antonellis,P.J., Bina,H.A., Kharitonov,A., Flier,J.S., and Maratos-Flier,E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 59, 2781-2789.

Fisher,F.M., Estall,J.L., Adams,A.C., Antonellis,P.J., Bina,H.A., Flier,J.S., Kharitonov,A., Spiegelman,B.M., and Maratos-Flier,E. (2011). Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology* 152, 2996-3004.

Fisher,F.M., Kleiner,S., Douris,N., Fox,E.C., Mepani,R.J., Verdeguer,F., Wu,J., Kharitonov,A., Flier,J.S., Maratos-Flier,E., and Spiegelman,B.M. (2012). FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271-281.

Fon, T.K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o M, Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol. Endocrinol.* *24*, 2050-2064.

Freyssenet, D. (2007). Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985) *102*, 529-540.

Frye, R.A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 273-279.

Fu, L., John, L.M., Adams, S.H., Yu, X.X., Tomlinson, E., Renz, M., Williams, P.M., Soriano, R., Corpuz, R., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Foster, J., Stephan, J.P., Tsai, S.P., and Stewart, T.A. (2004). Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* *145*, 2594-2603.

Fukumoto, S. (2008). Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism--pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Intern. Med.* *47*, 337-343.

Fulco, M., Schiltz, R.L., Iezzi, S., King, M.T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R.L., and Sartorelli, V. (2003). Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol. Cell* *12*, 51-62.

**G**aich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* *18*, 333-340.

Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, P., Gutierrez, M.M., Mateo, M.G., Cabeza, M.C., Fontanet, A., Vidal, F., Domingo, J.C., Giralt, M., and Villarroya, F. (2012). Reduced levels of serum FGF19 and impaired expression of receptors for endocrine FGFs in adipose tissue from HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* *61*, 527-534.

Gallego-Escuredo, J.M., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Fruhbeck, G., and Villarroya, F. (2014). Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int. J. Obes. (Lond)*.

Galman, C., Lundasen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafstrom, I., Dahlin, M., Amark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab.* *8*, 169-174.

Gerber, A.N., Klesert, T.R., Bergstrom, D.A., and Tapscott, S.J. (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* *11*, 436-450.

Gilde, A.J. and Van, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* *178*, 425-434.

Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O.A., Kalinina, J., Olsen, S.K., Eliseenkova, A.V., Xu, C., Neubert, T.A., Zhang, F., Linhardt, R.J., Yu, X., White, K.E., Inagaki, T., Kliewer, S.A., Yamamoto, M., Kurosu, H., Ogawa, Y., Kuro-o M, Lanske, B., Razzaque, M.S., and Mohammadi, M. (2007). Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol. Cell Biol.* *27*, 3417-3428.

Goetz, R. and Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 166-180.

Gorar,S., Culha,C., Uc,Z.A., Dellal,F.D., Serter,R., Aral,S., and Aral,Y. (2010). Serum fibroblast growth factor 21 levels in polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* 26, 819-826.

Gospodarowicz,D. (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249, 123-127.

Gossett,L.A., Kelvin,D.J., Sternberg,E.A., and Olson,E.N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell Biol.* 9, 5022-5033.

Gray,S.R. and Kamolrat,T. (2011). The effect of exercise induced cytokines on insulin stimulated glucose transport in C2C12 cells. *Cytokine* 55, 221-228.

**H**ale,C., Chen,M.M., Stanislaus,S., Chinookoswong,N., Hager,T., Wang,M., Veniant,M.M., and Xu,J. (2012). Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology* 153, 69-80.

Hamanaka,R.B. and Chandel,N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* 35, 505-513.

Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (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.

Hawley,J.A., Hargreaves,M., and Zierath,J.R. (2006). Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation. *Essays Biochem.* 42, 1-12.

He,Z., Jiang,T., Wang,Z., Levi,M., and Li,J. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 287, E424-E430.

Hirabara,S.M., Curi,R., and Maechler,P. (2010). Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J. Cell Physiol.* 222, 187-194.

Hojman,P., Pedersen,M., Nielsen,A.R., Krogh-Madsen,R., Yfanti,C., Akerstrom,T., Nielsen,S., and Pedersen,B.K. (2009). Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes* 58, 2797-2801.

Holland,W.L., Adams,A.C., Brozinick,J.T., Bui,H.H., Miyauchi,Y., Kusminski,C.M., Bauer,S.M., Wade,M., Singhal,E., Cheng,C.C., Volk,K., Kuo,M.S., Gordillo,R., Kharitonov,A., and Scherer,P.E. (2013). An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab.* 17, 790-797.

Hondares,E., Rosell,M., Gonzalez,F.J., Giralt,M., Iglesias,R., and 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.

Hondares,E., Iglesias,R., Giralt,A., Gonzalez,F.J., Giralt,M., Mampel,T., and Villarroya,F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983-12990.

Horowitz,J.F., Leone,T.C., Feng,W., Kelly,D.P., and Klein,S. (2000). Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 279, E348-E355.

Hotta,Y., Nakamura,H., Konishi,M., Murata,Y., Takagi,H., Matsumura,S., Inoue,K., Fushiki,T., and Itoh,N. (2009). Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* *150*, 4625-4633.

Howell,N. (1999). Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. *Int. Rev. Cytol.* *186*, 49-116.

Hu,F. and Liu,F. (2011). Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell Signal.* *23*, 1528-1533.

Hwang,J.H., Kim,D.W., Jo,E.J., Kim,Y.K., Jo,Y.S., Park,J.H., Yoo,S.K., Park,M.K., Kwak,T.H., Kho,Y.L., Han,J., Choi,H.S., Lee,S.H., Kim,J.M., Lee,I., Kyung,T., Jang,C., Chung,J., Kweon,G.R., and Shong,M. (2009). Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* *58*, 965-974.

Iizuka,K., Takeda,J., and Horikawa,Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* *583*, 2882-2886.

Inagaki,T., Choi,M., Moschetta,A., Peng,L., Cummins,C.L., McDonald,J.G., Luo,G., Jones,S.A., Goodwin,B., Richardson,J.A., Gerard,R.D., Repa,J.J., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* *2*, 217-225.

Inagaki,T., Dutchak,P., Zhao,G., Ding,X., Gautron,L., Parameswara,V., Li,Y., Goetz,R., Mohammadi,M., Esser,V., Elmquist,J.K., Gerard,R.D., Burgess,S.C., Hammer,R.E., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* *5*, 415-425.

Inagaki,T., Lin,V.Y., Goetz,R., Mohammadi,M., Mangelsdorf,D.J., and Kliewer,S.A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab.* *8*, 77-83.

Itoh,N. and Ornitz,D.M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* *20*, 563-569.

Itoh,N. and Ornitz,D.M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* *237*, 18-27.

Itoh,N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res.* *342*, 1-11.

Itoh,N. and Ornitz,D.M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* *149*, 121-130.

Izumiya,Y., Bina,H.A., Ouchi,N., Akasaki,Y., Kharitononkov,A., and Walsh,K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* *582*, 3805-3810.

Johnson,D.E., Lu,J., Chen,H., Werner,S., and Williams,L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell Biol.* *11*, 4627-4634.

Kawakami,K., Sato,S., Ozaki,H., and Ikeda,K. (2000). Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* *22*, 616-626.

- Keipert,S., Ost,M., Johann,K., Imber,F., Jastroch,M., Van Schothorst,E.M., Keijer,J., and Klaus,S. (2013). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through induction of FGF21 as a myokine. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 306, E469-82.
- Keller,H., Dreyer,C., Medin,J., Mahfoudi,A., Ozato,K., and Wahli,W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 2160-2164.
- Kelley,D.E., He,J., Menshikova,E.V., and Ritov,V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.
- Kelly,D.P. and Scarpulla,R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357-368.
- Kharitononkov,A., Shiyanova,T.L., Koester,A., Ford,A.M., Micanovic,R., Galbreath,E.J., Sandusky,G.E., Hammond,L.J., Moyers,J.S., Owens,R.A., Gromada,J., Brozinick,J.T., Hawkins,E.D., Wroblewski,V.J., Li,D.S., Mehrbod,F., Jaskunas,S.R., and Shanafelt,A.B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627-1635.
- Kharitononkov,A., Wroblewski,V.J., Koester,A., Chen,Y.F., Clutinger,C.K., Tigno,X.T., Hansen,B.C., Shanafelt,A.B., and Etgen,G.J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148, 774-781.
- Kharitononkov,A., Dunbar,J.D., Bina,H.A., Bright,S., Moyers,J.S., Zhang,C., Ding,L., Micanovic,R., Mehrbod,S.F., Knierman,M.D., Hale,J.E., Coskun,T., and Shanafelt,A.B. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J. Cell Physiol.* 215, 1-7.
- Kharitononkov,A. and Larsen,P. (2011). FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field. *Trends Endocrinol. Metab.* 22 , 81-86.
- Kim,K.H., Jeong,Y.T., Oh,H., Kim,S.H., Cho,J.M., Kim,Y.N., Kim,S.S., Kim,D.H., Hur,K.Y., Kim,H.K., Ko,T., Han,J., Kim,H.L., Kim,J., Back,S.H., Komatsu,M., Chen,H., Chan,D.C., Konishi,M., Itoh,N., Choi,C.S., and Lee,M.S. (2012). Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* 19, 83-92.
- Kim,K.H., Kim,S.H., Min,Y.K., Yang,H.M., Lee,J.B., and Lee,M.S. (2013). Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans. *PLoS. One* 8, e63517.
- Kliwer,S.A. and Mangelsdorf,D.J. (2010). Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 254S-257S.
- Klingenberg,M. (1992). Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 547-550.
- Koopman,R., Manders,R.J., Jonkers,R.A., Hul,G.B., Kuipers,H., and van Loon,L.J. (2006). Intramyocellular lipid and glycogen content are reduced following resistance exercise in untrained healthy males. *Eur. J. Appl. Physiol.* 96, 525-534.
- Kressler,D., Schreiber,S.N., Knutti,D., and Kralli,A. (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 13918-13925.
- Kubota,N., Terauchi,Y., Kubota,T., Kumagai,H., Itoh,S., Satoh,H., Yano,W., Ogata,H., Tokuyama,K., Takamoto,I., Mineyama,T., Ishikawa,M., Moroi,M., Sugi,K., Yamauchi,T., Ueki,K., Tobe,K., Noda,T., Nagai,R., and Kadowaki,T. (2006). Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 8748-8755.
- Kurosu,H., Choi,M., Ogawa,Y., Dickson,A.S., Goetz,R., Eliseenkova,A.V., Mohammadi,M., Rosenblatt,K.P., Kliwer,S.A., and Kuro-o M (2007). Tissue-specific expression of betaKlotho and

fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* **282**, 26687-26695.

Laganier, J., Deblois, G., Lefebvre, C., Bataille, A.R., Robert, F., and Giguere, V. (2005). From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 11651-11656.

Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., and Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* **58**, 823-831.

Lee, P., Linderman, J., Smith, S., Brychta, R.J., Perron, R., Idelson, C., Werner, C.D., Chen, K.Y., and Celi, F.S. (2013). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) and bone: is there a relationship in humans? *Osteoporos. Int.* **24**, 3053-3057.

Lee, S.A., Jeong, E., Kim, E.H., Shin, M.S., Hwang, J.Y., Koh, E.H., Lee, W.J., Park, J.Y., and Kim, M.S. (2012). Various oscillation patterns of serum fibroblast growth factor 21 concentrations in healthy volunteers. *Diabetes Metab J.* **36**, 29-36.

Legerlotz, K. and Smith, H.K. (2008). Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve* **38**, 1087-1100.

Li, H., Fang, Q., Gao, F., Fan, J., Zhou, J., Wang, X., Zhang, H., Pan, X., Bao, Y., Xiang, K., Xu, A., and Jia, W. (2010). Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J. Hepatol.* **53**, 934-940.

Lim, J.H., Lee, J.I., Suh, Y.H., Kim, W., Song, J.H., and Jung, M.H. (2006). Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. *Diabetologia* **49**, 1924-1936.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., and Spiegelman, B.M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.

Lin, Z., Wu, Z., Yin, X., Liu, Y., Yan, X., Lin, S., Xiao, J., Wang, X., Feng, W., and Li, X. (2010). Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS. One* **5**, e15534.

Lin, Z., Tian, H., Lam, K.S., Lin, S., Hoo, R.C., Konishi, M., Itoh, N., Wang, Y., Bornstein, S.R., Xu, A., and Li, X. (2013). Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab.* **17**, 779-789.

Lindgaard, B., Hvid, T., Grondahl, T., Frosig, C., Gerstoft, J., Hojman, P., and Pedersen, B.K. (2013). Expression of fibroblast growth factor-21 in muscle is associated with lipodystrophy, insulin resistance and lipid disturbances in patients with HIV. *PLoS. One* **8**, e55632.

Liu, S.Q., Tefft, B.J., Zhang, D., Roberts, D., Schuster, D.J., and Wu, A. (2011). Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia. *Mol. Cell Biomech.* **8**, 319-338.

Lotz, M. (2012). Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 192-196.

Lundasen, T., Galman, C., Angelin, B., and Rudling, M. (2006). Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J. Intern. Med.* **260**, 530-536.

Lundasen,T., Hunt,M.C., Nilsson,L.M., Sanyal,S., Angelin,B., Alexson,S.E., and Rudling,M. (2007). PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 437-440.

**M**ai,K., Andres,J., Biedasek,K., Weicht,J., Bobbert,T., Sabath,M., Meinus,S., Reinecke,F., Mohlig,M., Weickert,M.O., Clemenz,M., Pfeiffer,A.F., Kintscher,U., Spuler,S., and Spranger,J. (2009). Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21. *Diabetes* 58, 1532-1538.

Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P., and Evans,R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Margulis,L. (1981). *Symbiosis in cell evolution.* (San Francisco, CA, Freeman. Ref Type: Generic.

Margulis, L. *Origins of Eukaryotic Cells.* 1970. Yale University Press, New Haven. Ref Type: Generic.

Martins,A.R., Nachbar,R.T., Gorjao,R., Vinolo,M.A., Festuccia,W.T., Lambertucci,R.H., Cury-Boaventura,M.F., Silveira,L.R., Curi,R., and Hirabara,S.M. (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11:30.

Mashili,F.L., Austin,R.L., Deshmukh,A.S., Fritz,T., Caidahl,K., Bergdahl,K., Zierath,J.R., Chibalin,A.V., Moller,D.E., Kharitonov,A., and Krook,A. (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab Res. Rev.* 27, 286-297.

Melov,S., Coskun,P.E., and Wallace,D.C. (1999). Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence. *Mutat. Res.* 434, 233-242.

Melvin,R.G. and Andrews,M.T. (2009). Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 490-498.

Metivier,R., Reid,G., and Gannon,F. (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep.* 7, 161-167.

Micanovic,R., Raches,D.W., Dunbar,J.D., Driver,D.A., Bina,H.A., Dickinson,C.D., and Kharitonov,A. (2009). Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. *J. Cell Physiol.* 219, 227-234.

Michael,L.F., Wu,Z., Cheatham,R.B., Puigserver,P., Adelmant,G., Lehman,J.J., Kelly,D.P., and Spiegelman,B.M. (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.

Ming,A.Y., Yoo,E., Vorontsov,E.N., Altamentova,S.M., Kilkenny,D.M., and Rocheleau,J.V. (2012). Dynamics and Distribution of Klothobeta (KLB) and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) in living cells reveal the fibroblast growth factor-21 (FGF21)-induced receptor complex. *J. Biol. Chem.* 287, 19997-20006.

Mitchell,P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 41, 445-502.

Moller,D.E. (2012). Metabolic disease drug discovery- "hitting the target" is easier said than done. *Cell Metab.* 15, 19-24.

Morino,K., Petersen,K.F., and Shulman,G.I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 *Suppl* 2, S9-S15.

Motta,M.C., Divecha,N., Lemieux,M., Kamel,C., Chen,D., Gu,W., Bultsma,Y., McBurney,M., and Guarente,L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116, 551-563.

Moyers,J.S., Shiyanova,T.L., Mehrbod,F., Dunbar,J.D., Noblitt,T.W., Otto,K.A., Reifel-Miller,A., and Kharitonov,A. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J. Cell Physiol.* 210, 1-6.

Mraz,M., Bartlova,M., Lacinova,Z., Michalsky,D., Kasalicky,M., Haluzikova,D., Matoulek,M., Dostalova,I., Humenanska,V., and Haluzik,M. (2009). Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 71, 369-375.

Muise,E.S., Azzolina,B., Kuo,D.W., El-Sherbeini,M., Tan,Y., Yuan,X., Mu,J., Thompson,J.R., Berger,J.P., and Wong,K.K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol. Pharmacol.* 74, 403-412.

Muoio,D.M., Way,J.M., Tanner,C.J., Winegar,D.A., Kliewer,S.A., Houmard,J.A., Kraus,W.E., and Dohm,G.L. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 51, 901-909.

Muoio,D.M., MacLean,P.S., Lang,D.B., Li,S., Houmard,J.A., Way,J.M., Winegar,D.A., Corton,J.C., Dohm,G.L., and Kraus,W.E. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J. Biol. Chem.* 277, 26089-26097.

**N**agpal,S., Friant,S., Nakshatri,H., and Chambon,P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* 12, 2349-2360.

Nakamura,M.T., Yudell,B.E., and Loor,J.J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53, 124-144.

Nawrocki,A.R., Rajala,M.W., Tomas,E., Pajvani,U.B., Saha,A.K., Trumbauer,M.E., Pang,Z., Chen,A.S., Ruderman,N.B., Chen,H., Rossetti,L., and Scherer,P.E. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 281, 2654-2660.

Nelson,B.T., Ding,X., Boney-Montoya,J., Gerard,R.D., Kliewer,S.A., and Andrews,M.T. (2013). Metabolic hormone FGF21 is induced in ground squirrels during hibernation but its overexpression is not sufficient to cause torpor. *PLoS. One* 8, e53574.

Nishimura,T., Nakatake,Y., Konishi,M., and Itoh,N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203-206.

Norrbom,J., Sundberg,C.J., Ameln,H., Kraus,W.E., Jansson,E., and Gustafsson,T. (2004). PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 96, 189-194.

Nunnari,J. and Suomalainen,A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.

Nygaard,E.B., Moller,C.L., Kievit,P., Grove,K.L., and Andersen,B. (2014). Increased fibroblast growth factor 21 expression in high-fat diet-sensitive non-human primates (*Macaca mulatta*). *Int. J. Obes. (Lond)* 38, 183-191



**O**.A.Trowell and E.N.Willmer. Studies on the Growth of Tissues in vitro. (1939). *The Journal of Experimental Biology* 16, 60-70.

Ogawa,Y., Kurosu,H., Yamamoto,M., Nandi,A., Rosenblatt,K.P., Goetz,R., Eliseenkova,A.V., Mohammadi,M., and Kuro-o M (2007). BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7432-7437.

Oishi,K. and Tomita,T. (2011). Thiazolidinediones are potent inducers of fibroblast growth factor 21 expression in the liver. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1120-1121.

Ornitz,D.M. and Itoh,N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3005.

Orphanides,G., Lagrange,T., and Reinberg,D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10, 2657-2683.

Oulion,S., Bertrand,S., and Escriva,H. (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *Int. J. Evol. Biol.* 2012, 298147.

Owen,B.M., Bookout,A.L., Ding,X., Lin,V.Y., Atkin,S.D., Gautron,L., Kliewer,S.A., and Mangelsdorf,D.J. (2013). FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat. Med.* 19, 1153-1156.

**P**arish,R. and Petersen,K.F. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 5, 177-183.

Park,K.S., Ciaraldi,T.P., Abrams-Carter,L., Mudaliar,S., Nikoulina,S.E., and Henry,R.R. (1997). PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes* 46, 1230-1234.

Pedersen,B.K. and Febbraio,M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 88, 1379-1406.

Pedersen,B.K. (2011). Muscles and their myokines. *J. Exp. Biol.* 214, 337-346.

Penn,B.H., Bergstrom,D.A., Dilworth,F.J., Bengal,E., and Tapscott,S.J. (2004). A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2348-2353.

Perissi,V. and Rosenfeld,M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542-554.

Petersen,K.F., Befroy,D., Dufour,S., Dziura,J., Ariyan,C., Rothman,D.L., DiPietro,L., Cline,G.W., and Shulman,G.I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300, 1140-1142.

Pfeffer,G. and Chinnery,P.F. (2013). Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies. *Ann. Med.* 45, 4-16.

Planavila,A., Redondo,I., Hondares,E., Vinciguerra,M., Munts,C., Iglesias,R., Gabrielli,L.A., Sitges,M., Giralt,M., Van,B.M., and Villarroya,F. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* 4, 2019.

Polesskaya,A., Naguibneva,I., Fritsch,L., Duquet,A., Ait-Si-Ali,S., Robin,P., Vervisch,A., Pritchard,L.L., Cole,P., and Harel-Bellan,A. (2001). CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *EMBO J.* 20, 6816-6825.

