

# Estudi dels mecanismes moleculars implicats en l'associació entre inflamació i alteracions metabòliques en cèl·lules cardíques

David Álvarez Guardia

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

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

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





Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

**ESTUDI DELS MECANISMES MOLECULARS  
IMPLICATS EN L'ASSOCIACIÓ ENTRE  
INFLAMACIÓ I ALTERACIONS METABÒLIQUES  
EN CÈL·LULES CARDÍAQUES.**

David Álvarez Guardia

2011





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

PROGRAMA DE DOCTORAT:

Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

# ESTUDI DELS MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN L'ASSOCIACIÓ ENTRE INFLAMACIÓ I ALTERACIONS METABÒLIQUES EN CÈL·LULES CARDÍAQUES.

Memòria presentada per **David Álvarez Guardia** per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona.

Directors

**Dr. Manuel Vázquez Carrera**

**Dr. Xavier Palomer Tarridas**

El doctorand

**David Álvarez Guardia**

Barcelona, juny de 2011



Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, essent finançat per:

**Ministerio de Ciencia e Innovación**  
(Projecte SAF 2006-01475 i SAF 2009-06939)

**Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas**







En record a la meva àvia



# AGRAÏMENTS

---

Bé, ha arribat el moment, mà al teclat, i una idea gens clara de com vull expressar tot allò que tinc al cap. Però s'ha de començar per algun lloc, i el principi és el millor d'ells.

Ara farà uns quatre anys, i alguns mesos, vaig iniciar per recomanació de l'ara Dr. Ricardo Rodríguez el que seria el primer contacte amb el departament de farmacologia i farmacognòsia de la facultat de farmàcia. Inicialment vaig realitzar un primer any de màster que em va permetre aprendre a treballar com seria d'esperar d'un projecte de doctor, per després seguir, ja una mica més al meu aire, com a *predoc spp.*, fins arribar a l'instant en que em trobo ara mateix. En tot aquest temps que ha transcorregut són moltes les persones que m'han ajudat de manera que són moltes i a múltiples nivells les coses a agrair. Potser cometo l'error de deixar-me algú, qui em coneix ja sap que a vegades peco de despistat, així que per ser cautelós demano disculpes per avançat, i en cas de ser necessari realitzaria una fe d'errates en forma d'invitació a cafè/cerveseta per tal de solucionar tal malentès.

Així, en primer lloc, vull donar les gràcies al Dr. Manel Vázquez per brindar-me l'oportunitat d'entrar a treballar en el seu grup d'investigació i per ser, baix el meu parer, un extraordinari director de tesi alhora que una gran persona.

En segon lloc vull agrair, de la forma més sincera, al Dr. Xavier Palomer per oferir-me el seu pupil·latge i posar tota la seva experiència en *pro* de la meva formació. Xevi, gràcies per estar sempre allà, per suportar estoicament els meus constants dubtes (que haguessin fet perdre la paciència al més pintat) i per ser un excel·lent codirector de tesi, germà gran a vegades, fins acabar essent un veritable amic (en una de les poques coses en que t'has equivocat és en pensar que al finalitzar aquesta tesi t'acabaria odiant). Ah, i gràcies per els "berberetxos" de 12€ la llauna!!

Així mateix, vull estendre el meu agraïment a la resta de doctors, professors i personal del departament, amb els que he coincidit al llarg de la realització d'aquesta tesi. En especial vull donar les gràcies a la Mar pel seu caràcter afable i la seva eficaç ajuda en temes administratius d'impossible resolució a mans d'un simple *predoc*.

També vull agrair al Dr. Ricardo Rodríguez (Richy) per la teva noble amistat establerta ja el segle passat, d'ençà de que, gairebé imberbes, ens vam enrolar a la facultat d'obra vista, d'aquí al costat. Gràcies pel teu recolzament i consells dins i fora d'aquest laboratori. Així com a la Dra. Marta Tajés (Marty) per saber escoltar i ser una amiga com les que n'hi ha poques (amb l'afegit de fer uns pastissos de nous i xocolata blanca deliciosos!!!).

El més profund agraïment a la llarga corrua d'individus que han passat per aquest departament, que van començar essent companys de treball i han acabat formant part de la meva vida com a grans amics. No volia entrar a nombrar gent per evitar deixar algú en l'oblit, però tampoc em sembla just no nombrar a certes persones per por de deixar-me a algú, així que som-hi. Vull agrair a tots els companys que integren o han format part del grup de la cinta taronja (dianes farmacològiques en inflamació, diabetis i hipertròfia cardíaca), amb els que he compartit feina i amistat aquests anys. Gràcies a la Dra. Emma Barroso, per la seva ajuda i cura cap als seus companys (ah, i la fantàstica costum de portar-nos de tant en tant deliciosos plats preparats per ella). Gràcies a la Dra. Teresa Coll (TrisA), enamorada de la Garrotxa, per aquelles agradables xerrades entre westerns i PCR compartides amb en Xevi ("Va por uztedes!!") i gràcies Lucía per la teva alegria i simpatia. També vull fer extensiva la meva gratitud als companys vinguts al grup més recentment, però no per això menys importants. Gràcies Eva, Laia S. i Gerard (companys de palestins, amb els que he passat molts bons moments), i a la Saray i a l'Ana que ens han aprofitat els sabors dels seus respectius països. Vull donar també les gràcies als companys (i excompanys) de la cinta groga ("neuro") per tots els moments conviscuts que han estat intensos i no pas pocs. Gràcies al Dr. Javier Garcia (molts pensareu: "i aquest qui és?", doncs el Dr. Pizarro, bé [*pisagó*] en breu) per tots els consells, ajuda i bons moments compartits, i en extensió a la seva mitja taronja, la Loli (en breu també Dra.). Gràcies Aureli ("Eurelio" per als seus "amics de veritat"...) )

per la teva hospitalitat (el poble demana més Villa-Aurelio's) i amiat, i també a la resta de companys per estar quan se'ls necessita. Gràcies Sergi (mai oblidaré Calaceit i les seves "vaquilles") i Ilario, Luisa (per tenir sempre un somriure als llavis), Bea Trémols, Bea (Hoola Beaa!!), David P.C., Doris, Paolo i Katherina (algun dia vindré a Grècia), així com als *postdocs* Dr. Fèlix Junyent, Dr. Jaume del Valle i Dra. Esther Verdaguer. També agrair a aquells que ja no estan al "depar", però que han deixat la seva empremta aquí. Gràcies Dr. Daniel Alvira per ser un nen gran, amb el millor de cadascuna de les franges d'edat que això representa, gràcies Dr. Javier Gutiérrez (Javi) per les incomptables hores de fer petar la xerrada (gràcies sala 3!) i les bones estones compartides, així com a la Laura Altimira, al Marc Abrisqueta i al Toño (que gairebé és del depar sense haver-lo trepitjat). Gràcies, també, als companys de la cinta blava, amb els que he compartit vivències inoblidables. Vull donar les gràcies al, gairebé Dr., Pou per tots els bons i mals moments transcorreguts en el museu i en la resta d'habitacles que no són el museu. Gràcies a l'Alba i al Miguel per tenir sempre una paraula amable, a la Vicky (merci per acollir-nos a Sevilla) al Javier (aviat ens veure'm de nou per Barcelona) i a la Dra. Laia Vilà. També vull donar els meus agraïments als companys de la cinta verda ("amfetes"). Gràcies a la, en breu Dra., Sara, companya de fatigues i d'excursions dos pisos més amunt, així com a la Sònia (impulsora d'opulents àpats als masos d'Alcarràs), al Dr. Carlos Chipana, a la Clara, a l'Arís i a l'Angela, la primera de les portugueses que van venir al departament. També fer extensius els meus agraïments a la gent de Farmacognòsia. Gràcies Renato ("chico, chico, chico", tu sempre seràs el nostre "comandante"), Adi, Blanca, Simona, Carol i Enric.

També he d'agrair grans moments viscuts portes enfora del departament que en part han fet que jo fos com sóc i que, per tant, aquesta tesi sigui com és. Vull donar les gràcies a amics de quan anava a l'escola d'Isona, que veig amb menys freqüència de la que voldria, com són el Carles, el Lluís, el Francesc, la Jordina i el Juan Carles (recentment retrobat). Vull donar les gràcies també a altres amics que conec des de la infància amb els que he anat creixent. Gràcies Rubèn, Xavi i Sisco (tu en breu també seràs tot un Dr.) per estar al meu costat des de que pràcticament tinc memòria. També vull agrair la seva amiat a companys que vaig fer durant el meu pas per l'IES Joan d'Austria amb els que he cultivat una gran amiat. Gràcies Aida i Diego, Olga i Edgar,

Jordi i Merche, Iván, Albert i Dani Espinosa. També vull expressar la meva gratitud al Dani Selva (en camí de ser Dr. en el MIT), Tico i Javi amb els que he passat moments memorables. Vull agrair molts grans moments viscuts amb els amics que he anat coneixent al llarg de la carrera a Biologia (alguns en la carrera i altres fora, amics d'amics que, al final, un incorpora com a propis) com el Sergi Munné, la Verònica (tu em vas posar als teus agraïments, t'ho devia, jeje), l'Esther, el Carlos (Korea), David Cruz, Jordi (Darta), Laura i Mari. Gràcies per tots els bons moments i tot el que hem après junts.

També vull donar les gràcies a altres amics que he conegut en diferents feines en les que he treballat des de la finalització de la carrera fins al moment d'iniciar aquesta tesi doctoral. Gràcies a la Raquel i a la Silvia (ja fa temps d'AMC...) per tot els moments conviscuts. Gràcies també al Pep i a la Celi, a l'Eva i al Juanan, i a la Patri i al Jordi i a l'Anna Valldeperas, tots ells bons amics coneguts durant la meva estança a cavall entre la clínica del Pilar i el CPC. Gràcies per tots els moments d'aventures, riures i converses que hem compartit. També vull agrair al Jordi i a la Yolanda, a l'Isma i la Bea, a la Neus (recentment incorporada per part de l'Albert), a la Sabina, a la Noe i als "bascs" les vivències, barbacoes i vacances que hem compartit aquests últims anys.

Com no, he d'agrair moltíssim a la meva família. Així que vull donar les gràcies a la meva mare, al meu avi i a la meva avia (sé que t'hagués agradat poder veure'm el dia de la tesi, tant de bo encara estesis aquí) per cuidar-me i estimar-me de forma incondicional.

Per últim, moltes gràcies a la Núria ( i en extensiu a la seva família) per estar al meu costat i ajudar-me en tot el que li ha estat possible. Gràcies per la teva paciència i comprensió.

Així, per tot plegat, moltes Gràcies a tots!

I tal i com va dir un bon amic: *"Si la vida me diera un deseo, desearía conoceros de nuevo"* [Pizarro 2010].







ABREVIACIONS.....	1
PRESENTACIÓ.....	7
INTRODUCCIÓ.....	13
1. FISIOPATOLOGIA CARDÍACA.....	15
1.1. Hipertrofia cardíaca (HC).....	16
1.2. Insuficiència cardíaca (IC).....	19
1.3. Obesitat i fisiopatologia cardíaca.....	20
2. METABOLISME ENERGÈTIC EN EL COR.....	22
2.1. Metabolisme de la glucosa.....	23
2.1.1. Transport de glucosa.....	24
2.1.2. Glicòlisi i síntesi de piruvat.....	24
2.1.3. PDC.....	26
2.1.4. PDK4.....	27
2.2. Metabolisme del lactat.....	31
2.3. Metabolisme dels àcids grassos.....	33
2.3.1. Fonts d'àcids grassos.....	33
2.3.2. Captació dels àcids grassos.....	34
2.3.3. Entrada dels àcids grassos al mitocondri.....	36
2.3.4. $\beta$ -oxidació dels àcids grassos.....	37
2.4. Control transcripcional del metabolisme energètic.....	40
2.4.1. PPAR.....	40
2.4.2. ERR $\alpha$ .....	43
2.4.3. Altres factors de transcripció.....	45
2.4.3.1. E2F1.....	45

2.4.4. Coreguladors dels factors de transcripció.....	48
2.4.4.1. Corepresors. ....	49
2.4.4.2. Coactivadors. ....	49
2.4.4.1.1. PGC-1 $\alpha$ .....	50
3. INFLAMACIÓ EN EL COR. ....	55
3.1. Mecanismes moleculars implicats.....	55
3.1.1. Via NF- $\kappa$ B. ....	56
3.1.2. Estímuls proinflamatoris.....	59
3.1.2.1. TNF- $\alpha$ . ....	59
3.1.1.2. IL-6. ....	61
OBJECTIUS. ....	65
RESULTATS. ....	69
I. PPAR $\beta/\delta$ activation blocks lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells.....	71
II. TNF- $\alpha$ reduces PGC-1 $\alpha$ expression through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model.....	85
III. The p65 subunit of NF- $\kappa$ B binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells.....	99
IV. The interplay between nuclear factor- $\kappa$ B and E2F1 coordinately regulates inflammation and metabolism in human cardiac cells .....	117
DISCUSSIÓ. ....	133
CONCLUSIONS.....	155
BIBLIOGRAFIA.....	159

# **ABREVIACIONES**



<b>ACBP</b>	<i>Acyl-CoA Binding Protein</i>
<b>ACC</b>	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
<b>ACO</b>	<i>Acyl-CoA Oxidase</i>
<b>ACS</b>	<i>Acyl-CoA Synthase</i>
<b>AD</b>	<i>Activation Domain</i>
<b>ADN</b>	<i>Àcid desoxiribonucleic.</i>
<b>ADP</b>	<i>Adenosine diphosphate</i>
<b>AF-1</b>	<i>Activation Function-1</i>
<b>Akt/PKB</b>	<i>Protein Kinase B</i>
<b>AMPK</b>	<i>5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>
<b>AP-1</b>	<i>Activating Protein-1</i>
<b>ARC</b>	<i>Activator Recruited Cofactor</i>
<b>ARN</b>	<i>Àcid ribonucleic.</i>
<b>Asp</b>	<i>Aspartic acid</i>
<b>ATF2</b>	<i>Activating Transcription Factor 2</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
<b>BMI</b>	<i>Body Mass Index</i>
<b>CACT</b>	<i>Carnitine-acylcarnitine translocase</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB Binding Protein</i>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin Dependent Kinases</i>
<b>CoA</b>	<i>Coenzyme A</i>
<b>CPT-1</b>	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase-1</i>
<b>CPT-2</b>	<i>Carnitine Palmitoyl Transferase-2</i>
<b>CTE</b>	<i>Cytoplasmatic Thioesterase</i>
<b>Cyt C</b>	<i>Cytochrome C oxidase</i>
<b>DBD</b>	<i>DNA Binding Domain</i>
<b>DD</b>	<i>Death Domain</i>
<b>DP</b>	<i>DRTF Polypeptide</i>
<b>DRIP</b>	<i>vitamin D Receptor-Interacting Proteins</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
<b>ERR</b>	<i>Estrogen-Related Receptors</i>
<b>ERRE</b>	<i>ERR Response Element</i>
<b>FA</b>	<i>Fatty Acids</i>
<b>FABP</b>	<i>Fatty Acid Binding Proteins</i>
<b>FABPc</b>	<i>cytoplasmic Fatty Acid Binding Proteins</i>
<b>FABPpm</b>	<i>plasmatic membrane Fatty Acid Binding Proteins</i>
<b>FAD</b>	<i>Flavin Adenine Dinucleotide (oxidat)</i>

## ABREVIACIONS

---

<b>FADH<sub>2</sub></b>	<i>Flavin Adenine Dinucleotide (reduït)</i>
<b>FAS</b>	<i>Fatty Acid Synthase</i>
<b>FAT/CD36</b>	<i>Fatty Acid Translocase</i>
<b>FATP</b>	<i>Fatty Acid Transport Protein</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead box protein O</i>
<b>FOXO1</b>	<i>Forkhead box O1</i>
<b>FT</b>	Factors de transcripció
<b>FXR</b>	<i>Farnesyl X Receptor</i>
<b>G6P</b>	<i>Glucose 6-phosphate</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<b>GLUT</b>	<i>Glucose Transporter</i>
<b>GLUT4</b>	<i>Glucose Transporter 4</i>
<b>GP</b>	<i>Glycogen phosphorylase</i>
<b>GR</b>	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
<b>GS</b>	<i>Glycogen synthase</i>
<b>GSK3</b>	<i>Glycogen synthase kinase</i>
<b>HAT</b>	<i>Histone Acetyl Transferases</i>
<b>HC</b>	Hipertròfia cardíaca
<b>HDAC</b>	<i>Histone Deacetylases</i>
<b>HFD</b>	<i>High Fat Diet</i>
<b>HNF-4</b>	<i>Hepatic Nuclear Factor-4</i>
<b>HSP90</b>	<i>Heat Shock Protein 90</i>
<b>IC</b>	Insuficiència cardíaca
<b>IKK</b>	<i>Inhibitory <math>\kappa</math>B Kinase</i>
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin-6</i>
<b>IRS-1</b>	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitory <math>\kappa</math>B</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus Activated Kinase</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
<b>Kda</b>	Quilodalton
<b>K<sub>m</sub></b>	Constant de Michaelis–Menten
<b>LBD</b>	<i>Ligand Binding Domain</i>
<b>L-CPT-1</b>	<i>Liver-Carnitine Palmitoyl Transferase-1</i>
<b>LDH</b>	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
<b>LPS</b>	<i>lipopolysaccharide</i>
<b>LXR</b>	<i>Liver X Receptor</i>
<b>LZ</b>	<i>Leuzine Zipper</i>

<b>MB</b>	<i>Marked Box</i>
<b>MBP</b>	<i>p160 Myb Binding Protein</i>
<b>MCAD</b>	<i>Medium Chain Acyl Dehydrogenase</i>
<b>MCD</b>	<i>Malonyl-CoA Decarboxylase</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
<b>M-CPT-1</b>	<i>Muscle-Carnitine Palmitoyl Transferase-1</i>
<b>MCT</b>	<i>MonoCarboxylate Transporter</i>
<b>MEF2</b>	<i>Myocyte Enhancer Factor 2</i>
<b>MKK6</b>	<i>MAPK-Kinase-6</i>
<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>mtTFA</b>	<i>mitochondrial Transcription Factor A</i>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidat)</i>
<b>NADH</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (reduit)</i>
<b>NCoR</b>	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i>
<b>NEMO</b>	<i>NF-κB Essential Modifier</i>
<b>NES</b>	<i>Nuclear Export Signals</i>
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear Factor of Activated T lymphocyte</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor-κB</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear Localization Signal</i>
<b>NO</b>	<i>Òxid nítric</i>
<b>NRF-1</b>	<i>Nuclear Regulatory Factor-1</i>
<b>p38 MAPK</b>	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>PBP</b>	<i>PPAR Binding Protein</i>
<b>PDC</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Complex</i>
<b>PDH</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase</i>
<b>PDK4</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4</i>
<b>PDP</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase</i>
<b>PE</b>	<i>phenylephrine</i>
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
<b>PFK-1</b>	<i>Phosphofructokinase-1</i>
<b>PFK-2</b>	<i>Phosphofructokinase-2</i>
<b>PGC-1α</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1 α</i>
<b>PGC-1β</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1 β</i>
<b>PKA</b>	<i>Protein Kinase A</i>
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
<b>PPARα</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α</i>

## ABREVIACIONES

---

<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor <math>\beta/\delta</math></i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor <math>\gamma</math></i>
<b>PPRE</b>	<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>
<b>pRB</b>	<i>Retinoblastoma protein</i>
<b>RHD</b>	<i>Rel-Homology Domain</i>
<b>RIP</b>	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
<b>RIP-140</b>	<i>Receptor Interacting Protein-140</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RXR</b>	<i>Retinoid X Receptor</i>
<b>SCD-1</b>	<i>Stearoyl-CoA Desaturase-1</i>
<b>Ser</b>	<i>Serine</i>
<b>SH2</b>	<i>Src Homology 2</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SMRT</b>	<i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors</i>
<b>SOCS-3</b>	<i>Supresor Of Cytokine Signaling 3</i>
<b>SRC</b>	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
<b>STAT-3</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>TACE</b>	<i>TNF Alpha Converting Enzyme</i>
<b>TAD</b>	<i>Transcription Activation Domain</i>
<b>TCA</b>	<i>TriCarboxylic Acid</i>
<b>TG</b>	<i>Triacilgricerols</i>
<b>Thr</b>	<i>Threonine</i>
<b>TLR-4</b>	<i>Toll-Like Receptor-4</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>TR</b>	<i>Thyroid hormone Receptor</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
<b>TRAF2</b>	<i>TNF Receptor-Associated Factor 2</i>
<b>TRAP</b>	<i>Thyroid hormone Receptor-Associated Proteins</i>
<b>Trp</b>	<i>Tryptophan</i>
<b>VLACS</b>	<i>Very-Long-chain Acyl-CoA Synthetase</i>



# **PRESENTACIÓ**

---



El canvi en l'estil de vida que s'ha produït en les societats desenvolupades els darrers anys ha tingut com a contrapartida l'aparició de conductes sedentàries i modificacions en la dieta. Com a conseqüència d'aquests factors s'han produït diverses alteracions metabòliques que han causat un augment de la prevalença de l'obesitat. Aquesta obesitat té una sèrie d'efectes adversos sobre la fisiologia cardiovascular i és considerada un important factor de risc pel desenvolupament de la insuficiència cardíaca (IC) [Loehr i col., 2010], que a Espanya és la tercera causa de mortalitat cardiovascular. De fet, el consum de dietes amb un elevat contingut en greixos (HFD, de l'anglès *High Fat Diet*) s'ha relacionat amb una sèrie d'alteracions cardíques directes com són la inflamació, la hipertròfia i la disfunció contràctil [Tikellis i col., 2008]. No obstant això, els mecanismes mitjançant els quals la ingesta excessiva de greix participa en el desenvolupament i la progressió d'aquests trastorns són molt complexes i poc coneguts, ja que estan lligats a alteracions metabòliques sistèmiques i a canvis en el fenotip dels cardiomiòcits.

La insuficiència i la hipertròfia cardíques són trastorns que es caracteritzen per estar relacionats amb processos inflamatoris [Yndestad i col., 2007; Miguel-Carrasco i col., 2010]. Durant el procés inflamatori que es produeix en les malalties cardiovasculars esmentades, les cèl·lules cardíques humanes secreten citocines i quimiocines proinflamatòries com el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (MCP-1), i la interleucina-6 (IL-6) [Ancy i col., 2003]. Aquestes molècules estan sota el control transcripcional del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que és un factor de transcripció ubic i induïble que s'activa en processos patològics com la miocarditis, la insuficiència cardíaca congestiva i la hipertròfia cardíaca [Jones i col., 2003]. Tanmateix, aquestes citocines proinflamatòries exerceixen diversos efectes pleiotròpics autocrins en les cèl·lules cardíques, tot produint un efecte de retroalimentació positiva del procés inflamatori que contribueix al desenvolupament d'aquestes malalties.

Igualment, durant el desenvolupament de la hipertròfia i la insuficiència cardíaca també es produeixen alteracions metabòliques. En condicions normals, el cor de mamífers adults obté energia en forma d'ATP principalment a partir de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos en el mitocondri, encara que aquest orgàdul és capaç de catabolitzar altres substrats com la glucosa o el lactat per tal d'assegurar una font constant d'energia. Ara bé, en determinades circumstàncies, com és el cas de la hipertròfia i la insuficiència cardíaca, aquesta flexibilitat de substrat es veu compromesa i la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos es redueix degut a que la font principal d'energia passa a ser la glucosa [van Bilsen i col., 1998]. Aquests canvis metabòlics comporten una desregulació del control transcripcional de gens relacionats amb el transport, captació i catabolisme dels àcids grassos i la glucosa. En el miocardi, els factors de transcripció implicats en el control d'aquests gens inclouen el receptor relacionat amb l'estrogen ( $ERR\alpha$ ) i el receptor activat per proliferadors peroxisòmics  $\beta/\delta$  ( $PPAR\beta/\delta$ ).  $ERR\alpha$  pertany a la superfamília de receptors nuclears activats per lligand, dels quals no se'n coneix encara cap lligand, natural o endogen, de manera que són classificats com a receptors orfes [Giguere, 2008]. Aquest factor de transcripció es troba àmpliament distribuït en tots els teixits de l'organisme i està implicat en la regulació del metabolisme energètic tot interactuant directament amb determinats coreguladors transcripcionals. D'altra banda,  $PPAR\beta/\delta$  pertany a una família de receptors nuclears que està formada per tres subtipus,  $PPAR\alpha$ ,  $PPAR\beta/\delta$  i  $PPAR\gamma$ . Aquests PPARs, per tal de ser transcripcionalment actius, necessiten heterodimeritzar amb el receptor d'àcid retinoic (RXR). Un cop han format aquests heterodímers s'uneixen a seqüències específiques de l'ADN anomenades elements de resposta als proliferadors peroxisòmics (PPRE, de l'anglès *Peroxisome Proliferator Response Element*), situades a les regions promotores de gens diana de PPAR.

Ambdós factors de transcripció,  $ERR\alpha$  i  $PPAR\beta/\delta$ , participen en l'activació de la piruvat deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4), enzim clau en la modulació homeostàtica de la glucosa. Aquesta cinasa regula l'activitat del complex de la piruvat deshidrogenasa (PDC), enzim que catalitza la reacció de descarboxilació del piruvat a acetil-CoA, tot limitant l'ús de carbohidrats com a font d'energia en mitocondris i afavorint així la  $\beta$ -

oxidació d'àcids grassos. En l'activació de la transcripció de *PK4* també hi participa el coactivador-1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ), que interacciona amb ERR $\alpha$  i PPAR $\beta/\delta$ , tot incrementant-ne la seva activitat transcripcional. Estudis recents però, semblen indicar que no només aquests dos factors de transcripció participen en la regulació de *PK4*. És el cas d'E2F1, un factor de transcripció clau en la regulació de la transició de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular i del qual la regió promotora del gen que codifica per *PK4* en presenta dos llocs d'unió [Hlaing i col., 2004; Hsieh i col., 2008]. De fet, la supressió d'E2F1 *in vivo* produeix una atenuació de l'expressió de *PK4* en mioblasts de ratolí i en fibroblasts humans IMR90, mentre que una sobreexpressió d'aquest factor de transcripció n'augmenta els nivells [Hsieh i col., 2008].

La primera aproximació terapèutica en la majoria de patologies metabòliques associades a l'estil de vida característic de les societats industrialitzades, radica en corregir els factors que l'originen. Així, en primer terme, el tractament consisteix en introduir canvis en l'estil de vida com són un increment de l'exercici físic i una dieta equilibrada [Grundy, 2007]. Malgrat tot, sovint aquestes mesures no són suficients per corregir les alteracions metabòliques, i és aleshores quan s'ha de recórrer al tractament farmacològic. Entre els tractaments farmacològics actuals destinats a corregir aquests desordres metabòlics trobem les estatines, que inhibeixen la HMG-CoA reductasa, un enzim clau en la biosíntesi del colesterol. Altres fàrmacs que podem trobar són els fibrats i les tiazolidindiones o glitazones, que són activadors específics de PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ , respectivament, i estan indicats pel tractament de la hipertrigliceridèmia i de la hiperglucèmia. PPAR $\beta/\delta$  és l'únic subtipus de PPAR que no és diana de cap dels fàrmacs comercialitzats en l'actualitat, malgrat que s'han desenvolupat diversos lligands sintètics, com són L-165041, GW0742 i GW501516. El darrer d'aquests mostra una selectivitat 1000 vegades major cap a PPAR $\beta/\delta$  que cap als altres dos subtipus de PPAR, alhora que és un agonista més potent que els altres dos lligands sintètics esmentats, ja que presenta una EC<sub>50</sub> menor [Sznajdman i col., 2003].

Estudis recents suggereixen que PPAR $\beta/\delta$ , que és la forma predominant en les cèl·lules cardíques, pot atenuar les vies de senyalització inflamàtores i, per tant, interferir en la remodelació cardíaca [Planavila i col., 2005b]. Aquesta funció és en gran mesura deguda a la capacitat dels PPAR, un cop han estat activats per agonistes, de formar complexos amb altres factors de transcripció activats, com ara NF- $\kappa$ B i STAT (de l'anglès *Signal Transducer and Activator of Transcription*) resultant així en la inhibició de l'activitat transcripcional d'aquests últims [Daynes i Jones, 2002]. Així l'ús d'agonistes PPAR $\beta/\delta$  podria ser un camí força interessant de cara a trobar potencials fàrmacs per tal de pal·liar les afeccions cardíques derivades d'alteracions metabòliques i amb un rerefons inflamatori.

En conjunt en aquest treball es presenten una sèrie de resultats destinats a conèixer de forma més detallada els mecanismes moleculars que relacionen les alteracions metabòliques i els processos inflamatoris en cor, per tal de poder buscar potencials dianes farmacològiques amb l'objectiu de prevenir i tractar aquests estats patològics.

# **INTRODUCCIÓ**





## 1. FISIOPATOLOGIA CARDÍACA.

El cor humà és l'òrgan central i motor de l'aparell circulatori, que fa les funcions d'una bomba aspirant i impel·lent, doncs atreu a les seves cavitats la sang que circula per les venes i la impulsa, mitjançant les artèries aorta i la pulmonar, a tota la xarxa capil·lar. Interiorment s'hi distingeixen quatre cavitats: dues superiors, les aurícules dreta i esquerra, i dues inferiors, els ventricles dret i esquerre (figura 1).

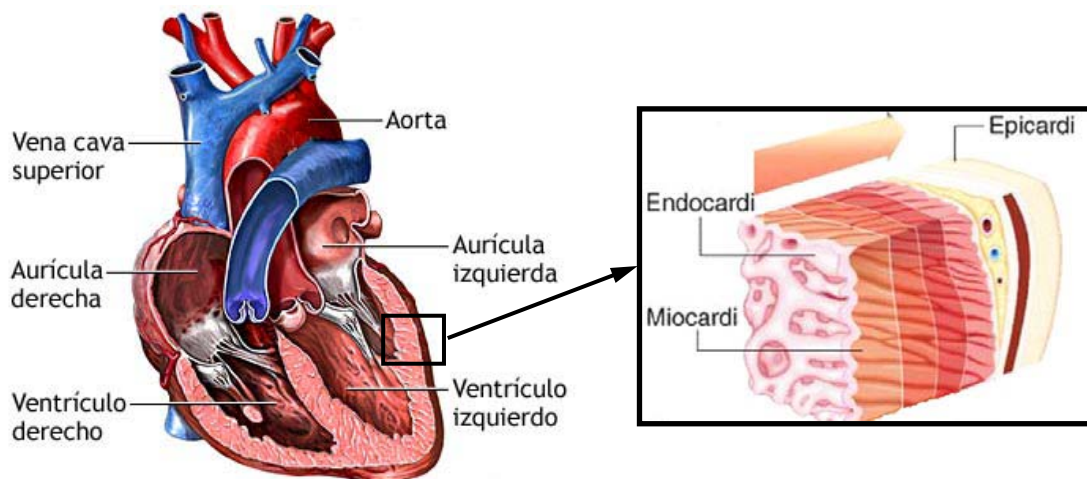


Figura 1. Detall de l'estructura del cor humà.