Polesskaya,A., Naguibneva,I., Duquet,A., Bengal,E., Robin,P., and Harel-Bellan,A. (2001). Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol. Cell Biol.* 21, 5312-5320.

Popovici,C., Roubin,R., Coulier,F., and Birnbaum,D. (2005). An evolutionary history of the FGF superfamily. *Bioessays* 27, 849-857.

Potthoff,M.J., Inagaki,T., Satapati,S., Ding,X., He,T., Goetz,R., Mohammadi,M., Finck,B.N., Mangelsdorf,D.J., Kliewer,S.A., and Burgess,S.C. (2009). FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 10853-10858.

Potthoff,M.J., Kliewer,S.A., and Mangelsdorf,D.J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 26, 312-324.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

Puri,P.L., Sartorelli,V., Yang,X.J., Hamamori,Y., Ogryzko,V.V., Howard,B.H., Kedes,L., Wang,J.Y., Graessmann,A., Nakatani,Y., and Levrero,M. (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell* 1, 35-45.

Puri,P.L., Avantaggiati,M.L., Balsano,C., Sang,N., Graessmann,A., Giordano,A., and Levrero,M. (1997). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* 16, 369-383.

**Q**iang,L. and Accili,D. (2012). FGF21 and the second coming of PPARgamma. *Cell* 148, 397-398.

**R**aingeaud,J., Whitmarsh,A.J., Barrett,T., Derijard,B., and Davis,R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* 16, 1247-1255.

Raschke,S. and Eckel,J. (2013). Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise. *Mediators. Inflamm.* 2013, 320724.

Reinehr,T., Woelfle,J., Wunsch,R., and Roth,C.L. (2012). Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 2143-2150.

Reitman,M.L. (2013). FGF21 mimetic shows therapeutic promise. *Cell Metab.* 18, 307-309.

Ritov,V.B., Menshikova,E.V., Azuma,K., Wood,R., Toledo,F.G., Goodpaster,B.H., Ruderman,N.B., and Kelley,D.E. (2010). Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 298, E49-E58.

Rojo,G., Chamorro,M., Salas,M.L., Vinuela,E., Cuezva,J.M., and Salas,J. (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J. Virol.* 72, 7583-7588.

Rudnicki,M.A., Schnegelsberg,P.N., Stead,R.H., Braun,T., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.

Russell,A.P., Feilchenfeldt,J., Schreiber,S., Praz,M., Crettenand,A., Gobelet,C., Meier,C.A., Bell,D.R., Kralli,A., Giacobino,J.P., and Deriaz,O. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 52, 2874-2881.

Russell,A.P. (2005). PGC-1alpha and exercise: important partners in combating insulin resistance. *Curr. Diabetes Rev.* *1*, 175-181.

Ryall,J.G. (2012). The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle 198. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *15*, 561-566.

Ryden,M. (2009). Fibroblast growth factor 21: an overview from a clinical perspective 199. *Cell Mol. Life Sci.* *66*, 2067-2073.

**S**andstrom,M.E., Zhang,S.J., Bruton,J., Silva,J.P., Reid,M.B., Westerblad,H., and Katz,A. (2006). Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* *575*, 251-262.

Sarruf,D.A., Thaler,J.P., Morton,G.J., German,J., Fischer,J.D., Ogimoto,K., and Schwartz,M.W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* *59*, 1817-1824.

Sasaki,Y., Shimada,T., Iizuka,S., Suzuki,W., Makihara,H., Teraoka,R., Tsuneyama,K., Hokao,R., and Aburada,M. (2011). Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* *662*, 1-8.

Schaap,F.G., Kremer,A.E., Lamers,W.H., Jansen,P.L., and Gaemers,I.C. (2013). Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie* *95*, 692-699.

Schaefer,A.M., Taylor,R.W., and Turnbull,D.M. (2001). The mitochondrial genome and mitochondrial muscle disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* *1*, 288-293.

Schiaffino,S. and Reggiani,C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* *91*, 1447-1531.

Schoenberg,K.M., Giesy,S.L., Harvatine,K.J., Waldron,M.R., Cheng,C., Kharitonov,A., and Boisclair,Y.R. (2011). Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology* *152*, 4652-4661.

Schuler,M., Ali,F., Chambon,C., Duteil,D., Bornert,J.M., Tardivel,A., Desvergne,B., Wahli,W., Chambon,P., and Metzger,D. (2006). PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab.* *4*, 407-414.

Solanes,G., Pedraza,N., Iglesias,R., Giralt,M., and Villarroya,F. (2003). Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol. Endocrinol.* *17*, 1944-1958.

Suomalainen,A., Elo,J.M., Pietilainen,K.H., Hakonen,A.H., Sevastianova,K., Korpela,M., Isohanni,P., Marjavaara,S.K., Tyni,T., Kiuru-Enari,S., Pihko,H., Darin,N., Ounap,K., Kluijtmans,L.A., Paetau,A., Buzkova,J., Bindoff,L.A., Annunen-Rasila,J., Uusimaa,J., Rissanen,A., Yki-Jarvinen,H., Hirano,M., Tulinius,M., Smeitink,J., and Tynismaa,H. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol.* *10*, 806-818.

Suzuki,M., Uehara,Y., Motomura-Matsuzaka,K., Oki,J., Koyama,Y., Kimura,M., Asada,M., Komi-Kuramochi,A., Oka,S., and Imamura,T. (2008). betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* *22*, 1006-1014.

**T**an,B.K., Hallschmid,M., Adya,R., Kern,W., Lehnert,H., and Randeve,H.S. (2011). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid: relationship with plasma FGF21 and body adiposity. *Diabetes* 60, 2758-2762.

Trayhurn,P., Drevon,C.A., and Eckel,J. (2011). Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch. Physiol Biochem.* 117, 47-56.

Turturro,A., Witt,W.W., Lewis,S., Hass,B.S., Lipman,R.D., and Hart,R.W. (1999). Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, B492-B501.

Tynismaa,H., Mjosund,K.P., Wanrooij,S., Lappalainen,I., Ylikallio,E., Jalanko,A., Spelbrink,J.N., Paetau,A., and Suomalainen,A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17687-17692.

Tynismaa,H., Carroll,C.J., Raimundo,N., Ahola-Erkila,S., Wenz,T., Ruhanen,H., Guse,K., Hemminki,A., Peltola-Mjosund,K.E., Tulkki,V., Oresic,M., Moraes,C.T., Pietilainen,K., Hovatta,I., and Suomalainen,A. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3948-3958.

**U**ebanso,T., Taketani,Y., Yamamoto,H., Amo,K., Ominami,H., Arai,H., Takei,Y., Masuda,M., Tanimura,A., Harada,N., Yamanaka-Okumura,H., and Takeda,E. (2011). Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PLoS. One* 6, e22976.

Uebanso,T., Taketani,Y., Yamamoto,H., Amo,K., Tanaka,S., Arai,H., Takei,Y., Masuda,M., Yamanaka-Okumura,H., and Takeda,E. (2012). Liver X receptor negatively regulates fibroblast growth factor 21 in the fatty liver induced by cholesterol-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* 23, 785-790.

Uppenberg,J., Svensson,C., Jaki,M., Bertilsson,G., Jendeberg,L., and Berkenstam,A. (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J. Biol. Chem.* 273, 31108-31112.

Urakawa,I., Yamazaki,Y., Shimada,T., Iijima,K., Hasegawa,H., Okawa,K., Fujita,T., Fukumoto,S., and Yamashita,T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444, 770-774.

**V**ega,R.B., Huss,J.M., and Kelly,D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell Biol.* 20, 1868-1876.

Veniant,M.M., Hale,C., Helmering,J., Chen,M.M., Stanislaus,S., Busby,J., Vonderfecht,S., Xu,J., and Lloyd,D.J. (2012). FGF21 promotes metabolic homeostasis via white adipose and leptin in mice. *PLoS. One* 7, e40164.

Verma,N.K., Singh,J., and Dey,C.S. (2004). PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 143, 1006-1013.

Vidal-Puig,A.J., Considine,R.V., Jimenez-Linan,M., Werman,A., Pories,W.J., Caro,J.F., and Flier,J.S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest* 99, 2416-2422.

Vienberg,S.G., Brons,C., Nilsson,E., Astrup,A., Vaag,A., and Andersen,B. (2012). Impact of short-term high-fat feeding and insulin-stimulated FGF21 levels in subjects with low birth weight and controls. *Eur. J. Endocrinol.* 167, 49-57.

Villarroya J. (2010). *Estudis experimentals sobre els efectes fisiopatològics de la depleció del DNA mitocondrial.* Tesi Doctoral, 15-29.

**W**alker,J.E. and Runswick,M.J. (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 435-446.

Wallace,D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.

Walsh,K. (2009). Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ. J.* 73, 13-18.

Wan,Y. (2013). Bone marrow mesenchymal stem cells: fat on and blast off by FGF21. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 546-549.

Wang,F., Kan,M., Yan,G., Xu,J., and McKeehan,W.L. (1995). Alternately spliced NH2-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J. Biol. Chem.* 270, 10231-10235.

Wang,H., Qiang,L., and Farmer,S.R. (2008). Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 28, 188-200.

Wang,Y., Xu,C., Liang,Y., and Vanhoutte,P.M. (2012). SIRT1 in metabolic syndrome: where to target matters. *Pharmacol. Ther.* 136, 305-318.

Wang,Y.X., Lee,C.H., Tiep,S., Yu,R.T., Ham,J., Kang,H., and Evans,R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159-170.

Wasserman,W.W. and Fickett,J.W. (1998). Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J. Mol. Biol.* 278, 167-181.

Wei,W., Dutchak,P.A., Wang,X., Ding,X., Wang,X., Bookout,A.L., Goetz,R., Mohammadi,M., Gerard,R.D., Dechow,P.C., Mangelsdorf,D.J., Kliewer,S.A., and Wan,Y. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 3143-3148.

Weintraub,H., Davis,R., Lockshon,D., and Lassar,A. (1990). MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5623-5627.

Weintraub,H., Davis,R., Tapscott,S., Thayer,M., Krause,M., Benezra,R., Blackwell,T.K., Turner,D., Rupp,R., Hollenberg,S., and . (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-766.

Wells,G.D., Noseworthy,M.D., Hamilton,J., Tarnopolski,M., and Tein,I. (2008). Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can. J. Neurol. Sci.* 35, 31-40.

Wende,A.R., Huss,J.M., Schaeffer,P.J., Giguere,V., and Kelly,D.P. (2005). PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol. Cell Biol.* 25, 10684-10694.

Wente,W., Efanov,A.M., Brenner,M., Kharitonov,A., Koster,A., Sandusky,G.E., Sewing,S., Treinies,I., Zitzer,H., and Gromada,J. (2006). Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function

and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 55, 2470-2478.

Wenz,T., Diaz,F., Spiegelman,B.M., and Moraes,C.T. (2008). Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab.* 8, 249-256.

White,A.T. and Schenk,S. (2012). NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 303, E308-E321.

Woo,Y.C., Xu,A., Wang,Y., and Lam,K.S. (2013). Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 78, 489-496.

Wredenberg,A., Freyer,C., Sandstrom,M.E., Katz,A., Wibom,R., Westerblad,H., and Larsson,N.G. (2006). Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 202-207.

Wu,S., Levenson,A., Kharitonov,A., and De,L.F. (2012). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits chondrocyte function and growth hormone action directly at the growth plate. *J. Biol. Chem.* 287, 26060-26067.

Wu,S.B., Wu,Y.T., Wu,T.P., and Wei,Y.H. (2014). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1331-1344.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

**X**u,J., Stanislaus,S., Chinooswong,N., Lau,Y.Y., Hager,T., Patel,J., Ge,H., Weiszmann,J., Lu,S.C., Graham,M., Busby,J., Hecht,R., Li,Y.S., Li,Y., Lindberg,R., and Veniant,M.M. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models--association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 297, E1105-E1114.

Xu,J., Lloyd,D.J., Hale,C., Stanislaus,S., Chen,M., Sivits,G., Vonderfecht,S., Hecht,R., Li,Y.S., Lindberg,R.A., Chen,J.L., Jung,D.Y., Zhang,Z., Ko,H.J., Kim,J.K., and Veniant,M.M. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 250-259.

**Y**ang,S.J., Hong,H.C., Choi,H.Y., Yoo,H.J., Cho,G.J., Hwang,T.G., Baik,S.H., Choi,D.S., Kim,S.M., and Choi,K.M. (2011). Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 75, 464-469.

Yang,Y., Creer,A., Jemiolo,B., and Trappe,S. (2005). Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985) 98, 1745-1752.

Yatsuga,S. and Suomalainen,A. (2012). Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Hum. Mol. Genet.* 21, 526-535.

Yie,J., Hecht,R., Patel,J., Stevens,J., Wang,W., Hawkins,N., Steavenson,S., Smith,S., Winters,D., Fisher,S., Cai,L., Belouski,E., Chen,C., Michaels,M.L., Li,Y.S., Lindberg,R., Wang,M., Veniant,M., and Xu,J. (2009). FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation. *FEBS Lett.* 583, 19-24.

Yokota,T., Kinugawa,S., Yamato,M., Hirabayashi,K., Suga,T., Takada,S., Harada,K., Morita,N., Oyama-Manabe,N., Kikuchi,Y., Okita,K., and Tsutsui,H. (2013). Systemic Oxidative Stress Is Associated With Lower Aerobic Capacity and Impaired Skeletal Muscle Energy Metabolism in Patients With Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 36, 1341-1346.

Yu,H., Xia,F., Lam,K.S., Wang,Y., Bao,Y., Zhang,J., Gu,Y., Zhou,P., Lu,J., Jia,W., and Xu,A. (2011). Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans. *Clin. Chem.* 57, 691-700.

**Z**hang,J., Kaasik,K., Blackburn,M.R., and Lee,C.C. (2006). Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature* 439, 340-343.

Zhang,X., Yeung,D.C., Karpisek,M., Stejskal,D., Zhou,Z.G., Liu,F., Wong,R.L., Chow,W.S., Tso,A.W., Lam,K.S., and Xu,A. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 57, 1246-1253.

Zhang,Y., Xie,Y., Berglund,E.D., Coate,K.C., He,T.T., Katafuchi,T., Xiao,G., Potthoff,M.J., Wei,W., Wan,Y., Yu,R.T., Evans,R.M., Kliewer,S.A., and Mangelsdorf,D.J. (2012). The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife.* 1, e00065.

Zhu,C.H., Mouly,V., Cooper,R.N., Mamchaoui,K., Bigot,A., Shay,J.W., Di Santo,J.P., Butler-Browne,G.S., and Wright,W.E. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6, 515-523.

Zong,H., Ren,J.M., Young,L.H., Pypaert,M., Mu,J., Birnbaum,M.J., and Shulman,G.I. (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.

Zurlo,F., Larson,K., Bogardus,C., and Ravussin,E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.* 86, 1423-142.





## **Apèndix**



## **APÈNDIX**

Durant la realització de la present tesi doctorals'ha col·laborat en la realització d'altres treballs experimentals que han donat lloc a les següents publicacions:

**Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype.**

Revista: The Journal of Biological Chemistry  
PMID: 21454513

**El receptor activat per proliferació peroxisomal gamma 1 alfa controla la transcripció del gen Sirt3, un component essencial del fenotip termogènic de l'adipòcit marró.**

Sirt3 (silenciador de tipus creuament regulador de la informació 2, homòleg 3), un membre de la família de les proteïnes desacetilases amb múltiples accions en el metabolisme i en l'expressió gènica, s'expressa en associació amb la diferenciació de l'adipòcit marró. Mitjançant la utilització d'adipòcits marrons provinents de ratolins Sirt3-KO, es va determinar que Sirt3 era requerit per tal que es donés una resposta apropiada de les cèl·lules a l'activació noradrenèrgica, vehiculada per l'AMPc, pel que fa a l'expressió de gens termogènics del teixit adipós marró. El coactivador transcripcional Pgc-1 $\alpha$  (receptor activat per proliferació peroxisomal gamma 1 alfa) induïa l'expressió del gen Sirt3 en adipòcits blancs i fibroblasts embrionics com a part de la seva inducció global del patró d'expressió gènica del teixit adipós marró. A cèl·lules que els hi manca Sirt3, Pgc-1 $\alpha$  no era capaç d'induir totalment l'expressió dels gens termogènics específics de teixit adipós. Pgc-1 $\alpha$  activa la transcripció del gen Sirt3 a través de la coactivació del receptor nuclear orfe Err (receptor relacionat amb estrògens)- $\alpha$ , el qual s'uneix a la regió proximal del promotor del gen Sirt3. Els assaigs fets amb *Err $\alpha$ -Knockdown* indicaven que Err $\alpha$  era requerit per la inducció total de l'expressió del gen Sirt3 en resposta a Pgc-1 $\alpha$ . Els resultats presents indiquen que Pgc-1 $\alpha$  controla l'expressió del gen Sirt3, i que aquesta acció és un component essencial dels mecanismes globals pels quals Pgc-1 $\alpha$  indueix l'adquisició total del fenotip diferenciat de l'adipòcit marró.

La meua contribució en aquesta publicació ha estat focalitzada principalment en tota la part que fa referència als assaigs de regulació transcripcional del promotor de Sirt3 i les construccions mutades generades a partir d'aquest, així com també amb altres factors moduladors de la transcripció que actuen a nivell del promotor Sirt3 com són Pgc-1 $\alpha$  i Err $\alpha$ .



# Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$ Coactivator-1 $\alpha$ Controls Transcription of the *Sirt3* Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype\*

Received for publication, November 15, 2010, and in revised form, March 4, 2011 Published, JBC Papers in Press, March 27, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.202390

Albert Giralt<sup>‡</sup>, Elayne Hondares<sup>‡</sup>, Josep A. Villena<sup>§</sup>, Francesc Ribas<sup>‡</sup>, Julieta Díaz-Delfín<sup>‡</sup>, Marta Giralt<sup>‡</sup>, Roser Iglesias<sup>‡</sup>, and Francesc Villarroya<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición, 08028 Barcelona, Spain and the <sup>§</sup>Institut de Recerca Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain

**Sirt3** (silent mating type information regulation 2, homolog 3), a member of the sirtuin family of protein deacetylases with multiple actions on metabolism and gene expression is expressed in association with brown adipocyte differentiation. Using *Sirt3*-null brown adipocytes, we determined that *Sirt3* is required for an appropriate responsiveness of cells to noradrenergic, cAMP-mediated activation of the expression of brown adipose tissue thermogenic genes. The transcriptional coactivator *Pgc-1 $\alpha$*  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) induced *Sirt3* gene expression in white adipocytes and embryonic fibroblasts as part of its overall induction of a brown adipose tissue-specific pattern of gene expression. In cells lacking *Sirt3*, *Pgc-1 $\alpha$*  failed to fully induce the expression of brown fat-specific thermogenic genes. *Pgc-1 $\alpha$*  activates *Sirt3* gene transcription through coactivation of the orphan nuclear receptor *Err* (estrogen-related receptor)- $\alpha$ , which bound the proximal *Sirt3* gene promoter region. *Err $\alpha$*  knockdown assays indicated that *Err $\alpha$*  is required for full induction of *Sirt3* gene expression in response to *Pgc-1 $\alpha$* . The present results indicate that *Pgc-1 $\alpha$*  controls *Sirt3* gene expression and this action is an essential component of the overall mechanisms by which *Pgc-1 $\alpha$*  induces the full acquisition of a brown adipocyte differentiated phenotype.

Brown adipose tissue plays a major role in the control of energy expenditure in mammals. The specific mitochondrial uncoupling that is characteristic of brown adipocytes creates a specialized cell type adapted to promoting energy expenditure in response to cold or overfeeding. In contrast, white adipocytes are specialized in the accumulation of metabolic energy in the form of lipids. Brown adipocytes respond to noradrenergic stimulation through  $\beta$ -adrenoreceptors in the cell surface, which bind norepinephrine and signal through adenylate cyclase to increase cAMP and activate protein kinase A. Ultimately, this signaling cascade lead to activation of hormone-sensitive lipase, induction of the expression of the gene for

uncoupling protein-1 (*Ucp1*)<sup>2</sup> and other genes involved in thermogenesis, and activation of the *Ucp1*-dependent uncoupling of mitochondria (1). Acquisition of the cellular machinery typical of brown adipocyte thermogenic function is a highly plastic process. In fact, pre-adipocytes or even white adipocytes may acquire brown adipocyte properties in response to developmental or environment regulators. Several molecular agents have been reported to promote brown adipocyte differentiation, central among them is *Pgc-1 $\alpha$* .