El cor està constituït per una massa contràctil o miocardi, coberta interiorment per l'endocardi i envoltada exteriorment pel pericardi (figura1).

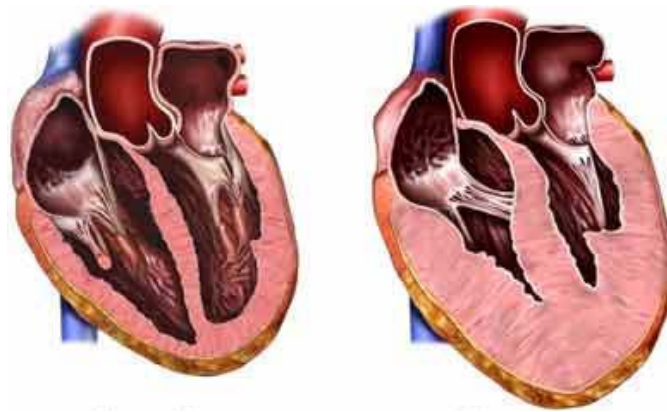
- L'**endocardi** és una membrana serosa de revestiment intern constituïda d'endoteli i teixit connectiu, amb la que entra en contacte la sang. Inclou fibres elàstiques i de col·lagen, vasos sanguinis i fibres musculars especialitzades anomenades fibres de Purkinje. Aquestes fibres són les encarregades de conduir l'estímul elèctric que intervé en l'impuls nerviós del cor fent que aquest es contregui de forma coordinada. En l'estructura de l'endocardi també hi trobem les trabècules carneses, que aporten resistència i permeten una amplificació de la contracció cardíaca.

- El **miocardi** està format per unes cèl·lules especialitzades només presents en el múscul cardíac anomenades cardiomiòcits, que integren una massa muscular contràctil autoexcitable que funciona involuntària i rítmicament sense estimulació nerviosa voluntària. El múscul cardíac és l'encarregat d'impulsar la sang pel cos mitjançant la seva contracció. En aquesta capa també hi trobem teixit connectiu, capil·lars limfàtics, fibres nervioses i una xarxa abundant de capil·lars sanguinis indispensables per cobrir les seves necessitats energètiques.
- L'**epicardi** és una fina capa serosa mesotelial que envolta el cor i que conté capil·lars i fibres nervioses. Aquesta capa es considera part del pericardi serós.

### 1.1. Hipertròfia cardíaca (HC).

El creixement del cor durant l'embriogènesi es produeix per proliferació de miòcits cardíacs. Posteriorment, els cardiomiòcits surten del cicle cel·lular i es diferencien de forma definitiva en el període perinatal. Després del naixement, aquestes cèl·lules, en tractar-se de cèl·lules altament diferenciades, perden la capacitat de proliferar [Reiss i col., 1993; Kajstura i col., 1994], malgrat que encara són capaces de respondre a estímuls que promouen el seu creixement [Sadoshima i Izumo, 1997; Russell i col., 2000]. En conseqüència, el subseqüent creixement postnatal del cor es dona per hipertròfia dels miòcits existents, que si bé representen tan sols el 30% del nombre total de cèl·lules del miocardi, degut a la seva gran mida, constitueixen un 76% del volum de l'òrgan [Ennis i Escudero, 2008]. Durant la vida adulta, enfront a diverses condicions fisiològiques o patològiques com són un augment de la càrrega hemodinàmica i/o l'alliberació de factors humorals circulants o provinents de les mateixes cèl·lules cardíques, es produeix un augment de la mida dels cardiomiòcits, donant lloc a la hipertròfia cardíaca (figura 2). Així, la HC és una resposta cel·lular adaptativa del cor a diferents factors com l'exercici físic (especialment en atletes), el creixement postnatal o un estímul biomecànic, que normalitza l'increment de la tensió sobre la paret i preserva una funció cardíaca normal [Frey i Olson, 2003; Dorn i Force, 2005], ja que un augment del gruix de la paret ventricular en disminueix la tensió

[Dorn i Force, 2005]. Dins dels estímuls biomecànics diferenciem els d'origen extrínsec com la hipertensió arterial, la isquèmica associada a malalties coronàries arterials, les malalties valvulars del cor, l'infart de miocardi, la miocarditis d'origen infeccios o la cardiomiopatia diabètica, dels d'origen intrínsec, com és el cas de la cardiomiopatia familiar hipertròfica [Frey i Olson, 2003; Dorn i Force, 2005; Heineke i Molkentin, 2006].



**Figura 2.** Cor normal (esquerra) i cor hipertrofiat (dreta).

Es poden establir tres tipus d'hipertròfia cardíaca: el creixement normal, que succeeix durant el desenvolupament postnatal i es coneix també com a eutròfia; el creixement induït per condició física, anomenat hipertròfia en resposta a exercici o fisiològica, ambdues subtipus de la hipertròfia adaptativa; i el creixement induït per estímul patològic a altrament conegut com hipertròfia patològica o maladaptativa [Frey i Olson, 2003; Dorn i Force, 2005; Gupta i col., 2007]. Els tres tipus d'hipertròfia difereixen a nivell molecular i morfològic [Frey i Olson, 2003]. Per exemple, la hipertròfia fisiològica, que es pot considerar com una resposta adaptativa, no comporta acumulació de col·lagen en el miocardi (fibrosi), no incrementa de manera important el gruix de la paret ventricular, i els gens expressats difereixen respecte a la hipertròfia patològica, tot i que algunes de les vies moleculars són activades en ambdós casos [Frey i Olson, 2003]. A llarg termini, si l'estímul hipertròfic no desapareix, es produeix una remodelació i dilatació ventricular, una major incidència d'apoptosi, una disminució de la densitat dels capil·lars sanguinis i una reprogramació de l'expressió gènica [Sadoshima i Izumo, 1997; Hunter i Chien, 1999; Chien, 1999; van

Empel i De Windt, 2004]. Aquestes alteracions a nivell de miocardi, estan relacionades amb un deteriorament de la funció ventricular i s'associen amb un augment significatiu del risc de mort sobtada, arítmia o aturada cardíaca i condueixen cap al desenvolupament d'una insuficiència cardíaca [Hardt i Sadoshima, 2004], independentment de la causa originària de la hipertròfia [Frey i Olson, 2003; Dorn i Force, 2005]. De fet, diferents estudis epidemiològics han relacionat la HC patològica amb un pronòstic desfavorable de cara al desenvolupament d'una insuficiència cardíaca, tant en la població general [Kannel i col., 1987; Levy i col., 1990; Levy i col., 1994], com en poblacions d'individus hipertensos [Casale i col., 1986; Schillaci i col., 2000; Brown i col., 2000], o en pacients amb episodis previs d'isquèmia aguda [Ghali i col., 1998; East i col., 2003]

D'altra banda, nombroses evidències sostenen que malgrat que la hipertròfia previngui o atenuï l'augment de l'estrès parietal, enfront a una situació de sobrecàrrega hemodinàmica, el desenvolupament d'una hipertròfia cardíaca patològica no implica que es produeixi una compensació funcional [Akhter i col., 1998; Wettschureck i col., 2001; Esposito i col., 2002]. De fet, la regressió de la HC produeix una reducció del risc cardiovascular independentment del tractament mitjançant el qual s'aconsegueixi [Verdecchia i col., 1998; Mathew i col., 2001]. Així, malgrat que la HC presenta en primer terme un caràcter adaptatiu mitjançant el qual el cor respon a diferents sobrecàrregues, específicament en el cas dels estímuls patològics, la HC constitueix el pas inicial en la progressió cap a la insuficiència cardíaca.

## 1.2. Insuficiència cardíaca (IC).

La insuficiència cardíaca és un estadi terminal comú a la majoria de les malalties cardiovasculars que es caracteritza per ser una alteració greu, progressiva i irreversible a la que, potencialment, la majoria dels pacients cardíopates hi poden desembocar. La IC no es tracta d'una malaltia concreta sinó d'un conjunt de símptomes i signes que la converteixen en una malaltia complexa en la qual el cor no és capaç de bombejar la sang suficient per tal de cobrir les demandes metabòliques dels teixits perifèrics. En països desenvolupats, aquest trastorn ha passat a ser un problema de gran rellevància, ja que es tracta d'un procés cada cop més freqüent degut a l'envelliment de la població [Braunwald E i col., 1999] i a l'increment de la prevalença de factors de risc per al desenvolupament d'aquesta patologia com són les malalties coronàries, les valvulopaties, la hipertensió, la diabetis mellitus i l'obesitat [Rosamond i col., 2008; Baena-Diez i col., 2010].

D'altra banda, la IC presenta una elevada morbiditat, amb freqüents ingressos hospitalaris, fet que implica un elevat ús de recursos sanitaris i un alt cost econòmic. De fet, en la població general, tant a nivell d'Espanya com en altres països occidentals, entre un 1-2% dels individus amb una edat superior als 40 anys sofreix IC [McMurray i Pfeffer, 2005]. Aquesta prevalença augmenta progressivament amb l'edat i arriba al 6-10% en els individus majors de 60-70 anys [Cortina i col., 2001; Cleland i col., 2001; McMurray i Pfeffer, 2005]. Així mateix, la IC és una de les principals causes de mortalitat a nivell mundial [Rodriguez-Artalejo i col., 2004], essent fins i tot major a la de molts processos neoplàsics [Stewart i col., 2001].

### 1.3. Obesitat i fisiopatologia cardíaca.

L'obesitat és un dels principals factors de risc que condiciona el desenvolupament d'un elevat nombre de malalties cròniques entre les que es troben la diabetis i nombroses malalties cardiovasculars [Lakhani i Fein, 2011]. En un primer moment tan sols era un problema característic de països desenvolupats, però actualment, en part degut a l'increment del consum de greixos en la dieta [Shikany i col., 2010], el fenomen de l'obesitat es troba en augment i també resulta un problema en societats més desfavorides, especialment en entorns urbans. De fet, en estudis recents es mostra un augment de la morbiditat de l'obesitat que supera la de conductes nocives com el tabaquisme o l'alcoholisme, de manera que si la tendència actual continua es preveu que s'arribaran a més de 300.000 defuncions anuals als EEUU com a conseqüència de l'obesitat, passant a ser la principal causa de mortalitat, inclús per sobre de l'abús del tabac [Sturm i Wells, 2001; Manson i Bassuk, 2003].

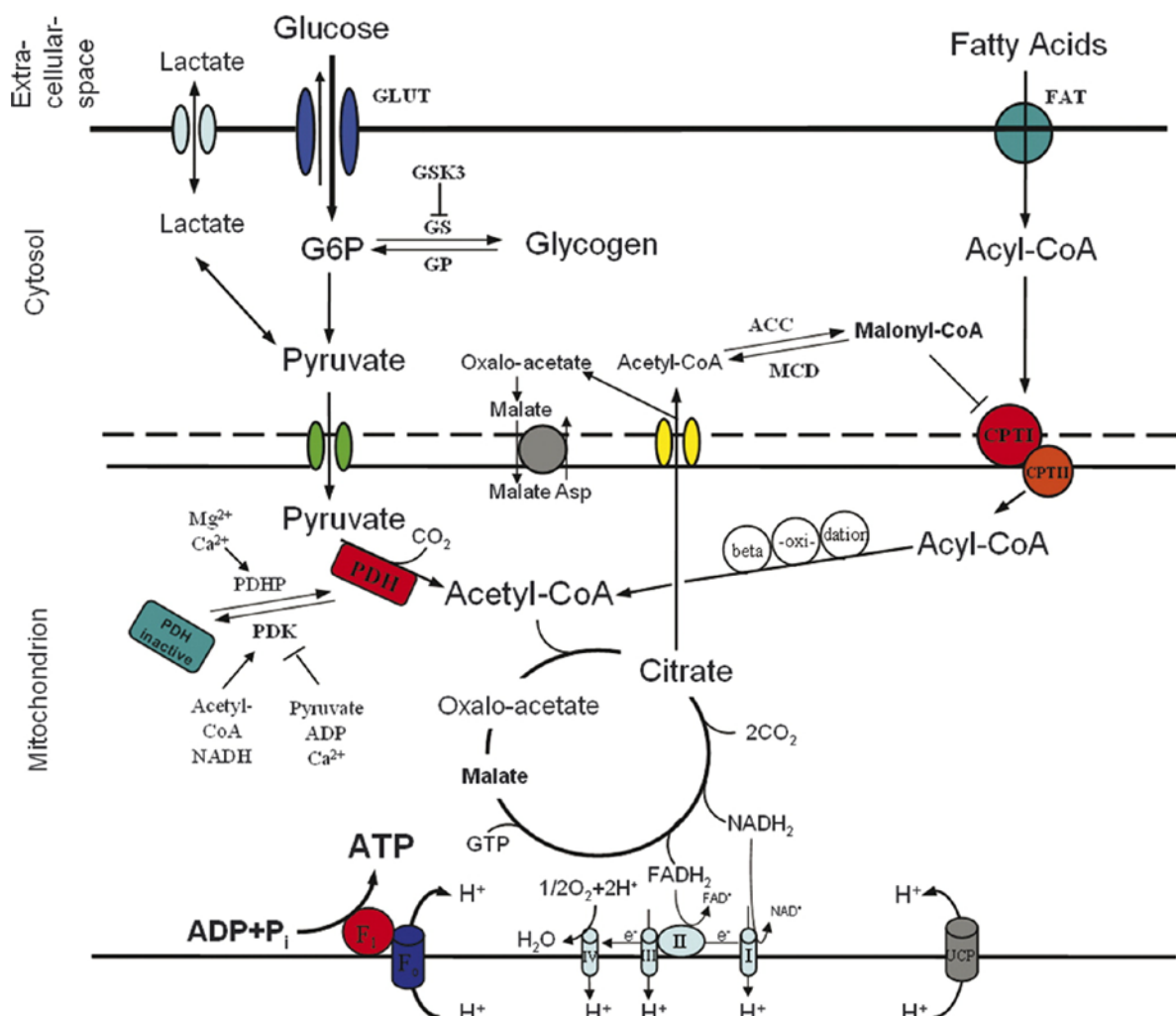
L'obesitat es caracteritza, segons la Organització Mundial de la Salut, per la presència d'un índex de massa corporal (BMI, de l'anglès *Body Mass Index*) per sobre de 30. Aquest BMI és un número que resulta del quocient entre el pes d'un individu en quilograms i la seva altura elevada al quadrat en metres.

L'obesitat suposa una càrrega important en el desenvolupament de malalties cardiovasculars, tot augmentant-ne la morbiditat i el risc de mortalitat. Així, l'obesitat presenta un efecte negatiu sobre l'entorn bioquímic de l'individu tot afavorint la progressió de la hipertensió i de determinades cardiomiopaties. El teixit adipós, no és tan sols un magatzem passiu de greix, sinó que també actua com a òrgan endocrí sintetitzant i secretant una àmplia varietat de molècules al torrent sanguini que poden jugar un paper important en l'homeòstasi cardiovascular. Entre aquestes molècules hi trobem citocines proinflamatòries com TNF- $\alpha$ , la concentració circulant de la qual està relacionada amb el BMI, i IL-6, de la que s'ha determinat que el 30% de la concentració en plasma s'origina en el teixit adipós [Yudkin i col., 1999]. L'obesitat també està associada amb una funció endotelial anòmala [Arcaro i col., 1999], la qual sembla derivar d'una reducció en la producció d'òxid nítric (NO). Aquesta disminució de NO podria estar relacionada amb un augment de l'estrès oxidatiu o bé ser conseqüència

de l'increment de citocines proinflamatories, i de la que en resulta una vasoconstricció i alteracions en la circulació sistèmica i coronària [Lakhani i Fein, 2011]. També s'ha descrit que un excés de teixit adipós altera la morfologia del cor tot produint un augment del volum de sang circulant i, com a conseqüència, un increment de la demanda metabòlica i de la despesa cardíaca [Kasper i col., 1992], que en individus obesos és major que l'observada en individus prims. Aquest augment de la despesa cardíaca es atribuïble principalment a l'augment del volum sistòlic, ja que la freqüència cardíaca no sofreix cap augment significatiu. L'augment del volum sistòlic pot derivar cap a una dilatació ventricular tot augmentant l'estrès parietal, que al seu torn, pot arribar a produir una hipertròfia del ventricle esquerra [Lakhani i Fein, 2011]. Aquest procés es veu agreujat per la hipertensió característica dels individus obesos. D'altra banda, en el desenvolupament de les cardiomiopaties derivades de l'obesitat possiblement també hi intervé l'acumulació d'àcids grassos que es produeix en el cor, ja que s'ha descrit que la presència excessiva d'àcids grassos a nivell de l'epicardi, observada en individus obesos, produeix canvis anatòmics en el cor i disfunció cardíaca [Roberts i Roberts, 1983]. Així, l'obesitat sembla ser un important factor de risc en el desenvolupament de malalties cardiovasculars tant per la seva participació en processos inflamatoris com per els desajustos metabòlics que provoca.

## 2. METABOLISME ENERGÈTIC EN EL COR.

La constant funció de bombeig del cor, necessària per tal de poder propulsar la sang a tots els òrgans del cos, requereix una elevada demanda energètica per part d'aquest, que és principalment coberta pels àcids grassos i glucosa i, en menor mesura, pel lactat [Taegtmeyer i col., 2002] (figura 3). En condicions normals, el cor humà adult obté aproximadament entre el 60 i el 70% de l'energia del metabolisme dels **àcids grassos** i la resta de **la glucosa** (20%) i del **lactat** (10%) [Coort i col., 2007].



**Figura 3.** Esquema simplificat de la regulació del metabolisme energètic del miocardi [Doenst i col., 2008]. G6P (glucosa 6-fosfat), GLUT (transportador de glucosa), FAT (transportador d'àcids grassos), GSK3 (glicogen sintetasa cinasa 3), GS (glicogen sintetasa), GP (glicogen fosforilasa), ACC (Acetil-CoA carboxilasa), MCD (malonil CoA descarboxilasa), PDH (piruvat deshidrogenasa), PDK (piruvat deshidrogenasa cinasa).



El cor, a diferència d'altres teixits com el cervell, és capaç d'adaptar el seu metabolisme a la disponibilitat de substrat. Així, en condicions fisiopatològiques com la hipertròfia i la insuficiència cardíaca, la font principal d'energia sofreix un canvi dràstic passant a ser-ho la glucosa en detriment dels àcids grassos [van der Vusse i col., 1992; van Bilsen i col., 1998]. Aquests canvis metabòlics en la utilització del substrat cardíac estan lligats a una desregulació dels gens involucrats en la captació, transport i catabolisme de la glucosa i dels àcids grassos.

### **2.1. Metabolisme de la glucosa.**

La D-glucosa és una de les molècules orgàniques més abundants a la natura, alhora que la seva concentració a nivell sanguini es manté dins un marge molt estret. Aquesta elevada i constant disponibilitat fa que aquest sucre sigui un potencial substrat de cara a la producció d'energia al cor. La glucosa que usa el cor deriva del torrent sanguini i de les reserves intracel·lulars de glicogen. Aquesta glucosa un cop a l'interior de la cèl·lula és metabolitzada, en una primera fase anaeròbica, obtenint ATP i piruvat. Posteriorment, aquest piruvat entra al mitocondri on, mitjançant un procés aeròbic s'obté una major quantitat d'energia que en la fase anaeròbica anterior. En condicions d'aerobiosi, la glucosa serà metabolitzada a piruvat i aquest entrarà al cicle dels àcids tricarbòxílics, mentre que en condicions de manca d'oxigen, en les que no es pot produir la respiració aeròbica, la taxa d'entrada del piruvat al cicle del àcids tricarbòxílics (que depèn de l'entrada del piruvat al mitocondri) és inferior a la producció d'aquest a partir de la glucosa, produint una acumulació de piruvat que acaba essent reduït a lactat per tal de recuperar el  $\text{NAD}^+$  necessari per que es pugui continuar amb la glicòlisi anaeròbica. Així, l'energia obtinguda de la glucosa en situacions en què el piruvat no pot entrar al cicle dels àcids tricarbòxílics es limita a la glicòlisi anaeròbica, essent 2 ATP per molècula de glucosa a diferència dels 38 que s'obtenen en la glicòlisi aeròbica [Lopaschuk i Stanley, 1997; Depre i col., 1999].

### 2.1.1. Transport de glucosa.

El transport de la glucosa del torrent sanguini cap a l'interior del cardiomiòcit es dona mitjançant un gradient de concentració que és regulat per diferents transportadors específics. Aquests transportadors que regulen la captació de glucosa pertanyen a la família GLUT (de l'anglès *Glucose Transporter*) [Pessin i Bell, 1992; Gould i Holman, 1993; Mueckler, 1994] i constitueixen un sistema de transport de glucosa a favor de gradient de concentració [Shepherd i Kahn, 1999]. D'aquests transportadors, la isoforma predominant expressada en la superfície dels cardiomiòcits adults és GLUT4, un transportador de glucosa sensible a insulina que també es troba en teixit adipós [Pessin i Bell, 1992]. D'altra banda, els cardiomiòcits també expressen la isoforma GLUT1, un transportador independent d'insulina predominant en el miocardi fetal [Gould i Holman, 1993] i, en menor mesura, GLUT3. L'estimulació del transport de glucosa és produït per un reclutament a nivell de membrana plasmàtica de transportadors provinents de reserves intracel·lulars, tot resultant en un increment de la velocitat del transport de glucosa cap a l'interior de la cèl·lula.

### 2.1.2. Glicòlisi i síntesi de piruvat.

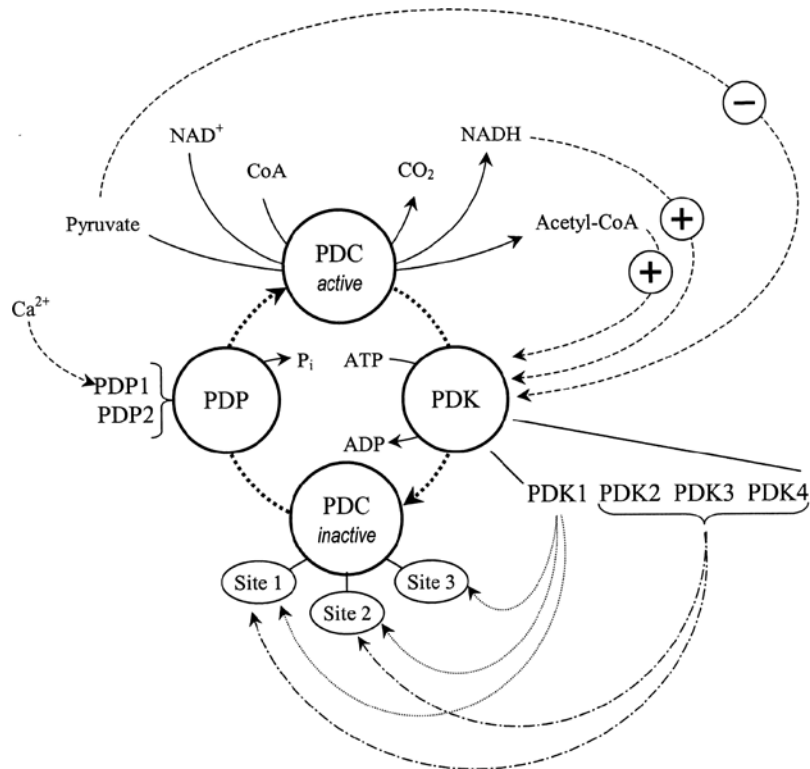
La glucosa intracel·lular és ràpidament fosforilada, de forma irreversible, a glucosa-6-fosfat per la hexocinasa, esdevenint un substrat tant per la via glicolítica com per a la síntesi de glicogen (figura 3). Aquesta reacció és irreversible, ja que en el cor no trobem glucosa-6 fosfatases, alhora que impedeix la sortida de la cèl·lula de la glucosa, ja que al ser fosforilada no pot travessar la membrana. Hi ha dues isoformes d'hexocinasa al cor, hexocinasa I i hexocinasa II [Printz i col., 1993]. La primera és la forma majoritària en el cor fetal, mentre que la segona és la isoforma majoritària en el cor adult. El camí que pren aquesta glucosa-6-fosfat depèn en gran mesura de la disponibilitat de substrats sobre els quals actuen els enzims que condicionen un pas o altre, i de la regulació hormonal. Per exemple, tant la insulina com l'oxidació dels àcids grassos afavoreixen la síntesi de glicogen tot incrementant l'activitat de la glicogen sintetasa [Kodde i col., 2007]. A nivell de miocardi, sembla ser que tant la síntesi de

glicogen a partir de glucosa-6-fosfat, com el seu pas invers, actuen com un mecanisme de control del metabolisme de la glucosa [Taegtmeyer, 1994]. Malgrat que la concentració de glicogen en cor és variable, la quantitat disponible en cor és relativament baixa. S'ha observat un augment de la quantitat de glicogen associada a la capacitat del cor neonatal de resistir les condicions d'hipòxia. Així, el glicogen que en condicions fisiològiques ocupa un 2% del volum d'un cardiomiòcit adult, en un cardiomiòcit neonatal en representa el 30% del volum. A diferència del fetge i del múscul esquelètic, el múscul cardíac davant d'una situació de dejuni augmenta la quantitat de glicogen [Schneider i col., 1991]. Aquest fet coincideix amb què els àcids grassos, que en condicions de dejuni són el principal substrat del miocardi, inhibeixen la glicòlisi més que no pas la captació de glucosa, tot redirigint la glucosa cap a la síntesi de glicogen. Aquestes reserves també augmenten per efectes de la insulina degut a una estimulació del transport de glucosa i de l'activitat glicogen sintetasa [Moule i Denton, 1997].

En cas d'entrar a la via glicolítica, la glucosa-6-fosfat és transformada a fructosa 6-fosfat per la glucosa-6-fosfat isomerasa i, a continuació, a fructosa 1,6-bifosfat per la fosfofructocinasa-1 (PFK-1, de l'anglès *Phosphofructokinase-1*). Després d'una sèrie de reaccions enzimàtiques a nivell de citoplasma, la glicòlisi finalitza amb l'obtenció de dues molècules de piruvat per cada molècula de glucosa [Depre i col., 1999]. El piruvat entra al mitocondri mitjançant un transportador de monocarboxilats específic [Poole i Halestrap, 1993; Sugden i Holness, 2003]. Un cop a la matriu mitocondrial el piruvat passa a ser un substrat intermedi de diferents vies metabòliques. Així, la major part d'aquest piruvat és oxidat pel complex de la piruvat deshidrogenasa (PDC, de l'anglès *Pyruvate Dehydrogenase Complex*) a acetil coenzim A (acetil-CoA), que entrarà al cicle dels àcids tricarboxílics (TCA de l'anglès *TriCarboxylic Acid*) [Depre i col., 1998].

2.1.3. PDC.

El complex de la piruvat deshidrogenasa juga un paper clau en el metabolisme de la glucosa catalitzant la descarboxilació oxidativa del piruvat, tot produint acetil-CoA i NADH, que seran usats en el cicle de Krebs. El PDC en humans és un complex multienzimàtic de simetria dodecaèdrica integrat per múltiples còpies de tres tipus d'enzims diferents (E1, E2 i E3). El nucli està format per 60 subunitats de dihidroliipoamida acetiltransferasa (E2), i a la perifèria es troben 30 heterotetràmers ( $\alpha_2\beta_2$ ) de piruvat deshidrogenasa (E1), units per 12 monòmers d'E3BP a 12 homodímers de dihidroliipoamida deshidrogenasa (E3) [Patel i Korotchkina, 2001; Smolle i col., 2006]. El complex PDC es troba regulat en gran part per la interconversió del component E1 de la seva forma activa (no fosforilada), a la inactiva (fosforilada). Els encarregats de catalitzar els pas de la forma activa a la inactiva, i viceversa, de la subunitat E1 de PDC són la piruvat deshidrogenasa cinasa (PDK, de l'anglès *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*) i la piruvat deshidrogenasa fosfatasa (PDP, de l'anglès *Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase*) (figura 4).



**Figura 4.** Mecanismes de regulació de PDK i PDP, enzims catalitzadors de la interconversió de la forma activa de PDC (defosforilada) a la forma inactiva (fosforilada) i viceversa [Holness i Sugden, 2003].

Tant la PDK com la PDP es troben unides als dominis lipoil de la subunitat E2 de PDC [Yang i col., 1998]. S'han identificat tres residus serina o *sites* (*site* 1, Ser<sup>264</sup>; *site* 2, Ser<sup>271</sup>; *site* 3, Ser<sup>203</sup>) a la subunitat  $\alpha$  d'E1 humana que al ser fosforilats per PDK provoquen la inactivació d'E1. Aquests tres residus presenten diferents taxes de fosforilació per part de PDK, mentre que les taxes de defosforilació per part de PDP, de la que se n'han descrit dues isoformes en humans [Huang i col., 1998], són pràcticament idèntiques [Patel i Korotchkina, 2001].

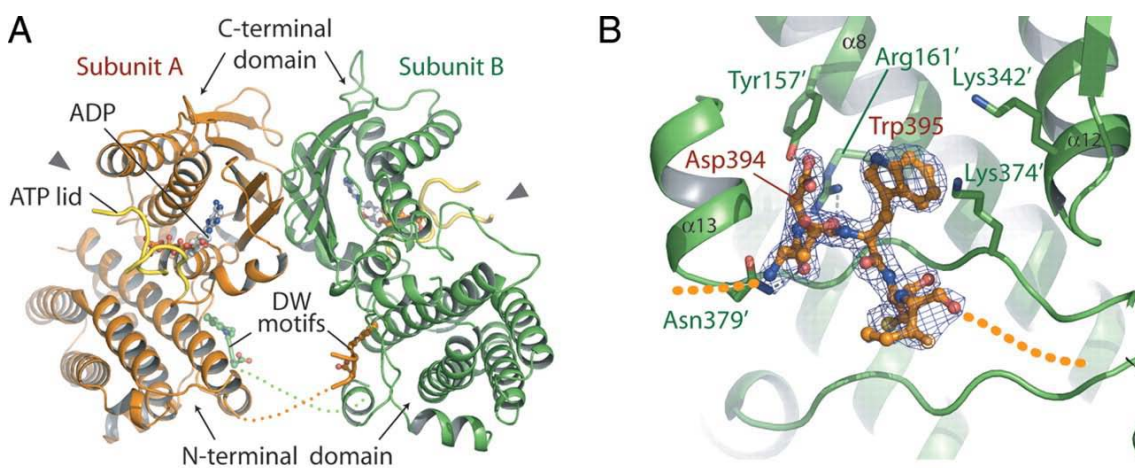
#### 2.1.4. PDK4.

Les PDK són proteïnes mitocondrials que juguen un paper molt important en la regulació del metabolisme de la glucosa, tot inactivant el complex PDC del que en resulta una reducció de la conversió de piruvat a acetil Co-A. Aquestes PDK, que pertanyen a la superfamília d'ATPases/cinases, són enzims dimèrics amb una activitat cinasa específica de residus de serina [Bowker-Kinley i Popov, 1999]. Estudis estructurals mostren que aquestes cinases presenten un domini N-terminal i un domini C-terminal [Steussy i col., 2001; Kato i col., 2005]. El domini N-terminal està format per vuit hèlix  $\alpha$  unides a una estructura integrada per un feix de quatre hèlix que formen el nucli. El domini C-terminal conté el domini catalític encarregat de transferir el grup fosfat. En les diferents isoformes de PDK s'observen quatre motius altament conservats que configuren un plegament on s'hi uneix l'ATP. Aquest plegament inclou un element estructural conegut com a tapa d'ATP, el canvi conformacional del qual està associat tant a l'hidròlisi de l'ATP com a la interacció proteïna-proteïna [Kato i col., 2005; Wynn i col., 2008].

En humans s'han descrit quatre isoformes diferents de PDK (PDK1-4) amb una expressió tissular específica [Gudi i col., 1995; Rowles i col., 1996]. Aquesta expressió tissular específica dels isoenzims de PDK, les diferències en la seva activitat i les diferents sensibilitats cap a efectors i metabòlits, explicaria les diferències que s'observen en la regulació del metabolisme de la glucosa en els diferents teixits [Bowker-Kinley i col., 1998; Holness i Sugden, 2003]. Malgrat que les quatre isoformes

## INTRODUCCIÓ

de PDK s'expressen en cor i en múscul esquelètic, PDK4 n'és la més abundant [Harris i col., 2001], alhora que aquest isoenzim mostra una activitat de 4 a 9 vegades major que la resta de PDK cap al segon residu de tirosina de la subunitat  $\alpha$  d'E1 de PDC [Korotchkina i Patel, 2001]. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en altres estudis en els què s'ha observat que aquesta cinasa mostra una activitat basal considerablement superior a la resta d'isoformes de PDK [Wynn i col., 2008]. En humans, el gen de *PDK4* es troba en la regió q21.3 del cromosoma 7 [Rowles i col., 1996]. Aquest gen de 13 Kb codifica per a una proteïna de 411 aminoàcids amb un pes molecular de 46,4 KDa. PDK4 s'uneix al domini lipoil de la subunitat E2 de PDC tot inhibint la seva activitat. La forma activa de PDK4 consisteix en un dímer en el que s'observa un motiu altament conservat anomenat DW (Asp<sup>394</sup> - Trp<sup>395</sup>), localitzat en el domini C-terminal de cadascun dels monòmers, que permet la interacció amb el domini N-terminal de l'altre monòmer (figura 5). El creuament dels monòmers forma una estructura oberta, en forma de pinça, que li permet interactuar amb el complex PDC. Aquesta conformació oberta redueix l'afinitat de PDK4 cap a l'ADP, producte de la fosforilació de PDC, tot facilitant-ne l'eliminació i evitant així la inhibició per producte. L'alteració o deleció d'aquest motiu DW no permet la correcta interacció entre les dues subunitats que conformen PDK4, resultant en una conformació tancada que pràcticament comporta la inactivació d'aquesta cinasa [Wynn i col., 2008].



Entre els estímuls que activen PDK, a curt termini, hi trobem l'acetil Co-A i el NADH, les concentracions dels quals augmenten amb l'oxidació d'àcids grassos. El NADH pot inhibir directament l'activitat del complex PDC, malgrat que les modificacions covalents d'aquest complex per part de PDK semblen ser més importants per a la regulació de la seva activitat [Harris i col., 2001]. Així, l'increment de les ràtios NADH/NAD<sup>+</sup> i acetil Co-A/Co-A intramitocondrials, que està associat a ràpides reaccions reversibles catalitzades per les subunitats E2 i E3 del complex PDC, augmenta la proporció de grups lipoil acetilats o reduïts presents en aquestes subunitats. L'acetilació o reducció d'aquests grups lipoil d'E2 i E3 produeix un augment de l'activitat de PDK [Roche i col., 2003]. Altres metabòlits que també es troben regulant PDK són el piruvat i l'ADP, que actuen inhibint l'activitat de PDK tot permetent una major activitat del complex PDC [Stanley i col., 2005]. En la regulació de l'expressió de *PDK4*, a llarg termini, hi participen diferents hormones com és el cas dels glucocorticoides i la insulina. Els glucocorticoides produeixen un augment en l'expressió de *PDK4*, mentre que la insulina en disminueix l'expressió, essent els efectes de la insulina predominants sobre els dels glucocorticoides [Kwon i Harris, 2004]. Donada la importància de *PDK4* en el control del metabolisme energètic, aquesta cinasa es troba regulada per mecanismes complexos en els que hi participen diversos factors de transcripció. Entre aquests factors hi trobem PPAR [Huang i col., 2002] i ERR $\alpha$  [Wende i col., 2005; Zhang i col., 2006], ambdós coactivats per PGC1- $\alpha$  [Lin i col., 2005] i implicats en la regulació del metabolisme dels àcids grassos i glucosa. Recentment també s'han suggerit altres factors de transcripció, com és el cas d'E2F1, implicat principalment en el control del cicle cel·lular, que també sembla participar en la regulació de *PDK4* [Hsieh i col., 2008].

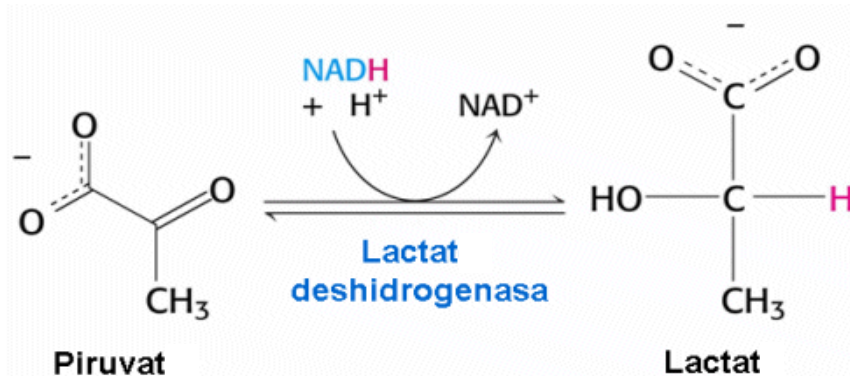
En diversos estudis s'ha descrit un augment de l'expressió de *PDK4* en situacions de dejuni i diabetis [Harris i col., 2001; Wu i col., 2001]. En estats de dejuni aquest augment juga un important paper, ja que participa en la reducció de la hipoglicèmia, mentre que en diabetis una major expressió de *PDK4* presenta efectes negatius ja que la conservació de substrat gluconeogènic contribueix a la hiperglicèmia característica de la diabetis [Kwon i Harris, 2004]. Altres treballs també han descrit un increment significatiu del contingut mitocondrial de *PDK4* en hipertiroïdisme i amb

l'administració de HFD [Kolobova i col., 2001], fet que concorda amb l'increment de l'activitat de PDK4 observada en teixits oxidatius en resposta a un augment de l'aport lipídic [Holness i Sugden, 2003]. D'altra banda, en altres estudis s'ha observat que diversos inductors d'hipertròfia com PE (de l'anglès *Phenylephrine*) i LPS (de l'anglès *Lipopolysaccharide*) *in vitro*, i la constricció de l'aorta *in vivo* també produeixen una reducció en l'expressió de *PDK4* [Planavila i col., 2005]. En conjunt, aquests fets suggereixen que PDK4 és el principal responsable dels canvis metabòlics associats a diferents malalties cardiovasculars [Abbot i col., 2005].



## 2.2. Metabolisme del lactat.

En condicions normals el cor humà adult obté aproximadament el 10% de l'energia del lactat, però en determinades circumstàncies, en les quals la demanda energètica és superior a l'aport d'oxigen per part de la sang, passa a ser un dels principals substrats energètics, ja que davant una baixa disponibilitat d'oxigen l'oxidació d'àcids grassos i glucosa es veu reduïda [Taegtmeier i col., 1998]. Així, en períodes d'hipòxia, com a conseqüència d'una limitació en la disponibilitat d'oxigen, es produeix un canvi en el metabolisme de la glucosa passant d'un estat aeròbic de la glicòlisi a un d'anaeròbic, del que en resulta un augment de la producció de lactat [Doenst i col., 2008]. Enfront de certes circumstàncies patològiques o en condicions d'exercici, el múscul esquelètic cobreix les necessitats energètiques mitjançant un augment de la glicòlisi anaeròbica. En aquesta reacció s'oxida el NADH a NAD<sup>+</sup> cedint els electrons al piruvat que es redueix a lactat per l'acció d'un enzim anomenat lactat deshidrogenasa (LDH, de l'anglès *Lactate Dehydrogenase*) (figura 6).



**Figura 6.** La Lactat deshidrogenasa (LDH) catalitza una reacció redox reversible en la qual el piruvat es reduït a lactat gràcies a l'oxidació de NADH a NAD<sup>+</sup>. En funció de la relació de concentracions de substrat i producte i de la isoforma de LDH la reacció pot anar en una direcció o altra.

Les cèl·lules de mamífers contenen dos tipus de subunitats de la LDH, anomenades M (predominant en el múscul esquelètic) i H (predominant en el múscul cardíac). Les diferents combinacions d'aquestes dues subunitats en forma de tetràmers donen lloc a les cinc isoformes existents de LDH (LDH 1-5), de les quals LDH-1(4H) i LDH-2(3H1M), isoformes específiques del cor, s'ha suggerit que afavoreixen l'oxidació de lactat a piruvat mentre que de les isoformes específiques de múscul, LDH-4(1H3M) i LDH-5(4M), se n'ha suggerit que afavoreixen la reducció de piruvat a lactat [Van Hall G.,

2000]. L'excés de lactat produït per la glicòlisi anaeròbica en múscul esquelètic difon cap a teixits altament aeròbics com el cor, travessant les membranes mitjançant un cotransportador de  $H^+$ -monocarboxilats específic (MCT, de l'anglès *MonoCarboxylate Transporter*) [Poole i Halestrap, 1993]. Un cop dins les cèl·lules cardíques el lactat és oxidat a piruvat per les isoformes de LDH específiques de cor (que presenten una baixa  $K_m$  per al piruvat). Aquest piruvat passarà a ser substrat del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA), essent usat com a font d'energia aeròbica.

## 2.3. Metabolisme dels àcids grassos.

En condicions fisiològiques normals, el 60-70% de l'energia necessària en el cor de mamífers adults prové de l'oxidació d'àcids grassos. En el cor, la capacitat d'emmagatzemar i sintetitzar lípids *de novo* és limitada i, per tant, en condicions normals, la majoria dels àcids grassos que entren als miòcits són oxidats, de manera que aquest òrgan depèn principalment de l'aport arterial d'àcids grassos [Kodde i col., 2007]. Els àcids grassos també participen en la regulació del seu propi metabolisme a través de l'activació de receptors nuclears com són els PPAR, ja que són lligands naturals d'aquests factors de transcripció relacionats amb el control de gens del metabolisme lipídic [Moller i Berger, 2003].

### 2.3.1. Fonts d'àcids grassos.

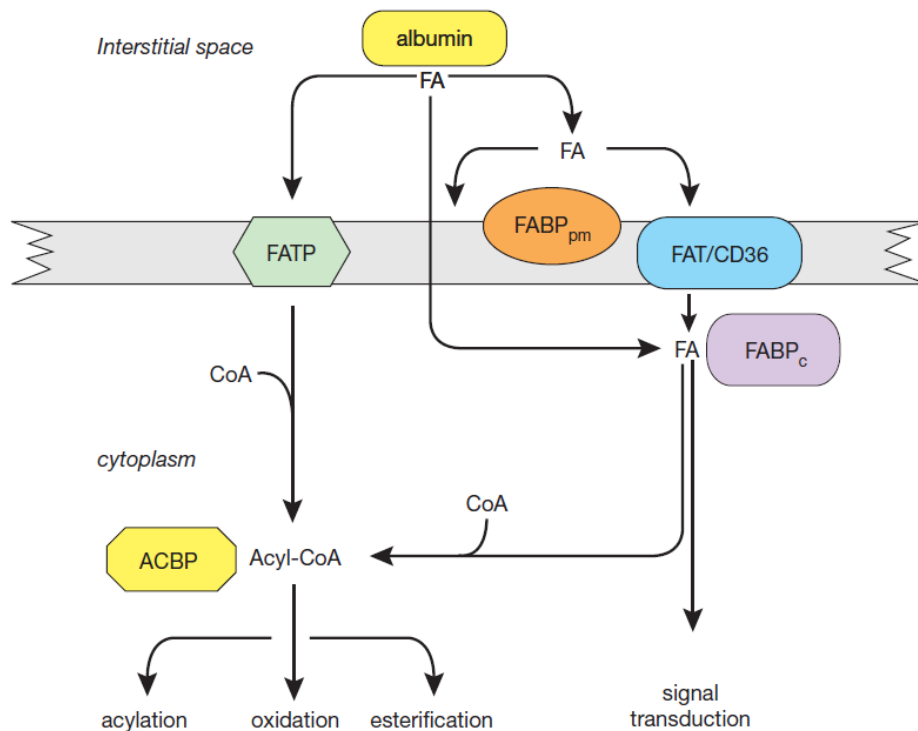
Els àcids grassos necessaris per a l'organisme provenen principalment de la dieta i en menor mesura de la biosíntesi endògena. En una dieta equilibrada l'aport d'energia en forma de lípids no ha de ser superior al 30% de l'aport energètic total [Acheson, 2010]. Els canvis en l'estil de vida han condicionat la transició de dietes baixes en calories i en greixos cap a dietes amb una major proporció d'àcids grassos, caracteritzades per un augment de l'aport energètic en forma de lípids (representant fins a un 58% de l'aport energètic total) [Misra i col., 2010]. Aquests canvis en els hàbits alimentaris s'han associat amb un augment de l'obesitat [Shikany i col., 2010]. Els àcids grassos són ingerits principalment en forma de triacilglicerols (TG). En l'intestí els TG no poden ser absorbits com a tal i són metabolitzats per l'acció de les lipases a àcids grassos lliures i monoglicèrids, en un procés anomenat lipòlisi. Els productes de la digestió dels TG són incorporats als enteròcits i retransformats de nou a TG. En l'enteròcit són empaquetats conjuntament amb colesterol i proteïnes per tal de formar els quilomicrons, un tipus de lipoproteïnes. Aquests quilomicrons són excretats per la cèl·lula al sistema limfàtic, des d'on són abocats al torrent sanguini [Ratnayake i Galli, 2009]. Els àcids grassos estan presents en la sang de forma esterificada (mono-, di- i triacilglicerols, fosfolípids i èsters de colesterol) o bé com a àcids grassos lliures. Els

més emprats pel cor són els àcids grassos lliures units a l'albumina i els triacilglicerols presents en el nucli de les lipoproteïnes plasmàtiques. Els primers representen la forma majoritària d'àcids grassos consumits en el cor, mentre que els TG en representen menys d'un 20-25% [Wang i col., 1998]. En la superfície de la llum de l'endoteli vascular coronari, la lipoproteïna lipasa allibera els àcids grassos de les lipoproteïnes, mentre que la triacilglicerol lipasa és l'enzim implicat en l'alliberament dels àcids grassos de les reserves de TG intracel·lulars [Lewin i Coleman, 2003].

### **2.3.2. Captació dels àcids grassos.**

Els àcids grassos poden entrar a l'interior dels cardiomiòcits per difusió passiva o bé mitjançant un sistema de transport facilitat per proteïnes [Musters i col., 2006]. La majoria d'àcids grassos que entren al múscul cardíac són captats a través d'aquest sistema de transport facilitat per proteïnes, mentre que només una petita fracció travessen la membrana per difusió passiva. La difusió passiva consisteix en l'absorció dels àcids grassos que es troben lliures a l'exterior de la membrana dels cardiomiòcits cap a l'interior de la cèl·lula a través de la membrana plasmàtica i la subseqüent desorció cap al citoplasma. Malgrat tot, degut a la seva naturalesa hidrofòbica, els àcids grassos lliures representen menys d'un 0,01% dels àcids grassos presents en sang, de manera que la seva contribució a la captació total d'àcids grassos és força baixa [Richieri i col., 1993]. En el cas del transport actiu d'àcids grassos hi juguen un paper clau tres tipus de proteïnes, les proteïnes d'unió als àcids grassos (FABP, de l'anglès *Fatty Acid Binding Proteins*) [Makowski i Hotamisligil, 2004], amb membres a la membrana plasmàtica (FABPpm) i al citoplasma (FABPc), les proteïnes transportadores d'àcids grassos (FATP, de l'anglès *Fatty Acid Transport Protein*) [Gimeno, 2007] i les proteïnes translocadores d'àcids grassos (FAT/CD36, de l'anglès *Fatty Acid Translocase*) (figura 7). L'expressió gènica d'aquestes tres famílies de proteïnes és regulada a través de mecanismes mitjançats per PPAR [Cha i col., 2001; Benton i col., 2006; Doege i Stahl, 2006]. Després de dissociar-se de l'albumina o de ser alliberats de les lipoproteïnes per la lipoproteïna lipasa, els àcids grassos poden difondre a través de la bicapa lipídica o bé unir-se a alguna de les tres proteïnes suggerides com a

transportadors d'àcids grassos. Les FABP són membres d'una superfamília de proteïnes d'unió a lípids [Wang i col., 2005] que, conjuntament amb la glicoproteïna integral de membrana FAT/CD36, promouen la dissociació dels àcids grassos de l'albumina i la interacció d'aquests amb les FATP. Aquestes últimes formen part d'una família de proteïnes integrals de membrana que estan implicades en la captació i internalització dels àcids grassos que presenten activitat VLACS (de l'anglès *Very-Long-chain Acyl-CoA Synthetase*). Un cop a l'interior del cardiomiòcit els àcids grassos s'uneixen a les FABPc, que els transfereixen fins a la membrana mitocondrial externa on es troba l'acil-CoA sintetasa (ACS, de l'anglès *Acyl-CoA Synthase*), una lligasa que activa els àcids grassos unint-los al coenzim A (CoA), tot transformant-los en acil-CoA de cadena llarga (*Long-Chain acyl-CoA*). Una altra font de acil-CoA de cadena llarga són les esmentades FATP [Hall i col., 2003]. L'acil-CoA és un component citoplasmàtic que té un important paper en la regulació del metabolisme energètic i que és transportat per una proteïna citoplasmàtica anomenada ACBP (de l'anglès *Acyl-CoA Binding Protein*).

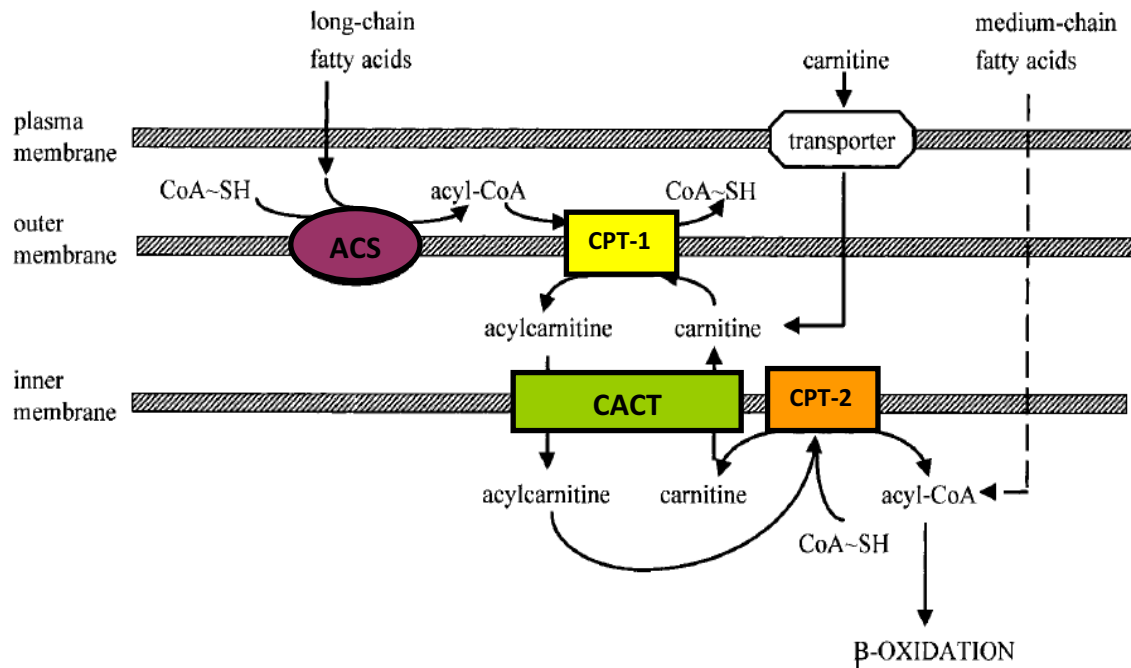


**Figura 7.** Esquema dels transportadors implicats en la captació dels àcids grassos [Brinkmann i col., 2002]. S'ha proposat que FAT/CD36, FABP<sub>pm</sub> i FATP actuen sinèrgicament. FA (àcids grassos), FATP (proteïna de transport d'àcids grassos), FABP<sub>pm/c</sub> (proteïna d'unió als àcids grassos de membrana plasmàtica/citoplasmàtica), FAT/CD36 (translocasa d'àcids grassos), ACBP (proteïna d'unió a l'acil-CoA).

### 2.3.3. Entrada dels àcids grassos al mitocondri.

Un cop els àcids grassos han travessat la membrana plasmàtica i han estat activats a acil-CoA per l'ACS, aquests poden ser oxidats pel mitocondri, emmagatzemats en forma de TG o bé hidrolitzats per l'enzim CTE (de l'anglès *Cytoplasmatic Thioesterase*), amb la subseqüent obtenció d'àcids grassos lliures i CoA. Per tal de que els acil-CoA de cadena llarga puguin ser oxidats han d'entrar a l'interior del mitocondri. Els mitocondris són orgànuls que es troben al citoplasma de les cèl·lules eucariotes en major o menor nombre segons la capacitat metabòlica del teixit, i estan formats per compartiments que duen a terme funcions especialitzades amb la finalitat de generar energia per a la cèl·lula en forma de trifosfat d'adenosina (ATP). En el múscul cardíac els mitocondris desenvolupen un paper clau en el metabolisme energètic [Marin-Garcia i col., 2001]. El mitocondri consta de dues membranes, la membrana externa i la membrana interna. La membrana externa és permeable als acil-CoA, però la interna no ho és, de manera que els acil-CoA de cadena llarga requereixen d'un sistema de transport anomenat carnitina palmitoil transferasa (figura 8) per tal de poder travessar la membrana mitocondrial interna [Beadle i Frenneaux, 2010]. Aquest sistema de transport és dependent de carnitina i consta de tres proteïnes, la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1, de l'anglès *Carnitine Palmitoyl Transferase-1*), la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT, de l'anglès *Carnitine-acylcarnitine translocase*) i la carnitina palmitoil transferasa 2 (CPT-2). La CPT-1 és un enzim transmembrana situat a la membrana mitocondrial externa (MME), que és limitant en la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos de cadena llarga [Ruderman i Saha, 2006], i que s'encarrega de formar acilcarnitina a partir d'acil-CoA i carnitina, permetent així que els àcids grassos puguin travessar la membrana mitocondrial interna (MMI) [McGarry i Brown, 1997]. La CACT és una translocasa que transporta la acilcarnitina de cadena llarga a través la MMI mitjançant la CPT-2. Aquest enzim situat a la MMI transfereix el grup acil de la acilcarnitina de cadena llarga al CoA formant acil-CoA de cadena llarga, que entrarà a la  $\beta$ -oxidació, i alliberant la carnitina que retorna a l'espai intermembrana mitocondrial. Existeixen dues isoformes de CPT-1, la isoforma del fetge (L-CPT-1 o CPT-1a) i la del múscul (M-CPT-1 o CPT-1b), amb diferents propietats cinètiques i reguladores. S'ha descrit que la M-CPT-1 és més sensible que no pas la isoforma del

fetge a la inhibició per part del malonil-CoA, la concentració del qual és un dels reguladors més importants de l'activitat CPT-1 [McGarry i Brown, 1997]. La CPT-2, a diferència de la CPT-1, no presenta un paper regulador en la captació d'àcids grassos per part del mitocondri [Kerner i Hoppel, 2000].



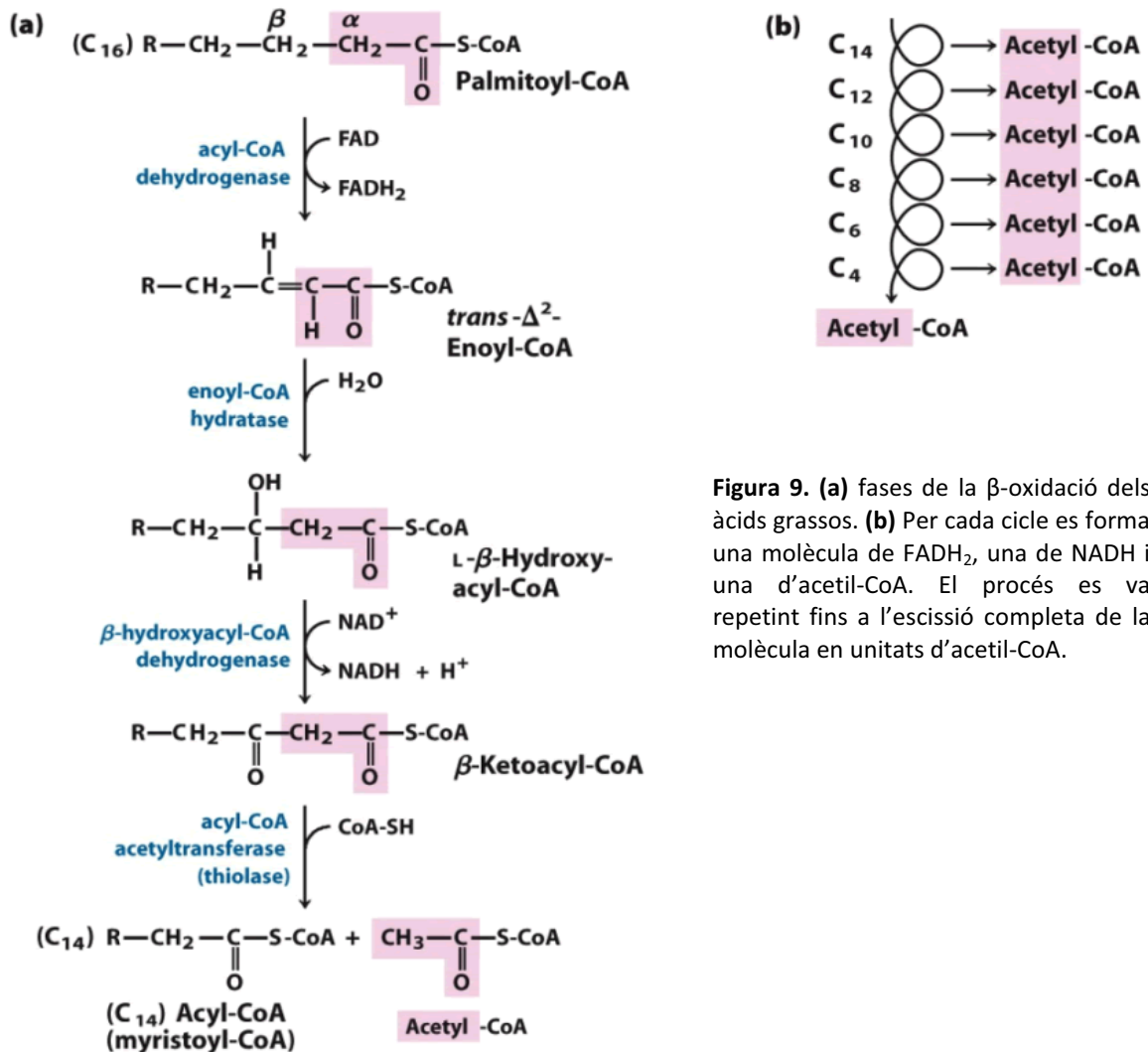
**Figura 8.** Sistema de transport carnitina palmitoil transferasa [Bonfont i col., 1999]. CACT (carnitina acilcarnitina translocasa), CPT-1 (carnitina palmitoil transferasa-1), CPT-2 (carnitina palmitoil transferasa-2), ACS (acil-CoA sintetasa).