*Pgc-1 $\alpha$*  is a transcriptional coactivator that plays a major role in the acquisition of the specific brown adipocyte phenotype. *Pgc-1 $\alpha$*  coactivates nuclear receptors and transcription factors and thereby activates genes involved in thermogenesis (e.g. *Ucp1*), lipid oxidation, and mitochondrial oxidation, which are associated with the specific thermogenic function of brown adipose tissue (2). For instance, when white adipocytes are forced to express high levels of *Pgc-1 $\alpha$* , they acquire the features of brown adipocytes, including expression of the brown fat-specific *Ucp1* gene (3). Cells lacking *Pgc-1 $\alpha$*  acquire a partial brown adipocyte phenotype but remain insensitive to noradrenergic activation of thermogenesis (4). Thus, the control of *Pgc-1 $\alpha$*  gene expression can ultimately determine the acquisition of a brown adipocyte phenotype in an adipose cell. The identification of factors that control *Pgc-1 $\alpha$*  expression and activity is an important prerequisite for developing tools to modulate brown adipocyte activity in the organisms.

Sirtuins are protein deacetylases that act on histones, transcription factors, and transcriptional co-regulators, modulating their activities by regulating their degree of acetylation (5). Among them, *Sirt3* is present in mitochondria and possibly in nuclei as well (6, 7). In mitochondria, *Sirt3* controls fatty acid oxidation by deacetylating enzymes involved in fatty acid oxidation, such as long-chain acyl-CoA dehydrogenase (8) and acetyl-CoA synthase (9, 10). Other roles reported for *Sirt3* include protection against cardiac hypertrophy (11, 12) and tumor suppression (13). Several reports have indicated that *SIRT3* gene polymorphisms are associated with human aging (14, 15).

\* The work was supported by Grant SAF2008-01896 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, and Grant 2009SGR-284 from the Generalitat de Catalunya.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34934021525; Fax: 34934021559; E-mail: fvillarroya@ub.edu.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: *Ucp1*, uncoupling protein 1; *Pgc-1 $\alpha$* , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; *Sirt3*, silent mating type information regulation 2, homolog 3; *Nrf*, nuclear respiratory factor; *ERR*, estrogen-related receptor; *Dio2*, type II 5'-deiodinase; *Fabp4*, fatty acid binding protein-4; *MEF*, mouse embryonic fibroblast; *FABP*, fatty acid-binding protein.

*Sirt3* is highly expressed in brown adipose tissue, in contrast with its low expression in white fat. *Sirt3* gene expression is impaired in brown fat of rodents under conditions of diminished thermogenic activity such as obesity, and it has been proposed that *Sirt3* is involved in the control of cAMP-mediated gene expression in brown fat (16).

In the present study, we report that PGC-1 $\alpha$  is a major controller of the transcription of the *Sirt3* gene. By this means, it contributes to the acquisition of the thermogenic capacity of the brown adipose cell.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture**—Primary brown adipocytes were differentiated in culture as described previously (17). Preadipocytes were isolated from interscapular, cervical, and axillary brown adipose tissue depots from 21-day-old Swiss mice, or from litter-matched wild-type and *Sirt3*-null mice. *Sirt3*-null mice (strain name: B6; 129S5-SIRT3Gt(neo)218Lex) were obtained from MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center) and had been backcrossed into the C57BL/6J Ola Hsd line (Harlan) for six generations. Where indicated, differentiated brown adipocytes were treated for 6 h with 0.5  $\mu$ M norepinephrine or for 24 h with 1 mM dibutyryl-cAMP. The HIB-1B brown adipocyte cell line was cultured as reported elsewhere (18). SGBS human adipocyte cells were cultured and differentiated as already reported (19), and experiments were performed on day 12 after induction of differentiation, a time at which more than 70% of cells were differentiated.

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained from 13-day-old embryos and were cultured and differentiated as described elsewhere (20) with some modifications. MEFs from wild-type and *Sirt3*-null mice were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Two days after reaching confluence, MEFs were differentiated into adipocytes in a DMEM containing 10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1.7  $\mu$ M insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone, and 10  $\mu$ M rosiglitazone. Beginning on day 10, MEFs were cultured in DMEM containing 1.7  $\mu$ M insulin and 1  $\mu$ M dexamethasone until lipid accumulation was observed. Experiments were performed when 80–90% of the cells were differentiated, determined based on the acquisition of adipocyte morphology. Where indicated, cells were exposed to the *Err $\alpha$*  antagonist/inverse agonist XCT-790 (Sigma) at a final concentration 5  $\mu$ M for 48 h.

**Western Blot Analysis**—Cell extracts were prepared by homogenization in a buffer containing 20 mM NaHepes, pH 8.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Igepal CA-630 (Sigma), 1 mM EDTA, a mixture of protease inhibitors (Complete-Mini, Roche Diagnostics) and 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride. Proteins (30  $\mu$ g/lane) were separated by 12 or 8% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Immunological detection was performed with specific antibodies against mouse *Sirt3* (ab56214, Abcam, UK) and Pgc-1 $\alpha$  (H300, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). For detection, an enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Biosciences) was employed. The intensity of the signals was quantified by densitometry (Phoretics 1D Software, Phoretic Interna-

tional, UK). Coomassie Blue staining of the gels was performed to assess equal total protein loading.

**Cloning of the *Sirt3* Promoter and *Sirt3* Promoter-Reporter Constructs**—The *Sirt3* promoter construct was created by amplifying a 978-base pair (bp) fragment of the mouse *Sirt3* gene corresponding to the –956 to +22 bp upstream region by PCR using primers 5'-CTC AAG GGC AGG GCC AGA AAC C-3' (forward) and 5'-CTG GAA TTC CAA TGC CAC AAC C-3' (reverse). The fragment obtained was cloned into the PGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI) and subsequently cloned into the PGL3-Basic Vector (Promega) using *Sma*I and *Mlu*I restriction enzymes (-956SIRT3-Luc). A shorter version (110 bp) of this construct was prepared by cutting with the *Ksp*I restriction enzyme to yield -85SIRT3-Luc. The -956SIRT3-Luc variants -956SIRT3-ERR1Mut, -956SIRT3-ERR2Mut, and -956SIRT3-ERR1+2Mut containing point mutations were generated using a QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Complementary oligonucleotides containing the desired mutation flanked by unmodified nucleotide sequence (5'-CGG GTT GCG GTC GTC AAC TTA ACC GCG TTC TTG ACT TCC GC-3' for the ERR1 mutation, and 5'-GGG CAT GCT GGG AGC GTC AGC CTA GCA GCA CGG GTT GCG GTC G-3' for the ERR2 mutation) were used. The fidelity of cloning and mutagenesis procedures were made by direct DNA sequencing.

**Cell Transfection**—For reporter assays, HIB-1B cells in 24-well plates were transfected with 0.3  $\mu$ g of SIRT3-Luc reporter plasmid, 0.5 ng of the expression vector pRL-CMV (Promega), and where indicated, 0.06  $\mu$ g of the expression vectors for PGC-1 $\alpha$ , nuclear respiratory factor 2- $\alpha$  and - $\beta$  (NRF2 $\alpha$  and NRF2 $\beta$ ), peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\gamma$ , thyroid receptor- $\alpha$  and - $\beta$ , alone or in combination with Pgc-1 $\alpha$ . Cells were transfected using FuGENE6 (Roche Diagnostics) and incubated for 48 h prior to assaying for luciferase activity. Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured in a Turner Designs Luminometer using the Dual Luciferase Reporter assay system (Promega). Firefly luciferase activity was expressed relative to *Renilla* luciferase activity to normalize for transfection efficiency. Each point was assayed in triplicate.

**Adenoviral-mediated Gene Transfer**—Adenoviral vectors expressing green fluorescent protein (GFP), *Err $\alpha$* , Pgc-1 $\alpha$ , and interfering small hairpin RNA (shRNA) for mouse *Err $\alpha$*  have been described (21, 22). For adenoviral-mediated gene transfer, differentiated SGBS adipocytes, MEF-derived adipocytes, or HIB-1 brown adipocytes were infected with adenoviral vectors driving Pgc-1 $\alpha$  (AdCMV-PGC-1 $\alpha$ , provided by Dr. B. Spiegelman), *Err $\alpha$* , shRNA-ERR $\alpha$ , or GFP (AdCMV-GFP, control) at a multiplicity of infection of 100 for 4 h. Experiments were performed after further incubation in differentiation medium for 48 h. Transduction efficiency based on GFP fluorescence was ~80%.

**Quantification of Transcript Levels**—Total RNA was extracted using NucleoSpin (Macherey Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed in a total volume of 20  $\mu$ l using random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 0.5  $\mu$ g of total RNA. Real time quantitative PCR was conducted in 20- $\mu$ l reaction mixtures containing 1  $\mu$ l of cDNA, 10  $\mu$ l of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems),

## PGC-1 $\alpha$ Controls Sirt3 Gene Expression in Adipocytes

and probes from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Assays primers for the transcripts of murine genes *Sirt3* (Mm00452129), *Ucp1* (Mm004940969), *Dio2* (Mm00515664), *Fabp4* (Mm00445880), *Pgc-1 $\alpha$*  (Mm00447183), and *Err $\alpha$*  (Mm00433143) and the human genes *SIRT3* (Hs00202030), *UCP1* (Hs00222453), *DIO2* (Hs00255341), and *FABP4* (Hs00609791) were used. 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.

**Chromatin Immunoprecipitation**—Chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP) were performed as described elsewhere (22). Differentiated brown adipocytes in primary culture and HIB-1B cells were used. When indicated, HIB-1B cells were transfected with luciferase reporter plasmids, as described above. Immunoprecipitation was carried out using anti-Pgc-1 $\alpha$  (H300) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-HA antibody (ab9110, Abcam, Cambridge, UK), or an equal amount of an unrelated immunoglobulin (Sigma). Purified DNA was amplified using primers 5'-CAC GGA AGT GCT CGC TCA-3' (forward) and 5'-GGG GAA GTT TAG CGG AAG TC-3' (reverse) encompassing the proximal promoter region (from -107 to +18) of the *Sirt3* gene, to generate a 125-bp fragment (proximal promoter region) or using primers 5'-AAG TGG CAG GCT CTT TGT GT-3' (forward) and 5'-CAA AAG GCT CCA CCT GAA AG-3' (reverse) to generate a 122-bp fragment encompassing an unrelated region, distant from the promoter (+17033/+17155) in the *Sirt3* gene, used as control. Input DNA and immunoprecipitated DNA were analyzed by quantitative PCR using SYBR Green fluorescent dye. The protein-bound DNA was calculated as a ratio to input DNA. When indicated, bound fragments were amplified by PCR (30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C) and visualized electrophoresing on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining.

## RESULTS

***Sirt3* Is Expressed in Association with Brown Adipocyte Differentiation and Is Required for the Induction of Thermogenesis-related Gene Expression**—Fig. 1 shows the *Sirt3* gene expression is dramatically induced during the brown adipocyte differentiation process, in parallel with up-regulation of the thermogenesis marker genes such as *Ucp1*. The expression profile showed that induction of *Sirt3* mRNA was delayed with respect to the induction of *Pgc-1 $\alpha$*  mRNA and *Err $\alpha$*  mRNA. In fact, on day 5 of differentiation *Pgc-1 $\alpha$*  and *Err $\alpha$*  mRNA levels had reached more than one-half their maximum levels in differentiated brown adipocytes (day 9), whereas *SIRT3* mRNA levels were still much lower. Induction of *Sirt3* mRNA in association with differentiation was also observed for the *Sirt3* protein, which was much more abundant in differentiated brown adipocytes than in preadipocytes (Fig. 1B), as well as for *Pgc-1 $\alpha$*  protein. Thus, *Sirt3* gene expression appeared as a component of the pattern of gene expression associated with brown adipocyte differentiation. However, in contrast with *Ucp1* and

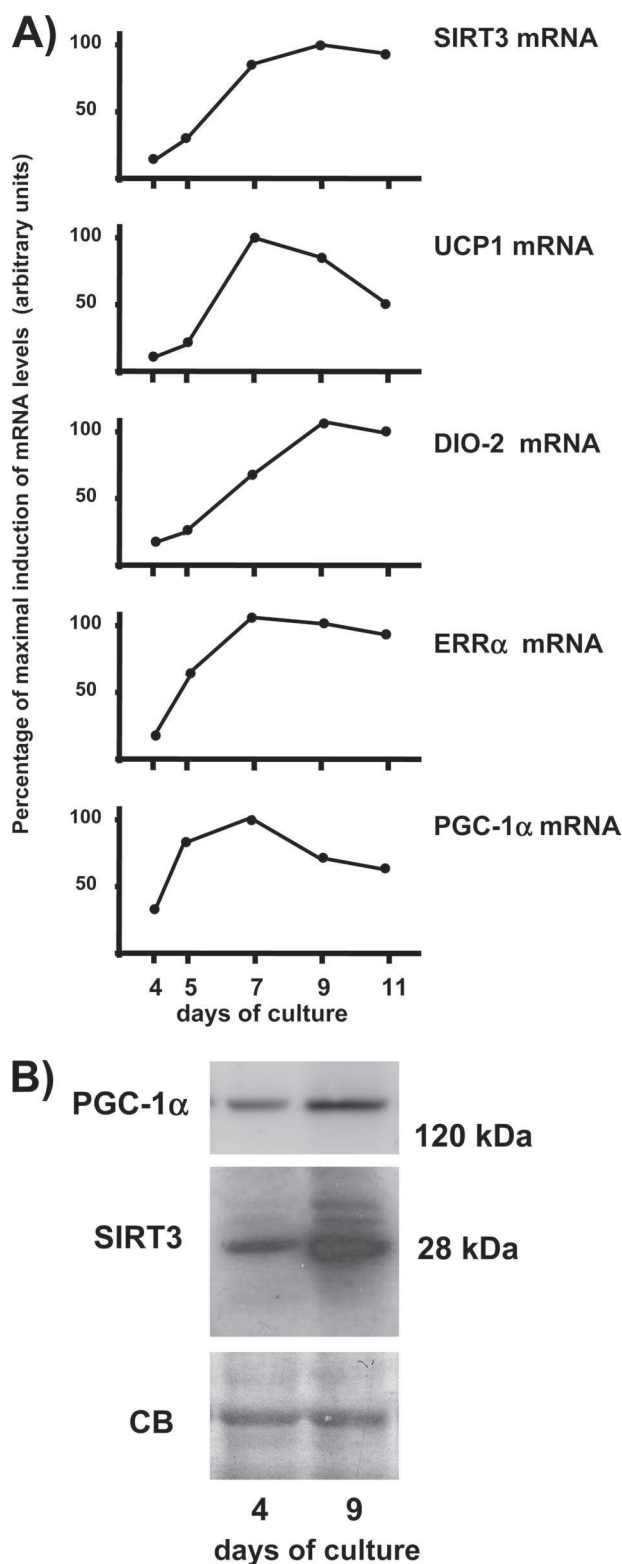


FIGURE 1. A, expression of *Sirt3* and thermogenic gene transcripts in brown adipocytes differentiating in culture. Points are the means of two to three independent experiments at each time of culture and are expressed as percentages relative to the mean value at the time of maximum levels of expression (defined as 100%). B, representative immunoblot (of three independent cell culture experiments) of *Sirt3* and *Pgc-1 $\alpha$*  protein levels in brown preadipocytes (day 4) and differentiated brown adipocytes (day 9). CB, Coomassie Blue staining of the gel showing equal loading.

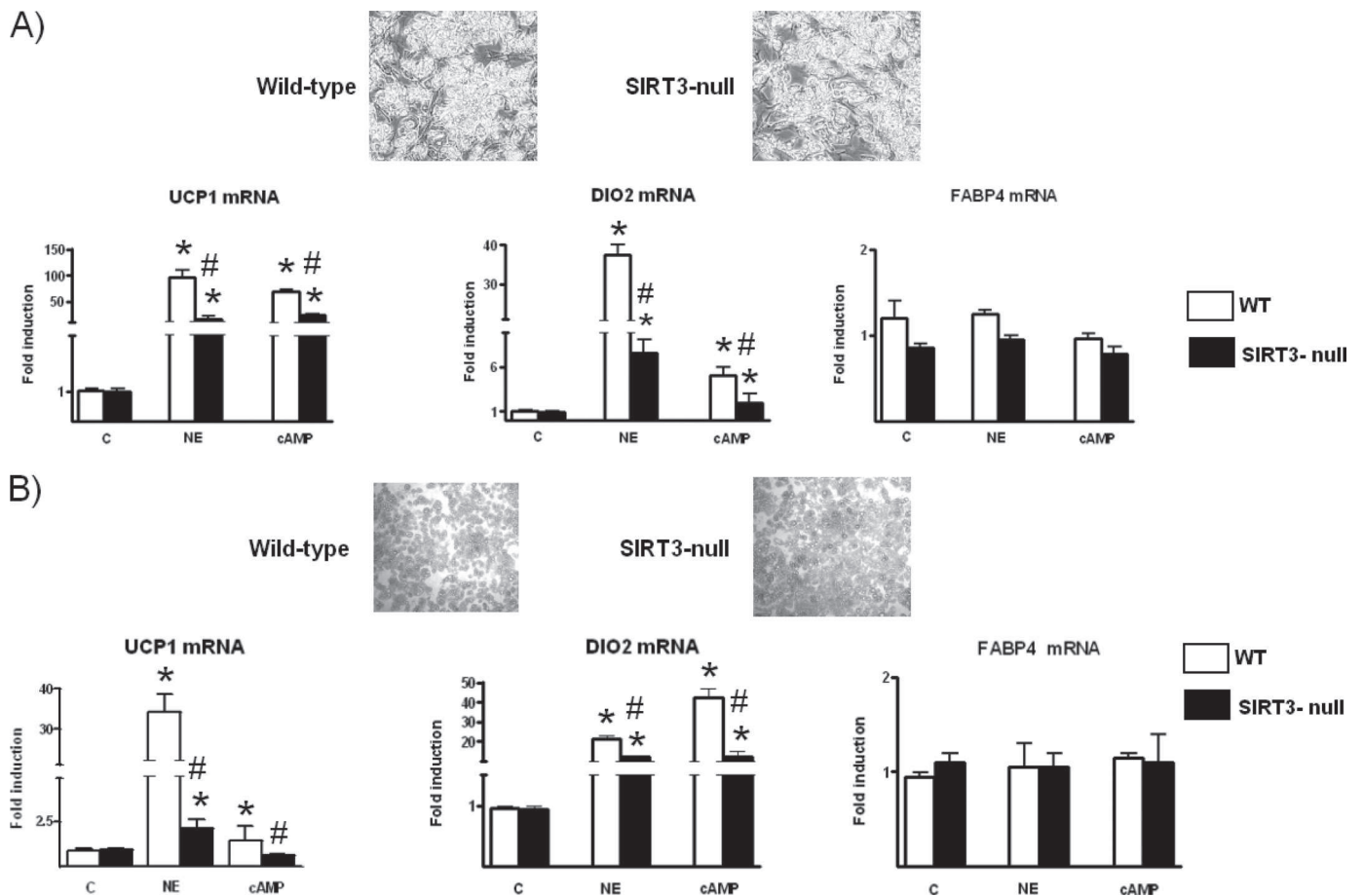


FIGURE 2. Expression of *Ucp1*, *Dio2*, and *Fabp4* in wild-type and *Sirt3*-null brown adipocytes and *Sirt3*-null MEF-derived adipocytes. The tops of panels A and B show micrographs representative of differentiated primary cultured brown adipocytes and MEF-derived adipocytes, respectively, from wild-type and *Sirt3*-null mice. Bars are mean  $\pm$  S.E. of four to five independent cultures (\*,  $p < 0.05$ , NE or cAMP versus controls; #,  $p < 0.05$ , wild-type versus *Sirt3*-null cells). NE, 0.5  $\mu$ M norepinephrine for 6 h; cAMP, 1 mM dibutyryl-cAMP for 24 h. c, control.

other genes directly related to thermogenesis, *Sirt3* gene expression was not induced by norepinephrine (data not shown). To ascertain the role of *Sirt3*, brown adipocytes were differentiated in primary culture from preadipocytes obtained from *Sirt3*-null mice and compared with parallel cultures from wild-type littermates. Acquisition of brown adipocyte morphology and accumulation of lipid were essentially unaltered when preadipocytes were isolated from mice lacking *Sirt3* (Fig. 2A). Accordingly, there were no differences between wild-type and *Sirt3*-null differentiated adipocytes in the basal expression of genes related to thermogenesis (*Ucp1* and *Dio2*) and overall adipogenesis (fatty acid binding protein-4, *Fabp4*) (Fig. 2A), genes related to mitochondriogenesis (cytochrome *c* oxidase subunit IV) and the  $\beta$ 3-adrenoreceptor gene (data not shown). In contrast, the responsiveness of the *Ucp1* and *Dio2* genes to norepinephrine exposure was significantly reduced in differentiated brown adipocytes from *Sirt3*-null mice compared with that in wild-type brown adipocytes (Fig. 2A). The transcript for *Fabp4*, a gene associated with white or brown adipocyte differentiation and not specifically related to thermogenesis, was not up-regulated by norepinephrine and was unaffected by the absence of *Sirt3*. Parallel experiments in which brown adipocytes were exposed to dibutyryl-cAMP led to similar observations. As a second model of study, we performed similar

experiments in adipocytes differentiated from MEFs obtained from *Sirt3*-null embryos. Adipocytes derived from MEFs exhibit an intermediate brown to white phenotype and a high propensity toward the acquisition of brown adipocyte features and expression of thermogenic genes (23).<sup>3</sup> As for primary brown adipocytes, the lack of *Sirt3* did not alter the acquisition of adipocyte morphology or basal levels of expression of the genes studied (Fig. 2B). However, again, the responsiveness of thermogenic genes (*Ucp1* and *Dio2*) to induction by norepinephrine or cAMP, was significantly decreased in *Sirt3*-null adipocytes, and there was no effect on the non-brown fat-specific gene *Fabp4*. Collectively, these results indicate that *Sirt3* is required for the full thermogenic competence of brown adipocytes.