### 2.3.4. $\beta$ -oxidació dels àcids grassos.

Un cop l'acil-CoA de cadena llarga està a l'interior del mitocondri, aquest pot entrar a la via de la  $\beta$ -oxidació (figura 9). La  $\beta$ -oxidació mitocondrial és la responsable de la degradació d'àcids grassos de cadena curta (<C8), intermèdia (C8-C12) o llarga (C12-C20), i contribueix a la producció d'ATP via fosforilació oxidativa. En cada cicle d'oxidació, que consta de quatre reaccions, s'escurça la cadena de l'àcid gras i s'allibera una molècula d'acetil-CoA i cofactors reduïts (NADH i FADH<sub>2</sub>) [Reddy i Hashimoto, 2001]. Les quatre reaccions que es duen a terme són, en primer lloc, una oxidació de l'acil-CoA per part de l'enzim acil-CoA deshidrogenasa que conté el

## INTRODUCCIÓ

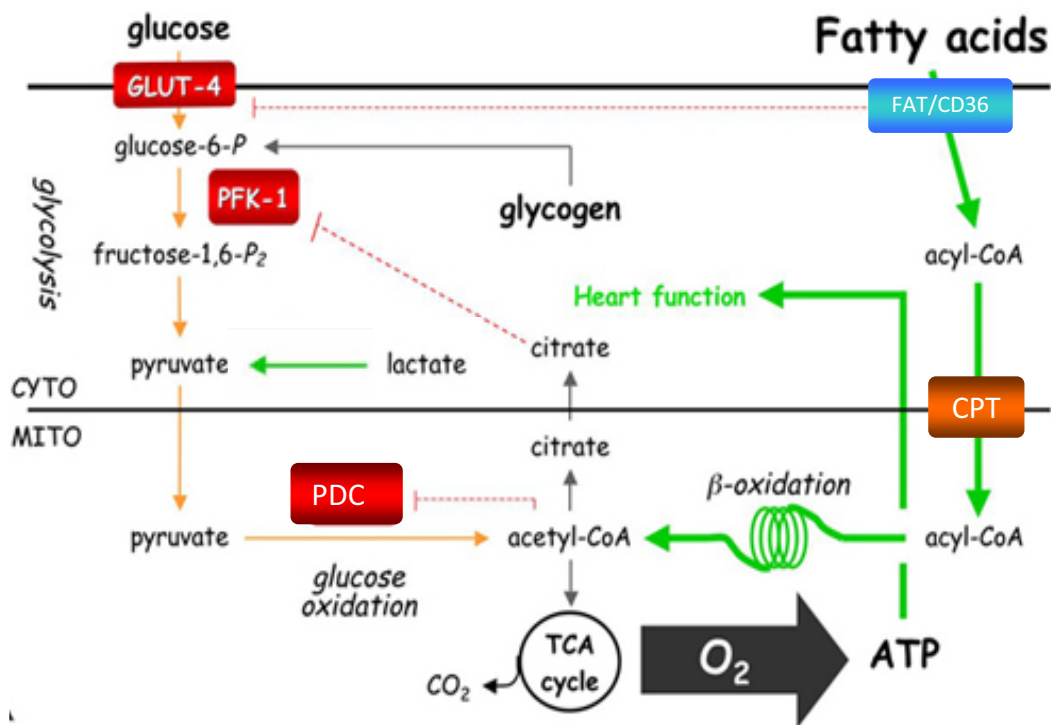
coenzim FAD unit covalentment. Aquest enzim catalitza la formació d'un doble enllaç entre els carbonis 2 i 3, tot obtenint  $\text{FADH}_2$  i un acil-CoA  $\beta$ -insaturat. A continuació es produeix una hidratació del doble enllaç trans entre els carbonis 2 i 3 per part de l'enzim enoil-CoA hidratasa, tot obtenint un  $\beta$ -hidroxiacil-CoA. El següent pas consisteix en l'oxidació del producte anterior per la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, generant-se 3-cetoacil-CoA i NADH. El quart i últim pas consisteix en la ruptura del cetoacil-CoA entre els carbonis 2 i 3 pel grup tiol d'una altra molècula de CoA. Aquesta reacció és catalitzada per la  $\beta$ -cetotilasa i dóna lloc a una molècula d'acetil-CoA i un acil CoA, amb dos carbonis menys que a l'inici del procés, que torna a entrar de nou a aquest procés de  $\beta$ -oxidació.



**Figura 9. (a)** fases de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos. **(b)** Per cada cicle es forma una molècula de  $\text{FADH}_2$ , una de NADH i una d'acetil-CoA. El procés es va repetint fins a l'escissió completa de la molècula en unitats d'acetil-CoA.



Aquestes quatre reaccions continuen fins a l'escissió completa de la molècula en unitats d'acetil-CoA. Per cada cicle es forma una molècula de FADH<sub>2</sub>, una de NADH i una d'acetil-CoA. Aquesta molècula, producte tant de la β-oxidació com de la glicòlisi, té una importància rellevant en el metabolisme energètic (figura 10), ja que és usada com a substrat del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) per l'obtenció d'energia i es troba en un punt de confluència del metabolisme de la glucosa i dels àcids grassos [Naimi i col., 2010].



**Figura 10.** Esquema resum dels principals substrats que participen en el metabolisme energètic del cor d'un adult en condicions normals [Viollet i col., 2009].

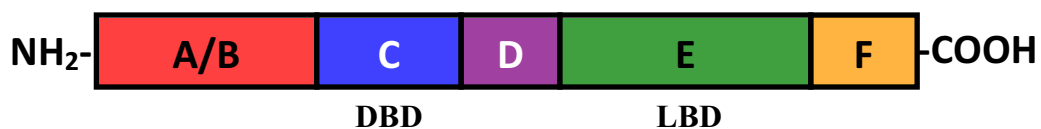
### 2.4. Control transcripcional del metabolisme energètic.

#### 2.4.1. PPAR.

Els receptors activats per proliferadors peroxisòmics (PPAR, de l'anglès *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) són factors de transcripció dependents de lligand que pertanyen a la superfamília de receptors nuclears i que participen en el control transcripcional de gens implicats en el transport i catabolisme d'àcids grassos i glucosa [Desvergne i Wahli, 1999; Kersten i col., 2000]. Aquests PPAR, dels quals n'hi ha tres subtipus, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  i PPAR $\gamma$ , tenen una estructura molecular molt similar entre ells i són activats pels àcids grassos, que actuen com a lligands naturals. Els tres subtipus també presenten lligands sintètics específics com els fibrats en el cas de PPAR $\alpha$ , les glitazones en el cas de PPAR $\gamma$  i agonistes com L-165041 o GW501516 en el cas de PPAR $\beta/\delta$  [Berger i Moller, 2002]. PPAR $\alpha$  s'expressa principalment en teixits amb una elevada taxa de catabolisme dels àcids grassos, com són el múscul esquelètic, el cor, el teixit adipós marró, el fetge, el ronyó i l'intestí [Braissant i col., 1996]. Aquesta isoforma participa en la regulació de gens implicats en la recaptació, l'activació i la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos. PPAR $\beta/\delta$  està distribuït d'una forma més homogènia per tot l'organisme, però es troba de forma més abundant al múscul esquelètic i al cor, on n'és la isoforma majoritària. S'ha vist que aquest PPAR indueix l'expressió de gens implicats en l'oxidació i la utilització d'àcids grassos en miòcits. PPAR $\gamma$  s'expressa principalment en teixit adipós i en cèl·lules del sistema immune, i s'encarrega de controlar la funció adipocitària i la utilització metabòlica de la glucosa. L'estructura molecular dels PPAR, compartida per la major part de receptors nuclears, consisteix en cinc dominis funcionals independents, però que interactuen entre ells [Berger i Moller, 2002; Blanquart i col., 2003] (figura 11).

- Domini **A/B**: regió amino terminal, amb una funció d'activació constitutiva independent de lligand (AF-1, de l'anglès *Activation Function-1*). És la regió responsable de la funció de fosforilació del PPAR i és la menys conservada entre els receptors nuclears.

- Domini **C** o DBD (de l'anglès *DNA Binding Domain*): és una regió molt conservada amb una localització central en tots els receptors nuclears. Permet la unió de PPAR a seqüències específiques anomenades Elements de Resposta a Proliferadors Peroxisòmics (PPRE, de l'anglès *Peroxisome Proliferator Response Element*) situades a les regions promotores dels gens diana.
- Domini **D**: és un dels dominis menys conservats entre els diferents membres de la família PPAR i és l'encarregat de mantenir la unió entre les regions **C** i **E**. Està implicat en la interacció del receptor amb cofactors que controlen l'activitat transcripcional.
- Domini **E** o LBD (de l'anglès *Ligand Binding Domain*): es troba a l'extrem carboxi terminal. Conté la funció d'activació-2 (AF-2) i requereix la unió del lligand per induir l'activació transcripcional. Dóna als PPAR una gran variabilitat d'unió a lligands tant naturals com sintètics. La unió al lligand indueix un canvi conformacional en el LBD que permet el reclutament de molècules coactivadores.
- Domini **F**: és una regió petita i variable situada a l'extrem carboxi terminal que, de moment, no se li ha atribuït una funció específica.

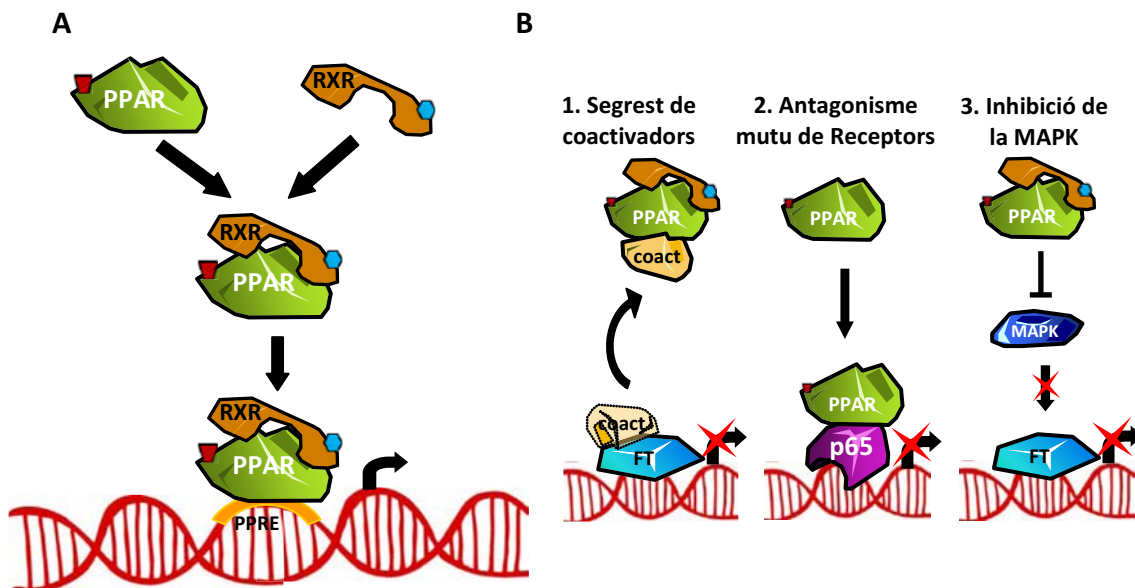


**Figura 11.** Representació esquemàtica de l'estructura de PPAR, compartida per la majoria de receptors nuclears.

Per tal de ser transcripcionalment actius, els PPAR han d'heterodimeritzar amb RXR (receptor de l'àcid 9-*cis*-retinoic). Aquests heterodímers s'uneixen a seqüències específiques de la regió promotora dels seus gens diana (PPRE). En absència de lligand, el complex PPAR-RXR està unit a proteïnes corepressores que n'impedeixen l'activitat transcripcional [Desvergne i Wahli, 1999]. La unió de lligand a cadascun dels membres del complex en modifica la conformació estructural, fet que comporta un reclutament de coactivadors, que afavoreixen la unió de PPAR-RXR a les seqüències PPRE, incrementant, així, la seva activitat transcripcional [Yessoufou i Wahli, 2010]. Aquest

procés és conegut com **transactivació** (figura 12 A). Entre els coactivadors que regulen l'activitat de PPAR hi trobem proteïnes amb activitat histona acetilasa com CBP/p300 (de l'anglès *CREB Binding Protein*) i SRC (de l'anglès *Steroid Receptor Coactivator*), proteïnes que actuen com a pont entre el receptor nuclear i la maquinària d'inici de la transcripció com PBP (de l'anglès *PPAR Binding Protein*) i altres coactivadors com RIP140 i PGC-1 $\alpha$  [Berger i Moller, 2002]. La transactivació de PPAR permet regular la transcripció dels seus gens diana, molts dels quals es troben implicats en la regulació del metabolisme cel·lular. Entre els gens diana de PPAR hi trobem els que codifiquen per proteïnes com la FATP, la FAT i la FABP involucrades en el transport d'àcids grassos a través de la membrana, l'ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*), la FAS (*Fatty Acid Synthase*) i la SCD-1 (*Stearoyl-CoA Desaturase-1*) enzims implicats en la biosíntesi d'àcids grassos, l'ACS que participa en l'activació dels àcids grassos, la CPT-1 que permet l'entrada d'acil-CoA en el mitocondri, així com l'ACO (*Acyl-CoA Oxidase*) involucrada en la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, la MCAD (*Medium Chain Acyl Dehydrogenase*), l'enoil CoA hidratasa i la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enzims clau en la  $\beta$ -oxidació mitocondrial. Altres gens que també estan sota el control transcripcional de PPAR són el que codifiquen per enzims com la lipoproteïna lipasa, que permet l'alliberament dels àcids grassos que formen part dels TG que es troben en les lipoproteïnes, la PEPCK (*Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*) implicada en la gluconeogènesi i les apolipoproteïnes A-I, A-II i C-III components essencials de les lipoproteïnes que s'encarreguen del transport d'àcids grassos per la sang.

D'altra banda, els PPAR també poden regular l'expressió gènica de forma independent a la seva unió a l'ADN, per un mecanisme conegut com a **transrepressió** (figura 12 B). Així, els complexos PPAR-RXR poden regular negativament l'activitat d'altres factors de transcripció mitjançant: (1) segrest de coactivadors; (2) formant complexos amb altres factors (com és el cas de NF- $\kappa$ B) i inhibint la seva activitat transcripcional; o (3) inhibició de la fosforilació i activació de certs membres de la cascada de les MAPK (de l'anglès *Mitogen-Activated Protein Kinase*), com JNK i p38 MAPK [Daynes i Jones, 2002].



**Figura 12. A.** Mecanisme de transactivació. La unió a lligand produeix un canvi conformacional que allibera les proteïnes repressores permetent la unió del complex PPAR-RXR als elements de resposta que es troben en la regió promotora dels gens diana. **B.** Els PPAR presenten tres principals mecanismes de transrepressió independents d'unió a ADN. **1.** Els PPAR poden competir amb altres factors de transcripció (FT) per un mateix coactivador (coact). **2.** Els PPAR poden interaccionar físicament amb altres factors de transcripció tot inhibint-ne la seva activitat transcripcional. **3.** Els PPAR poden inhibir l'activació de les MAPK tot inhibint els factors de transcripció que es trobin activats per la via de les MAPK.

#### 2.4.2. ERR $\alpha$ .

ERR $\alpha$  és un factor de transcripció que pertany a la família de receptors relacionats amb l'estrogen (ERR, de l'anglès *Estrogen-Related Receptors*). Els membres d'aquesta família són receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció dependents de lligand [Tremblay i Giguere, 2007]. Malgrat presentar una homologia estructural amb els receptors d'estrogen, els ERR no són activats per aquesta hormona esteroïdal ni per cap altre lligand natural conegut, de manera que són considerats receptors orfes [Gallet i Vanacker, 2010]. Com la resta de receptors nuclears, els ERR presenten un domini d'unió a seqüències específiques de l'ADN, anomenades ERRE (*ERR Response Element*) i un domini d'unió a lligand (LBD) [Horard i Vanacker, 2003]. Aquest últim participa en la dimerització i l'activació transcripcional d'ERR així com en la interacció amb diferents coactivadors, com és el cas de PGC-1 $\alpha$  [Willy i col., 2004; Tremblay i Giguere, 2007].

Aquesta família de receptors presenta tres isoformes  $ERR\alpha$ ,  $ERR\beta$ , i  $ERR\gamma$  [Heard i col., 2000], que presenten una distribució tissular similar en humans i ratolins. Les tres isoformes s'expressen de forma ubiqua tot i que les isoformes  $ERR\alpha$  i  $ERR\gamma$  sembla que són les més rellevants en els teixits que depenen del metabolisme mitocondrial oxidatiu per generar l'energia, com és el cas del cor [Kodde i col., 2007]. Dels tres membres,  $ERR\alpha$  presenta una major expressió que  $ERR\beta$ , i aquest, major que  $ERR\gamma$  [Tremblay i Giguere, 2007].  $ERR\alpha$  activa la transcripció d'un elevat nombre de gens de múltiples vies involucrades en la producció d'energia, incloent aquells que participen en el metabolisme d'àcids grassos i glucosa. Entre aquests gens es troba el gen de  $PPAR\alpha$ , de manera que molts dels gens activats per aquest factor de transcripció també ho seran per  $ERR\alpha$ , tot suggerint una forta interacció entre ambdós receptors nuclears [Huss i col., 2004]. Un altre dels gens regulats per la família dels ERR és  $PDK4$ , a la regió promotora del qual s'hi poden unir  $ERR\alpha$  i  $ERR\gamma$  tot estimulant-ne la seva expressió [Zhang i col., 2006].

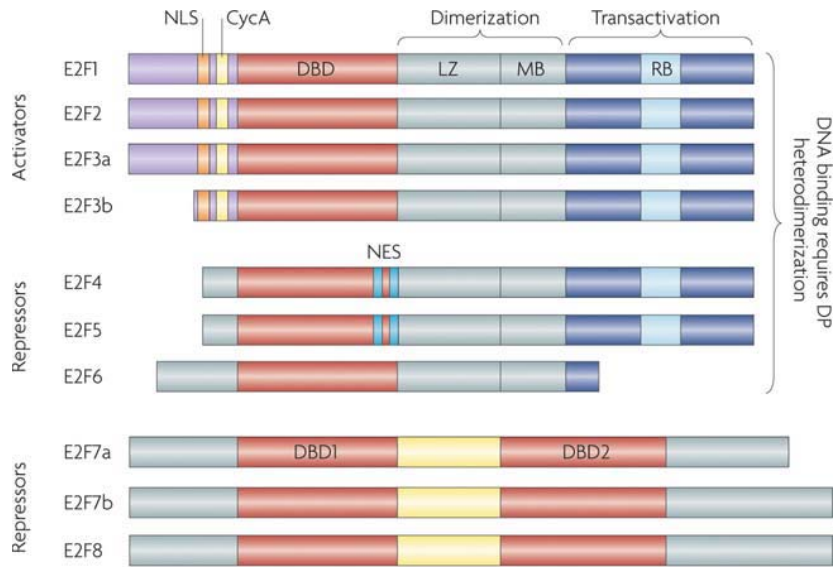
L'activitat transcripcional dels ERR depèn de la interacció amb diferents coactivadors, com són PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$  [Laganiere i col., 2004]. PGC-1 $\alpha$  actua com a coactivador de la isoforma  $ERR\alpha$  alhora que n'augmenta els nivells d'expressió gènica [Zhang i col., 2006]. La interacció entre PGC-1 $\alpha$  i  $ERR\alpha$  produeix una inducció dels processos de fosforilació oxidativa i biogènesi mitocondrial fet que concorda amb la coexpressió de PGC-1 $\alpha$  i  $ERR\alpha$  en teixits amb una elevada demanda energètica [Dufour i col., 2007]. Enfront de determinades patologies l'activitat d'aquest factor de transcripció es veu alterada. Així, en el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca es produeix un augment de la utilització de la glucosa, acompanyada d'una reducció en l'oxidació d'àcids grassos [Stanley i col., 2005], que s'ha relacionat amb una davallada en l'expressió i l'activitat tant de PGC-1 $\alpha$  com d' $ERR\alpha$  [Huss i col., 2007]. Malgrat que, aquest canvi en la font d'energia actua en un primer moment com un mecanisme compensatori, a llarg terme passa a ser una resposta maladaptativa que pot derivar cap al desenvolupament d'una insuficiència cardíaca. Així, sembla ser que la progressiva desactivació de l'eix PGC-1/ERR juga un important paper en la transició d'una hipertròfia adaptativa cap a una insuficiència cardíaca [Schilling i Kelly, 2010].

### 2.4.3. Altres factors de transcripció.

El creixement del cor de mamífers es produeix principalment per hipertròfia cel·lular, ja que un cop passat el període postnatal els cardiomiòcits perden la capacitat de dividir-se. Aquest creixement fisiològic adaptatiu permet que el cor pugui mantenir la despesa cardíaca necessària. Lesions a nivell cardíac, conseqüència d'un infart de miocardi o d'una hipertensió crònica, deriven cap a un creixement patològic del cor que pot acabar donant lloc a una insuficiència cardíaca. El desenvolupament de la hipertròfia cardíaca patològica es produeix conjuntament amb una reactivació de la maquinària del cicle cel·lular que porta cap a la transició de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular dels cardiomiòcits [Vara i col., 2003]. Entre les proteïnes implicades en la regulació de la transició d'aquest punt de control del cicle cel·lular hi trobem E2F1, del que recentment s'ha determinat que també participa en la regulació del metabolisme de la glucosa [Hlaing i col., 2004; Hsieh i col., 2008].

#### 2.4.3.1. E2F1.

El factor de transcripció E2F1 és una de les proteïnes claus en la regulació de la transició de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular, tot essent un punt crític en la proliferació i supervivència cel·lular [Vara i col., 2003]. Malgrat tot, E2F1 presenta certes activitats antagòniques. Així, en funció dels nivells d'expressió i de l'estat de la cèl·lula, pot induir proliferació cel·lular o, per contra, induir a l'apoptosi [La Thangue, 2003]. A dia d'avui s'han identificat vuit membres de la família d'E2F en cèl·lules de mamífers (E2F1-8, figura 13). Tots ells contenen un domini d'unió a l'ADN, però només els membres E2F1-5 contenen un domini de transactivació que els permet activar l'expressió gènica i en el que es troba una curta seqüència que permet la unió amb la proteïna del retinoblastoma (pRB). Els membres E2F1-6 contenen un domini que els permet heterodimeritzar amb un membre de la família DP (DP-1 o DP-2) (de l'anglès *DRTF Polypeptide*) per tal de formar complexos de transcripció funcionals anomenats DP/E2F. E2F7 i E2F8 no heterodimeritzen amb DP, però poden unir-se a l'ADN en forma d'homodímers o bé com heterodímers E2F7-E2F8.

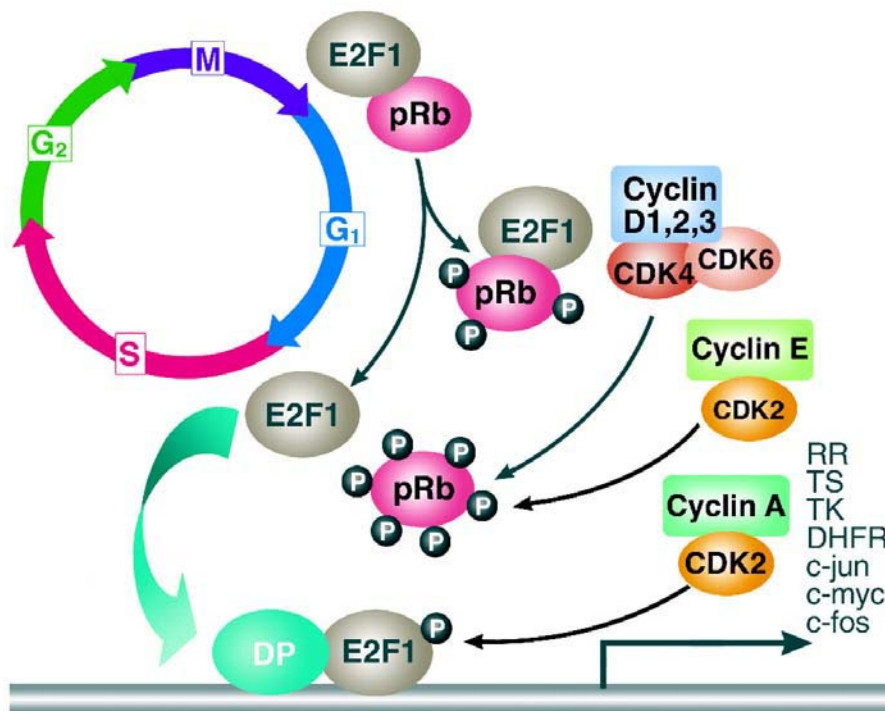


**Figura 13.** Representació esquemàtica de l'estructura dels diferents membres de la família d'E2F en mamífers [Chen i col., 2009]. DBD (*DNA Binding Domain*), NLS (*amino-terminal Nuclear Localization Signal*), NES (*Nuclear Export Signals*), RB domini d'unió a pRB, LZ (*Leuzine Zipper*), MB (*Marked Box*)

A nivell funcional podem dividir la família E2F en dos grups: E2F1-3, que actuen principalment com a activadors transcripcionals interaccionant amb histona-acetiltransferases (HAT, de l'anglès *Histone Acetyl Transferases*), essent essencials per una correcta progressió del cicle cel·lular, i E2F4-8 que principalment formen part de complexos repressors de la transcripció alhora que juguen un paper important en la inducció de la sortida del cicle cel·lular i la diferenciació [Ferreira i col., 2001; Polager i col., 2008]. L'activitat transcripcional dels membres de la família E2F és regulada per la proteïna del retinoblastoma (pRB), de manera que la interacció de pRB amb E2F1 resulta en una inhibició de l'activitat transactivadora d'aquesta última [Sellers i col., 1998]. La progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular està regulada per l'activació i inactivació de complexos proteics formats per dues subunitats, una subunitat catalítica anomenada CDK (de l'anglès *Cyclin Dependent Kinases*) i una subunitat que es troba regulant l'anterior anomenada ciclina. Quan els diferents complexos CDK/ciclina es troben activats fosforilen pRB. Aquesta fosforilació de pRB produeix la seva separació del complex E2F-DP, tot permetent la transcripció dels gens diana d'E2F [Morgan, 1997]. Entre les proteïnes regulades per E2F, i que estan involucrades en la progressió del cicle cel·lular, hi trobem la ciclina A, la ciclina E, pRB, i



el propi E2F1 [Wells i col., 2002]. No obstant, s'ha vist que el complex pRB-E2F és diana de diferents factors de creixement i senyals externs provinents de la dieta, fet que sembla indicar que l'eix  $Rb \rightarrow E2F1 \rightarrow PDK4$  permet establir una relació entre les condicions nutricionals i la conseqüent adaptació metabòlica de la cèl·lula, en particular en la regulació mitocondrial de l'oxidació de la glucosa [Hsieh i col., 2008]. Estudis recents mostren que la supressió d'E2F1 en mioblasts de ratolí produeix una disminució dels nivells d'expressió de *PDK4*, mentre que una sobreexpressió d'E2F1, en fibroblasts IMR90, augmenta els nivells d'aquest enzim [Hsieh i col., 2008]. Aquests resultats semblen indicar que E2F1 també pot regular altres gens a part dels que estan implicats en el control del cicle cel·lular, com es el cas de *PDK4* [Hlaing i col., 2004; Hsieh i col., 2008]. Així, el factor mitogènic E2F1 interacciona físicament amb el promotor de *PDK4*, tot regulant-ne la seva expressió i activitat. Degut la funció crítica de *PDK4* en el control del metabolisme de la glucosa, aquesta interacció descrita entre E2F1 i *PDK4* permet establir un vincle entre els reguladors del cicle cel·lular i el processament de les diverses fonts d'energia.



**Figura 14.** Transició de la fase G1 a la fase S. La pRB hipofosforilada s'uneix al factor de transcripció E2F1. Diferents CDK fosforilen pRB tot alliberant E2F1 que dimeritza amb DP i s'uneix a l'ADN tot induint la transcripció dels seus gens diana [Schwartz i Shah, 2005].

D'altra banda, E2F sembla jugar un paper important en el desenvolupament del càncer [Chen i col., 2009], ja que en la majoria de cèl·lules canceroses s'observen alteracions en la via de pRB-E2F. Aquestes cèl·lules tenen afectada, en gran part, la via d'oxidació de la glucosa a nivell de mitocondri tot desviant productes finals de la glucòlisi, fins i tot en condicions normòxiques, cap a la producció de lactat. Tenint en compte l'àmplia varietat de mutacions de pRB presents en els càncers humans i el paper central del complex pRB-E2F en la supervivència i la proliferació cel·lular, la interacció entre E2F i *PK4* podria ajudar a explicar les causes dels canvis en el metabolisme que s'observa en les cèl·lules hiperproliferatives, en les que es produeix una oxidació mitocondrial de la glucosa deficient tot i l'aparent necessitat d'ATP [Hsieh i col., 2008].

### **2.4.4. Coreguladors dels factors de transcripció.**

La gran majoria de receptors nuclears estan subjectes a una regulació per part de proteïnes coreguladores anomenades coactivadors o corepressors, capaces d'estimular o inhibir, respectivament, l'activitat dels factors de transcripció [McKenna i col., 1999]. Aquests coreguladors actuen formant complexos multiproteics que s'uneixen al domini AF-2 present als receptors nuclears, tot induint o reprimint la transcripció gènica. S'ha vist que les proteïnes coreguladores poden presentar activitat histona desacetilasa (HDAC) o histona acetiltransferasa (HAT) [Puigserver i col., 1998; Lin i col., 2005; Soyol i col., 2006]. Les HDAC desacetilen histones i impedeixen la transcripció, mentre que les HAT acetilen histones i per tant relaxen la cromatina, permetent l'accés de la maquinària de transcripció a regions específiques de l'ADN [Czubryt i col., 2003; Soyol i col., 2006]. En absència d'estímuls, els receptors nuclears romanen inactius, units a proteïnes corepressores, però en presència de lligand, es produeix un canvi conformacional en el receptor, que allibera les proteïnes corepressores i facilita la dimerització i interacció amb coactivadors. Aquests últims, mitjançant l'acetilació d'histones o el reclutament i estabilització dels complexos transcripcionals involucrats, permeten la interacció dels receptors nuclears amb seqüències específiques d'ADN en el nucli, modulant d'aquesta manera l'activitat transcripcional.

#### 2.4.4.1. COREPRESSORS.

En absència de lligand, o bé en presència d'antagonistes, els receptors nuclears adopten una conformació que afavoreix la unió de proteïnes corepressores. Aquests corepressors es caracteritzen per formar complexos multiproteics amb activitat histona desacetilasa, promovent la condensació de la cromatina per hipoacetilació de residus presents en les histones [Nagy i col., 1997; Heinzl i col., 1997]. Com a conseqüència d'aquesta condensació de la cromatina, es produeix una inhibició de la interacció entre els factors de transcripció i l'ADN que resulta en una reducció de l'activitat transcripcional [Spiegelman i Heinrich, 2004]. Entre aquests corepressors destaquen la proteïna RIP-140 (de l'anglès *Receptor Interacting Protein-140*), SMRT (de l'anglès *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors*) i NCoR (de l'anglès *Nuclear Receptor Corepressor*) [Miyata i col., 1998; Dowell i col., 1999].

#### 2.4.4.2. COACTIVADORS.

En presència de lligand, o mitjançant processos de fosforilació dels receptors nuclears o de proteïnes associades, es produeixen canvis conformacionals en l'estructura dels factors de transcripció que afavoreixen la unió de coactivadors transcripcionals. Els coactivadors són proteïnes o complexos proteics que augmenten la taxa d'expressió gènica mitjançant la interacció amb factors de transcripció però, que a diferència d'aquests, no s'uneixen a la seqüència d'ADN de forma específica, doncs no tenen domini d'unió a ADN [Puigserver i Spiegelman, 2003; Puigserver, 2005]. Tal i com s'ha descrit prèviament, per tal de que un coactivador sigui considerat com a tal ha d'interactuar directament amb el domini d'activació d'un receptor nuclear de manera dependent d'agonista (i no ho ha de fer en presència d'un antagonista), tot produint un increment en la funció d'activació del receptor. De fet, la majoria de coactivadors estan formats per un o més motius LXXLL (L, leucina i X, qualsevol aminoàcid), alguns dels quals són necessaris per la seva unió al LBD del corresponent receptor nuclear [Heery i col., 1997]. Per tal de ser considerat com a coactivador, també hauria d'interactuar amb components de la maquinària de transcripció basal, així com no hauria d'incrementar l'activitat transcripcional pel seu compte. De fet, en absència d'un receptor nuclear els coactivadors no poden ser reclutats als promotors i

per tant no poden coactivar la transcripció [Robyr i col., 2000]. Molts coactivadors presenten activitat enzimàtica de la que en resulta la fosforilació, acetilació, metilació o ubiquitinització de la proteïna diana en qüestió, de manera que sovint proveeixen de les activitats que els manca als factors de transcripció per dur a terme la seva funció. Els coactivadors es poden dividir en diferents grups segons les seves característiques funcionals. Així, alguns coactivadors actuen de xaperones moleculars tot dirigint la maduració i el trànsit dels receptors, com és el cas de la HSP90 (de l'anglès *Heat Shock Protein 90*). També en trobem amb activitat histona acetil transferasa (HAT), com és el cas de CBP/p300 i el SRC-1, activitat que facilita la interacció entre l'ADN i el complex proteic encarregat d'iniciar la transcripció. Altres participen en el reclutament de complexos que interactuen amb la maquinària de transcripció basal, com passa amb els membres del complex TRAP/DRIP/ARC (de l'anglès *Thyroid hormone Receptor-Associated Proteins/vitamin D Receptor-Interacting Proteins/Activator Recruited Cofactor*). Altres, com els membres del complex proteic SWI/SNF, estan implicats en la remodelació de la cromatina de manera dependent d'ATP [Wolf i col., 2008]. Altres coactivadors es caracteritzen per no presentar activitat enzimàtica pròpia, i per això necessiten formar complexos amb altres proteïnes amb activitat histona acetil transferasa. En aquest últim grup hi trobem PGC-1 $\alpha$ , un dels coactivadors més rellevants implicats en el control i regulació del metabolisme energètic, en la regulació transcripcional del qual hi està implicat el mateix PPAR [Hondares i col., 2007].

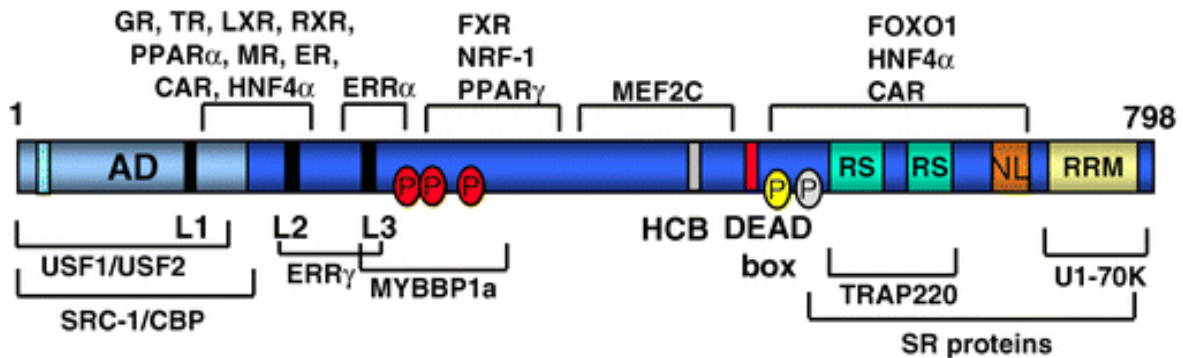
### **2.4.4.1.1. PGC-1 $\alpha$ .**

PGC-1 $\alpha$  (de l'anglès *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$* ) forma part d'una petita família de coactivadors transcripcionals que també inclou PGC-1 $\beta$  (o PERC) i el coactivador relacionat amb PGC-1 (PRC), amb una elevada homologia en els seus extrems N- i C-terminal [Puigserver i Spiegelman, 2003]. PRC presenta una expressió ubiqüa i coactiva factors de transcripció implicats en la biogènesi mitocondrial [Huss i Kelly, 2005], mentre que PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$  s'expressen en teixits amb una elevada demanda energètica i capacitat oxidativa, com són el teixit adipós marró, cor, múscul esquelètic, fetge, ronyó i cervell [Lin i col., 2005; Finck i Kelly, 2006].

PGC-1 $\alpha$  fou descrit inicialment com un coactivador de PPAR $\gamma$  i es va aïllar per primer cop en cèl·lules de teixit adipós marró de ratolí. En el mateix estudi es va demostrar que PGC-1 $\alpha$  també interacciona amb el receptor d'àcid retinoic (RAR) i el receptor d'èstrogen (ER $\alpha$ ) [Puigserver i col., 1998]. Posteriorment també s'ha demostrat que PGC-1 $\alpha$  coactiva altres factors de transcripció nuclears entre els quals trobem PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , TR (*Thyroid hormone Receptor*), FXR (*Farnesyl X Receptor*), HNF-4 (*Hepatic Nuclear Factor-4*), LXR (*Liver X Receptor*), NRF-1 (*Nuclear Regulatory Factor-1*) i factors de transcripció no nuclears com FOXO1 (*Forkhead box O1*) o MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) [Lin i col., 2005; Finck i Kelly, 2006; Soyol i col., 2006].

La proteïna PGC-1 $\alpha$ , amb un pes molecular de 92 KDa, consta de 798 aminoàcids i conté un domini d'unió a l'ARN (*RNA-binding motif*, RMM, aa 677-709) i dos dominis SR (regions riques en serina i arginina, aa 565-598 i aa 617-731) a l'extrem C-terminal (figura 15) [Puigserver i Spiegelman, 2003]. PGC-1 $\alpha$  també conté tres llocs consens (aa 238–241, 373–376 i 655–658) de fosforilació per la proteïna cinasa A (PKA), fet que suggereix que pot ésser activada per aquesta cinasa [Puigserver i col., 1998], i un lloc consens en el domini RS de fosforilació per l'Akt/PKB (Ser<sup>570</sup>) (de l'anglès *Protein Kinase B*), probablement de caire inhibidor [Soyol i col., 2006; Li i col., 2007], doncs en redueix l'estabilitat proteica [Rodgers i col., 2008]. PGC-1 $\alpha$  també pot ser fosforilada per p38 MAPK (de l'anglès *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*) en els residus Thr<sup>262</sup>, Ser<sup>265</sup> i Thr<sup>298</sup>, tot evitant la unió de corepressors, com és el cas de la proteïna p160 MBP (de l'anglès *p160 Myb Binding Protein*), en el motiu LXXLL present en aquesta regió [Fan i col., 2004]. La p38 MAPK també pot activar PGC-1 $\alpha$  indirectament per l'estimulació de diferents factors de transcripció que indueixen l'expressió de PGC-1 $\alpha$ , com són ATF2 (de l'anglès *Activating Transcription Factor 2*) i PPAR $\alpha$  [Huss i Kelly, 2005; Lin i col., 2005]. L'extrem N-terminal de PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  i PRC conté el domini d'activació transcripcional (AD, de l'anglès *Activation Domain*), mitjançant el qual recluten complexos proteics amb activitat histona acetiltransferasa com CBP/p300 i SRC-1 i que inclou el motiu LXXLL d'interacció amb receptors nuclears hormonals (PPAR, HNF4 $\alpha$ , ERR $\alpha$ ) i d'altres factors de transcripció [Puigserver i Spiegelman, 2003; Sano i col., 2007; Rodgers i col., 2008]. Els motius LXXLL de PGC-1 $\alpha$  (aa 142-146) permetrien la interacció entre el coactivador i el domini AF-2 del receptor nuclear

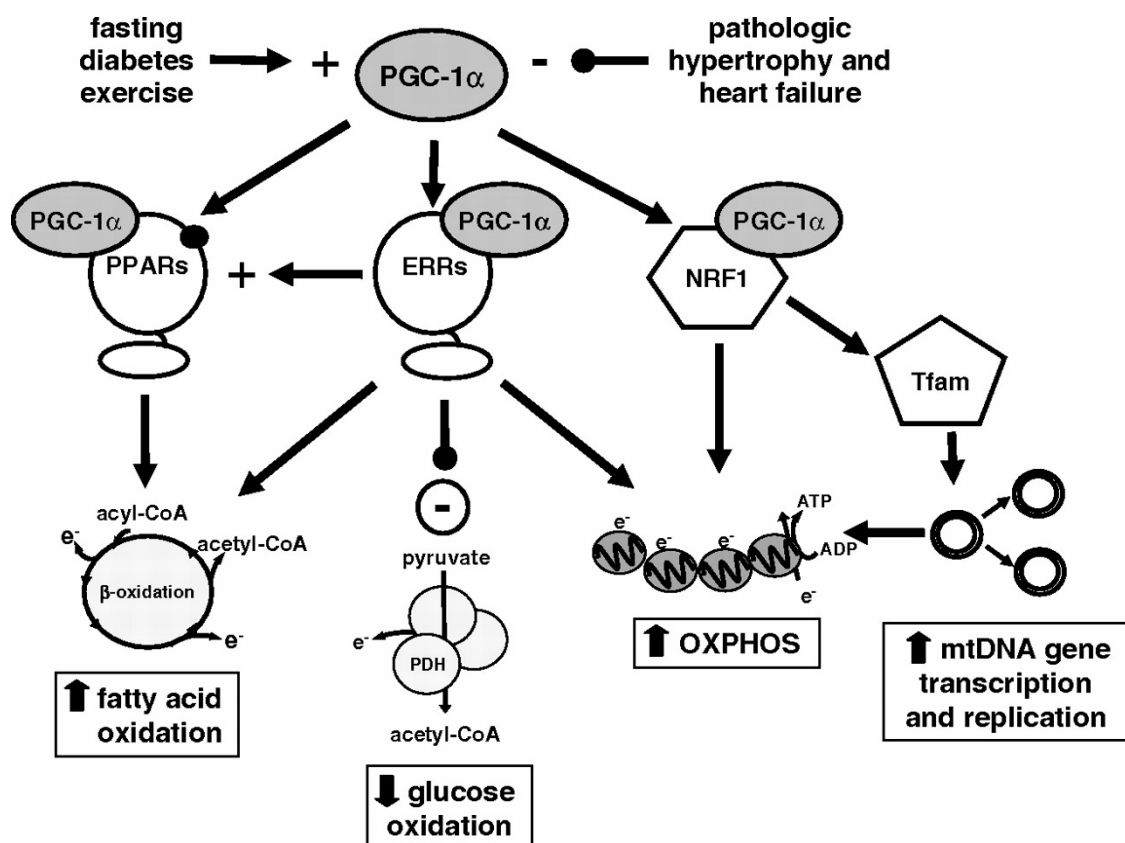
PPAR [Puigserver i col., 1998; Moore i col., 2003], essent, a més, imprescindibles per a la interacció dependent de lligand amb ER $\alpha$ , RXR $\alpha$  i GR (de l'anglès *Glucocorticoid Receptor*) [Puigserver i Spiegelman, 2003]. A més de LXXLL, altres regions de PGC-1 $\alpha$  també poden interaccionar amb factors de transcripció, com el domini entre els aa 200-400, que interacciona i coactiva PPAR $\gamma$  i NRF-1, i el domini entre els aa 400-570, que interacciona i coactiva MEF2c [Puigserver i Spiegelman, 2003; Moore i col., 2003]. D'altra banda, PGC-1 $\alpha$ , que no presenta activitat enzimàtica intrínseca, sembla interaccionar amb el domini C-terminal de la ARN polimerasa II per mitjà dels dominis SR i RMM. Malgrat tot, la coactivació per part de PGC-1 $\alpha$  també sembla reclutar i unir proteïnes amb activitat HAT, com les pròpies SRC-1 o CBP [Puigserver i Spiegelman, 2003; Puigserver, 2005; Rodgers i col., 2008].



**Figura 15.** Representació esquemàtica de l'estructura i dominis funcionals de la proteïna PGC-1 $\alpha$  humana. En l'extrem N-terminal es troba el domini d'activació (AD). PGC-1 $\alpha$  presenta tres motius LXXLL (L1-L3) altament conservats, així com tres llocs de fosforilació de la p38 MAPK (òvals vermells). En l'extrem C-terminal trobem dues regions riques en serina i arginina (RS) i un domini d'unió a ARN (RMM).

El cor expressa quantitats relativament importants de PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$  [Puigserver i Spiegelman, 2003]. L'estimulació dels gens mitocondrials per part de PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$  comporta un increment de l'activitat enzimàtica de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, del cicle de Krebs i de la fosforilació oxidativa [Lin i col., 2005; Finck i Kelly, 2007]. PGC-1 $\alpha$  actua com a regulador crucial del metabolisme oxidatiu durant el desenvolupament cardíac o en resposta a estrès [Lin i col., 2005; Finck i Kelly, 2006]. De fet, PGC-1 $\alpha$  coactiva PPAR $\alpha$  i ERR $\alpha$ , receptors nuclears que activen la transcripció de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos, la oxidació de glucosa i respiració mitocondrial [Finck i Kelly, 2006; Finck i Kelly, 2007]. PGC-1 $\alpha$  també coactiva NRF-1 i 2 que són activadors transcripcionals de gens nuclears que codifiquen per proteïnes de

la cadena respiratòria mitocondrial (fosforilació oxidativa) i proteïnes nuclears que regulen la transcripció de gens mitocondrials, com Tfam (de l'anglès *Transcription factor of activated mitochondria*) (figura 16) [Lehman i col., 2000; Finck i Kelly, 2007]. Així, la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  en cardiomiòcits *in vitro* o *in vivo* indueix MCAD, M-CPT-1 i la subunitat  $\beta$  de l'ATP sintetasa mitocondrial, a més d'augmentar l'expressió de gens del cicle TCA (com la citrat sintetasa, enzim limitant del cicle de Krebs) o de la cadena de transport d'electrons/fosforilació oxidativa [Lehman i col., 2000; Puigserver i Spiegelman, 2003; Finck i Kelly, 2006]. Aquest fet, conjuntament amb la coactivació d'ERR $\alpha$  i NRF, provoca que PGC-1 $\alpha$  estimuli la biogènesi mitocondrial (creixement i divisió de mitocondris preexistents) i la cadena de transport d'electrons, que augmenten la capacitat productora d'ATP [Finck, 2007] i incrementen el consum d'oxigen [Lehman i col., 2000; Finck i Kelly, 2007].



**Figura 16.** Representació esquemàtica de la cascada de regulació gènica de PGC-1 $\alpha$  en cardiomiòcits. PGC-1 $\alpha$  coactiva PPAR tot activant la expressió de gens involucrats en l'oxidació d'àcids grassos, així com ERR $\alpha$  tot incrementant l'expressió d'enzims associats a l'oxidació d'àcids grassos i a la fosforilació oxidativa (OXPHOS) i inhibint l'oxidació de glucosa. PGC-1 $\alpha$  també coactiva NRF-1 tot incrementant l'expressió de gens que codifiquen per enzims nuclears i mitocondrials involucrats en la fosforilació oxidativa, efecte que també es troba regulat de forma secundària per factors de transcripció mitocondrials com Tfam [Finck i Kelly, 2007].

En diferents estudis s'ha observat que en formes patològiques d'hipertròfia cardíaca, en models murins d'hipòxia, malaltia isquèmica cardíaca, i en cardiomiòcits en cultiu en presència d'agonistes prohipertròfics, l'expressió i activitat de PGC-1  $\alpha$ , i la de les seves dianes, es troba reduïda [Huss i Kelly, 2005; Finck i Kelly, 2007; Duncan i Finck, 2008]. Per tal de poder estudiar els efectes d'aquesta reducció, s'han emprat, entre d'altres, ratolins *knockout* per PGC-1 $\alpha$ , que mostren una reducció basal de l'expressió de gens mitocondrials en fetge, cervell, múscul esquelètic i cor.



### 3. INFLAMACIÓ EN EL COR.

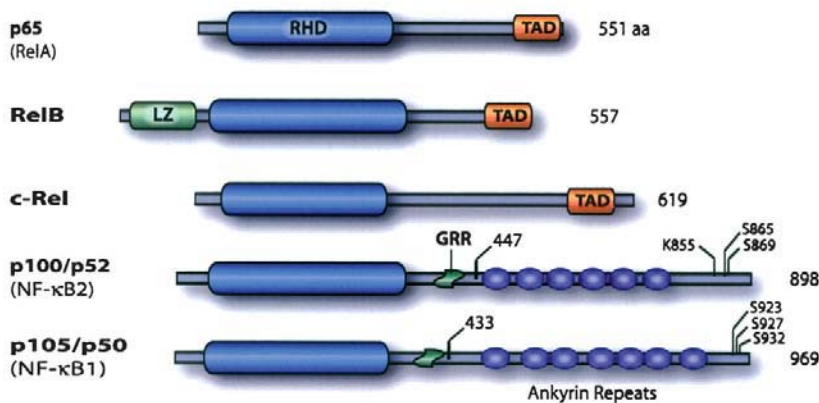
S'ha descrit que l'obesitat està associada a una sèrie d'efectes adversos sobre la fisiologia cardiovascular i és considerada com un important factor de risc enfront al desenvolupament de la insuficiència cardíaca [Loehr i col., 2010]. També s'ha observat que alteracions en el metabolisme participen en el desenvolupament del procés etiopatogènic d'algunes malalties cardíques [Neglia i col., 2007]. Cada vegada són més les evidències que ens mostren l'existència d'un possible vincle entre la inflamació crònica de baix grau i els trastorns metabòlics que s'associen amb un augment del nivell d'àcids grassos saturats, com ara la resistència a la insulina, l'obesitat manifesta i la diabetis tipus 2. Al cor, el greix de la dieta afecta l'expressió gènica, l'estructura, el metabolisme i la funció contràctil, factors dels que en poden derivar tota una sèrie d'efectes adversos sobre la fisiologia cardiovascular. De fet, dietes amb un elevat contingut en greixos (HFD) s'han relacionat amb una sèrie d'efectes cardíacs directes com són la inflamació, hipertròfia i disfunció contràctil [Tikellis i col., 2008]. Aquestes malalties estan associades a un increment significatiu de l'expressió d'*IL-6*, *TNF- $\alpha$*  i *MCP-1* en cor [Tikellis i col., 2008], citocines que alhora estan implicades en el desenvolupament i progressió de la insuficiència i la hipertròfia cardíques.

#### 3.1. Mecanismes moleculars implicats.

Durant el procés inflamatori que es produeix en les esmentades malalties cardiovasculars, el cor humà secreta citocines i quimiocines proinflamatòries. Entre elles, trobem *TNF- $\alpha$*  (de l'anglès *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), *MCP-1* (de l'anglès *Monocyte Chemotactic Protein-1*) i *IL-6* [Ancey i col., 2003]. Aquestes citocines inflamatòries estan sota el control transcripcional d'un factor de transcripció anomenat factor nuclear  $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*, de l'anglès *Nuclear Factor- $\kappa$ B*), l'activació del qual està involucrada en diferents malalties cardiovasculars com la hipertròfia i la insuficiència cardíaca [Araki i col., 2008; Gupta i col., 2008].

**3.1.1. Via NF-κB.**

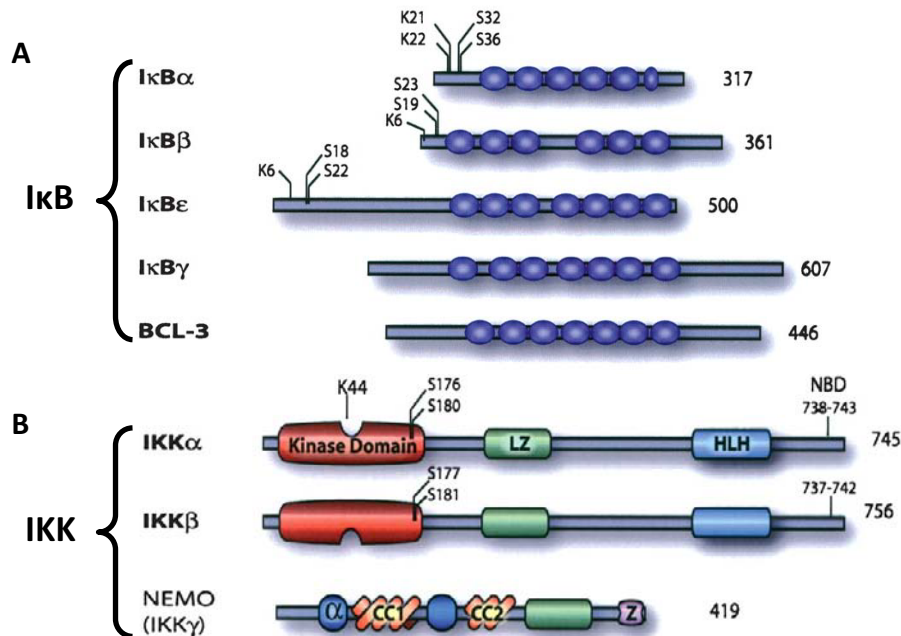
NF-κB és un factor de transcripció induïble i expressat de forma ubiqua que està involucrat en els processos d'apoptosi i proliferació cel·lular i en el desenvolupament de la resposta inflamatòria [Perkins, 2007]. En mamífers, NF-κB consta de cinc membres, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) i p52/p100 (NF-κB2) que formen complexos com a homo- o heterodímers (figura 17).



**Figura 17.** Representació esquemàtica dels membres de la família de proteïnes NF-κB. A la dreta s'indica en número d'aminoàcids de cada proteïna. RHD (domini d'homologia Rel); TAD (domini de transactivació); LZ (domini de cremallera de leucines) [Hayden i Ghosh, 2004].

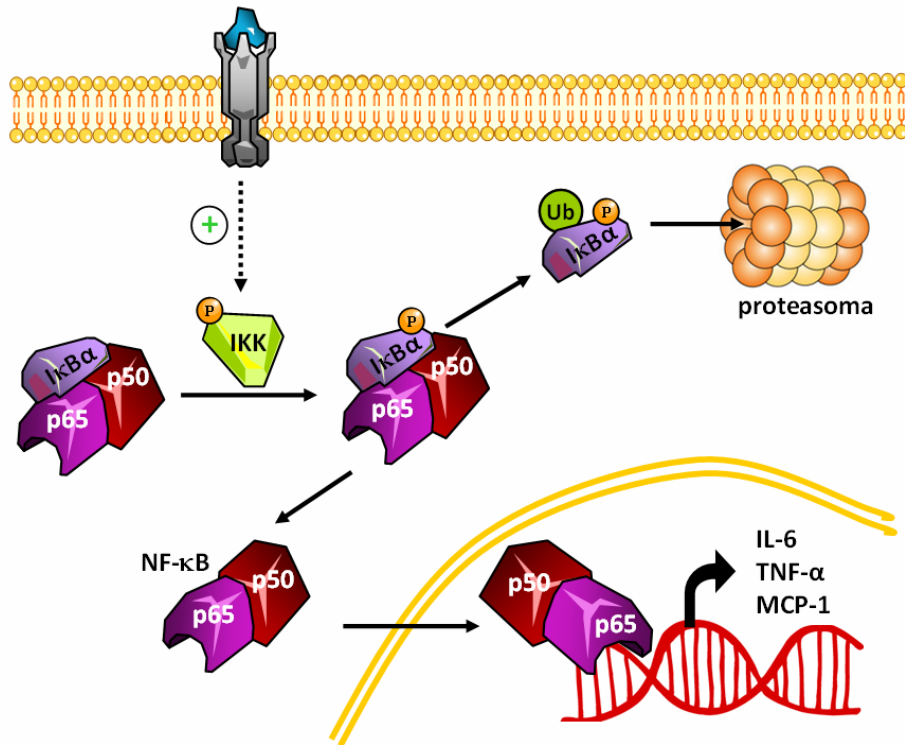
Tots els membres de NF-κB comparteixen un domini RHD (de l'anglès *Rel-Homology Domain*) a l'extrem N-terminal necessari per a la dimerització, per la translocació al nucli, per l'associació amb proteïnes inhibidores, com IκB (de l'anglès *Inhibitory κB*), i per la unió a l'ADN [Winther i col., 2005]. Només les formes p65, RelB i c-Rel contenen en el seu extrem C-terminal el domini TAD (de l'anglès *Transcription Activation Domain*), necessari per tal de poder activar la transcripció dels seus gens diana, de manera que tant p50 com p52 han d'heterodimeritzar amb alguna de les subunitats que contenen aquest domini per ser capaces d'activar la transcripció [Hayden i Ghosh, 2004]. La forma més abundant de NF-κB en mamífers sol ser l'heterodímer format per p65/p50, essent p65 el que conté el potent domini d'activació transcripcional [Vermeulen i col., 2003]. Aquest factor de transcripció es pot veure activat per tota una sèrie d'estímuls exògens, com són els lipopolisacàrids dels bacteris gram negatius [Li i col., 2002] i endògens, com estats d'hiperglucèmia, nivells alts d'àcids grassos lliures [Jove i col., 2005], espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*) [Gloire i col., 2006] i per diferents mediadors inflamatoris com TNF-α i IL [Brasier, 2010], que s'alliberen durant el procés inflamatori que es produeix en malalties cardiovasculars, com la hipertròfia o la insuficiència

cardíacques [Zandi i col., 1997]. En cèl·lules no estimulades, NF- $\kappa$ B es troba inactiu al citosol degut a la seva unió a I $\kappa$ B, que li impedeix translocar a nucli [Gupta i col., 2008]. Existeixen set membres de la família I $\kappa$ B: les I $\kappa$ B típiques (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  i I $\kappa$ B $\epsilon$ ), les I $\kappa$ B atípiques (Bcl-3 i I $\kappa$ B $\gamma$ ) (figura 18 A) i els precursors de les proteïnes p100 i p105.



**Figura 18.** Representació esquemàtica dels membres de les famílies de proteïnes I $\kappa$ B (A) i IKK (B). A la dreta s'indica en número d'aminoàcids de cada proteïna. NBD (domini d'unió a NEMO); LZ (domini de cremallera de leucines); Z (domini dits de Zn<sup>2+</sup>) [Hayden i Ghosh, 2004].

La degradació de les proteïnes I $\kappa$ B és regulada per la cinasa d'I $\kappa$ B (IKK). Aquesta proteïna consta de dues subunitats catalítiques (IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ ) i una subunitat reguladora (IKK $\gamma$  o NEMO, de l'anglès *NF- $\kappa$ B Essential Modifier*) (figura 18 B). En presència d'un estímul, com és el cas de la citocina proinflamatòria TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B és fosforilada per la IKK, convertint-se en substrat per la ubiquitinització i essent posteriorment degradada pel proteasoma. D'aquesta manera, l'heterodímer NF- $\kappa$ B queda lliure i pot translocar al nucli, on s'unirà a seqüències específiques dels promotors dels seus gens diana, tot activant-ne la transcripció (figura 19) [Nakano i col., 1998]. El potencial de transactivació de NF- $\kappa$ B requereix de la presència de coactivadors amb activitat HAT, com CBP/p300, p/CAF i SRC-1 [Miao i col., 2004]. D'altra banda, s'han descrit diferents compostos que actuen inhibint l'activació de NF- $\kappa$ B com el partenolide, que produeix la retenció citoplasmàtica de NF- $\kappa$ B, tot estabilitzant I $\kappa$ B $\alpha$  [Hehner i col., 1998; Kwok i col., 2001], o la pirrolidina ditiocarbamat (PDTC) [Kumar i col., 2010].



**Figura 19.** Esquema de l'activació de NF-κB. Diferents estímuls poden provocar la ubiquitinització i posterior degradació per part del proteasoma de la proteïna IκB, tot alliberant NF-κB i permetent la translocació a nucli on augmenta l'expressió dels seus gens diana [Winther i col., 2005].

Entre els gens més rellevants induïts per NF-κB trobem gens proinflamatoris com IL-1β, TNF-α, MCP-1 i IL-6, però també en trobem altres com IκBα (taula 1). Així, el propi NF-κB indueix la síntesi de proteïnes IκBα que s'uneixen a aquest factor de transcripció, fent que retorni al citoplasma i finalitzi la seva activitat transcripcional, evitant així una activació excessiva de la via de NF-κB [Arenzana-Seisdedos i col., 1995].