***Pgc-1 $\alpha$  Induces *Sirt3* Gene Expression in Adipocytes***—Given that *Sirt3* appears as an essential component of the acquisition of full thermogenic activity in brown adipocytes, we analyzed the action of *Pgc-1 $\alpha$* , a master regulator of acquisition of thermogenic brown adipocyte phenotype and of its sensitivity to noradrenergic activation (4). For this purpose we transduced HIB-1B brown preadipocytes with an adenoviral vector driving

<sup>3</sup> A. Giralt and J. Diaz-Delfin, unpublished observations.



## PGC-1 $\alpha$ Controls *Sirt3* Gene Expression in Adipocytes

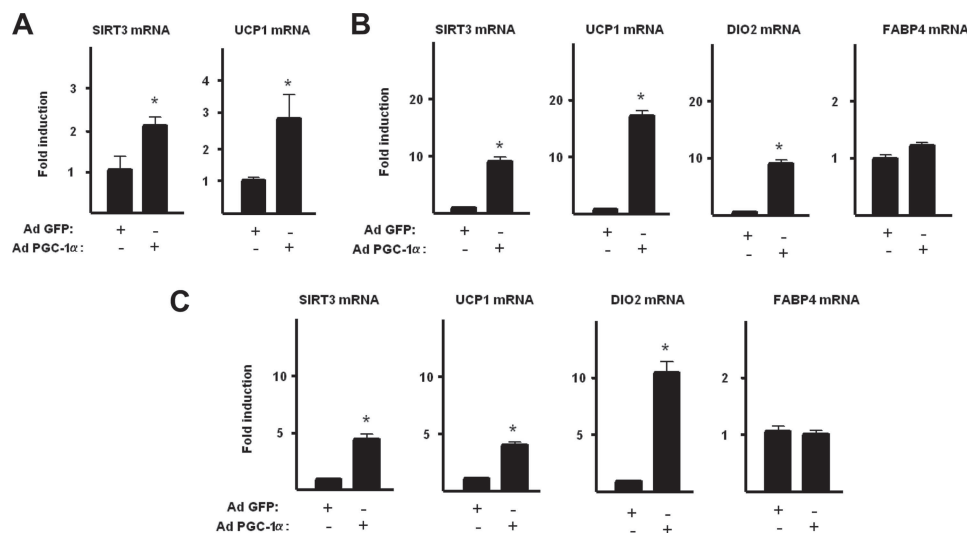


FIGURE 3. **Effects of Pgc-1 $\alpha$  overexpression on the expression of *Sirt3* and thermogenic genes.** HIB-1B brown preadipocytes (A), SGBS adipocytes (B), and MEF-derived adipocytes (C) were transduced with an adenoviral vector driving the expression of Pgc-1 $\alpha$  or GFP (control) (see “Experimental Procedures”). Results are presented as mean  $\pm$  S.E. of four to five independent experiments (\*,  $p < 0.05$ ).

Pgc-1 $\alpha$ . This procedure led to a  $2.7 \pm 0.3$ -fold increase in the levels of the Pgc-1 $\alpha$  protein in these cells. Pgc-1 $\alpha$  overexpression caused a significant induction of *Sirt3* mRNA expression in parallel with the induction of *Ucp1* mRNA, the marker gene of the thermogenically differentiated status of HIB-1B brown adipocytes (Fig. 3A). Considering that Pgc-1 $\alpha$  is known to be capable of driving white adipocytes into a brown adipocyte phenotype (3), we analyzed the effects of Pgc-1 $\alpha$  overexpression on human SGBS white adipocytes. In this cell system, an induction of  $3.5 \pm 0.5$ -fold in the levels of the Pgc-1 $\alpha$  protein was achieved. Pgc-1 $\alpha$  effectively caused a coordinated induction of marker genes of brown *versus* white adipocyte phenotype (*UCP1* and *DIO2*) accompanied by a marked induction of *SIRT3* gene expression (Fig. 3B). No changes were observed in the expression of the *FABP4* gene, which is known to be commonly expressed in brown and white adipocytes. MEF-derived adipocytes, another cellular model, was used. Adenoviral driven overexpression of Pgc-1 $\alpha$  in these cells ( $3.1 \pm 0.4$ -fold increase in Pgc-1 $\alpha$  protein) again dramatically induced the expression of *Sirt3* in parallel with the induction of the *Ucp1* and *Dio2* genes, without affecting expression of the *Fabp4* gene (Fig. 3C). These findings indicate that the *Sirt3* gene belongs to the cluster of genes under control of the Pgc-1 $\alpha$  that determines the thermogenesis-related brown *versus* white differential phenotype.

***Sirt3* Expression Is Required for Induction of the Brown Fat Phenotype in Response to Pgc-1 $\alpha$  in Adipocytes**—To establish the role of *Sirt3* in the Pgc-1 $\alpha$ -mediated induction of the brown fat pattern of gene expression, we compared the effects of Pgc-1 $\alpha$  overexpression in *Sirt3*-null MEF-derived adipocytes to those in wild-type MEF-derived adipocytes. In this experimental setting, similar levels of increased Pgc-1 $\alpha$  expression were attained in both types of cells using adenoviral mediated Pgc-1 $\alpha$  overexpression ( $2.9 \pm 0.3$ -fold induction in wild-type MEFs and  $3.2 \pm 0.4$ -fold induction in *Sirt3*-null MEFs; see also Fig. 3, *bottom*). The induction of *Ucp1* and *Dio2* mRNA expression by Pgc-1 $\alpha$  was dramatically impaired in the *Sirt3*-null cells with

respect to wild-type cells, whereas *Fabp4* gene expression was insensitive to the absence of *Sirt3* (Fig. 4). These results indicate that the induction of *Sirt3* by Pgc-1 $\alpha$  is required for a full acquisition of the gene expression pattern characteristic of thermogenically competent brown adipocytes.

**Transcriptional Activation of the *Sirt3* Gene by Pgc-1 $\alpha$** —To establish whether Pgc-1 $\alpha$  acts as a direct transcriptional coactivator of the *Sirt3* gene, we first created a *Sirt3* promoter-reporter construct by amplifying the 5' promoter region of the *Sirt3* gene from mouse genomic DNA by PCR, and then cloned it into a promoterless luciferase expression vector (see “Experimental Procedures”). The putative structure of the 5' transcriptional regulatory region of the *Sirt3* gene is depicted in Fig. 5A. The *Sirt3* gene is closely apposed and in inverse orientation to the gene for *Psmid13*, a poorly characterized component of the proteasome system (24). The upstream translation initiation site of the *Sirt3* gene (as defined in NM\_001177804.1 and upstream to the most 5' defined exonic region) is only 85 bp distant from the putative transcriptional initiation site of the *Psmid13* gene. This structure is similar to that of the human *SIRT3* gene (24), with the exception that the distance between the transcription initiation sites of the two genes is shorter in mice. A region encompassing 978 bp of the upstream region of the mouse *Sirt3* gene (−956/22), including part of the first non-translated exon of the *Psmid13* gene but excluding the *Psmid13* gene translation initiation site) was cloned into the luciferase reporter plasmid pGL3. This construct exhibited strong promoter activity when transfected into the brown adipocyte cell line HIB-1B, within the range of the activity of gene promoters typically expressed in brown adipocytes (2.6-fold compared with the 4.5-kb UCP1-Luc promoter activity, 3.0-fold compared with the 2-kb PGC-1 $\alpha$ -Luc promoter activity, data not shown). The 956SIRT3-Luc construct was co-transfected with a Pgc-1 $\alpha$  expression vector alone or in combination with an expression vector for Nrf1, Nrf2 $\alpha$ , Nrf2 $\beta$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , Err $\alpha$ , thyroid receptor- $\alpha$  or - $\beta$ , transcription fac-

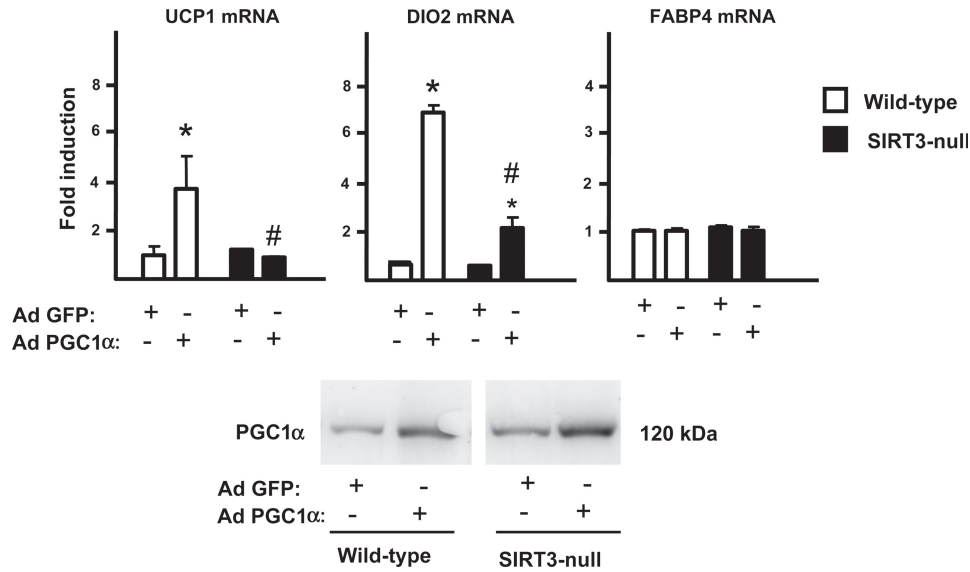


FIGURE 4. **Effects of PGC-1 $\alpha$  on the expression of thermogenic genes in wild-type or *Sirt3*-null adipocytes.** Wild-type and *Sirt3*-null MEF-derived adipocytes were transduced with an adenoviral vector driving the expression of Pgc-1 $\alpha$  or GFP (control) (see "Experimental Procedures"). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. of four to five independent experiments (\*,  $p < 0.05$ , differences due to Pgc-1 $\alpha$  for each type of cell; #,  $p < 0.05$ , wild-type versus *Sirt3*-null cells) (top). A representative example of a similar overexpression of PGC-1 $\alpha$  protein achieved by adenoviral mediated transfer of wild-type and *Sirt3*-null cells (bottom).

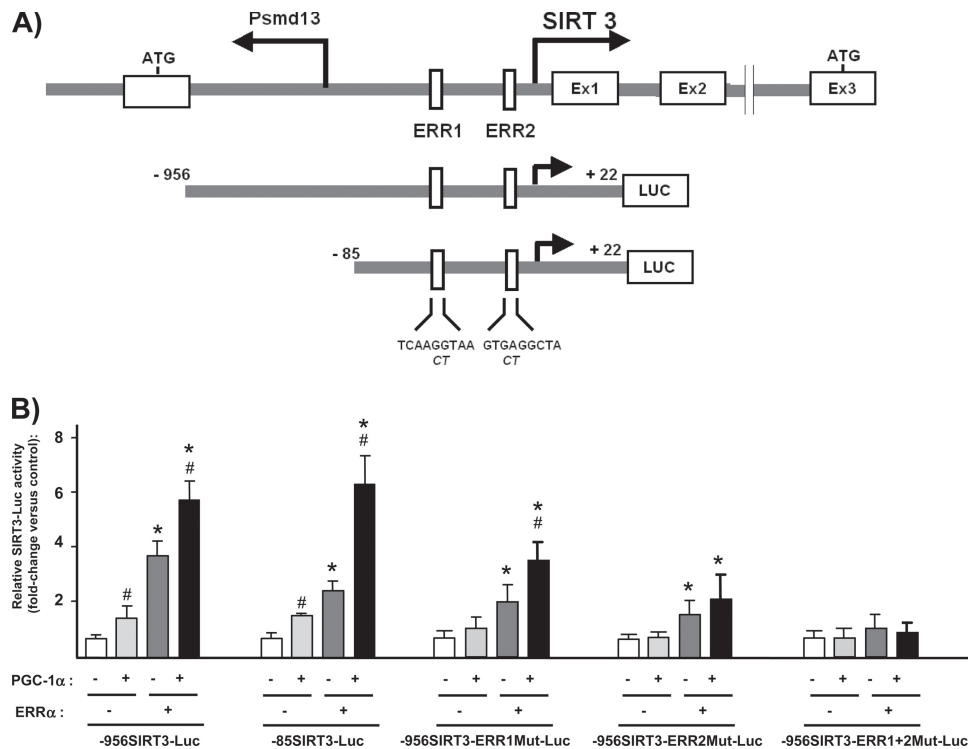
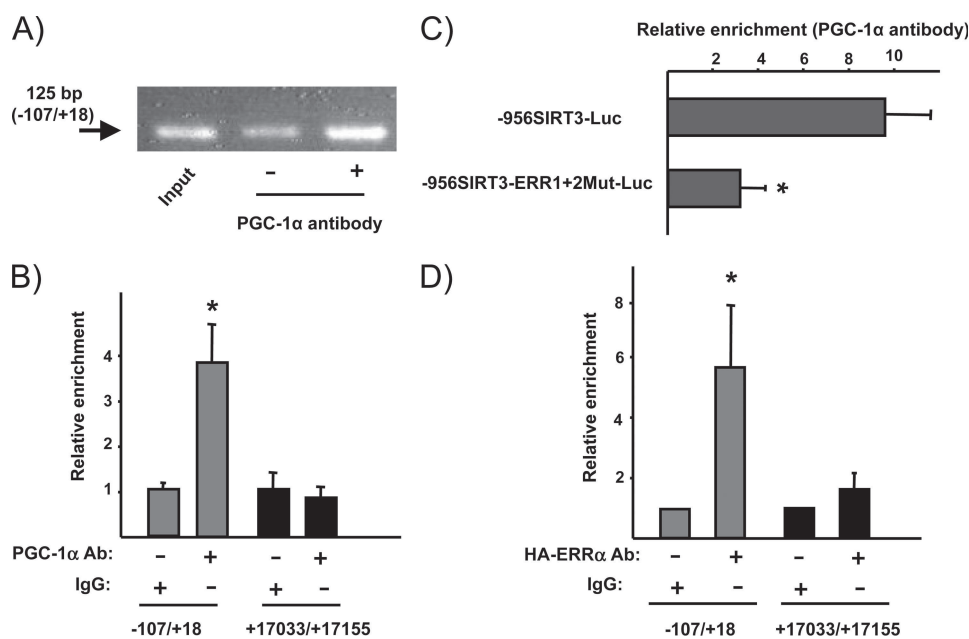


FIGURE 5. **Effects of Pgc-1 $\alpha$  and Err $\alpha$  on *Sirt3* promoter activity.** A, schematic representation of the mouse *Sirt3* promoter region (top) and luciferase promoter constructs (bottom). Mutations in the ERR1 and ERR2 sites are shown in *italics* under the wild-type sequence. B, effects of co-transfection of expression vectors for Pgc-1 $\alpha$  and/or Err $\alpha$  on the relative luciferase activity of the indicated *Sirt3* promoter constructs. Bars are mean  $\pm$  S.E. of five to seven independent experiments. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) due to Err $\alpha$  co-transfection are shown as \*, and those due to Pgc-1 $\alpha$  are shown by #.

tors, and nuclear receptors known to be potentially coactivated by Pgc-1 $\alpha$ . Pgc-1 $\alpha$  transfection alone caused a mild but significant induction of *Sirt3* promoter activity (Fig. 5B). The co-transfection of the indicated transcription factors and nuclear receptors failed to modify the *Sirt3* promoter activity in response to Pgc-1 $\alpha$  (data not shown), with the exception of Err $\alpha$ . Co-transfection with the expression vector for Err $\alpha$  markedly increased the transcriptional activity of the *Sirt3* pro-

moter, as well as it enhanced the activation by Pgc-1 $\alpha$  (Fig. 5B). A *Sirt3* promoter-reporter construct containing only the -85/+22 bp proximal reporter region (-85SIRT3-Luc) was activated to essentially the same extent by Pgc-1 $\alpha$  and Err $\alpha$  as the construct containing the longer promoter region. Computer-assisted analysis of the proximal promoter region revealed the presence of two sites, one at -45/-36 (ERR1) and one at -22/-14 (ERR2), with sequences potentially capable of binding

## PGC-1 $\alpha$ Controls *Sirt3* Gene Expression in Adipocytes



**FIGURE 6. Chromatin immunoprecipitation of Pgc-1 $\alpha$  and Err $\alpha$  binding to the proximal *Sirt3* gene promoter region.** *A*, representative PCR after ChIP of Pgc-1 $\alpha$  binding to the proximal promoter region of the endogenous *Sirt3* gene in brown adipocytes. The arrow indicates the -125-bp PCR product from the mouse *Sirt3* gene promoter. Input was 1/10 diluted for amplification. *B*, quantitative analysis of ChIP amplification of the Pgc-1 $\alpha$  binding to the proximal promoter region of the endogenous *Sirt3* gene (-107/+18) in comparison with a control, non-promoter, region of the *Sirt3* gene (+17033/+17155) in brown adipocytes. The enrichment due to protein-bound DNA was calculated as a ratio to input DNA. *C*, quantitative analysis of ChIP amplification of the Pgc-1 $\alpha$  binding to the proximal promoter region of the transfected wild-type -956SIRT3 promoter region and the mutated version in the ERR1 and ERR2 sites in HIB-1B cells co-transfected with the Pgc-1 $\alpha$  expression vector. *D*, quantitative analysis of ChIP amplification of the binding of Err $\alpha$  to the *Sirt3* gene promoter region in comparison with the non-promoter region (see above). Expression vector for the HA-tagged version of Err $\alpha$  was transfected to HIB-1B cells before the assay. Bars are mean  $\pm$  S.E. of three to four independent assays (\*,  $p < 0.05$ , differences due to specific enrichment due to binding of Pgc-1 $\alpha$  or Err $\alpha$  in *B* and *D*, and for the comparison of Pgc-1 $\alpha$  binding between wild-type and ERR1+2-mutated *Sirt3* promoter construct, in *C*).

members of the nuclear hormone receptor superfamily, including Err $\alpha$ . Individually mutating ERR1 or ERR2 sites to blunt receptor binding partially reduced Pgc-1 $\alpha$ /Err $\alpha$ -induced *Sirt3* gene promoter activity, whereas mutating both sites completely abolished the action of co-transfected Pgc-1 $\alpha$ /Err $\alpha$  (Fig. 5B). Collectively, these results suggest that Pgc-1 $\alpha$  acts in concert with Err $\alpha$  to promote *Sirt3* gene transcription and identify two cis-acting sites in the *Sirt3* promoter that mediate Pgc-1 $\alpha$  action.

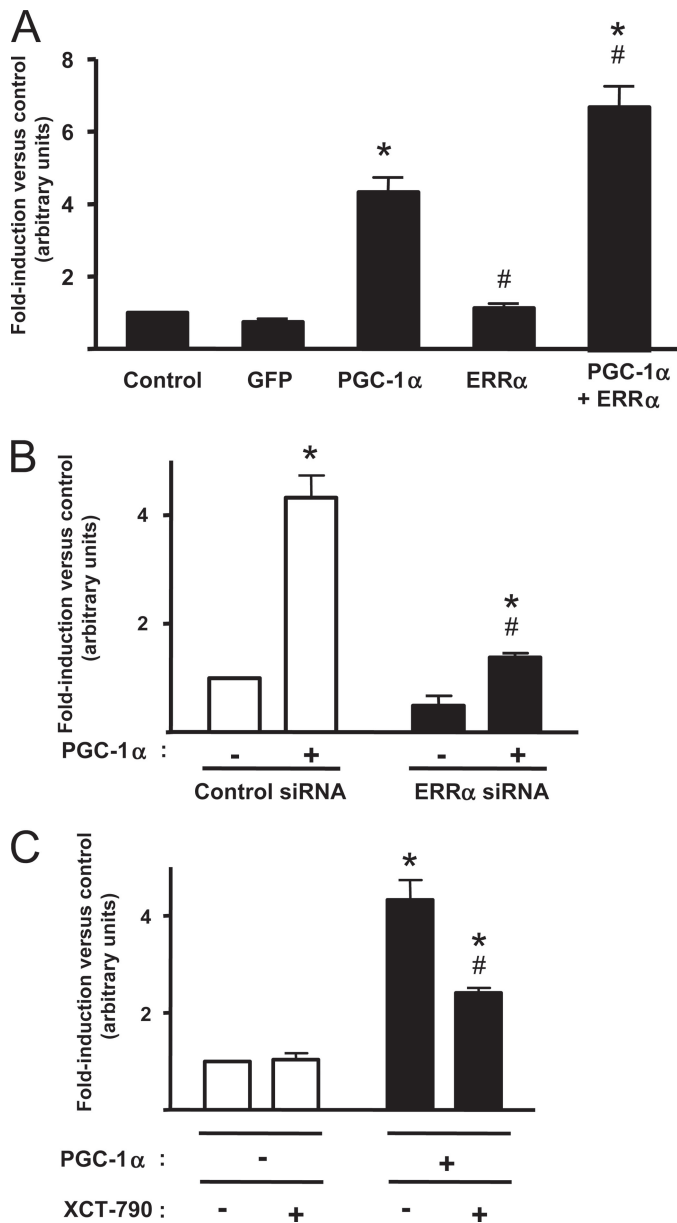
To determine whether Pgc-1 $\alpha$  binds specifically to the *Sirt3* promoter, we performed ChIP assays in primary cultured brown adipocytes. Using a specific antibody to immunoprecipitate Pgc-1 $\alpha$  and primers that spanned the proximal region of the *Sirt3* promoter, we found a significant enrichment in the expected PCR product (Fig. 6), whereas no such enrichment was found following amplification of an *Sirt3* gene region far from the promoter (negative control). This indicated that Pgc-1 $\alpha$  does indeed bind the endogenous *Sirt3* promoter. Moreover, ChIP was also performed in HIB-1B cells transfected with the 956SIRT3-Luc and 956SIRT3-ERR1+2Mut-Luc constructs, after co-transfection with the Pgc-1 $\alpha$  expression vector. Enrichment was evident when cells were transfected with the wild-type version of the *Sirt3* promoter construct but was strongly impaired when cells had been transfected with the construct in which the Err $\alpha$  binding sites had been mutated (Fig. 6B). In addition, we analyzed the binding of Err $\alpha$  to the *Sirt3* proximal promoter region. For this purpose, we transfected HIB-1B cells with an expression vector driving HA-Err $\alpha$ . ChIP assays indicated a substantial enrichment in Err $\alpha$  binding

to the proximal promoter region of the endogenous *Sirt3* gene (Fig. 6C).

*Err $\alpha$  Is Required for *Sirt3* Gene Expression in Response to Pgc-1 $\alpha$* —To ascertain whether the endogenous *Sirt3* gene, like the transfected *Sirt3* promoter, is also induced by Pgc-1 $\alpha$ /Err $\alpha$ , we transduced MEFs with adenoviral vectors for Err $\alpha$ , alone or in combination with that for Pgc-1 $\alpha$ . Err $\alpha$  caused a mild but significant induction of *Sirt3* gene expression, whereas the combination of Err $\alpha$  plus PGC-1 $\alpha$  yielded maximal induction (Fig. 7A). To confirm the role of Err $\alpha$  in the induction of the *Sirt3* gene by Pgc-1 $\alpha$ , we transduced MEFs with a vector driving the expression of Err $\alpha$  siRNA. This procedure reduced the Err $\alpha$  expression to ~30% of original levels, and significantly reduced the capacity of Pgc-1 $\alpha$  to induce *Sirt3* gene expression (Fig. 7B). As a complementary approach, we used XCT-790, an inhibitor of Err $\alpha$  transcriptional activity (25). Treatment of cells with XCT-790 caused a significant reduction in the capacity of Pgc-1 $\alpha$  to induce *Sirt3* gene expression, thus confirming the involvement of Err $\alpha$  in Pgc-1 $\alpha$ -mediated regulation of the *Sirt3* gene (Fig. 7C).

## DISCUSSION

Complex regulation of gene expression is required to program cells to acquire the phenotype of differentiated, thermogenically competent brown adipocytes. This differentiation process allows brown adipocytes to perform the specialized thermogenic function of the cell in response to noradrenergic activation. Pgc-1 $\alpha$  is a transcriptional coactivator known to play a master role in eliciting the coordinate induction of gene



**FIGURE 7. Involvement of *Err $\alpha$*  in the responsiveness of *Sirt3* gene expression to *Pgc-1 $\alpha$* .** *A*, effects of adenoviral mediated overexpression of *Pgc-1 $\alpha$*  and/or *Err $\alpha$*  on *Sirt3* gene expression in MEF-derived adipocytes. *B*, effects of impairment of endogenous *Err $\alpha$*  expression via adenoviral mediated expression of *Err $\alpha$*  siRNA on the capacity of *Pgc-1 $\alpha$*  to induce *Sirt3* gene expression. *C*, effects of the *Err $\alpha$*  inhibitor 5  $\mu$ M *XCT-790* on the action of *Pgc-1 $\alpha$*  on *Sirt3* gene expression. Bars are mean  $\pm$  S.E. of five to seven independent experiments. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) due to *Pgc-1 $\alpha$*  are shown as \*, and those due to *Err $\alpha$*  overexpression (*A*), *Err $\alpha$*  siRNA (*B*), or *XCT-790* (*C*) are shown by #.

expression that leads to brown adipocyte differentiation. Increasing *Pgc-1 $\alpha$*  levels can drive white adipocytes to acquire a brown fat phenotype (3). Moreover, *Pgc-1 $\alpha$*  is required for brown adipocytes to acquire the sensitivity to noradrenergic-stimulated thermogenic activation (4). Our present findings, which constitute the first analysis of *Sirt3* gene regulation in brown adipocytes, indicate that *Pgc-1 $\alpha$*  induces *Sirt3* gene expression and this effect is essential for brown adipocyte full differentiation. The observations indicating that *Pgc-1 $\alpha$*  is unable to activate the full program of thermogenic gene expres-

sion in cells that lack *Sirt3* indicates that the induction of *Sirt3* may be a mechanism that contributes to the ability of *Pgc-1 $\alpha$*  to promote the widespread cellular effects that lead to the differentiation of fully thermogenic competent brown adipocytes. The specific requirement for *Sirt3* in the acquisition of sensitivity to thermogenic activation by brown adipocytes is in complete agreement with the observation of impaired responses to noradrenergic activation in cells with impaired *Pgc-1 $\alpha$*  expression (4).

*Sirt3* is a protein deacetylase of the sirtuin family, and is considered to control intracellular biological processes by de-acetylating target proteins involved in metabolism and gene expression. It is localized to the mitochondria and, it is controversial whether under specific circumstances, to the nucleus as well (6). The capacity of *Sirt3* to influence nuclear gene expression has been reported in several cell models, including brown adipocytes (16, 26). It is unknown whether this is due to signaling from mitochondrial to nuclei (the so-called mitochondrial reverse signaling) or it should be considered a direct consequence of the potential presence of *Sirt3* in nuclei, as proposed by some authors (7, 12). Shi *et al.* (16) reported that *Sirt3* acts by increasing cAMP-response element-binding protein phosphorylation, but the specific targets of *SIRT3* deacetylation among the actors involved in the cascade of noradrenergic induction of gene expression have not been identified to date. In any case, our present findings indicate that *Sirt3* expression is an essential component of the specific brown adipocyte phenotype, and is functionally required for brown adipocytes to respond to *Pgc-1 $\alpha$* -mediated thermogenic activation.

Although few studies have been conducted on the thermoregulation of *Sirt3*-null mice *in vivo*, Lombard *et al.* (27) reported that the response to short-term cold exposure was unaltered in these mice. However, we observed that the thermal stress-induced postnatal expression of the *Ucp1* gene is significantly reduced in brown fat from *Sirt3*-KO mice (28). Further studies will be needed to determine whether inactivation of the *Sirt3* gene *in vivo* influences the overall capacity of adaptive thermogenesis in mice under distinct physiological conditions. Moreover, the possibility that other sirtuins (*e.g.* *Sirt1*) might compensate for the lack of *Sirt3* cannot be excluded. Although it is not known whether *Sirt1* affects BAT differentiation or cAMP responsiveness, chronic activation of *Sirt1* in rodents has been reported to promote brown adipose tissue thermogenic activity (29).

Although *Pgc-1 $\alpha$*  can potentially coactivate multiple nuclear receptors and transcription factors, its action at the *Sirt3* promoter appears to involve mainly the orphan nuclear receptor *Err $\alpha$* . The identification of *Err $\alpha$*  as the transcription factor being coactivated by *Pgc-1 $\alpha$* , and involved in driving the induction of the *Sirt3* gene is consistent with the known role of *Err $\alpha$*  in brown adipocyte function as well as on the transcriptional control of protein preferentially expressed in the mitochondria. *Err $\alpha$*  appears to be essential for adaptation to cold environment, as evidenced by the failure of mice lacking *Err $\alpha$*  to maintain body temperature when exposed to cold (30). *Err $\alpha$*  is needed for the high levels of oxidative capacity characteristic of brown adipose tissue, and thus for providing the energy necessary for thermogenesis. *Err $\alpha$*  fulfills this role by acting directly

## PGC-1 $\alpha$ Controls Sirt3 Gene Expression in Adipocytes

at genes important for brown fat thermogenesis: for instance, it is one of the transcription factors that interact with Pgc-1 $\alpha$  to mediate Pgc-1 $\alpha$  action on the *Ucp1* gene (31). The present findings demonstrate that Err $\alpha$  is essential for the promotion of *Sirt3* gene expression by Pgc-1 $\alpha$ . During the preparation of this article, Kong *et al.* (32) reported that Pgc-1 $\alpha$  controls *Sirt3* gene expression in the context of muscle cells. This confirms that the Pgc-1 $\alpha$ -Sirt3 regulatory axis may be important not only in brown adipocytes but also in other cell types in which mitochondrial functions are regulated for physiological purposes other than thermogenesis. In summary, we conclude that Pgc-1 $\alpha$  controls the expression of *Sirt3* in brown adipocytes, and this process may be a relevant intracellular mechanisms by which Pgc-1 $\alpha$  conducts its master role in the induction of brown adipocyte phenotype.

*Acknowledgments*—We thank Dr. B. Spiegelman for HIB-1B cells and PGC-1 $\alpha$  expression vectors, Dr. Wabitsch for SGBS white adipocytes, and Drs. R. Evans, H. H. Samuels, S. Green, and S. McKnight for expression vectors.

### REFERENCES

1. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) *Physiol. Rev.* **84**, 277–359
2. Handschin, C., and Spiegelman, B. M. (2006) *Endocr. Rev.* **27**, 728–735
3. Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33370–33376
4. Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B. M. (2006) *Cell Metab.* **3**, 333–341
5. Bao, J., and Sack, M. N. (2010) *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 3073–3087
6. Huang, J. Y., Hirschey, M. D., Shimazu, T., Ho, L., and Verdin, E. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1645–1651
7. Scher, M. B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007) *Genes Dev.* **21**, 920–928
8. Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Jr., Alt, F. W., Kahn, C. R., and Verdin, E. (2010) *Nature* **464**, 121–125
9. Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R. O., Andersen, J. S., and Verdin, E. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10224–10229
10. Hallows, W. C., Lee, S., and Denu, J. M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10230–10235
11. Pillai, V. B., Sundaesan, N. R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S. B., Pillai, J. B., Samant, S., Ravindra, P. V., Isbatan, A., and Gupta, M. P. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 3133–3144
12. Sundaesan, N. R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S. B., Isbatan, A., and Gupta, M. P. (2009) *J. Clin. Invest.* **119**, 2758–2771
13. Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X., and Gius, D. (2010) *Cancer Cell* **17**, 41–52
14. 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, A. I., and De Benedictis, G. (2003) *Exp. Gerontol.* **38**, 1065–1070
15. Bellizzi, D., Rose, G., Cavalcante, P., Covello, G., Dato, S., De Rango, F., Greco, V., Maggiolini, M., Feraco, E., Mari, V., Franceschi, C., Passarino, G., and De Benedictis, G. (2005) *Genomics* **85**, 258–263
16. Shi, T., Wang, F., Stieren, E., and Tong, Q. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 13560–13567
17. Carmona, M. C., Hondares, E., Rodríguez de la Concepción, M. L., Rodríguez-Sureda, V., Peinado-Onsurbe, J., Poli, V., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giralt, M. (2005) *Biochem. J.* **389**, 47–56
18. Klaus, S., Choy, L., Champigny, O., Cassard-Douclier, A. M., Ross, S., Spiegelman, B., and Ricquier, D. (1994) *J. Cell Sci.* **107**, 313–319
19. Wabitsch, M., Brenner, R. E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K. M., and Hauner, H. (2001) *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25**, 8–15
20. Hansen, J. B., Jørgensen, C., Petersen, R. K., Hallenborg, P., De Matteis, R., Bøye, H. A., Petrovic, N., Enerbäck, S., Nedergaard, J., Cinti, S., te Riele, H., and Kristiansen, K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4112–4117
21. Herzog, B., Cardenas, J., Hall, R. K., Villena, J. A., Budge, P. J., Giguère, V., Granner, D. K., and Kralli, A. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 99–106
22. Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., Rodriguez de la Concepción, M., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2006) *Endocrinology* **147**, 2829–2838
23. Mercader, J., Palou, A., and Bonet, M. L. (2010) *Obesity* **18**, 655–662
24. Bellizzi, D., Dato, S., Cavalcante, P., Covello, G., Di Cianni, F., Passarino, G., Rose, G., and De Benedictis, G. (2007) *Genomics* **89**, 143–150
25. Busch, B. B., Stevens, W. C., Jr., Martin, R., Ordentlich, P., Zhou, S., Sapp, D. W., Horlick, R. A., and Mohan, R. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 5593–5596
26. Jacobs, K. M., Pennington, J. D., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Kim, H. S., Mishra, M., Sun, L., Nguyen, P., Ahn, B. H., Leclerc, J., Deng, C. X., Spitz, D. R., and Gius, D. (2008) *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 291–299
27. Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Jr., Weissman, S., Verdin, E., and Schwer, B. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–8814
28. Villarroya, F., Giralt, A., Planavila, A., Hondares, E., Iglesias, R., and Giralt, M. (2009) *J. Physiol. Sci.* **59**, Suppl. 1, 279
29. Feige, J. N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S. M., Milne, J. C., Lambert, P. D., Matak, C., Elliott, P. J., and Auwerx, J. (2008) *Cell Metab.* **8**, 347–358
30. Villena, J. A., Hock, M. B., Chang, W. Y., Barcas, J. E., Giguère, V., and Kralli, A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1418–1423
31. Debevec, D., Christian, M., Morganstein, D., Seth, A., Herzog, B., Parker, M., and White, R. (2007) *Mol. Endocrinol.* **21**, 1581–1592
32. Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., Fang, F., and Chang, Y. (2010) *PLoS. One* **5**, e11707



**FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation.**

Revista: Journal of Lipid Research

PMID: 23661803

**FGF21 vehicula la resposta del metabolisme lipídic a la privació d'aminoàcids.**

L'expressió de gens lipogènics al fetge en ratolins es veu reprimida en condicions de manca de leucina. L'hormona *fibroblast growth factor 21* (FGF21), la qual és crítica per l'adaptació metabòlica en resposta al dejuni, també s'indueix en resposta a la manca d'aminoàcids a la dieta. Sota un règim de privació de leucina, hem identificat que FGF21 és necessari per reprimir l'expressió dels gens lipogènics al fetge i al teixit adipós blanc, i estimula la fosforilació de la lipasa sensible a hormones al teixit adipós blanc. L'increment de l'expressió d'UCP1 al teixit adipós marró, en aquestes circumstàncies, també es veu impedit a ratolins deficients amb FGF21. Els nostres resultats demostren la importància del rol d'FGF21 en la regulació del metabolisme lipídic durant la privació d'aminoàcis.

La meva contribució en aquesta publicació ha estat bàsicament en la responsabilització de la gestió i l'estudi del model *in vivo* dels ratolins FGF21-KO utilitzats per l'estudi.





# FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation

Ana Luísa De Sousa-Coelho,<sup>\*,†</sup> Joana Relat,<sup>\*,†</sup> Elayne Hondares,<sup>†,§</sup> Albert Pérez-Martí,<sup>\*,†</sup> Francesc Ribas,<sup>†,§</sup> Francesc Villarroya,<sup>†,§</sup> Pedro F. Marrero,<sup>\*,†</sup> and Diego Haro<sup>1,\*,†</sup>

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,\* Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB),<sup>†</sup> 08028 Barcelona, Spain; and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,<sup>§</sup> Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, 08028 Barcelona, Spain

**Abstract** Lipogenic gene expression in liver is repressed in mice upon leucine deprivation. The hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21), which is critical to the adaptive metabolic response to starvation, is also induced under amino acid deprivation. Upon leucine deprivation, we found that FGF21 is needed to repress expression of lipogenic genes in liver and white adipose tissue, and stimulate phosphorylation of hormone-sensitive lipase in white adipose tissue. The increased expression of *Ucp1* in brown adipose tissue under these circumstances is also impaired in FGF21-deficient mice. **Our results demonstrate the important role of FGF21 in the regulation of lipid metabolism during amino acid starvation.**—De Sousa-Coelho, A. L., J. Relat, E. Hondares, A. Pérez-Martí, F. Ribas, F. Villarroya, P. F. Marrero, and D. Haro. FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 1786–1797.

**Supplementary key words** brown adipose tissue • fibroblast growth factor 21 • leucine deprivation • liver • white adipose tissue

Amino acid starvation initiates a signal transduction cascade, starting with the activation of the general control nonderepressible 2 (GCN2) kinase, phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2), and increased synthesis of activating transcription factor 4 (ATF4) (1). We have recently found that fibroblast growth factor 21 (*Fgf21*) is a target gene for ATF4. Consequently, FGF21 is induced by amino acid deprivation both in mouse liver and HepG2 cells as part of the transcriptional program initiated by increased levels of ATF4 (2).

FGF21 is a member of the FGF family with endocrine properties. It is predominantly produced by the liver, but is also produced by other tissues such as white adipose

tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), skeletal muscle, and pancreas (3–6). FGF21 expression in liver is under tight control by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  (7–10). It is induced in the liver during fasting and its expression induces a metabolic state that mimics long-term fasting. Thus, FGF21 is critical for the induction of hepatic fat oxidation, ketogenesis, and gluconeogenesis, which are metabolic processes critical for the adaptive metabolic response to starvation (11). *Fgf21* is also a target of the liver X receptor that represses its induction during fasting (12, 13). Significantly, FGF21 extends life span in transgenic mice to a similar extent as dietary restriction (14).

A dietary amino acid imbalance alters metabolic pathways beyond protein homeostasis. GCN2-dependent inhibition of fatty acid synthase (FASN) activity, expression of lipogenic genes in liver, and increased mobilization of lipid stores occur in response to leucine deprivation in mice (15). In addition, the following have been observed: increased expression of  $\beta$ -oxidation genes, decreased expression of lipogenic genes and activation of FASN in WAT, and increased expression of uncoupling protein 1 (*Ucp1*) in BAT (16, 17).

Abbreviations: ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1;  $\beta$ 3AR,  $\beta$ 3-adrenergic receptor; ASNS, asparagine synthetase; ATF4, activating transcription factor 4; Atgl, adipose triglyceride lipase; BAT, brown adipose tissue; Cd36, cluster of differentiation 36; Cpt1a, carnitine palmitoyl-transferase 1a; Ctl, control; DIO, diet-induced obesity; Dio2, type 2 deiodinase; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; eWAT, epididymal white adipose tissue; Fabp4, fatty acid binding protein 4; FASN, fatty acid synthase; FGF21, fibroblast growth factor 21; FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1; GCN2, general control nonderepressible 2; H and E, hematoxylin and eosin; HSL, hormone-sensitive lipase; KO, knockout; (–)leu, leucine-deficient; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein/ERK kinase; PGC1, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1; Plin1, perilipin 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c; *Ucp1*, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue; WT, wild-type.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: dharo@ub.edu.

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2010-15217 to D.H. and SAF2011-23636 to F.V.) and the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR163). A.L.D.-S.C. was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) from Portuguese Government.

Manuscript received 18 October 2012 and in revised form 6 May 2013.

Published, JLR Papers in Press, May 9, 2013  
DOI 10.1194/jlr.M033415

The coincidence between the metabolic response to essential amino acid deprivation and to FGF21, the induction of *Fgf21* under amino acid deprivation (2), together with the repression of the transcription and maturation of sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) induced by FGF21 in HepG2 cells (18), led us to consider that FGF21 could be an important mediator between amino acid deprivation and lipid metabolism in liver, WAT, and BAT.