Funció	Gens diana de NF-κB
<b>Reguladors de la inflamació</b>	
Citocines/quimiocines	TNFα, IL-8, IL-6, IL-12, IL-1α, IL-1β, MCP-1
Molècules d'adhesió cel·lular	ICAM-1, VCAM-1, E-selectin i P-selectin
Antioxidants	Mn-SOD, SOD1
Enzims	MMP-1/3, iNOS, COX-2 i PLA <sub>2</sub>
Factors de transcripció	GATA3, STAT4, IRF-1, p105, p100, c-Myc i IRF-2
Moduladors	IL-2, Cyclin D1, VEGF, IL-6, c-Myc, TRAF1-2 i IκBα
<b>Reguladors apoptòtics</b>	A1, c-IAPs, c-FLIP, Bcl-xl, Bcl-2 i GADD45β
<b>Reguladors de l'angiogènesi</b>	VEGF i MMP-9

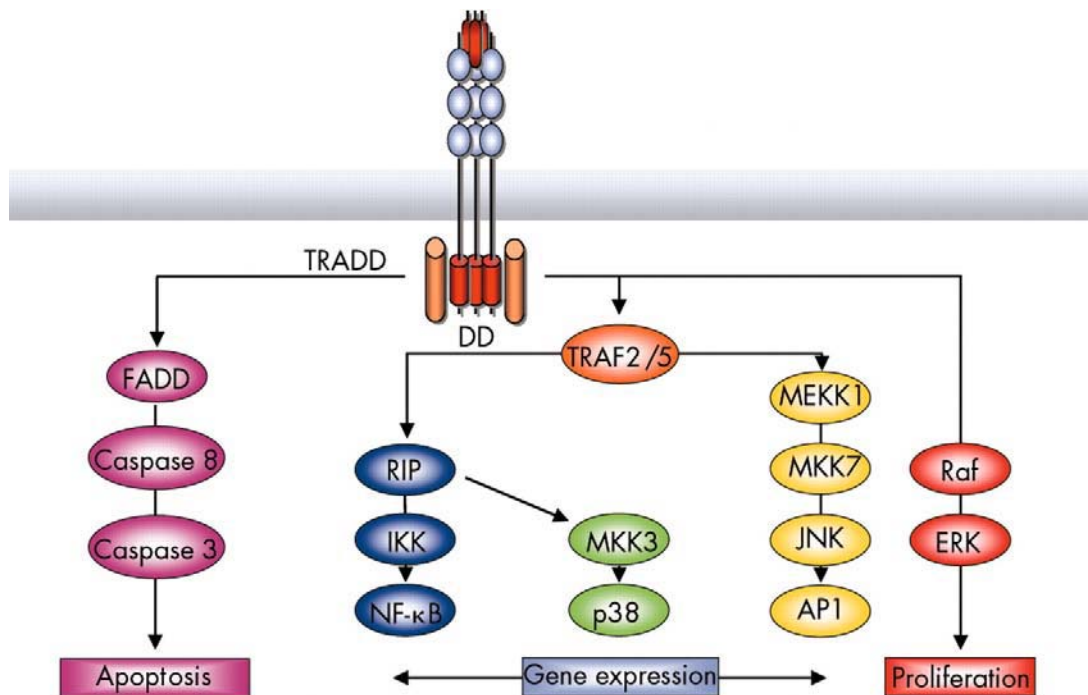
**Taula 1.** Alguns dels gens diana de NF-κB i la seva funció associada [Heiden K. i col., 2010].

### 3.1.2. Estímuls proinflamatoris.

#### 3.1.2.1. TNF- $\alpha$ .

El factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és una citocina proinflamatòria secretada pel miocardi en resposta a diferents estímuls, que a curt termini indueix efectes inotròpics negatius [Yokoyama i col., 1993]. Un increment mantingut en la secreció de TNF- $\alpha$ , que actua principalment de forma autocrina, s'ha relacionat amb diversos processos patològics com la hipertròfia i la insuficiència cardíaca [Oral i col., 1995; Stetson i col., 2001]. A nivell cel·lular, s'ha observat que aquesta citocina participa en l'activació de diverses vies de senyalització que modulen un ampli espectre de respostes que inclouen la diferenciació, la supervivència, la proliferació i la mort cel·lular, així com la resposta inflamatòria [Bradley, 2008]. TNF- $\alpha$  és majoritàriament sintetitzat com una proteïna transmembrana estructurada en homotrímers estables [Tang i col., 1996], que per l'acció d'una metaloproteasa anomenada TACE (de l'anglès *TNF Alpha Converting Enzyme*, també coneguda com ADAM17) s'escindeix de la membrana tot obtenint la forma trimèrica soluble de TNF- $\alpha$  de 51 KDa [Black i col., 1997]. Cadascun dels monòmers de 17 KDa que integren el trímer consta de 185 aminoàcids, i presenta una estructura típica de la família TNF, consistent en dues làmines  $\beta$  plegades antiparal·leles formades per filaments  $\beta$  antiparal·lels [Wajant i col., 2003]. Els membres de la família TNF duen a terme les seves funcions biològiques mitjançant la interacció amb el seus respectius receptors de membrana (figura 20) [Locksley i col., 2001]. En el cas de TNF- $\alpha$  s'ha determinat que es pot unir a dos receptors diferents de la superfície cel·lular, anomenats TNF-R1 i TNF-R2. El primer és activat tant per la forma soluble de TNF- $\alpha$  com per la unida a membrana, mentre que TNF-R2 respon majoritàriament a l'homotrímer de TNF- $\alpha$  unit a membrana [Grell i col., 1995]. Ambdós receptors s'expressen en el cor adult humà [Torre-Amione i col., 1995], però a diferència de TNF-R1, que presenta una expressió més generalitzada, TNF-R2 es troba principalment en cèl·lules del sistema immune [Grell i col., 1995]. Les diferències en els dominis intracel·lulars d'aquests dos receptors, que no presenten activitat enzimàtica, permeten establir aquests receptors com a membres representatius de dos subgrups diferents de la família de receptors de TNF. Així, mentre que TNF-R2

interactua directament amb les proteïnes TRAF (de l'anglès *TNF Receptor-Associated Factor*), TNF-R1 conté un domini d'interacció proteïna-proteïna anomenat DD (de l'anglès *Death Domain*) que pot reclutar altres proteïnes amb aquest mateix domini. Entre aquestes proteïnes es troba TRADD, que unida a TNF-R1 serveix de plataforma d'unió amb TRAF2, de manera que la via de senyalització dels dos receptors està interconnectada [Wajant i col., 2003].



**Figura 20.** Esquema de les vies de senyalització de TNF- $\alpha$ . Aquesta citocina participa en l'activació de múltiples vies que modulen diferents processos cel·lulars [Clark i col., 2005].

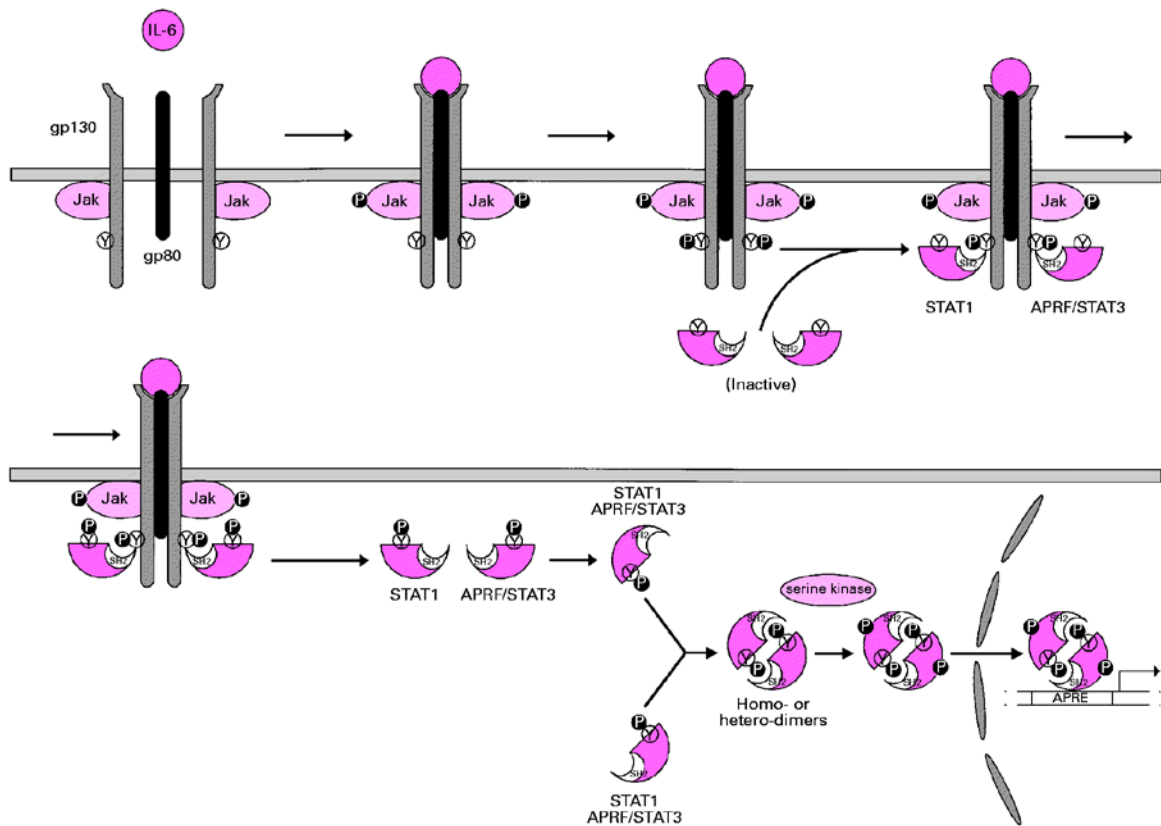
La majoria dels efectes biològics coneguts de TNF- $\alpha$  són mitjançats a través de l'activació de TNF-R1 [MacEwan, 2002]. Després de la unió de TNF- $\alpha$  a TNF-R1, aquest sofreix un canvi conformacional que comporta la dissociació de la proteïna inhibidora SODD del domini DD de TNF-R1, tot permetent que la proteïna adaptadora TRADD sigui reclutada. Aquesta proteïna actua de plataforma per a la subseqüent unió de diferents proteïnes, entre les que trobem TRAF2 i RIP (de l'anglès *Receptor-Interacting Protein*), que al seu torn s'encarreguen, respectivament, de reclutar i activar la cinasa IKK [Wajant i col., 2003]. TNF- $\alpha$  també pot activar altres vies de senyalització com la cascada de les MAPK. Aquestes cinases, que estan implicades en nombrosos processos cel·lulars i que poden interaccionar a diferents nivells en les seves vies de senyalització, juguen un paper molt important en la transmissió de senyals captats per receptors de

membrana cap a la maquinària transcripcional del nucli, per mitjà de la fosforilació i regulació de múltiples factors de transcripció. Aquestes MAPK, de les que en cèl·lules de mamífers en trobem tres subfamílies, ERK (de l'anglès *Extracellular signal-Regulated Kinases*), p38 MAPK i JNK (de l'anglès *c-Jun N-terminal Kinases*), són essencials per la diferenciació, apoptosi i regulació del creixement cel·lular [Wajant i col., 2003]. Tant JNK com p38 MAPK també són conegudes com a proteïnes cinases activades per estrès, ja que les citocines proinflamàtores i l'estrès ambiental en produeixen l'activació [Frey i Olson, 2003]. S'ha descrit que TNF- $\alpha$  pot activar les tres cascades de MAPK [Wajant i col., 2003], malgrat que en estudis recents s'ha demostrat que, en fibroblasts cardíacs, TNF- $\alpha$  activa les vies ERK-1/2 i p38 MAPK, però no la via JNK [Turner i col., 2007].

### 3.1.1.2. IL-6.

Una altra de les citocines proinflamàtores d'expressió induïda per NF- $\kappa$ B és IL-6, una glicoproteïna d'aproximadament 25 kDa i d'efectes pleiotròpics, que pot actuar de manera autocrina o paracrina [Schilling i Kelly, 2010]. La secreció d'aquesta citocina es dona en monòcits i macròfags, fibroblasts, cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars esquelètiques i en adipòcits. Aquest últim teixit és el responsable d'entre el 10 i el 35% de l'IL-6 circulant, quantitat que es veu incrementada quan es dona un augment de l'adipositat. De fet, s'ha demostrat que els àcids grassos lliures poden activar la producció d'IL-6 a través de la via de NF- $\kappa$ B [Weigert i col., 2004]. En condicions normals, els nivells plasmàtics d'IL-6 són baixos, però enfront de diferents estímuls fisiològics o patològics com l'exercici, la sèpsia o lesió muscular, la seva producció es pot veure augmentada [Schmidt i Duncan, 2003; Plomgaard i col., 2005]. A nivell cardíac, s'ha demostrat que les citocines de la família IL-6 indueixen hipertròfia dels cardiomiòcits alhora que n'inhibeixen l'apoptosi [Ancey i col., 2003]. La via de senyalització d'IL-6 desencadena l'activació de la via JAK/STAT (figura 21) [Kerr i col., 2003]. IL-6 s'uneix a la subunitat  $\alpha$  del seu receptor (IL-6R $\alpha$ ), un polipèptid de 80 kDa amb un domini citoplasmàtic molt curt. Aquesta unió estimula l'associació d'IL-6R $\alpha$  amb gp130 (la subunitat  $\beta$  del receptor d'IL-6, de 130 kDa), que posteriorment

homodimeritza, tot permetent l'autofosforilació creuada de la JAK (*Janus Activated Kinase*). JAK1 fosforila gp130 en determinats residus tirosina que són reconeguts pel domini SH2 (*Src Homology 2*) de STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). La interacció entre STAT-3 i gp130 permet a JAK1 fosforilar a STAT-3 en els residus tirosina 705, tot possibilitant la dimerització de STAT-3 i la seva posterior translocació a nucli, on regula la transcripció de gens implicats en angiogènesi, inflamació, apoptosi, senyalització cel·lular i formació de la matriu extracel·lular [Boengler i col., 2008].

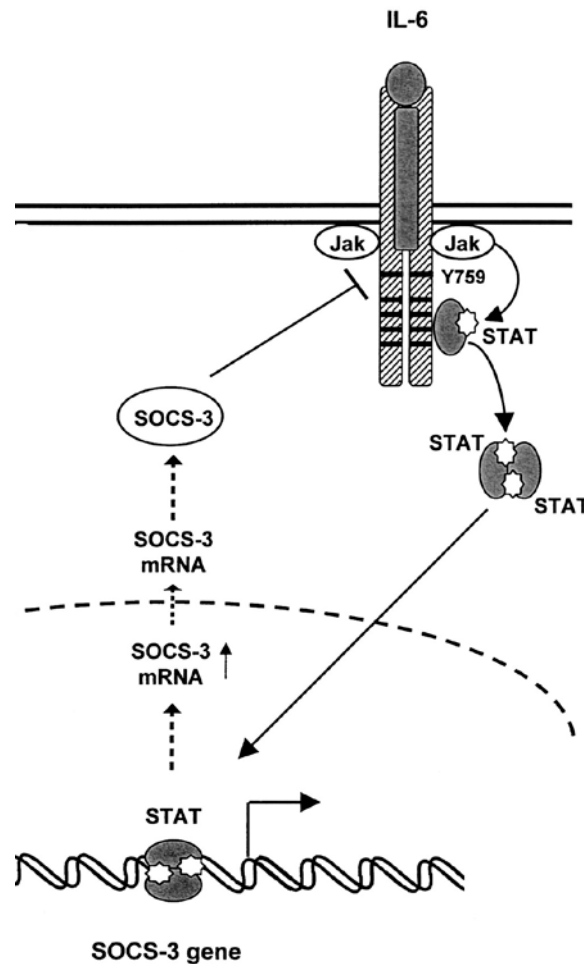


**Figura 21.** Esquema de la via de senyalització d'IL-6. Aquesta citocina desencadena l'activació de la via JAK/STAT [Heinrich i col., 1998].

La fosforilació de STAT-3 en serina 727 promou encara més aquesta activitat transcripcional. Però no només la fosforilació regula l'activitat STAT, ja que SOCS-3 (*Supresor Of Cytokine Signaling 3*), un dels gens activats per aquest factor de transcripció, presenta un domini SH2 que li permet interaccionar amb el receptor d'IL-6, tot impedit la unió de STAT, i inhibint així la via de senyalització JAK/STAT. D'aquesta forma, SOCS-3 regula l'activitat del propi STAT-3 tot actuant com un



mecanisme de retroalimentació negativa (figura 22) [Murray, 2007]. S'ha descrit que processos com la hipòxia, la isquèmia o la hipertròfia cardíaca incrementen els nivells d'IL-6 i gp130, sovint associats a increments de STAT-1 i STAT-3, suggerint un paper important de la via JAK/STAT en aquestes patologies [Boengler i col., 2008].



**Figura 22.** Mecanisme de retroalimentació negativa en la via de senyalització de JAK/STAT. STAT activa la transcripció de *SOCS-3* que s'uneix al receptor d'IL-6 tot implicant l'activació de la via JAK/STAT [Terstegen i col., 2000].



**OBJECTIUS**

---



El consum de dietes amb un elevat contingut en greixos s'ha relacionat amb una sèrie d'alteracions cardíaques directes com són la inflamació, la hipertròfia i la disfunció contràctil. No obstant això, els mecanismes mitjançant els quals la ingesta excessiva de greix participa en el desenvolupament i la progressió d'aquests trastorns són molt complexes i poc coneguts, ja que estan lligats a alteracions metabòliques sistèmiques i a canvis en el fenotip dels cardiomiòcits. L'objectiu general d'aquest treball ha estat aprofundir en els mecanismes moleculars que relacionen les alteracions metabòliques i els processos inflamatoris que es produeixen en el cor, per tal de poder buscar potencials dianes farmacològiques que ens permetin prevenir i tractar aquests estats patològics. Més concretament, els objectius plantejats en aquesta tesi doctoral han estat els següents:

- I. Avaluar els efectes proinflamatoris d'una dieta rica en greixos en el cor de ratolins, així com de l'àcid gras saturat palmitat en cardiomiòcits humans AC16.
- II. Determinar si l'activador de PPAR $\beta/\delta$  GW501516 és capaç de revertir aquesta resposta inflamatòria en cèl·lules cardíaques.
- III. Estudiar el efectes del desenvolupament d'un estat proinflamatori sobre el metabolisme dels cardiomiòcits humans AC16 tractats amb la citocina TNF- $\alpha$ .
- IV. Aprofundir en els mecanismes moleculars que vinculen un increment de l'estat proinflamatori amb els canvis metabòlics que es produeixen en cardiomiòcits humans AC16.



# **RESULTATS**

---





Publicació 1

**PPAR $\beta$ / $\delta$  activation blocks lipid-induced  
inflammatory pathways in mouse heart and  
human cardiac cells**

**David Álvarez-Guardia**, Xavier Palomer, Teresa Coll, Lucía Serrano,  
Ricardo Rodríguez-Calvo, Mercy M. Davidson, Manuel Merlos, Ilhem El  
Kochairi, Liliane Michalik, Walter Wahli, Manuel Vázquez-Carrera

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids (2010)

Que en la categoria BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY es troba en  
la posició 65 de 283 (Q1)

Índex d'impacte (2009): 4,357

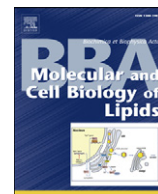


Com a conseqüència del seu alt contingut en greixos, la dieta Western clàssica o també anomenada HFD (de l'anglès *High Fat Diet*) presenta un ampli rang d'efectes adversos sobre el cor, entre els que hi trobem un increment de l'estat inflamatori, la hipertròfia i la disfunció contràctil. Diversos factors proinflamatoris secretats per les cèl·lules cardíaques, que estan sota el control transcripcional del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), poden contribuir al desenvolupament de la insuficiència cardíaca i de la cardiomiopatia dilatada. Els mecanismes subjacents involucrats en aquest procés són complexes, ja que estan vinculats a anomalies metabòliques sistèmiques i a canvis en el fenotip dels cardiomiòcits.

Els receptors activats per proliferadors peroxisòmics (PPARs) són factors de transcripció involucrats en la regulació del metabolisme dels que s'ha observat que també poden participar en la reducció de la inflamació i la hipertròfia cardíaques a través de la inhibició de NF- $\kappa$ B. Donat que PPAR $\beta/\delta$  és la isoforma de PPAR majoritària en el cor, es van analitzar els efectes de GW501516, agonista de PPAR $\beta/\delta$ , en els paràmetres inflamatoris.

Una dieta rica en greixos indueix l'expressió de citocines com el factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la proteïna quimiotàctica de monòcits-1 (MCP-1) i la interleucina-6, així com un augment de l'activitat de NF- $\kappa$ B en el cor de ratolí. Aquest increment del perfil proinflamatori observat en els ratolins alimentats amb una HFD va revertir al ser tractats amb GW501516. Es van obtenir resultats similars quan cèl·lules cardíaques humanes AC16 exposades a palmitat es van coincubar amb GW501516. D'altra banda, l'activació de PPAR $\beta/\delta$  induïda per GW501516 va incrementar la interacció física entre PPAR $\beta/\delta$  i p65, el que suggereix que aquest mecanisme també podria interferir en la capacitat de transactivació de NF- $\kappa$ B en cor. Aquesta activació de PPAR $\beta/\delta$  per part de GW501516 sembla atenuar la resposta inflamatòria induïda en les cèl·lules cardíaques humanes (AC16) exposades a l'àcid gras saturat palmitat i en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos. Aquest fet és rellevant ja que s'ha postulat PPAR $\beta/\delta$  com una potencial diana en el tractament de l'obesitat i l'estat de resistència a la insulina.





## PPAR $\beta/\delta$ activation blocks lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells

David Álvarez-Guardia<sup>a,1</sup>, Xavier Palomer<sup>a,1</sup>, Teresa Coll<sup>a</sup>, Lucía Serrano<sup>a</sup>, Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>a</sup>, Mercy M. Davidson<sup>b</sup>, Manuel Merlos<sup>a</sup>, Ilhem El Kochairi<sup>c</sup>, Liliane Michalik<sup>c</sup>, Walter Wahli<sup>c</sup>, Manuel Vázquez-Carrera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, University of Barcelona, Building A, 643 Diagonal, E-08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Radiation Oncology, Columbia University, P&S 11-451, 630 West 168th Street, New York, NY 10032, USA

<sup>c</sup> Center for Integrative Genomics, National Research Center Frontiers in Genetics, University of Lausanne, Quartier UNIL-Sorge, Bâtiment Génopode, CH-1015 Lausanne, Switzerland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 July 2010

Received in revised form 21 October 2010

Accepted 2 November 2010

Available online 9 November 2010

#### Keywords:

High-fat diet

Inflammation

Heart

NF- $\kappa$ B

Nuclear factor- $\kappa$ B

Peroxisome proliferator-activated receptor

### ABSTRACT

Owing to its high fat content, the classical Western diet has a range of adverse effects on the heart, including enhanced inflammation, hypertrophy, and contractile dysfunction. Proinflammatory factors secreted by cardiac cells, which are under the transcriptional control of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), may contribute to heart failure and dilated cardiomyopathy. The underlying mechanisms are complex, since they are linked to systemic metabolic abnormalities and changes in cardiomyocyte phenotype. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are transcription factors that regulate metabolism and are capable of limiting myocardial inflammation and hypertrophy via inhibition of NF- $\kappa$ B. Since PPAR $\beta/\delta$  is the most prevalent PPAR isoform in the heart, we analyzed the effects of the PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 on inflammatory parameters. A high-fat diet induced the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-6, and enhanced the activity of NF- $\kappa$ B in the heart of mice. GW501516 abrogated this enhanced proinflammatory profile. Similar results were obtained when human cardiac AC16 cells exposed to palmitate were coincubated with GW501516. PPAR $\beta/\delta$  activation by GW501516 enhanced the physical interaction between PPAR $\beta/\delta$  and p65, which suggests that this mechanism may also interfere NF- $\kappa$ B transactivation capacity in the heart. GW501516-induced PPAR $\beta/\delta$  activation can attenuate the inflammatory response induced in human cardiac AC16 cells exposed to the saturated fatty acid palmitate and in mice fed a high-fat diet. This is relevant, especially taking into account that PPAR $\beta/\delta$  has been postulated as a potential target in the treatment of obesity and the insulin resistance state.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Under various pathological stimuli, the human heart can secrete proinflammatory cytokines and chemokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and interleukin-6 (IL-6) [1]. These molecules exert several autocrine pleiotropic effects in cardiac cells that may contribute to states that are associated with myocardial inflammation, such as ischemic myocardial injury, heart failure, and dilated cardiomyopathy [2,3]. Proinflammatory cytokines are under the transcriptional control of

the ubiquitous inducible nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which is activated in myocarditis, congestive heart failure, and cardiac hypertrophy [4].

Owing to its high fat content, the classical Western diet has several adverse effects on cardiovascular physiology that seem to account for the development of cardiovascular diseases. Indeed, high-fat diets have been related to a range of direct cardiac effects, including inflammation, hypertrophy, fibrosis, and contractile dysfunction [5]. However, little is known about the mechanistic effects of fat intake on the development and progression of such disorders. The underlying mechanisms are complex, since they are linked to systemic metabolic abnormalities and changes in cardiomyocyte phenotype. For instance, during the development of heart failure and cardiac hypertrophy, the myocardial energy substrate switches from fatty acids to glucose [6,7]. The uptake and metabolism of these substrates is under the transcriptional control of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). In order to be transcriptionally active, PPARs need to heterodimerize with the 9-*cis* retinoic acid receptor (NR2B). These heterodimers bind to specific DNA sequences called peroxisome

*Abbreviations:* AMPK, AMP-activated protein kinase; HFD, high-fat diet; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024531; fax: +34 93 4035982.

E-mail address: [mvazquezcarrera@ub.edu](mailto:mvazquezcarrera@ub.edu) (M. Vázquez-Carrera).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

proliferator-response elements (PPRE), which are located within the promoter regions of PPAR target genes. The PPAR subfamily consists of three subtypes: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) and PPAR $\gamma$  (NR1C3). PPAR $\beta/\delta$  is the predominant form in cardiac cells and is the only PPAR subtype that is not a target of current drugs, even though several synthetic ligands have been developed, namely GW0742, GW501516, and L-165041, which are useful for studying PPAR $\beta/\delta$  functions.

Recent evidence suggests that PPARs may attenuate inflammatory signaling pathways and, as such, interfere with cardiac remodeling. This function is largely mediated through the ability of agonist-activated PPARs to form complexes with other transcription factors, such as NF- $\kappa$ B and STATs (signal transducers and activators of transcription), thereby resulting in the functional cross-inhibition of their transcriptional activity [8]. Treatment with L-165041 inhibits phenylephrine- and lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes and embryonic rat heart-derived H9c2 cells [7]. The antihypertrophic effects of this PPAR $\beta/\delta$  agonist involve downregulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway through enhanced physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and PPAR $\beta/\delta$  [9].

Chronic feeding on a high-fat diet (HFD) in mice induces diabetes and obesity, while an HFD for shorter periods results in systemic and myocardial insulin resistance, which leads to increased left-ventricle remodeling and dysfunction [10]. The present study aimed to examine the effects of the PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 on the inflammatory processes induced in the heart of mice fed a high-fat diet for a short period. HFD feeding for 3 weeks was selected to study the specific effects of lipid-induced inflammation on the heart, while avoiding other confounding factors such as obesity and established insulin resistance. Many inconsistencies have been encountered when results obtained with murine models have been extrapolated to humans. To overcome this problem, we used AC16 cells, which are a cardiac cell line of human origin, and exposed them to palmitate. This is important, especially as PPARs are known to be expressed at lower levels in human cells than in rodent cells [11], and gene expression is also differentially regulated by PPARs in human versus rodent cells [12].

## 2. Materials and methods

The Supplementary Methods section provides a detailed description of the methodology used.

### 2.1. Cell culture and mice

Human AC16 cells were maintained and grown as previously described [13]. Palmitate-containing medium was prepared by conjugation with fatty acid-free BSA [14].

Mice were maintained under standard conditions of illumination (12-h light/dark cycle) and temperature ( $21 \pm 1$  °C), and were fed a standard diet before the studies began. Food and water were provided *ad libitum*. This investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). All procedures were approved by the University of Barcelona Bioethics Committee, as stated in Law 5/21 July 1995 passed by the Generalitat de Catalunya, and the Commission de Surveillance de l'Expérimentation Animale of the Canton de Vaud (Switzerland).

Five-week-old CD-1 male mice were randomized in two groups ( $n = 15$  each) and fed with a Western-type high-fat diet (HFD, 35% fat by weight, 58% Kcal from fat, Harlan Ibérica S.A., Barcelona, Spain) for 3 weeks. During this period, mice were given one daily oral gavage of vehicle (0.5% w/v carboxymethylcellulose medium viscosity) or a dose of 3 mg/kg/day of the PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) dissolved in the vehicle solution.

Wild-type littermates fed with a chow diet (4% fat, Harlan Teklad) served as control animals ( $n = 15$ ). Male PPAR $\beta/\delta$  knockout mice and control mice (PPAR $\beta/\delta$ <sup>+/+</sup>, wild-type,  $n = 5$ ) with the same genetic background (C57BL/6X129/SV) and an initial weight of 20–25 g were fed with a standard diet. The generation of PPAR $\beta/\delta$  null mice has been described previously [15].

### 2.2. RNA preparation and quantitative real-time RT-PCR

Relative levels of specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as previously described [13].

### 2.3. Electrophoretic mobility shift assay and immunoblot analysis

The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and immunoblot analysis were performed as previously described [13].

### 2.4. Coimmunoprecipitation studies

Cell nuclear extracts were brought to a final volume of 250  $\mu$ L with buffer containing 10 mM PBS, 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, BSA 2% and 1 mg/mL nonfat milk for 18 h at 4 °C and incubated with 4  $\mu$ g of antibody. Immunocomplex was captured by incubating the samples with 50  $\mu$ L protein A-agarose suspension for 6 h at 4 °C. Agarose beads were collected by centrifugation and washed. After microcentrifugation, the pellet was resuspended with SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min at 100 °C. The resulting supernatant was then subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE and immunoblot analysis as described in Supplementary material online.