To investigate this hypothesis, we examined the response of FGF21-deficient mice to deprivation of the essential amino acid leucine. As expected, we found a huge increase in *Fgf21* expression in the liver of wild-type (WT) animals, along with a repression of lipogenic genes after 7 days of leucine deprivation. In this condition, FGF21-deficient mice developed liver steatosis caused by unrepressed expression of lipogenic genes. In WAT, the expression of lipogenic genes was also repressed and the phosphorylation of hormone-sensitive lipase (HSL) was increased under leucine deprivation. The absence of leucine also induced an increase in the expression of *Ucp1* and type 2 deiodinase (*Dio2*) in BAT. We found that all these effects in WAT and BAT were also impaired in FGF21-deficient mice. Here, we show the involvement of FGF21 in the regulation of lipid metabolism during amino acid starvation, thus reinforcing its important role as an endocrine factor in coordinating energy homeostasis under a variety of nutritional conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and diets

Male WT and *Fgf21*-null mice (B6N; 129 S5-Fgf21tm1Lex/Mmucd), obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center, were housed in a temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12/12 h light/dark cycle and were provided free access to commercial rodent chow and tap water prior to the experiments. Control (nutritionally complete amino acid) and leucine-deficient [(-)leu] diets were obtained from Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ). All diets were isocaloric and compositionally the same in terms of carbohydrate and lipid components. At the beginning of the feeding experiment, 12–15 week old male mice were first acclimated to the control diet for 7 days, and then randomly assigned to either the control diet group, with continued free access to the nutritionally complete diet, or the (-)leu diet group, with free access to the diet devoid of the essential amino acid leucine for 7 days. Food intake and body weight were recorded at least every 2 days. Animals were anesthetized by isoflurane inhalation, and blood was collected from the heart for the assay described below. After euthanization, tissues were isolated and immediately snap-frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for future analysis. The Animal Ethics Committee of the University of Barcelona approved these experiments.

### Cell culture and treatment conditions

HepG2 cells were cultured in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (GIBCO, Invitrogen) supplemented to contain 1× nonessential amino acids, 4 mM glutamine, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin sulfate, 100 units/ml penicillin G, and 10% (v/v) fetal bovine serum. Cells were maintained at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air

incubator, and cultures were replenished with fresh MEM medium and serum for approximately 16 h prior to initiating all treatments to ensure that the cells were in the basal ("fed") state. Amino acid deprivation was induced by transfer of cells to culture medium containing 2 mM histidinol (HisOH) for 8 h, which blocks charging of histidine onto the corresponding tRNA and thus mimics histidine deprivation and triggers activation of the AAR cascade (19). For mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK) inhibition, the direct upstream kinases of ERK1/2, cells were treated with 30  $\mu\text{M}$  PD98059 (PD98) for approximately 16 h before harvesting. HisOH (H6647) and PD98059 (P215) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Primary BAT adipocytes were obtained and maintained as previously described (20). Mouse 3T3-L1 adipocytes were cultured and differentiated as described previously (21).

**Serum measurements.** Serum was obtained by centrifugation of clotted blood and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . A mouse FGF21 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was obtained from Millipore for the quantification of FGF21 in mouse serum. The assay was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, a calibration curve was constructed by plotting the difference in absorbance values at 450 and 590 nm versus the FGF21 concentrations of the calibrators, and concentrations of unknown samples (performed in duplicate) were determined using this calibration curve (22). The Veterinary Service of Clinical Biochemistry at the Universitat Autònoma de Barcelona determined blood biochemical parameters.

**RNA isolation and relative quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted from the frozen tissues [liver, epididymal white adipose tissue (eWAT), and BAT] or cells (3T3L1 and primary brown adipocytes) using TRI reagent solution (Ambion) followed by DNase I treatment (Ambion) to eliminate genomic DNA contamination. To measure the relative mRNA levels, quantitative (q)RT-PCR was performed using TaqMan reagents. cDNA was synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA by MLV reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. TaqMan Gene Expression Master Mix and TaqMan Gene Expression assays (Invitrogen/Applied Biosystems) were used for the PCR step. Amplification and detection were performed using the Step-One Plus Real-Time PCR System. Each mRNA from a single sample was measured in duplicate, using 18S rRNA as an internal control. Results were obtained by the comparative threshold cycle (Ct) method and expressed as fold of the experimental control.

**Protein extract preparation.** Whole-cell lysates from HepG2 cells were isolated using NP40 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40]. To obtain liver nuclear extracts, frozen liver was triturated within a mortar in liquid nitrogen and immediately homogenized with a Dounce homogenizer in 1 ml of HB buffer [15 mM Tris-HCl (pH 8), 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.5 mM EDTA], and centrifuged at 800  $g$  for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of HB buffer supplemented with 0.05% Triton X-100 (Sigma), and centrifuged for 10 min at 1,000  $g$ . Nuclear pellets were washed with 1 ml of HB buffer supplemented with 0.05% Triton X-100 and 1 ml of HB buffer. Nuclei were incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min in 50  $\mu\text{l}$  of HB buffer containing 360 mM KCl and centrifuged for 5 min at 10,000  $g$ . The supernatant corresponding to the nuclear extract was collected, frozen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . To obtain liver, WAT, and BAT total extracts, tissues were homogenized in RIPA buffer and centrifuged at 12,000  $g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Protein concentration was assayed using Bio-Rad reagent. All of the buffers were

supplemented with a mixture of protease inhibitors (Sigma-Aldrich), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and a phosphatase inhibitor cocktail (IPC3, Sigma-Aldrich).

**Immunoblotting.** Total and nuclear proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a Hybond-P PVDF membrane (Millipore). Membranes were blocked for 1 h at room temperature. The blots were then incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4°C. Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. The blots were washed three times and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in blocking buffer for 2 h at room temperature. After three washes, the blots were developed using the EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP (Biological Industries). The quantification of phosphorylation was performed by densitometry of phosphorylated protein normalized to total protein using Image J software.

**Antibodies.** HSL (#4107), phospho HSL (#4126), ERK1/2 (#4695), phospho-ERK1/2 (#4370), and phospho-p38 (#9211) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. ATF4 (sc-200), p38 $\alpha/\beta$  (A-12, sc-7972), and SREBP1c (C-20, sc-36) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); FASN (ab128870) antibody was from Abcam; acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) (04-322) and phospho-ACC1 (07-303) antibodies were from Millipore; actin antibody (A2066) was from Sigma-Aldrich; and tubulin antibody (#CP06) was from Calbiochem.

**Histological examinations.** For the histological analysis, tissues (liver and eWAT) were fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich) and embedded in paraffin. Then, 4  $\mu$ m thick sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (H and E). Images were acquired using a Leica CTR 4000 microscope. Quantitative data were obtained using the IMAT program developed in the Science and Technology Center of the University of Barcelona. The selection of the test objects was performed according to color and choosing the same limits for binarization for all images. Adipocyte size and lipid accumulation were measured using at least three different randomly chosen fields of eWAT and liver sections, respectively, from each mouse.

**Lipolysis assay.** Lipolysis assay was performed after 24 h treatment with FGF21 using the Free Glycerol Determination Kit (Sigma).

**Data analysis/statistics.** All data are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant differences were assessed by a two-tailed Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered statistically significant. *a*, *P* < 0.05 versus control (Ctl) WT mice (or DMSO-treated HepG2 cells); *b*, *P* < 0.05 versus Ctl *Fgf21*-knockout (KO) mice; *c*, *P* < 0.05 versus (-)leu WT (or HisOH-treated HepG2 cells) (*n* = 6 per group of mice, or at least three independent experiments with HepG2 cells).

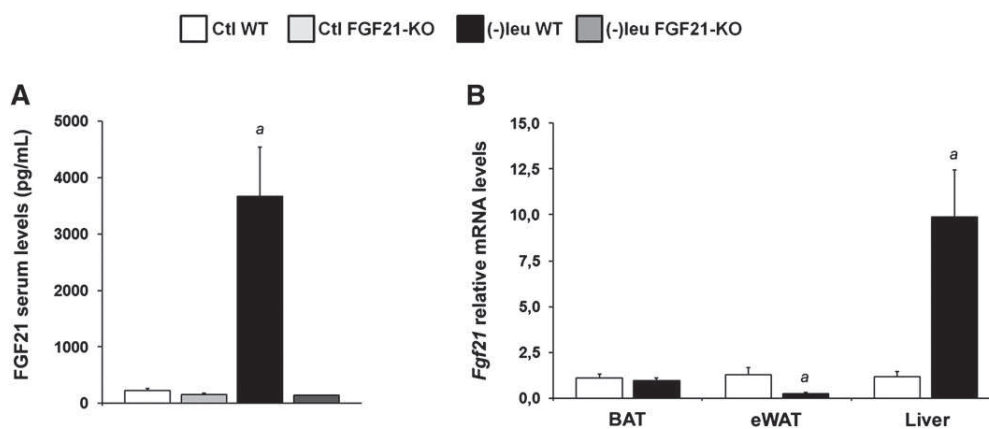
## RESULTS

### FGF21 gene expression is induced by leucine deprivation specifically in liver but not in BAT or WAT

According to our previously reported results (2), mice maintained on a (-)leu diet show a dramatic increase in FGF21 circulating levels (Fig. 1A). To check the origin of this circulating FGF21 we analyzed *Fgf21* gene expression in several tissues. Consistent with the liver as the main site of FGF21 production and release into the blood, *Fgf21* mRNA levels in liver paralleled those in serum, whereas mRNA levels were unchanged in BAT and, unexpectedly, significantly decreased in eWAT in WT mice maintained on a (-)leu diet (Fig. 1B). As expected, *Fgf21* mRNA levels were undetectable in any analyzed tissue in the *Fgf21*-KO mice. In accordance with previous reports (23), the circulating levels of FGF21 in KO mice were below the threshold for correct quantification.

### FGF21 deficiency significantly attenuates weight loss under leucine deprivation

When fed a leucine-deprived diet, mice undergo rapid weight loss (16). The goal of the present study is to investigate whether this phenomenon is FGF21 dependent. For this purpose, WT and *Fgf21*-KO mice were fed a control or (-)leu diet for 7 days. Together with total body weight



**Fig. 1.** FGF21 is differently regulated by leucine deprivation in liver and adipose tissues. A: Serum FGF21 protein concentrations were measured by ELISA. B: *Fgf21* mRNA in BAT, eWAT, and liver was measured by qRT-PCR. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. *a*, *P* < 0.05 versus Ctl WT.

loss (Figs. 2A, B), mice fed a leucine-deprived diet undergo a fat mass loss, both epididymal and subcutaneous (Fig. 2D). We found that these effects were partially blunted in *Fgf21*-KO mice (Figs. 2A, B, D), while the reduction in food intake caused by leucine deprivation (~30%) was unchanged between genotypes (Fig. 2C).

The reported observation that white adipocytes from FGF21 transgenic mice are substantially smaller than those from WT mice (8, 24) and that leucine deprivation decreased adipocyte volume (16), led us to examine whether this effect was FGF21 dependent. A histological analysis of eWAT (Fig. 3A) showed that leucine deprivation resulted in a reduction in adipocyte volume compared with mice fed a control diet. By contrast, the adipocyte volume was only slightly reduced in (-)leu-fed *Fgf21*-KO mice and remained unchanged in *Fgf21*-KO mice on the control diet (Fig. 3A). We note that other groups reported increased (25) or decreased (26) adipocyte size in *Fgf21*-KO mice on regular diets. We have no explanation for these discrepancies beyond potential minor differences in the composition of the diet.

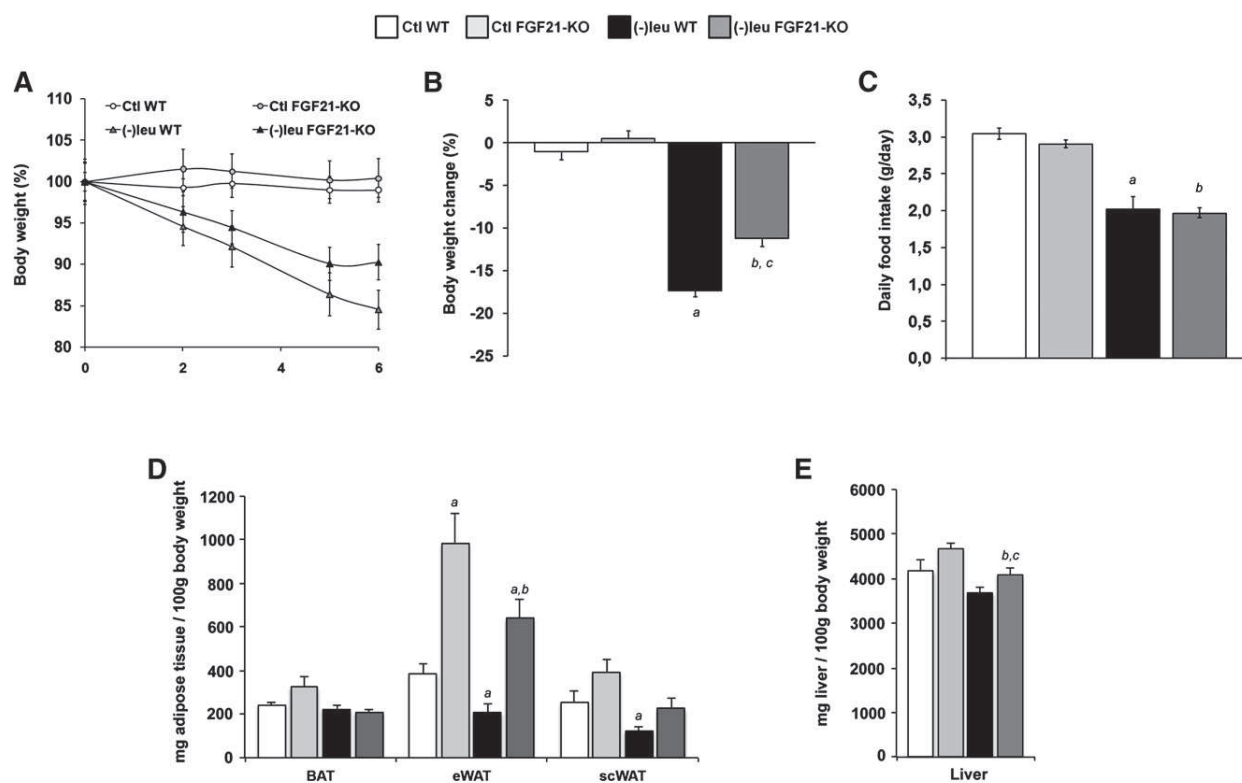
#### Increased phosphorylation of HSL under leucine deprivation is FGF21 dependent

It has been previously described that leucine deprivation increases lipolysis in WAT (16). It has also been

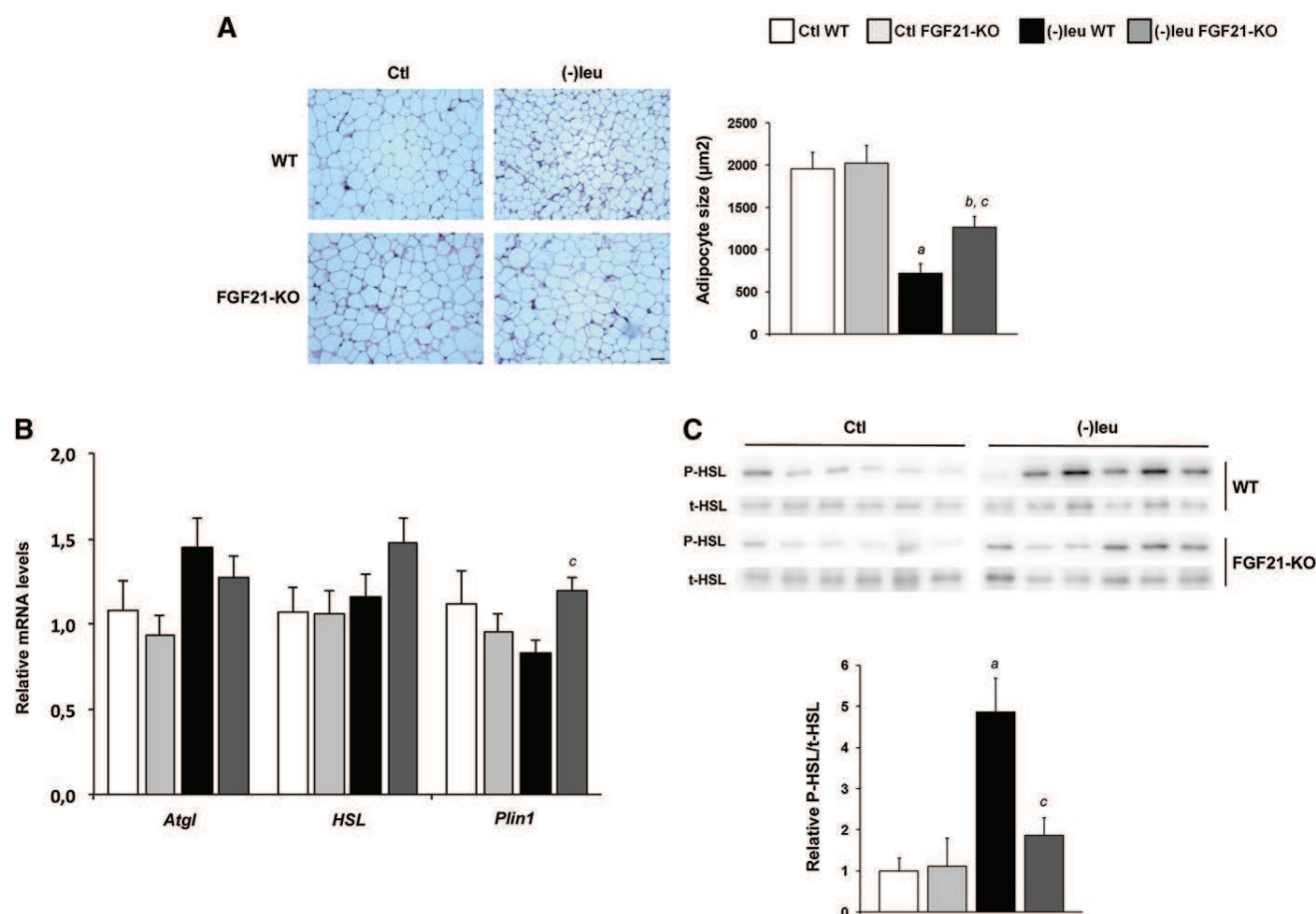
suggested that FGF21 stimulates lipolysis in WAT during normal feeding, but inhibits it during fasting (25). Therefore, to examine the role of FGF21 in lipolysis, we evaluated the mRNA levels of adipose triglyceride lipase (*Atgl*), *Hsl*, and perilipin 1 (*Plin1*), and the levels of phosphorylated HSL. We did not find any statistically significant changes in *Atgl*, *Hsl*, or *Plin1* mRNA levels upon leucine deprivation (Fig. 3B). Consistent with changes in body weight, lack of FGF21 significantly decreased levels of phosphorylated HSL in WAT under leucine deprivation (Fig. 3C), which suggests that lipolysis was impaired in these mice. Despite the evidence of increased lipolysis under leucine deprivation, levels of free fatty acids in serum were not significantly altered in the conditions analyzed (Table 1), suggesting increased fatty acid utilization by other tissues.

#### FGF21 deficiency prevents changes in liver and WAT in leucine-deprived mice

A link between FGF21 and SREBP1c during lipogenesis in cultured hepatocytes has recently been proposed (18). As lipogenic genes are downregulated in the liver of mice deprived of leucine (15), we speculated that FGF21 might regulate their expression. To investigate this possibility, we examined the expression of genes involved in the regulation of lipid metabolism in the liver



**Fig. 2.** FGF21 is required for (-)leu diet effects on body weight without affecting food consumption. A: Body weight of mice fed with Ctl or (-)leu diet. The weight on the first day was considered 100%. B: Body weight change (%) after 7 days of feeding the Ctl or (-)leu diet. C: Daily food intake. D: BAT, eWAT, and scWAT weight of mice fed with Ctl or (-)leu diet related to 100 mg of body weight. E: Liver weight of mice fed with Ctl or (-)leu diet related to 100 mg of body weight. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. a,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; b,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; c,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group).



**Fig. 3.** The (-)leu diet effects on adipocyte size and lipid metabolism in WAT are FGF21 dependent. A: Representative H and E-stained eWAT sections from WT and FGF21-KO mice ( $\times 20$  magnification). Scale bar, 50  $\mu$ M. Adipocyte size (right panel) was measured as described in Materials and Methods, using at least three different randomly chosen fields of eWAT sections from each mouse. B: *Atgl*, *Hsl*, and *Plin1* gene expression was measured by qRT-PCR in mouse eWAT. C: Phosphorylated HSL (P-HSL) and total HSL (t-HSL) protein levels were measured in WT and FGF21-KO eWAT homogenates by Western blot analysis. The bottom panel shows quantification by densitometry of phosphorylated HSL normalized to total HSL using Image J software. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. *a*,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; *b*,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; *c*,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group). P-HSL, phosphorylated HSL.

of WT and *Fgf21*-KO mice maintained either on the control or (-)leu diet. As expected, levels of *Fasn*, *Srebp1c*, and *Acc1* mRNA were significantly decreased on the (-)leu diet. However, in mice lacking FGF21, the reduced expression of *Fasn* was statistically significantly increased, and, although not statistically significant, showed a tendency to increase in both *Srebp1c* and *Acc1* (Fig. 4A). The expression of other genes involved in fatty acid uptake

[cluster of differentiation 36 (*Cd36*) and fatty acid binding protein 4 (*Fabp4*)] or oxidation [carnitine palmitoyl-transferase 1a (*Cpt1a*)] was decreased in the absence of *Fgf21*. The analysis of FASN, SREBP1c, and ACC1 protein abundance showed a good correlation with the gene expression data (Fig. 4B). By contrast ACC1 phosphorylation was decreased under leucine deprivation in both WT and *Fgf21*-KO mice.