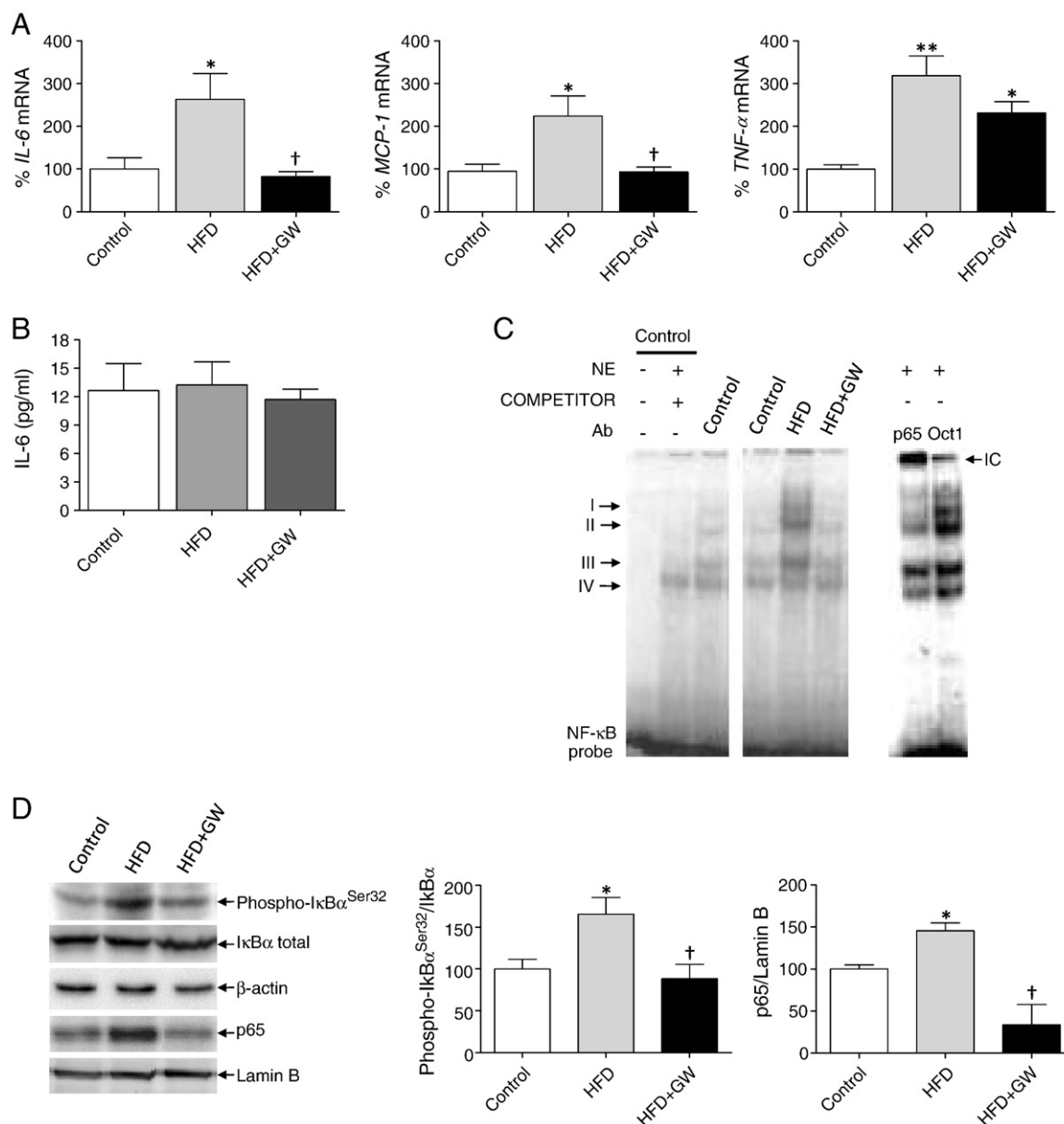
### 2.5. Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of at least two separate experiments. Significant differences were established by either the Student's *t*-test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the computer program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). In the latter case, when significant variations were found, the Tukey–Kramer multiple comparisons post-test was performed. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. GW501516 prevents the proinflammatory profile induced in heart of mice fed a high-fat diet

The heart of CD-1 mice fed a high-fat diet exhibited a significant increase in the expression of various markers of cardiac inflammation, such as *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , and *MCP-1* (Fig. 1A), although plasma *IL-6* levels were not modified (Fig. 1B). Therefore, we also assessed the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B in the heart by means of an EMSA. As expected, the high-fat diet increased the NF- $\kappa$ B DNA binding activity, specifically that of complexes I, II, and III (Fig. 1C). Supershift analyses demonstrated that complexes I, II and IV and, to a lesser extent, complex III, contained the p65 subunit of NF- $\kappa$ B. In resting cells, NF- $\kappa$ B is bound in the cytoplasm to the inhibitory protein,  $\kappa$ B. Upon stimulation,  $\kappa$ B kinases phosphorylate  $\kappa$ B on Serine 32, thus triggering its degradation by the proteasome. This results in the release of NF- $\kappa$ B, which translocates into the nucleus, where it stimulates the transcription of specific target genes. As shown in Fig. 1D, the high-fat diet increased the phospho- $\kappa$ B<sup>Ser32</sup> levels and raised p65 translocation into the nucleus of heart cells. Interestingly, the proinflammatory response displayed after feeding mice a high-fat diet was prevented by GW501516 treatment, since this reduced



**Fig. 1.** The PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 prevents the proinflammatory profile induced in heart of CD-1 mice fed a high-fat diet. (A) Relative quantification of mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in CD-1 male mice fed either with a Western-type high-fat diet (HFD) or an HFD supplemented with GW501516 (3 mg/kg/day, HFD + GW) for 3 weeks. Wild-type littermates fed a chow diet served as control animals (Control). The graphics represent the quantification of the APRT-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. (B) Determination by ELISA of plasma IL-6 levels. (C) EMSA assay showing NF- $\kappa$ B activity in the HFD, HFD + GW and control mice groups shown in A. NE, nuclear extracts; IC, immunocomplex. (D) Levels of phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>Ser32</sup> and p65 subunit of NF- $\kappa$ B protein in total (total and phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ ) or nuclear (p65) protein extracts isolated from mice fed an HFD or an HFD supplemented with GW501516. To show equal loading of protein, the  $\beta$ -actin (total protein) or lamin B (nuclear extracts) signal is included from the same blot. Graphics represent the quantification of the normalized protein levels expressed as a percentage of control samples. All autoradiograph data are representative of two separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. Control; † $P$ <0.05 vs. HFD.

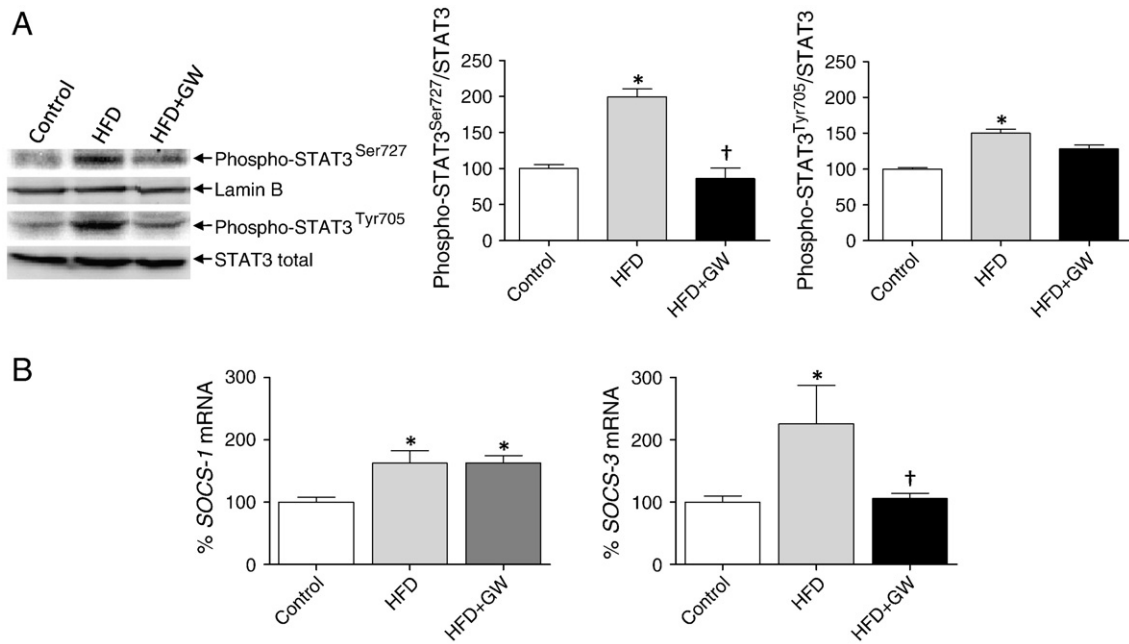
cytokine expression, NF- $\kappa$ B DNA binding activity, phospho-I $\kappa$ B<sup>Ser32</sup> levels and p65 translocation into the nucleus.

The binding of IL-6 to its membrane receptor leads to the phosphorylation of STAT3 proteins on a specific tyrosine residue (Tyr705) by Janus kinases (JAK), which undergo homo- or heterodimerization. These STAT3 dimers dissociate from the receptor and translocate into the nucleus, where they induce the expression of specific genes. The subsequent phosphorylation of Ser727 residue in the STAT transactivation domain will further promote its transcriptional activity. As shown in Fig. 2A, there was an increase in the activity of the JAK/STAT3 signaling pathway in the heart of mice fed a high-fat diet, as phospho-STAT3<sup>Tyr705</sup> and phospho-STAT3<sup>Ser727</sup> protein levels were increased with regard to animals fed a chow diet. In agreement with this, CD-1 mice fed an HFD displayed an

increase in the expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 genes (Fig. 2B), which are under the transcriptional control of activated STAT proteins and have the ability to inhibit Janus kinase activity. In agreement with the observed reduction in IL-6 expression, GW501516 treatment also blocked the enhanced STAT3 activity that was induced by HFD, although only SOCS-3 expression was reverted after GW501516 treatment.

### 3.2. PPAR $\beta/\delta$ knockout mice exhibit an enhanced proinflammatory profile in heart

To gain further insight into the mechanisms underlying the proinflammatory profile blockade by GW501516, we examined several components of the inflammatory signaling pathway in the



**Fig. 2.** GW501516 prevents the activation of the JAK/STAT3 signaling pathway in the heart of CD-1 mice fed a high-fat diet. (A) Levels of phospho-STAT3<sup>Tyr705</sup> and phospho-STAT3<sup>Ser727</sup> protein in total (phospho-STAT3<sup>Tyr705</sup>) or nuclear (phospho-STAT3<sup>Ser727</sup>) protein extracts isolated from mice fed either with an HFD or an HFD supplemented with GW501516 (3 mg/kg/day, HFD + GW) for 3 weeks. Wild-type littermates fed with a chow diet served as control animals (Control). To show equal loading of protein, the laminin B (nuclear extracts) signal is included from the same blot. The graphics represent the quantification of the STAT3-normalized protein levels expressed as a percentage of control samples. All autoradiograph data are representative of two separate experiments. (B) Relative quantification of SOCS-1 and SOCS-3 mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in the same HFD, HFD + GW and control mice groups shown in A. Graphs represent the quantification of the *APRT*-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. \* $P < 0.05$  vs. Control; † $P < 0.05$  vs. HFD.

heart of PPAR $\beta/\delta$  knockout mice. Knockout mice displayed an increase in *IL-6* and *MCP-1* expression with regard to their control littermates (Fig. 3A). NF- $\kappa$ B DNA binding activity, specifically of complexes I to IV, was also clearly up-regulated in PPAR $\beta/\delta$  knockout mice (Fig. 3B). In accordance with the enhanced *IL-6* expression, the activity of the JAK/STAT3 signaling pathway was up-regulated, as assessed by phosphorylation of STAT3 at Ser727 (Fig. 3C). The expression of SOCS-3 was also upregulated (Fig. 3D).

### 3.3. PPAR $\beta/\delta$ activation prevents the proinflammatory profile induced by palmitate in human cardiac cells

To study the effects of fatty acids on human cardiac cells, AC16 cells were exposed to the saturated fatty acid palmitate (0.25 mmol/L), which is among the most common fatty acids. The expression pattern of *IL-6* was chosen to establish optimal treatment conditions (see Supplementary material online, Fig. S1). Palmitate induced *IL-6* expression (Fig. 4A) and secretion (Fig. 4B) in cardiac AC16 cells. Likewise, *MCP-1* and *TNF- $\alpha$*  expressions were also up-regulated (Fig. 4A). This is not surprising, as palmitate induced the NF- $\kappa$ B DNA binding activity of complexes I to III with regard to control cells (Fig. 4C). We also checked I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 protein levels and, as expected, palmitate downregulated I $\kappa$ B $\alpha$  and increased the p65 protein levels in nuclear extracts (Fig. 4D). Addition of GW501516 to palmitate-treated AC16 cells completely abrogated the increase in *MCP-1* and *TNF- $\alpha$*  expression (Fig. 4A) and the enhanced NF- $\kappa$ B activity (Fig. 4C and D). In contrast, *IL-6* expression and secretion (Fig. 4, A and B) were not reverted by GW501516. In agreement with this, GW501516 did not prevent the increase in phospho-STAT3<sup>Ser727</sup> protein levels (Fig. 4D) and SOCS (Fig. 4E) expression observed after palmitate treatment. To elucidate whether PPAR $\beta/\delta$  activity was involved in the effects of GW501516 on such inflammatory processes we used the specific PPAR $\beta/\delta$  inhibitor GSK0660 [16]. This compound prevented the anti-inflammatory effects of GW501516 in the presence of palmitate. PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity was assessed

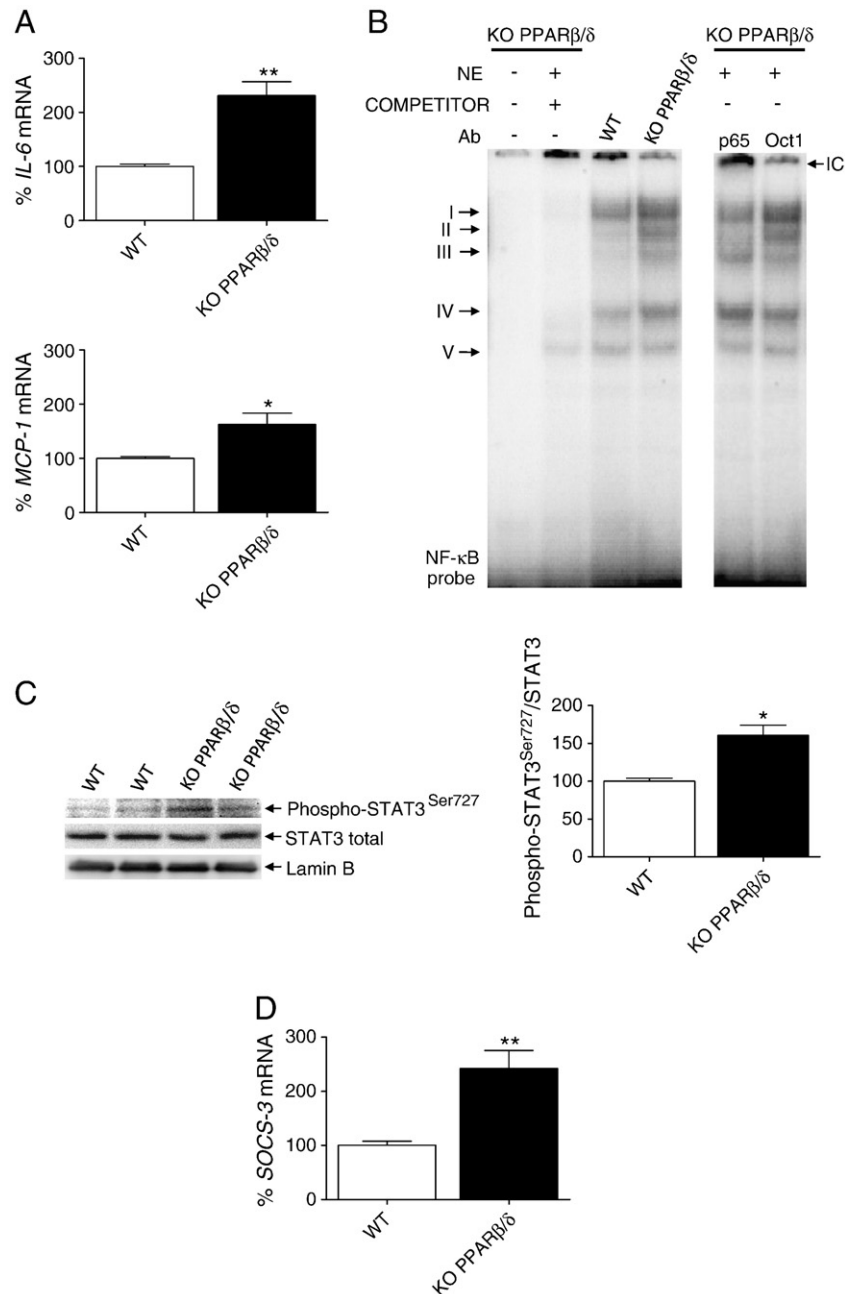
to verify the effects of GW501516 and GSK0660 on PPAR $\beta/\delta$  activity (see Supplementary material online, Fig. S2).

### 3.4. The anti-inflammatory effects of GW501516 are both AMPK- and PPAR $\beta/\delta$ -dependent

Obesity is associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction, and reactive oxygen species (ROS) play a considerable role in the development of heart failure [17]. The primary target after ROS production is I $\kappa$ B inhibition [18], which is in agreement with our results for AC16 cells. In contrast, there were no changes in the activity of the following in human AC16 cells (data not shown): mitogen-activated protein kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), p38, and JNK (c-Jun N-terminal kinases), which are induced partly through ROS in cardiac fibroblasts [18]. These differences might be attributed to the different cell models, stimuli and exposure times used throughout the studies. Interestingly, the addition of the NADPH oxidase inhibitor DPI (diphenyleneiodonium) to palmitate-treated AC16 cells completely abolished the enhanced *MCP-1* expression, while it only partially reversed *IL-6* expression (Fig. 5).

Next, we sought to determine the molecular mechanism by which the PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 inhibits palmitate-induced NF- $\kappa$ B activation. PPAR $\alpha$  activators have been reported to induce the expression of I $\kappa$ B $\alpha$ , which forms a cytoplasmic inactive complex with the p65-p50 heterodimer and thus results in the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling [19]. Accordingly, I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels were upregulated after the addition of GW501516 in AC16 cells (Fig. 4D). However, we did not observe a significant increase in the expression of I $\kappa$ B $\alpha$  (see Supplementary material online, Fig. S3). Although short-term induction of I $\kappa$ B $\alpha$  expression by GW501516 cannot be ruled out, our results suggest that additional mechanisms inhibit NF- $\kappa$ B. PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  activators may also act through DNA-binding-independent mechanisms that may involve physical interaction with NF- $\kappa$ B [7,9,20]. This association prevents NF- $\kappa$ B from binding to its response



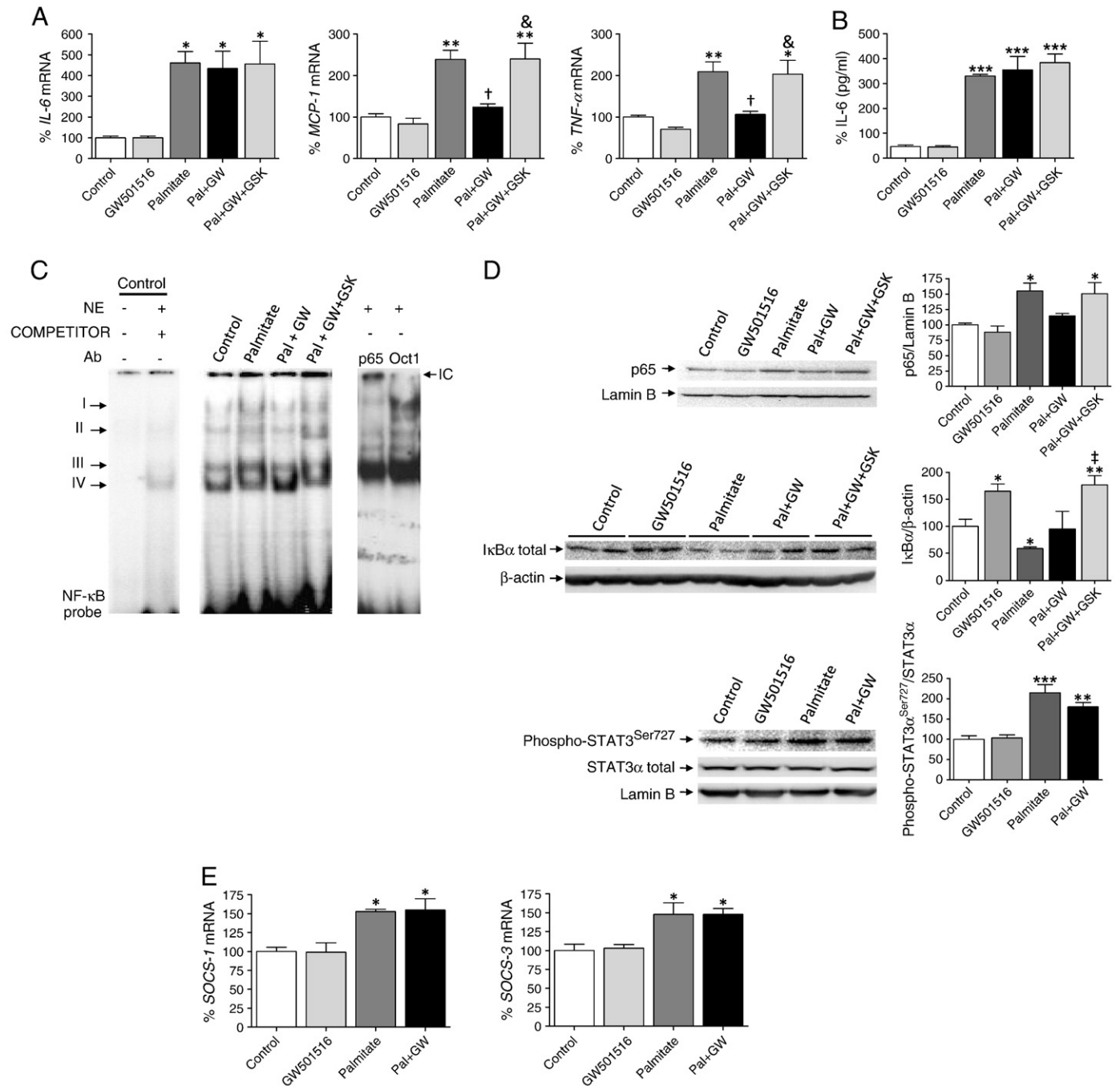


**Fig. 3.** PPAR $\beta/\delta$  knockout mice exhibit an enhanced proinflammatory profile in heart. (A) Relative quantification of *IL-6* and *MCP-1* mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in male PPAR $\beta/\delta$  knockout (KO PPAR $\beta/\delta$ ) mice and wild type mice (PPAR $\beta/\delta$ <sup>+/+</sup>, WT) with the same genetic background (C57BL/6X129/SV) that were fed a standard diet. The graphics represent the quantification of the *APRT*-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of WT samples. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs. WT. (B) EMSA assay showing NF- $\kappa$ B activity in PPAR $\beta/\delta$  knockout and WT mice. NE, nuclear extracts; IC, immunocomplex. (C) Phospho-STAT3<sup>Ser727</sup> protein levels in nuclear protein extracts isolated from PPAR $\beta/\delta$  knockout and WT mice. To show equal loading of protein, the lamin B signal is included from the same blot. Graphs represent the quantification of the STAT3-normalized protein levels expressed as a percentage of WT samples. All autoradiograph data are representative of two separate experiments. (D) Relative quantification of *SOCS-3* mRNA levels assessed by real-time RT-PCR, as described in panel A.

element and thereby inhibits its ability to induce gene transcription. Data shown in Fig. 6A demonstrate that GW501516 strongly enhanced the physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and PPAR $\beta/\delta$  in human cardiac AC16 cells, thus suggesting that increased association between these two proteins is the mechanism through which NF- $\kappa$ B activity is reduced after GW501516 treatment. Furthermore, addition of GSK0660 partially blocked the enhanced interaction between p65 and PPAR $\beta/\delta$  in AC16 cells, thus linking this physical interaction with PPAR $\beta/\delta$  availability in the nucleus and its subsequent activity.

On the other hand, it has been reported that GW501516 is able to regulate lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle

by AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent, but PPAR $\beta/\delta$ -independent, mechanisms [21]. Since activation of AMPK may block NF- $\kappa$ B signaling pathway through the blockade of I $\kappa$ B kinase activity [22], it might be feasible that GW501516 was blocking lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells through AMPK-dependent mechanisms. Thus, we performed a treatment with AC16 cells in which the AMPK inhibitor compound C (10  $\mu$ M, 20 h) was added before GW501516 and palmitate treatment. As it is shown in Fig. 6B, compound C prevented GW501516-mediated *MCP-1* downregulation after palmitate treatment, thus confirming a role of this kinase in the process.

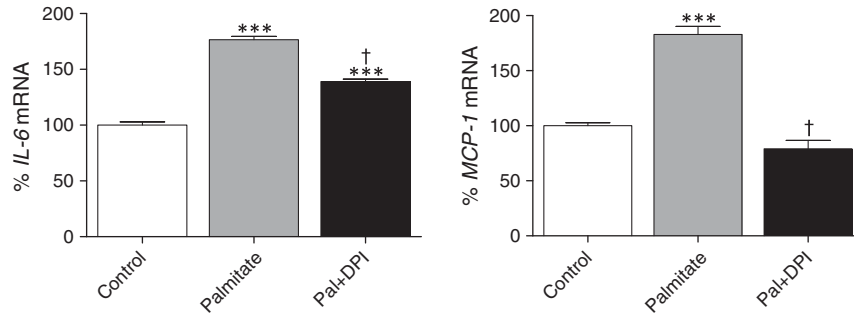


**Fig. 4.** PPAR $\beta/\delta$  activation prevents the proinflammatory profile induced by palmitate in human cardiac AC16 cells. (A) Relative quantification of mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in human cardiac AC16 cells incubated with palmitate (Pal, 0.25 mmol/L) for 18 h in the presence or absence of GW501516 (GW, 10  $\mu$ mol/L) and GSK0660 (GSK, 1  $\mu$ mol/L). Graphs represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. (B) Determination by ELISA of IL-6 secretion into the culture media in AC16 cells. (C) EMSA assay showing NF- $\kappa$ B activity in AC16 cells incubated with palmitate, GW501516 and GSK0660 as described in panel A. NE, nuclear extracts; IC, immunocomplex. (D) p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-STAT3<sup>Ser727</sup> and total STAT3 protein levels in nuclear (p65 and phospho-STAT3<sup>Ser727</sup>) or total (I $\kappa$ B $\alpha$  and total STAT3) protein extracts isolated from AC16 cells incubated with palmitate, GW501516 and GSK0660, as described in panel A. To show equal loading of protein, the  $\beta$ -actin (total protein) or lamin B (nuclear protein) signal is included from the same blot. Graphics represent the quantification of the normalized protein levels expressed as a percentage of control samples. All autoradiograph data are representative of two separate experiments. (E) Relative quantification of SOCS mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in the same samples is shown. The graphics represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. Control; † $P$ <0.05 vs. Palmitate; ‡ $P$ <0.01 vs. Palmitate; & $P$ <0.05 vs. Pal + GW.

#### 4. Discussion

Increasing evidence demonstrates a potential link between chronic low-grade inflammation and metabolic disorders that are associated with increased levels of saturated fatty acids, such as insulin resistance, overt obesity and type 2 diabetes. In the heart, dietary fat affects gene expression, structure, metabolism, and

contractile function. For instance, cardiac glucose metabolism is reduced in obese mice fed a high-fat diet for 6 weeks, in a process which is associated with increased levels of proinflammatory cytokines [23]. Accordingly, diet-induced inflammation and defects in glucose metabolism are attenuated in IL-6 knockout mice [23]. The mechanism by which IL-6 suppresses glucose metabolism and causes insulin resistance in heart involves the SOCS-3-mediated inhibition of



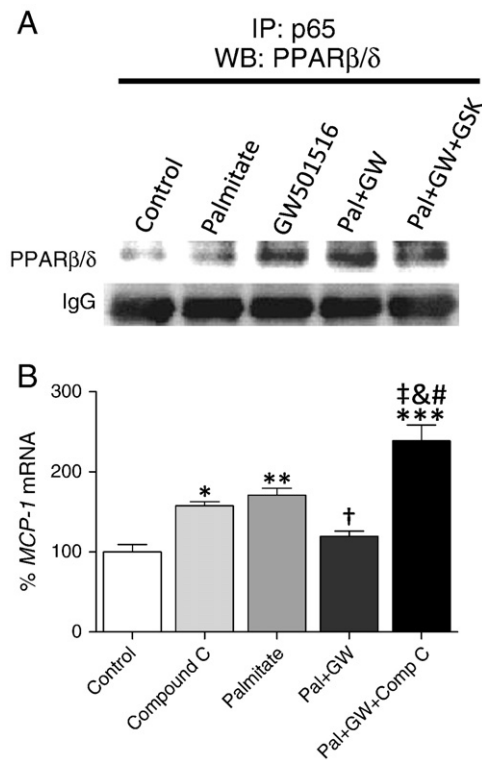
**Fig. 5.** Relative quantification of *IL-6* and *MCP-1* mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in human cardiac AC16 cells incubated with palmitate (Pal, 0.25 mmol/L) for 18 h in the presence or absence of diphenyleiiodonium (DPI, 10  $\mu$ mol/L). Graphs represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. Control; † $P$ <0.001 vs. Palmitate.

the insulin receptor substrate (IRS)-1. This highlights the significant role of cardiac inflammation in the pathogenesis of the diabetic heart [23]. However, we did not observe any change in IRS-1 protein levels after SOCS up-regulation in heart of CD-1 mice fed a high-fat diet or cardiac AC16 cells exposed to palmitate (data not shown). This suggests that IRS-1 degradation is not induced by SOCS in our experimental models or, more probably, that the treatment period was too short. In fact, CD-1 mice fed a Western HFD for 3 weeks were

not insulin resistant, as measured by Akt phosphorylation on Ser478 or IRS-1 phosphorylation on Ser307 (data not shown). However, HFD-fed mice displayed intolerance to glucose, as determined by an intraperitoneal glucose tolerance test (data not shown), even though no increases in body weight or plasma levels of glucose, insulin and free fatty acids were observed. GW501516 treatment markedly improved glucose tolerance in HFD-fed mice (data not shown), as it has been reported in obese ob/ob mice [24]. Likewise, C57BL/6J mice fed an HFD for 4 weeks do not display an increase in body mass, despite impaired glucose tolerance [10], while long-term feeding of an HFD results in an increase in body weight, hyperglycemia and hyperinsulinemia [25]. AC16 cells exposed to palmitate for 18h did not display enhanced insulin resistance either, as measured by phospho-Akt<sup>Ser478</sup> or phospho-IRS-1<sup>Ser307</sup> (data not shown). Indeed, the lack of an inhibitory effect on insulin action after STAT3 pathway activation by IL-6 has also been reported in human myotubes [26].