TABLE 1. Serum measurements in mice maintained on different diets

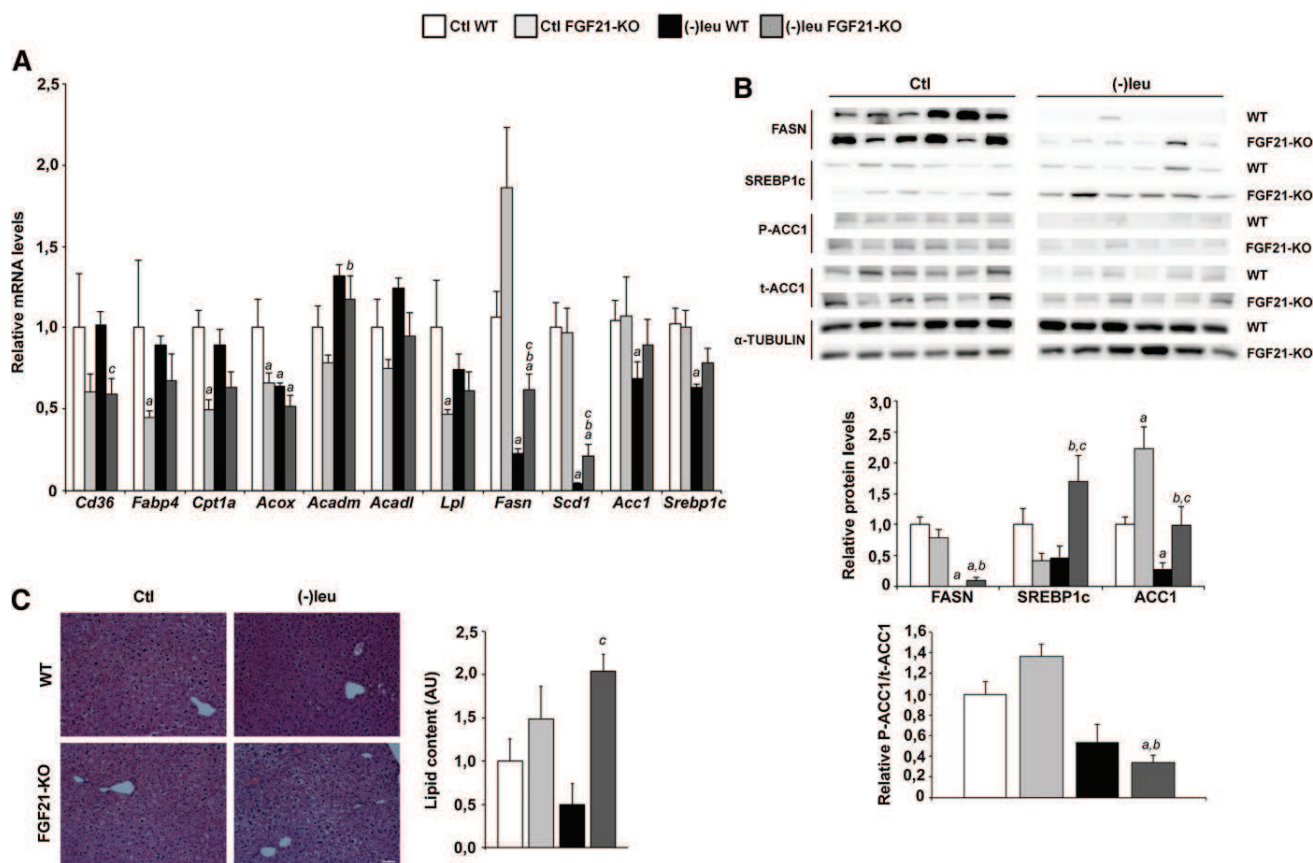
	WT Ctl	FGF21-KO Ctl	WT leu(-)	FGF21-KO leu(-)
NEFA (nmol/l)	0.79 $\pm$ 0.11	1.05 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.06
TG (mg/dl)	95.79 $\pm$ 7.18	153.73 $\pm$ 11.62 <sup>a</sup>	99.39 $\pm$ 15.36	186.08 $\pm$ 27.38 <sup>a,c</sup>
Cholesterol (mg/dl)	101.13 $\pm$ 13.13	147.65 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	96.40 $\pm$ 7.69	122.55 $\pm$ 3.08 <sup>b,c</sup>
Glucose (mg/dl)	209.43 $\pm$ 10.45	212.90 $\pm$ 7.88	185.53 $\pm$ 14.87	187.02 $\pm$ 9.55
Glycerol ( $\mu$ mol/l)	393.50 $\pm$ 38.32	520.95 $\pm$ 23.10 <sup>a</sup>	313.93 $\pm$ 26.56	372.16 $\pm$ 19.99 <sup>b</sup>
Insulin ( $\mu$ g/l)	1.26 $\pm$ 0.23	2.01 $\pm$ 0.52	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. Significant differences were assessed by a two-tailed Student's *t*-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.  $n = 6$ /group of mice. TG, triglycerides.

<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus Ctl WT mice.

<sup>b</sup> $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice.

<sup>c</sup> $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice.



**Fig. 4.** FGF21-KO liver has impaired lipid metabolism and lipid accumulation in response to leucine deprivation. **A:** Expression of genes related with lipid handling was measured by qRT-PCR in mouse liver. **B:** FASN, SREBP1c, phosphorylated ACC1 (P-ACC1), and total ACC1 (t-ACC1) protein levels were detected by Western blot analysis in mouse liver. The bottom panel shows quantification by densitometry of the immunoblotted proteins using Image J software. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. *a*,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; *b*,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; *c*,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group). **C:** Histological appearance and hepatic lipid accumulation of H and E liver staining of WT and FGF21-KO mice maintained either on a Ctl or a (-)leu diet. Representative H and E-stained hepatocytes are shown ( $\times 20$  magnification). Scale bar, 50  $\mu$ m. Lipid accumulation (right panel) was measured as described in Materials and Methods, using at least three different randomly chosen fields of liver sections from each mouse. Acadm, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; Acadl, long-chain acyl-CoA dehydrogenase; Acox, acetyl-CoA oxidase; Lpl, lipoprotein lipase; Scd1, stearoyl-CoA desaturase 1.

Although liver triglyceride levels, measured by extraction and posterior quantification, did not reflect the expression pattern of the lipid synthesis genes, H and E staining revealed it. This suggested a decreased lipid accumulation under leucine deprivation in WT animals that does not seem to occur in the *Fgf21*-KO mice (Fig. 4C).

As expected, gene expression analysis in eWAT revealed that the mRNA levels of the lipogenic genes *Fasn*, *Srebp1c*, and *Acc1* were also lower in this tissue in mice maintained on the (-)leu diet. These changes were blunted in the *Fgf21*-KO mice, particularly for *Fasn* (Fig. 5A). The analysis of FASN protein abundance showed a good correlation with the gene expression data (Fig. 5B).

We have analyzed the expression of the FGF21-receptor complex  $\beta$ -Klotho and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) in WAT. There was a significant increase in both  $\beta$ -Klotho and *Fgfr1* mRNA levels induced by both *Fgf21* knockout and leucine deprivation (Figs. 5C).

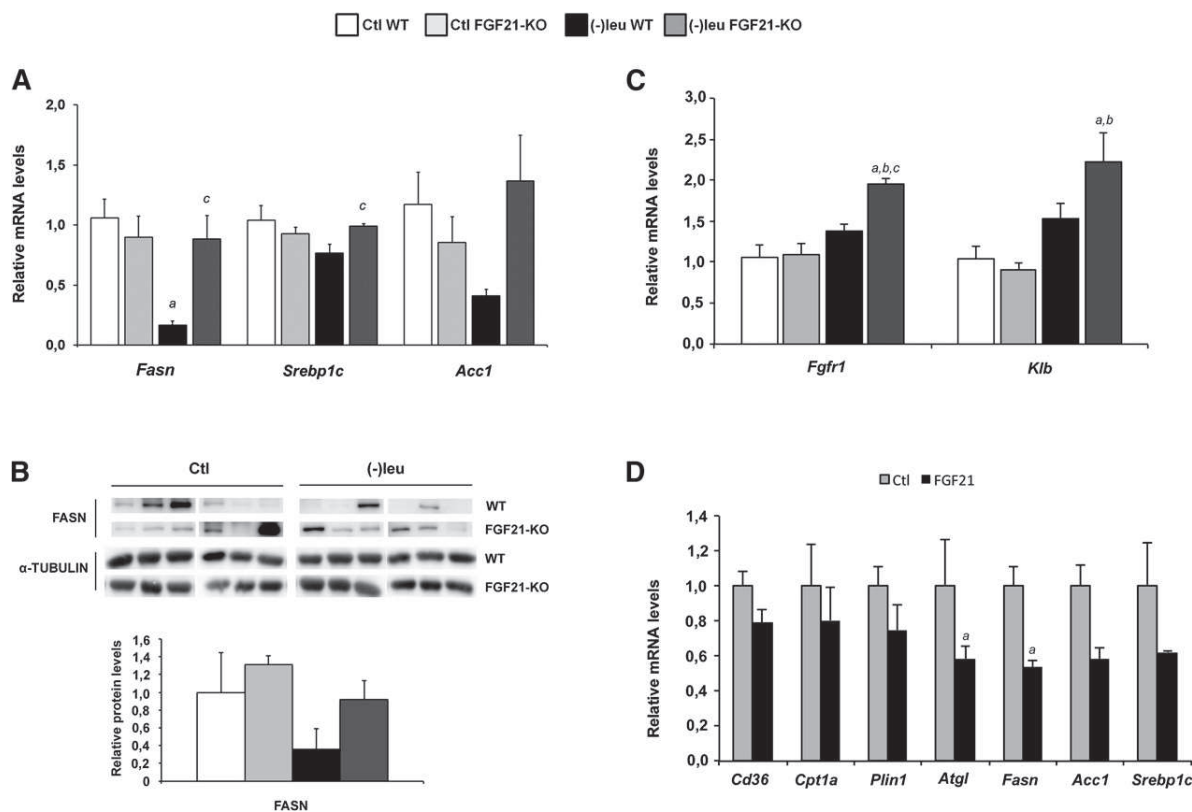
To further confirm the results obtained in mice, we have analyzed the expression of lipogenic and lipolytic genes in 3T3L1 treated with FGF21. This treatment induced

a decrease in the expression of *Fasn*, *Srebp1c*, and *Acc1* and also of *Atgl* and *Plin* (Fig. 5D).

#### The FGF21-dependent phenotype during leucine deprivation is not related with the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 signaling pathway

As described, mitogen-activated protein kinase (MAPK) ERK1/2 signaling is required for the amino acid starvation response (27, 28). Accordingly, histidinol treatment of HepG2 cells, which blocks charging of histidine onto the corresponding tRNA and thus mimics histidine deprivation, induced the phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 6A). In addition, increased *FGF21* and asparagine synthetase (ASNS), mRNA levels (Fig. 6C), as well as increased ATF4 protein levels in HisOH-treated cells (Fig. 6B) were reduced in the presence of the MEK inhibitor PD98. In these cells, FASN expression is opposed to that of *FGF21* (Fig. 6D), mimicking what we observed in leucine-deprived WT (high FGF21) or *Fgf21*-null mice (Fig. 4A).

As it has been described that exogenous FGF21 is able to induce ERK1/2 phosphorylation in the liver and WAT



**Fig. 5.** FGF21-KO eWAT has altered lipogenic pathway in response to leucine deprivation. **A:** *Fasn*, *Srebp1c*, and *Acc1* gene expression was measured by qRT-PCR in mouse eWAT. **B:** FASN protein levels were detected by Western blot analysis in mouse liver. The bottom panel shows quantification by densitometry of the immunoblotted proteins using Image J software. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. *a*,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; *b*,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; *c*,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group). **C:** *Fgfr1* and  $\beta$ -Klotho gene expression was measured by qRT-PCR in mouse eWAT. **D:** The expression of genes related with lipid metabolism pathways was measured by qRT-PCR in 3T3L1 adipocytes treated with recombinant FGF21 (100 nM) for 24 h. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. *a*,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; *b*,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; *c*,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group).

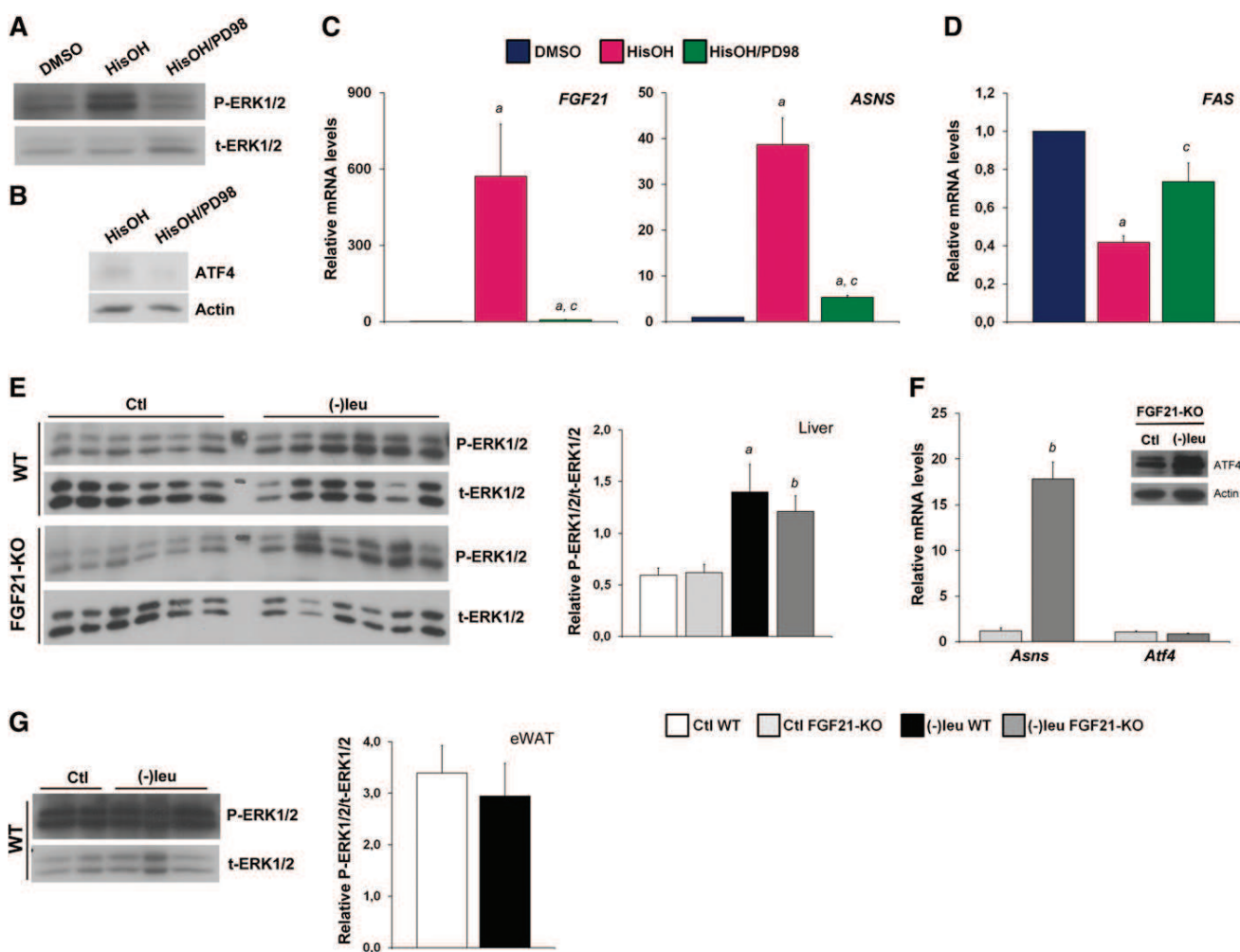
of acutely treated mice (29); we checked ERK1/2 phosphorylation in leucine-deprived WT and FGF21-null mice. Effectively, ERK1/2 phosphorylation was induced in the liver of leucine-deprived mice, although there were no differences between genotypes (Fig. 6E). Accordingly, the amino acid starvation response program was correctly initiated in *Fgf21*-KO mice, as shown by the increased levels of ATF4 protein and *Asns*, a prototypical ATF4 target gene, mRNA levels (Fig. 6F). Moreover, despite the fact that FGF21 serum levels are highly increased in leucine-deprived mice (Fig. 1A), ERK1/2 phosphorylation is not modified in WAT (Fig. 6G).

#### FGF21 deficiency prevents increases in BAT activation in leucine-deprived mice

Thermogenesis in BAT is mediated by the upregulation of UCP1 (30). It has been proposed that the induction of FGF21 production by the liver mediates direct activation of brown fat thermogenesis during the fetal-to-neonatal transition (20). FGF21 also regulates PPAR $\gamma$  coactivator 1 (PGC1)  $\alpha$  and browning of WAT in adaptive thermogenesis (31). Consistent with previous results (16), leucine deprivation increased levels of *Ucp1* and *Dio2* mRNAs in the

BAT of WT mice. These changes were blocked in *Fgf21*-KO mice (Fig. 7A). Because UCP1 expression is related to energy expenditure, the absence of induction of *Ucp1* in *Fgf21*-KO mice under leucine deprivation may contribute to the decrease in weight loss observed under these circumstances. mRNA levels of *Pgc1 $\alpha$* , which regulates the expression of UCP1 (32), were also increased. However, they did not differ between WT and *Fgf21*-KO mice under either control or (-)leu diet conditions (Fig. 7B). The same pattern as for *Ppar $\gamma$*  and *Pgc1 $\alpha$*  was observed for *Adrb3* mRNA levels (Fig. 7C). We tested the possibility that the activation of p38 MAPK by the  $\beta$ 3-adrenergic receptor ( $\beta$ 3AR) participated in the induction of the *Ucp1* gene in BAT under this situation. However, although p38 phosphorylation, but not PKA activity, is induced in primary brown adipocytes treated with recombinant FGF21 (data not shown), phosphorylated p38 levels remained unchanged between diets and genotypes in BAT (Fig. 7C).

We have also analyzed the expression of lipogenic and lipolytic genes and glycerol release in primary brown adipocytes treated with FGF21. This treatment decreased the expression of *Fasn* and increased glycerol release without significant changes in the expression of *Atgl* and *Plin*



**Fig. 6.** Activation of the MEK/ERK pathway in the liver by leucine deprivation is independent of FGF21. HepG2 cells were incubated for 8 h with HisOH (2 mM) and the MEK inhibitor PD98 (30  $\mu$ M), when indicated. Phosphorylation of ERK1/2 (A) and ATF4 protein levels (B) were analyzed by Western blot in total and nuclear HepG2 extracts, respectively. mRNA levels for *FGF21*, *ASNS* (C), and *FASN* (D) were analyzed by qRT-PCR. E: Phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2) and total ERK1/2 (t-ERK1/2) levels were measured in liver extracts of WT and FGF21-KO mice by Western blot analysis. The right panel shows quantification by densitometry of phosphorylated ERK1/2 normalized to total ERK1/2 using Image J software. F: *Asns* and *Atf4* mRNA levels and nuclear ATF4 protein levels (insert), were measured in FGF21-KO mouse liver by qRT-PCR and Western blot, respectively. Actin was used as a loading control. A representative blot is shown. G: Phosphorylated and total ERK1/2 levels were measured in WT mouse eWAT homogenates by Western blot analysis. The right panel shows quantification by densitometry of phosphorylated ERK1/2 normalized to total ERK1/2 using Image J software. Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. a,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; b,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; c,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group).

(Fig. 7E, F). Accordingly, mRNA levels of *Hsl* and *Atgl* as well as HSL phosphorylation did not change in BAT of *Fgf21*-deficient mice (Fig. 7B, D).

## DISCUSSION

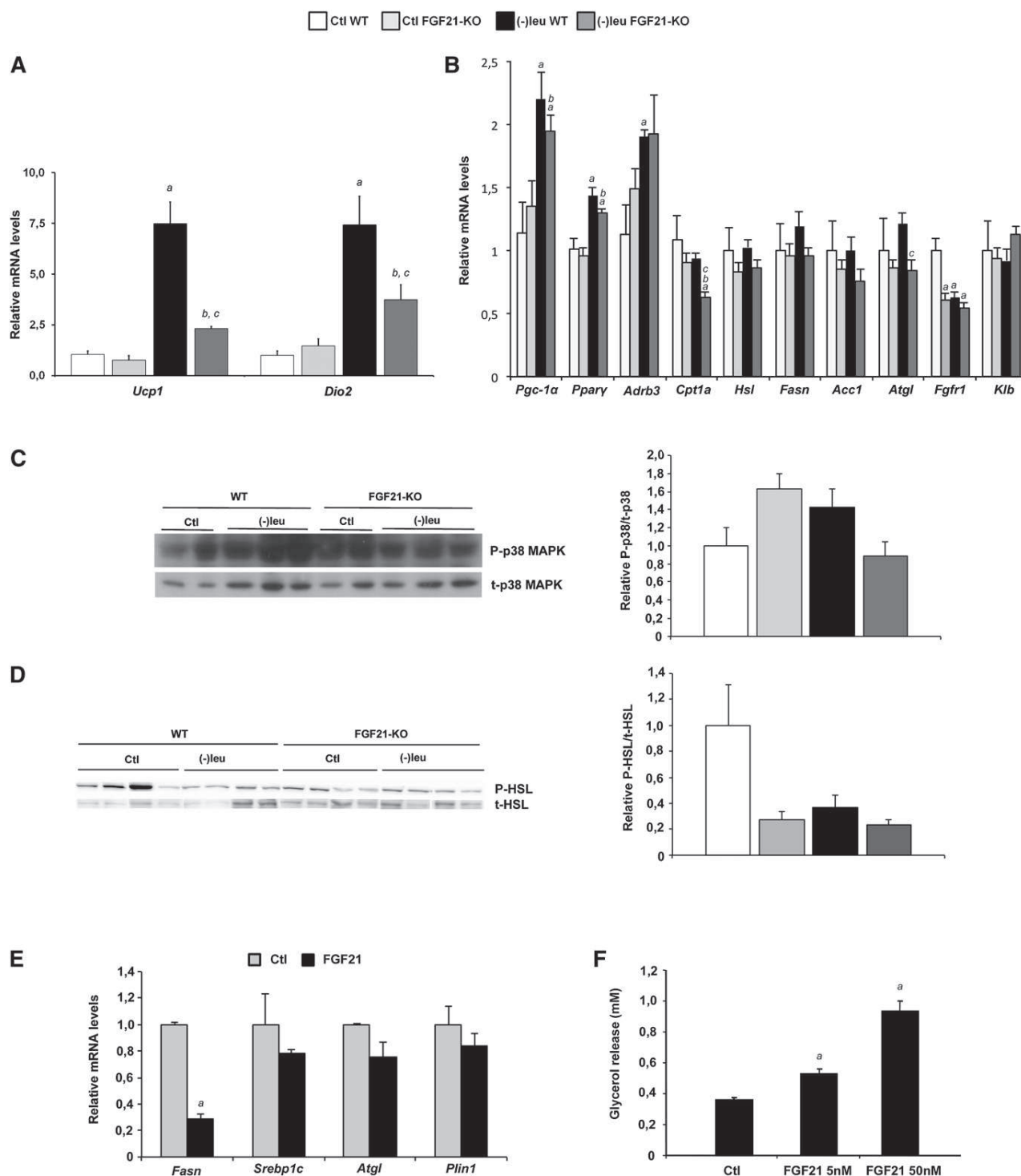
We have previously shown that leucine deprivation significantly increased FGF21 hepatic expression and serum protein levels (2), suggesting an important role of this hormone in the amino acid starvation phenotype. In the current study, we demonstrate that in response to leucine deprivation, weight loss, downregulation of liver and WAT key lipogenic genes, as well as BAT activation are partly FGF21 dependent. Our results show that the FGF21 serum levels positively correlate with the mRNA levels measured

in liver but not in BAT or WAT where they were not affected or even downregulated.

We have seen that FGF21 deficiency significantly attenuates weight loss under leucine deprivation; although the established reduction in food intake induced by a leucine-deprived diet was not changed by the absence of FGF21. This means that FGF21 is in part responsible for the loss of weight under amino acid deprivation, independently of food intake. Consistent with our observation, previous studies have shown that FGF21 transgenic mice are resistant to diet-induced obesity (DIO) and that FGF21 treatment induced weight loss in genetically obese (*ob/ob*) mice (24, 33, 34).

It has been shown that white adipocytes from FGF21 transgenic mice are substantially smaller than those from WT mice (8, 24). Here, we demonstrate that the reduction





**Fig. 7.** FGF21 is required for inducing BAT activation during amino acid deprivation. **A:** *Ucp1* and *Dio2* gene expression was measured by qRT-PCR in mouse BAT. **B:** The expression of genes related with lipid metabolism was measured by qRT-PCR in mouse BAT. **C:** Phosphorylated p38 MAPK (P-p38 MAPK) and total p38 MAPK (t-p38 MAPK) levels were measured in WT and FGF21-KO mouse liver extracts by Western blot analysis. The right panel shows quantification by densitometry of phosphorylated p38 MAPK normalized to total p38 MAPK using Image J software. **D:** Phosphorylated and total HSL protein levels were measured in WT and FGF21-KO eWAT homogenates by Western blot analysis. The right panel shows quantification by densitometry of phosphorylated HSL normalized to total HSL, using Image J software. A representative blot is shown. **E:** *Fasn*, *Srebp1c*, *Atgl* and *Plin1* gene expression was measured by qRT-PCR in differentiated primary BAT treated with FGF21 (50nM) for 24h. **F:** Glycerol release in differentiated primary BAT treated with FGF21 (5nM and 50nM) for 24h. Error bars represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Error bars represent the mean  $\pm$  SEM. A representative blot is shown. *a*,  $P < 0.05$  versus Ctl WT mice; *b*,  $P < 0.05$  versus Ctl FGF21-KO mice; *c*,  $P < 0.05$  versus (-)leu WT mice ( $n = 6$ /group).

in the adipocyte volume that occurs under leucine deprivation depends on the increased FGF21 expression and secretion that takes place under this diet.

We have found that the levels of phosphorylated (P)-HSL were increased upon (-)leu feeding in eWAT, as it was described in (16), so activation of the HSL protein probably allowed increased lipolysis. Interestingly, our results show that lack of FGF21 significantly decreases phosphorylated HSL levels in the eWAT of (-)leu-fed mice, suggesting an important role of FGF21 action on leucine deprivation-induced lipolysis.

The analysis of blood biochemical parameters, however, did not show significant changes in NEFA levels, likely due to increased fatty acid utilization by other tissues. We assume that there is an increased glucagon signaling under leucine deprivation, indicated by the increased PKA-dependent HSL Ser660 phosphorylation in WAT. Additionally, a reduction in insulin levels under leucine deprivation is observed in WT but not in KO mice; these changes are well correlated with the differences observed in body weight and fat mass.

We have also examined whether the impaired reduction in body weight observed in *Fgf21*-KO mice under leucine deprivation was not only related to lipolysis in WAT, but also to other factors that influence adipose tissue mass as lipogenesis. We have observed a significant reduction in *Fasn* mRNA levels in eWAT upon (-)leu feeding that was totally blocked in *Fgf21*-KO mice. *Srebp1c* and *Acc1* mRNA levels presented the same pattern, although with distinct statistical significances. The endocrine effect of FGF21 on WAT under leucine deprivation that we observe here is different from the recently described autocrine effect on this tissue in a fed state, in which FGF21 induces lipogenesis through the regulation of PPAR $\gamma$  activity (26). The decreased *Fgf21* expression in WAT under leucine deprivation also contrasts with its observed induction after one day of fasting (35). FGF21 administration to DIO mice leads to a dramatic decrease in the WAT *Fgf21* transcript. However, controversially, it induces an increase in the expression of adipogenic genes (33). It seems, therefore, that the response to increased levels of FGF21 depends on

its origin and other factors, which may reflect the metabolic state and the energy requirements of the organism.

An inhibitory action in the lipid synthesis had been already described for FGF21 (36). It was demonstrated that the reduction of hepatic triglyceride levels was associated with FGF21 inhibition of nuclear sterol regulatory element binding protein 1c (*Srebp1c*) and the expression of an extended array of genes involved in fatty acid and triglyceride synthesis. Accordingly, in liver, we have seen that the expected reduction in the mRNA levels of *Srebp1c*, *Fasn*, and *Acc1* by (-)leu diet was not observed in *Fgf21*-KO mice. We have also seen a direct effect in lipogenic gene expression in both 3T3L1 cells and primary brown adipocytes treated with recombinant FGF21.

The induction, in liver from *Fgf21*-KO mice, of *Asns* expression, for which the gene product catalyzes the glutamine and ATP-dependent conversion of aspartic acid to asparagine, suggests that FGF21 is not involved in the control of amino acid metabolism under amino acid starvation. We have also observed that contrary to the exogenous FGF21 induction of ERK1/2 phosphorylation in the liver and WAT of acutely treated mice (29), the FGF21-dependent phenotype in leucine deprivation is unexpectedly not related with the MAPK ERK1/2 signaling pathway both in liver and WAT.

BAT is a major site of adaptive thermogenesis, and it is used to preserve both thermal and caloric homeostasis in response to environmental temperature or diet (37). *Fgf21*-KO mice under leucine deprivation exhibited decreased induction of genes defining BAT identity (i.e., *Ucp1* and *Dio2*), while its transcriptional regulators *Pgc1 $\alpha$*  and *Ppar $\gamma$*  were identically induced in both WT and *Fgf21*-KO mice. Increased *Ucp1* expression may be regulated by the sympathetic nervous system through the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors. We found that the mRNA expression of *Adrb3* was induced by leucine deprivation in BAT, although there were no significant changes between genotypes. The  $\beta$ 3AR stimulates p38 MAPK, which is required for the  $\beta$ AR-dependent increase in *Ucp1* expression in brown adipocytes (38). Nevertheless, p38 phosphorylation levels were not affected by leucine deprivation compared with control, both in the WT

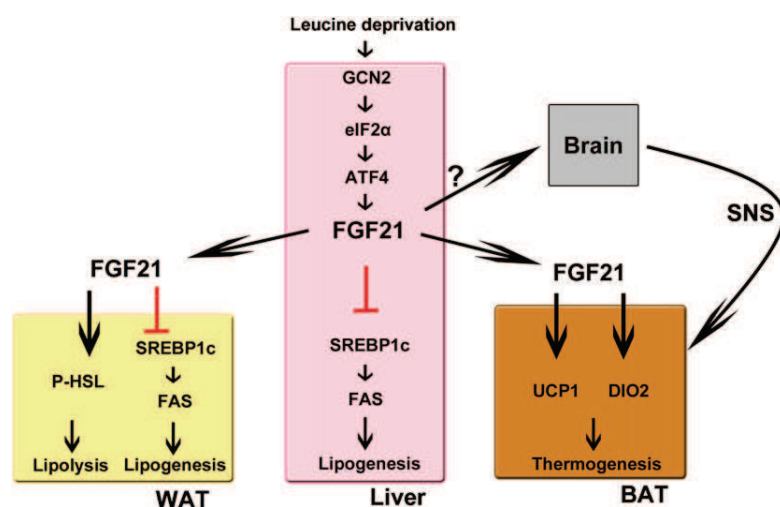


Fig. 8. Working model of the FGF21 regulatory pathway under leucine deprivation.

and *Fgf21*-KO mice. One of the best-known inducers of BAT and its function is norepinephrine (39), which has also been shown to be induced in leucine-deprived mice (16). These findings raise the possibility that FGF21 might induce *Ucp1* (and also *Dio2*) through an indirect mechanism involving the central nervous system. Of interest, it has been recently proposed that increased expression of FGF21 secreted from liver enters the brain and stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (40). However, a more extensive analysis of other candidate factors should be performed in the future, and further investigation will be required to determine the exact mechanism by which FGF21 induces BAT activation.

In summary, we found that FGF21 is an important factor, although not the only one, in mediating the changes in lipid metabolism observed upon leucine deprivation (Fig. 8). We have shown that *Fgf21*-deficient mice under these circumstances showed unrepressed lipogenesis in liver and WAT, decreased phosphorylation of HSL in WAT indicating impaired lipolysis, and impaired induction of *Ucp1* expression in BAT. Thus, our results suggest that FGF21 plays an important role in the regulation of lipid metabolism during amino acid starvation.

While this work was under revision, a study was published (41) that showed the *Atf4*-dependent induction of FGF21 in mice with autophagy deficiency in skeletal muscle or liver. As a result of this induction, these mice are protected from diet-induced obesity and insulin resistance. In the supplementary results of this paper, the authors confirm that the *ATF4*-*FGF21* axis also has a physiologically relevant role under conditions of leucine deprivation. In agreement with our results, they also show how the effects of leucine deprivation on body weight, fat weight, and blood glucose are partially diminished in *Fgf21*-KO mice. ■■

## REFERENCES

- Kilberg, M. S., J. Shan, and N. Su. 2009. *ATF4*-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**: 436–443.
- De Sousa-Coelho, A. L., P. F. Marrero, and D. Haro. 2012. Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* **443**: 165–171.
- Nishimura, T., Y. Nakatake, M. Konishi, and N. Itoh. 2000. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1492**: 203–206.
- Johnson, C. L., J. Y. Weston, S. A. Chadi, E. N. Fazio, M. W. Huff, A. Kharitonov, A. Köester, and C. L. Pin. 2009. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* **137**: 1795–1804.
- Izumiya, Y., H. A. Bina, N. Ouchi, Y. Akasaki, A. Kharitonov, and K. Walsh. 2008. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* **582**: 3805–3810.
- Hondares, E., R. Iglesias, A. Giral, F. J. Gonzalez, M. Giral, T. Mampel, and F. Villarroya. 2011. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **286**: 12983–12990.
- Badman, M. K., P. Pissios, A. R. Kennedy, G. Koukos, J. S. Flier, and E. Maratos-Flier. 2007. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR $\alpha$  and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* **5**: 426–437.
- Inagaki, T., P. Dutchak, G. Zhao, X. Ding, L. Gautron, V. Parameswara, Y. Li, R. Goetz, M. Mohammadi, V. Esser, et al. 2007. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**: 415–425.
- Gälman, C., T. Lundäsén, A. Kharitonov, H. A. Bina, M. Eriksson, I. Hafström, M. Dahlin, P. Amark, B. Angelin, and M. Rudling. 2008. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR $\alpha$  activation in man. *Cell Metab.* **8**: 169–174.
- Lundäsén, T., M. C. Hunt, L. M. Nilsson, S. Sanyal, B. Angelin, S. E. Alexson, and M. Rudling. 2007. PPAR $\alpha$  is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**: 437–440.
- Reitman, M. L. 2007. FGF21: a missing link in the biology of fasting. *Cell Metab.* **5**: 405–407.
- Uebanso, T., Y. Taketani, H. Yamamoto, K. Amo, S. Tanaka, H. Arai, Y. Takei, M. Masuda, H. Yamanaka-Okumura, and E. Takeda. 2012. Liver X receptor negatively regulates fibroblast growth factor 21 in the fatty liver induced by cholesterol-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* **23**: 785–790.
- Archer, A., N. Venteclef, A. Mode, M. Pedrelli, C. Gabbi, K. Clément, P. Parini, J. Gustafsson, and M. Korach-André. 2012. Fasting-induced FGF21 is repressed by LXR activation via recruitment of an HDAC3 corepressor complex in mice. *Mol. Endocrinol.* **26**: 1980–1990.
- Zhang, Y., Y. Xie, E. D. Berglund, K. C. Coate, T. T. He, T. Katafuchi, G. Xiao, M. J. Potthoff, W. Wei, Y. Wan, et al. 2012. The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife.* **1**: e00065.
- Guo, F., and D. R. Cavener. 2007. The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab.* **5**: 103–114.
- Cheng, Y., Q. Meng, C. Wang, H. Li, Z. Huang, S. Chen, F. Xiao, and F. Guo. 2010. Leucine deprivation decreases fat mass by stimulation of lipolysis in white adipose tissue and upregulation of uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipose tissue. *Diabetes.* **59**: 17–25.
- Cheng, Y., Q. Zhang, Q. Meng, T. Xia, Z. Huang, C. Wang, B. Liu, S. Chen, F. Xiao, Y. Du, et al. 2011. Leucine deprivation stimulates fat loss via increasing CRH expression in the hypothalamus and activating the sympathetic nervous system. *Mol. Endocrinol.* **25**: 1624–1635.
- Zhang, Y., T. Lei, J. F. Huang, S. B. Wang, L. L. Zhou, Z. Q. Yang, and X. D. Chen. 2011. The link between fibroblast growth factor 21 and sterol regulatory element binding protein 1c during lipogenesis in hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **342**: 41–47.
- Hansen, B. S., M. H. Vaughan, and L. Wang. 1972. Reversible inhibition by histidinol of protein synthesis in human cells at the activation of histidine. *J. Biol. Chem.* **247**: 3854–3857.
- Hondares, E., M. Rosell, F. J. Gonzalez, M. Giral, R. Iglesias, and F. Villarroya. 2010. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPAR $\alpha$  in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* **11**: 206–212.
- Díaz-Delfín, J., E. Hondares, R. Iglesias, M. Giral, C. Caelles, and F. Villarroya. 2012. TNF- $\alpha$  represses  $\beta$ -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology.* **153**: 4238–4245.
- Vilá-Brau, A., A. L. De Sousa-Coelho, C. Mayordomo, D. Haro, and P. F. Marrero. 2011. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *J. Biol. Chem.* **286**: 20423–20430.
- Badman, M. K., A. Koester, J. S. Flier, A. Kharitonov, and E. Maratos-Flier. 2009. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology.* **150**: 4931–4940.
- Kharitonov, A., T. L. Shivanova, A. Koester, A. M. Ford, R. Micanovic, E. J. Galbreath, G. E. Sandusky, L. J. Hammond, J. S. Moyers, R. A. Owens, et al. 2005. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* **115**: 1627–1635.
- Hotta, Y., H. Nakamura, M. Konishi, Y. Murata, H. Takagi, S. Matsumura, K. Inoue, T. Fushiki, and N. Itoh. 2009. Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology.* **150**: 4625–4633.
- Dutchak, P. A., T. Katafuchi, A. L. Bookout, J. H. Choi, R. T. Yu, D. J. Mangelsdorf, and S. A. Kliewer. 2012. Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR $\gamma$  activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell.* **148**: 556–567.
- Thiaville, M. M., Y. X. Pan, A. Gjymishka, C. Zhong, R. J. Kaufman, and M. S. Kilberg. 2008. MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2 $\alpha$  following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 10848–10857.

28. Pan, Y. X., H. Chen, M. M. Thiaville, and M. S. Kilberg. 2007. Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* **401**: 299–307.
29. Fisher, F. M., J. L. Estall, A. C. Adams, P. J. Antonellis, H. A. Bina, J. S. Flier, A. Kharitonov, B. M. Spiegelman, and E. Maratos-Flier. 2011. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology.* **152**: 2996–3004.
30. Matthias, A., K. B. Ohlson, J. M. Fredriksson, A. Jacobsson, J. Nedergaard, and B. Cannon. 2000. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 25073–25081.
31. Fisher, F. M., S. Kleiner, N. Douris, E. C. Fox, R. J. Mepani, F. Verdeguer, J. Wu, A. Kharitonov, J. S. Flier, E. Maratos-Flier, et al. 2012. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**: 271–281.
32. Handschin, C., and B. M. Spiegelman. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **27**: 728–735.
33. Coskun, T., H. A. Bina, M. A. Schneider, J. D. Dunbar, C. C. Hu, Y. Chen, D. E. Moller, and A. Kharitonov. 2008. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* **149**: 6018–6027.
34. Xu, J., D. J. Lloyd, C. Hale, S. Stanislaus, M. Chen, G. Sivits, S. Vonderfecht, R. Hecht, Y. S. Li, R. A. Lindberg, et al. 2009. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes.* **58**: 250–259.
35. Muise, E. S., B. Azzolina, D. W. Kuo, M. El-Sherbeini, Y. Tan, X. Yuan, J. Mu, J. R. Thompson, J. P. Berger, and K. K. Wong. 2008. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol. Pharmacol.* **74**: 403–412.
36. Xu, J., S. Stanislaus, N. Chinooswong, Y. Y. Lau, T. Hager, J. Patel, H. Ge, J. Weiszmann, S. C. Lu, M. Graham, et al. 2009. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**: E1105–E1114.
37. Tseng, Y. H., A. M. Cypess, and C. R. Kahn. 2010. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 465–482.
38. Cao, W., A. V. Medvedev, K. W. Daniel, and S. Collins. 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.
39. Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**: 277–359.
40. Wang, T., Y. M. Shah, T. Matsubara, Y. Zhen, T. Tanabe, T. Nagano, S. Fotso, K. W. Krausz, T. M. Zabriskie, J. R. Idle, et al. 2010. Control of steroid 21-oic acid synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Biol. Chem.* **285**: 7670–7685.
41. Kim, K. H., Y. T. Jeong, H. Oh, S. H. Kim, J. M. Cho, Y. N. Kim, S. S. Kim, H. Kim, K. Y. Hur, H. K. Kim, et al. 2013. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* **19**: 83–92.