The progression of heart failure and cardiac hypertrophy usually entails a local rise in cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  [27], which mainly act in an autocrine fashion via downstream activation of NF- $\kappa$ B [28]. As has been previously reported in mice [5], the HFD resulted in a significant increase in *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , and *MCP-1* expression in heart. Expression analyses also revealed that CD68 and F4/80, which are widely used as macrophage-specific markers, were not up-regulated (data not shown). This suggests that the increased cytokine expression was not due to macrophage infiltration. Analogous results were obtained when cardiac AC16 cells were exposed to palmitate, since they also exhibited enhanced *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , and *MCP-1* expression. In fact, saturated fatty acids, especially palmitate, also induce increased secretion of proinflammatory cytokines in skeletal muscle cells [29,30]. In accordance with this result, NF- $\kappa$ B DNA binding activity and nuclear p65 levels were enhanced in palmitate-treated AC16 cells and in CD-1 mice fed an HFD. This correlates with greater degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  by the proteasome, as observed in cardiac AC16 cells, and suggested by the hyperphosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  at the Serine 32 residue in CD-1 mice. Our data are consistent with the slight degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  reported in C2C12 myotubes after exposure to palmitate concentrations above 0.75 mmol/L [31]. Physiological levels of circulating fatty acids are between 0.3 and 0.4 mmol/L, rising to 0.6–0.8 mmol/L in obese or type 2 diabetes patients. Thus, our data suggest that human cardiac AC16 cells are more sensitive to palmitate-induced inflammation than skeletal muscle cells, which may develop at nearly physiological free fatty acid levels.

The main goal of this study was to examine the effects of the PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 on fatty acid-induced inflammation in cardiac cells. This agonist is a selective ligand with a 1000-fold higher affinity to PPAR $\beta/\delta$  than to other PPAR isotypes [32]. PPAR $\beta/\delta$  plays an important role in the heart, where it has similar functions to PPAR $\alpha$ . Interestingly, activation of PPAR $\beta/\delta$  may inhibit the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus avoiding both cardiomyocyte hypertrophy and



**Fig. 6.** The anti-inflammatory effects of GW501516 are both AMPK- and PPAR $\beta/\delta$ -dependent. (A) GW501516 enhances PPAR $\beta/\delta$  association with the p65 subunit of NF- $\kappa$ B. Nuclear extracts from AC16 cells treated with palmitate (Pal, 0.25 mmol/L) for 18 h, in the presence or absence of GW501516 (GW, 10  $\mu$ mol/L) and GSK06660 (GSK, 1  $\mu$ mol/L), were subjected to immunoprecipitation using anti-p65 antibody coupled to protein A-agarose beads. Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-PPAR $\beta/\delta$  antibody. All autoradiograph data are representative of two separate experiments. (B) Relative quantification of *MCP-1* mRNA levels assessed by real-time RT-PCR in human cardiac AC16 cells incubated with palmitate (Pal, 0.25 mmol/L) for 18 h in the presence or absence of GW501516 (GW, 10  $\mu$ mol/L) and compound C (Comp C, 10  $\mu$ mol/L). Graphs represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. Control; † $P$ <0.05, ‡ $P$ <0.01 vs. Palmitate; & $P$ <0.001 vs. Pal + GW; # $P$ <0.05 vs. Compound C.

preventing downregulation of the genes involved in fatty acid metabolism. PPAR $\beta/\delta$  anti-inflammatory activity has been reported in several experimental immunological diseases [33], as well as in some experimental models. For instance, PPAR $\beta/\delta$  activation by GW0742 or L-165041 inhibits cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes in a process that involves downregulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway [7]. Here, we show that PPAR $\beta/\delta$  activation by GW501516 reduced the induction of the NF- $\kappa$ B target genes *MCP-1* and *TNF- $\alpha$*  in human cardiac cells stimulated by palmitate and in the heart of mice fed a high-fat diet. This suggests that PPAR $\beta/\delta$  may antagonize NF- $\kappa$ B activity. We also report that *IL-6* expression and NF- $\kappa$ B DNA-binding activity is induced in heart of PPAR $\beta/\delta$  knockout mice compared to wild-type mice, which is consistent with the anti-inflammatory activity of PPAR $\beta/\delta$ . Other studies also demonstrate that PPAR $\beta/\delta$  activation by ligand administration or adenoviral over-expression in cultured cardiac myocytes has potent anti-inflammatory effects [34]. Enhanced myocardial *MCP-1* expression may lead to the infiltration and activation of inflammatory cells in the heart, hence contributing to the left ventricular remodeling and heart failure observed after myocardial infarction [7]. Therefore, PPAR $\beta/\delta$  activation might be therapeutically useful to reduce the expression of *MCP-1* in heart.

In the heart, *IL-6* induces STAT3 and, to a lesser extent, STAT1 transcription factors, whose target genes encode proteins activated under stress conditions such as acute myocardial infarction and hypertrophic stimuli [35]. Mice with cardiomyocyte-specific over-expression of STAT3 or *IL-6* develop hypertrophy [35]. Therefore, therapies aimed at downregulating cardiac *IL-6* secretion during obesity might improve cardiac performance and, thus, reduce the occurrence of adverse cardiovascular events. Strikingly, GW501516 prevented activation of the *IL-6*/JAK/STAT3 signaling pathway in mice fed an HFD, but not in AC16 cells treated with palmitate. This discrepancy might be explained by species-specific differences and by the fact that the effects of high dietary fat intake on the heart are dependent on fatty acid composition. Some nutritional fatty acids may induce inflammatory signaling through an increase in plasma lipopolysaccharide and subsequent activation of the toll-like receptor-4 [36]. In accordance with this result, palmitate and HFD may trigger different inflammatory pathways in human AC16 and mice cardiac cells, respectively, thus accounting for the different responses observed after GW501516 treatment. Parthenolide prevented *IL-6* and *MCP-1* expression induction by palmitate in AC16 cells (see Supplementary material online, Fig. S4), although only the latter was prevented by GW501516 (Fig. 4). Consequently, it is feasible that *IL-6* and *MCP-1* transcription is initiated by NF- $\kappa$ B in AC16 cells. However, once *IL-6* transcription has been induced, it may be controlled by other signaling pathways. Alternatively, the effect of parthenolide on *IL-6* expression might be attributed to the inhibitory effect of this compound on other transcription factors that regulate *IL-6*, such as activating protein-1 [37].

Our results demonstrate that the anti-inflammatory effects of GW501516 are due to both AMPK- and PPAR $\beta/\delta$ -dependent mechanisms. In fact, it has been already reported that AMPK may block NF- $\kappa$ B signaling pathway through the blockade of I $\kappa$ B kinase activity [22]. On the other hand, several mechanisms have been proposed to explain the anti-inflammatory effects of PPAR $\beta/\delta$  activation, such as the physical interaction between PPAR $\beta/\delta$  and p65, the induction of antioxidative genes or the release of nuclear corepressors. Indeed, it is possible that PPAR $\beta/\delta$  exerts its inhibitory effects on NF- $\kappa$ B via multiple mechanisms, depending on conditions and cell types. Here, we demonstrate that PPAR $\beta/\delta$  activation by GW501516 enhances the protein–protein association between PPAR $\beta/\delta$  and p65, which indicates that this mechanism may also interfere with NF- $\kappa$ B transactivation capacity in the diabetic heart. Similar results have been reported in other cardiac cell types, such as in rat neonatal cardiomyocytes or H9c2 myotubes [7,9]. PPAR $\beta/\delta$  also inhibits

enhanced cytokine production in adipocytes by preventing NF- $\kappa$ B activation via ERK1/2, an effect that may help to prevent insulin resistance [38]. However, we did not observe ERK1/2 activation after GW501516 treatment in vivo or in vitro (data not shown), thus ruling out a role for this kinase in the GW501516-mediated effects. Further studies are required to elucidate whether additional mechanisms after PPAR $\beta/\delta$  activation may inhibit the proinflammatory profile induced in the heart by palmitate and high-fat diets, for instance by inhibiting other transcriptional factors such as nuclear factor of activated T lymphocyte (NFAT) or activating protein-1.

In summary, the novel finding of the present study is that GW501516-induced PPAR $\beta/\delta$  activation, which is the predominant isotype in cardiac fibroblasts and myofibroblasts, can attenuate the inflammatory response induced in human cardiac AC16 cells exposed to the saturated fatty acid palmitate and in mice fed an HFD. Since chronic low-grade inflammation plays a significant role in cardiac hypertrophy and heart failure, and GW501516 has been shown to ameliorate metabolic disturbances in heart caused by high-fat diets, it is tempting to speculate that PPAR $\beta/\delta$  may serve as a therapeutic target to prevent cardiac hypertrophy and heart failure in metabolic disorders. PPAR $\beta/\delta$  has many beneficial physiological functions ranging from enhancing fatty acid catabolism, improving insulin sensitivity and inhibiting inflammation, thus displaying a potential therapeutic role for the prevention and treatment of diseases including diabetes, dyslipidemias or metabolic syndrome. However, activation of PPAR $\beta/\delta$  has also been shown to increase the growth of several human cancers (reviewed in [39]). Nevertheless, further studies are guaranteed, since the role of PPAR $\beta/\delta$  in carcinogenesis is highly controversial at present, as there are data suggesting that it either promotes or inhibits cancer, and overall data cannot distinguish whether PPAR $\beta/\delta$  upregulation is a mechanistically inconsequential result of carcinogenesis or an active player in this process [39].

## Acknowledgments

We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for their assistance. This work was supported by grants from the 'Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government' (SAF2006-01475 and SAF2009-06939) and the 'Swiss National Science Foundation'. T.C. (FPI BES2005-8448) was supported by a grant from the Spanish Government. 'CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas' (CIBERDEM) is an ISCIII project.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.bbali.2010.11.002](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.11.002).

## References

- [1] C. Ancey, E. Menet, P. Corbi, S. Fredj, M. Garcia, C. Rucker-Martin, J. Bescond, F. Morel, J. Wijdenes, J.C. Lecron, D. Potreau, Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation. *Cardiovasc. Res.* 59 (2003) 78–85.
- [2] G. Ding, L. Cheng, Q. Qin, S. Frontin, Q. Yang, PPARdelta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40 (2006) 821–828.
- [3] H. Takano, T. Nagai, M. Asakawa, T. Toyozaki, T. Oka, I. Komuro, T. Saito, Y. Masuda, Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 87 (2000) 596–602.
- [4] W.K. Jones, M. Brown, X. Ren, S. He, M. McGuinness, NF- $\kappa$ B as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc. Toxicol.* 3 (2003) 229–254.
- [5] C. Tikellis, M.C. Thomas, B. Harcourt, M.T. Coughlan, J. Pete, K. Bialkowski, A. Tan, A. Bierhaus, M.E. Cooper, J.M. Forbes, Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2008) E323–E330.
- [6] M.N. Sack, T.A. Rader, S. Park, J. Bastin, S.A. McCune, D.P. Kelly, Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94 (1996) 2837–2842.

- [7] A. Planavila, R. Rodríguez-Calvo, M. Jove, L. Michalik, W. Wahli, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 65 (2005) 832–841.
- [8] R.A. Daynes, D.C. Jones, Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 748–759.
- [9] A. Planavila, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17464–17471.
- [10] M.J. Raheer, H.B. Thibault, E.S. Buys, D. Kuruppu, N. Shimizu, A.L. Brownell, S.L. Blake, J. Rieusset, M. Kaneki, G. Derumeaux, M.H. Picard, K.D. Bloch, M. Scherrer-Crosbie, A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (2008) H2495–H2502.
- [11] C.N. Palmer, M.H. Hsu, K.J. Griffin, J.L. Raucy, E.F. Johnson, Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver, *Mol. Pharmacol.* 53 (1998) 14–22.
- [12] J.W. Lawrence, Y. Li, S. Chen, J.G. DeLuca, J.P. Berger, D.R. Umbenhauer, D.E. Moller, G. Zhou, Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31521–31527.
- [13] X. Palomer, D. Álvarez-Guardia, R. Rodríguez-Calvo, T. Coll, J.C. Laguna, M.M. Davidson, T.O. Chan, A.M. Feldman, M. Vázquez-Carrera, TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model, *Cardiovasc. Res.* 81 (2009) 703–712.
- [14] T. Coll, X. Palomer, F. Blanco-Vaca, J.C. Escola-Gil, R.M. Sanchez, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells, *Endocrinology* 151 (2010) 537–548.
- [15] K. Nadra, S.I. Anghel, E. Joye, N.S. Tan, S. Basu-Modak, D. Trono, W. Wahli, B. Desvergne, Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3266–3281.
- [16] B.G. Shearer, D.J. Steger, J.M. Way, T.B. Stanley, D.C. Lobe, D.A. Grillot, M.A. Iannone, M.A. Lazar, T.M. Willson, A.N. Billin, Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 523–529.
- [17] N. Suematsu, H. Tsutsui, J. Wen, D. Kang, M. Ikeuchi, T. Ide, S. Hayashidani, T. Shiomi, T. Kubota, N. Hamasaki, A. Takeshita, Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes, *Circulation* 107 (2003) 1418–1423.
- [18] M. Sano, K. Fukuda, T. Sato, H. Kawaguchi, M. Suematsu, S. Matsuda, S. Koyasu, H. Matsui, K. Yamauchi-Takahara, M. Harada, Y. Saito, S. Ogawa, ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts, *Circ. Res.* 89 (2001) 661–669.
- [19] P. Delerive, J.C. Fruchart, B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control, *J. Endocrinol.* 169 (2001) 453–459.
- [20] P. Delerive, K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J.M. Peters, F.J. González, J.C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman, B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32048–32054.
- [21] D.K. Kramer, L. Al Khalili, B. Guigas, Y. Leng, P.M. Garcia-Roves, A. Krook, Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19313–19320.
- [22] H.L. Li, R. Yin, D. Chen, D. Liu, D. Wang, Q. Yang, Y.G. Dong, Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy, *J. Cell. Biochem.* 100 (2007) 1086–1099.
- [23] H.J. Ko, Z. Zhang, D.Y. Jung, J.Y. Jun, Z. Ma, K.E. Jones, S.Y. Chan, J.K. Kim, Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by Suppressing AMPK in heart, *Diabetes* 58 (2009) 2536–2546.
- [24] B.L. Bernardo, T.S. Wachtmann, P.G. Cosgrove, M. Kuhn, A.C. Opsahl, K.M. Judkins, T.B. Freeman, J.R. Hadcock, N.K. LeBrasseur, Postnatal PPARdelta activation and myostatin inhibition exert distinct yet complementary effects on the metabolic profile of obese insulin-resistant mice, *PLoS ONE* 5 (2010) e11307.
- [25] J. Molnar, S. Yu, N. Mzhavia, C. Pau, I. Cheresnev, H.M. Dansky, Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice, *Circ. Res.* 96 (2005) 1178–1184.
- [26] C. Weigert, K. Brodbeck, H. Staiger, C. Kausch, F. Machicao, H.U. Haring, E.D. Schleicher, Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 23942–23952.
- [27] E. Haugen, J. Chen, J. Wikstrom, J. Gronros, L.M. Gan, L.X. Fu, Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *Int. J. Cardiol.* 115 (2007) 24–28.
- [28] P.J. Smeets, B.E. Teunissen, A. Planavila, H. de Vogel-van den Bosch, P.H. Willemsen, G.J. van der Vusse, M. van Bilsen, Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by PPARalpha and PPARdelta, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29109–29118.
- [29] T. Coll, E. Eyre, R. Rodríguez-Calvo, X. Palomer, R. Sánchez, M. Merlos, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11107–11116.
- [30] T. Coll, M. Jove, R. Rodríguez-Calvo, E. Eyre, X. Palomer, R.M. Sánchez, M. Merlos, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator receptor gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and NF-kappaB activation, *Diabetes* 55 (2006) 2779–2787.
- [31] A. Kadotani, Y. Tsuchiya, H. Hatakeyama, H. Katagiri, M. Kanzaki, Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C(2)C(12) myotubes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 (2009) E1291–E1303.
- [32] W.R. Oliver Jr., J.L. Shenk, M.R. Snaith, C.S. Russell, K.D. Plunket, N.L. Bodkin, M.C. Lewis, D.A. Winegar, M.L. Sznaidman, M.H. Lambert, H.E. Xu, D.D. Sternbach, S.A. Kliever, B.C. Hansen, T.M. Willson, A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5306–5311.
- [33] T. Kino, K.C. Rice, G.P. Chrousos, The PPARdelta agonist GW501516 suppresses interleukin-6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition, *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007) 425–433.
- [34] B.N. Finck, The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease, *Cardiovasc. Res.* 73 (2007) 269–277.
- [35] K. Boengler, D. Hilfiker-Kleiner, H. Drexler, G. Heusch, R. Schulz, The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure, *Pharmacol. Ther.* 120 (2008) 172–185.
- [36] P.D. Cani, J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, R. Burcelin, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* 56 (2007) 1761–1772.
- [37] Y. Zhou, C. Yau, J.W. Gray, K. Chew, S.H. Dairkee, D.H. Moore, U. Eppenberger, S. Eppenberger-Castori, C.C. Benz, Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer, *BMC Cancer* 7 (2007) 59.
- [38] R. Rodríguez-Calvo, L. Serrano, T. Coll, N. Moullan, R.M. Sanchez, M. Merlos, X. Palomer, J.C. Laguna, L. Michalik, W. Wahli, M. Vázquez-Carrera, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta)/(delta) (PPAR{beta})/(delta) inhibits LPS-induced cytokine production in adipocytes by lowering NF-{kappa}B activity via ERK1/2, *Diabetes* 57 (2008) 2149–2157.
- [39] K.D. Wagner, N. Wagner, Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions, *Pharmacol. Ther.* 125 (2010) 423–435.



Publicació 2

**TNF- $\alpha$  reduces PGC-1  $\alpha$  expression through NF- $\kappa$ B  
and p38 MAPK leading to increased glucose  
oxidation in a human cardiac cell model**

Xavier Palomer, **David Álvarez-Guardia**, Ricardo Rodríguez-Calvo, Teresa Coll, Juan C. Laguna, Mercy M. Davidson, Tung O. Chan, Arthur M. Feldman, and Manuel Vázquez-Carrera

Cardiovascular Research (2009) 81, 703–712

Que en la categoria CARDIAC & CARDIOVASCULAR SYSTEMS es troba en la  
posició 8 de 95 (Q1)

Índex d'impacte en l'any de publicació: 5,801





Les respostes inflammatòries que es donen en el cor, produïdes per un augment sostingut de citocines, han estat associades a diversos processos patològics com la hipertròfia i la insuficiència cardíaca. Dades recents suggereixen una relació entre les cardiomiopaties i la desregulació del metabolisme cardíac. Per tal de dilucidar la relació entre un perfil proinflamatori i la desregulació del metabolisme en cor vam tractar la línia cel·lular cardíaca d'origen humà, AC16, amb el factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

L'exposició de les cèl·lules AC16 a TNF- $\alpha$  inhibeix l'expressió del coactivador-1 $\alpha$  del receptor activat per proliferadors peroxisòmics  $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ), un gen que participa en la regulació del metabolisme oxidatiu dels lípids i la glucosa. De la mateixa manera, en estudis realitzats amb ratolins transgènics específics de cor (*Mus musculus*), que sobreexpressen TNF- $\alpha$  i que han estat caracteritzats com un model de cardiomiopatia induïda per citocines, també s'ha observat una reducció de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  a nivell cardíac respecte la que presenten els ratolins control.

En el mecanisme a través del qual TNF- $\alpha$  participa en la reducció de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  *in vitro*, sembla ser que en gran mesura hi intervenen les vies de la proteïna cinasa activada per mitògens p38 (p38 MAPK) i del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). La disminució en l'expressió de PGC-1 $\alpha$  resulta en un augment de la taxa d'oxidació de la glucosa, fet en el que hi està implicat una reducció en l'expressió de la piruvat deshidrogenasa cinasa quatre (PDK4), alhora que depèn de l'activitat d'unió a l'ADN dels factors de transcripció anomenats receptor activat per proliferadors peroxisòmics  $\beta/\delta$  (PPAR  $\beta/\delta$ ) i receptor relacionat amb l'estrogen (ERR).

Aquests resultats semblen indicar que la reducció de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  contribueix en el desenvolupament de la disfunció i la insuficiència cardíaca en els trastorns metabòlics amb un fons inflamatori.



# TNF- $\alpha$ reduces PGC-1 $\alpha$ expression through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model

Xavier Palomer<sup>1</sup>, David Álvarez-Guardia<sup>1</sup>, Ricardo Rodríguez-Calvo<sup>1</sup>, Teresa Coll<sup>1</sup>, Juan C. Laguna<sup>1</sup>, Mercy M. Davidson<sup>2</sup>, Tung O. Chan<sup>3</sup>, Arthur M. Feldman<sup>3</sup>, and Manuel Vázquez-Carrera<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Building A, 643 Diagonal Ave, E-08028 Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Neurology, Columbia University, Russ Berrie Medical Pavilion, Room 301, 1150 St Nicholas Avenue, New York, NY 10032, USA; and <sup>3</sup>Center for Translational Medicine, Department of Medicine, Thomas Jefferson University, RM 813 College Building, 1025 Walnut St., Philadelphia, PA 19107, USA

Received 6 August 2008; revised 20 November 2008; accepted 23 November 2008; online publish-ahead-of-print 27 November 2008

Time for primary review: 39 days

Downloaded from [cardiovascres.oxfordjournals.org](http://cardiovascres.oxfordjournals.org) at Universitat De Barcelona on November 17, 2010

## KEYWORDS

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ;  
NF- $\kappa$ B;  
TNF- $\alpha$

**Aims** Inflammatory responses in the heart that are driven by sustained increases in cytokines have been associated with several pathological processes, including cardiac hypertrophy and heart failure. Emerging data suggest a link between cardiomyopathy and myocardial metabolism dysregulation. To further elucidate the relationship between a pro-inflammatory profile and cardiac metabolism dysregulation, a human cell line of cardiac origin, AC16, was treated with tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**Methods and results** Exposure of AC16 cells to TNF- $\alpha$  inhibited the expression of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), an upstream regulator of lipid and glucose oxidative metabolism. Studies performed with cardiac-specific transgenic mice (*Mus musculus*) overexpressing TNF- $\alpha$ , which have been well characterized as a model of cytokine-induced cardiomyopathy, also displayed reduced PGC-1 $\alpha$  expression in the heart compared with that of control mice. The mechanism by which TNF- $\alpha$  reduced PGC-1 $\alpha$  expression *in vitro* appeared to be largely mediated via both p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B pathways. PGC-1 $\alpha$  downregulation resulted in an increase in glucose oxidation rate, which involved a reduction in pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression and depended on the DNA-binding activity of both peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  and estrogen-related receptor  $\alpha$  transcription factors.

**Conclusion** These results point to PGC-1 $\alpha$  downregulation as a potential contributor to cardiac dysfunction and heart failure in metabolic disorders with an inflammatory background.

## 1. Introduction

The myocardium expresses and secretes several cytokines in response to different stimuli, such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin (IL)-6, which are under the control of the ubiquitous inducible transcription factor called nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Inflammatory responses driven by sustained increases in TNF- $\alpha$ , which mainly acts in an autocrine fashion, have been related to several pathological processes, including ischaemic myocardial injury, cardiac hypertrophy, and chronic heart failure.<sup>1–3</sup>

The adult mammalian heart generates ATP primarily from fatty acid (FA)  $\beta$ -oxidation by mitochondria, though this

organelle can also catabolize other substrates, such as glucose and lactate, in order to ensure an efficient and constant fuel source. However, cardiac energy substrate flexibility becomes constrained under certain circumstances, such as in cardiac hypertrophy and heart failure, owing to a shift in the source of energy from FA to glucose. Metabolic changes in cardiac substrate utilization entail dysregulation of genes involved in the transport and catabolism of FA and glucose. The expression of these genes is controlled at least in part by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) transcription factors family. There are three different PPAR subtypes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ , which require heterodimerization with another nuclear receptor, the retinoid X receptor, in order to be activated. Heterodimerization is then followed by coactivator recruitment and subsequent induction of target gene transcription.

\* Corresponding author. Tel: +34 93 4024531; fax: +34 93 4035982.  
E-mail address: mvazquezcarrera@ub.edu

The PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) is a potent transcriptional coactivator that acts as an upstream regulator of lipid and glucose oxidative metabolism in a variety of tissues.<sup>4</sup> In the myocardium, PGC-1 $\alpha$  may coactivate PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  subtypes, although it also interacts with and coactivates the nuclear respiratory factor-1 (NRF-1)<sup>5</sup> and the estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) transcription factors.<sup>6</sup> The primary functions of PGC-1 $\alpha$  in the heart consist of the activation of mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation, and respiration, and the transcriptional control of enzymes involved in metabolism.<sup>5,6</sup> PGC-1 $\alpha$  expression in the heart is activated perinatally, coinciding with a metabolic shift towards major FA consumption and a burst of mitochondrial biogenesis, which play a crucial role in cardiac oxidative capacity.<sup>7</sup> Similarly, PGC-1 $\alpha$  is induced in the adult heart by physiological stimuli that increase its dependence on FA oxidation for energy, such as fasting and exercise.<sup>8</sup> On the other hand, the PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$  axis regulates genes involved in glucose oxidation, such as pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4). This kinase is responsible for the inactivation by phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex, which catalyzes the rate-limiting step of glucose oxidation. Interestingly, cardiac ERR $\alpha$  expression following birth is concordant with the upregulation of PGC-1 $\alpha$  and, furthermore, deletion of the ERR $\alpha$  gene in mice has been found to accelerate heart failure in a process which involves PGC-1 $\alpha$  downregulation as well.<sup>6,8,9</sup> Cardiac hypertrophy<sup>7</sup> and heart failure<sup>10,11</sup> have been associated with decreased expression of PGC-1 $\alpha$  and its target genes in several animal models, thus providing increasing evidence of a link between lessening of PGC-1 $\alpha$  activity and cardiac dysfunction.

To gain a better understanding of the mechanisms by which exposure to TNF- $\alpha$  may result in the metabolic dysregulation that underlies heart dysfunction and failure in metabolic diseases, we have taken advantage of a human cell line of cardiac origin, AC16. Results reported herein demonstrate that TNF- $\alpha$  reduces PGC-1 $\alpha$  expression in AC16 cells *in vitro* and also in a mouse model with cardiac-specific overexpression of TNF- $\alpha$ . In AC16 cells, PGC-1 $\alpha$  downregulation eventually results in an increase in the glucose oxidation rate. The mechanism by which TNF- $\alpha$  reduces PGC-1 $\alpha$  expression involves both p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and NF- $\kappa$ B. Consequently, therapies aimed at preventing PGC-1 $\alpha$  downregulation in inflammatory states associated with metabolic disorders might be useful for preventing cardiomyopathies.

## 2. Methods

### 2.1 Reagents

GW501516 was obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). BSA was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). D-[U-<sup>14</sup>C]-glucose was purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA), and 1-[<sup>14</sup>C]-oleic acid, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP, and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP were purchased from GE Healthcare Life Sciences (Sant Cugat, Spain). All other chemicals, except when specified, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Antibody against I $\kappa$ B $\alpha$  was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); p65, Oct-1, and PPAR $\alpha$  were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany), ERR1 from Affinity BioReagents (Golden, CO, USA), and  $\beta$ -actin from Sigma.

### 2.2 Cell culture and transfection

Human AC16 cells were maintained and grown as previously described.<sup>12</sup> Briefly, non-differentiated AC16 cells were maintained in medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium:F12 (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 12.5% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and 1% Fungizone (Invitrogen), and grown at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air until they reached 70–80% confluence. For PGC-1 $\alpha$  overexpression studies, AC16 cells were transfected with pcDNA4/His-myc/PGC-1 $\alpha$  (Addgene plasmid 10974, Cambridge, MA, USA)<sup>13</sup> using the Lipofectamine 2000 kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations, with both pcDNA4/His-myc/lacZ and pcDNA4/His-myc (Invitrogen) as control vectors. Transfection time and DNA:lipofectamine ratio were set at 24 h and 1:3, respectively, after optimization with pcDNA4/His-myc/lacZ using a  $\beta$ -galactosidase reporter gene staining kit (Sigma).

### 2.3 TNF- $\alpha$ transgenic mouse cardiac sample preparation

We used transgenic TNF1.6 male mice (8 to 12-week-old) with cardiac-specific overexpression of TNF- $\alpha$ . These well-characterized mice were created as a model of cytokine-induced cardiomyopathy and congestive heart failure.<sup>14</sup> Ventricular sample tissues were obtained as described previously.<sup>15</sup> The study was approved by our Institutional Animal Research Committee and conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

### 2.4 RNA preparation and analysis

Relative levels of specific mRNAs were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as previously described.<sup>4</sup> Owing to its high transcription levels, PGC-1 $\alpha$  expression after overexpression was analysed by real-time RT-PCR. The sequences of the forward and reverse primers used for amplification are displayed in Supplementary material online, Table S1.

### 2.5 Electrophoretic mobility shift assay and immunoblot analysis

The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and immunoblot analysis were performed as previously described<sup>4,16</sup> (Supplementary material online).

### 2.6 Glucose oxidation and fatty acid oxidation

Glucose oxidation rate was determined as reported in previously published protocols,<sup>17</sup> using some modifications, while FA oxidation was measured according to an adapted protocol from Roduit *et al.*<sup>18</sup> (Supplementary material online).

### 2.7 Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of at least three separate experiments. Significant differences were established by either the Student's *t*-test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the computer program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. V4.03, San Diego, CA, USA). In the latter case, when significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons post-test was performed. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1 PGC-1 $\alpha$ expression is downregulated by TNF- $\alpha$

Treatment of AC16 cells with TNF- $\alpha$  (100 ng/mL for 24 h, see Supplementary material online) significantly induced the expression of pro-inflammatory genes such as monocyte chemoattractant protein (*MCP-1*, approximately two-fold,  $P < 0.01$ ), *IL-6* (approximately four-fold,  $P < 0.05$ ), and TNF- $\alpha$  (~20-fold,  $P < 0.001$ ) (see Supplementary material online, *Figure S1*). Next, we evaluated whether induction with TNF- $\alpha$  led to a reduction in the expression of cardiac genes involved in cell metabolism. Neither PPAR $\beta/\delta$  nor PPAR $\alpha$  expression was reduced after treatment with TNF- $\alpha$  (data not shown). In consonance with this, the expression level of PPAR target genes involved in mitochondrial FA  $\beta$ -oxidation, such as medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) or muscle-type carnitine palmitoyltransferase-I (M-CPT-I), was not reduced. However, when we examined the effects of TNF- $\alpha$  on the expression of PGC-1 $\alpha$ , a significant inhibition was observed (~80% reduction,  $P < 0.01$ ) compared with control cells (*Figure 1A*). On the contrary, expression of the close homologue PGC-1 $\beta$  remained unaltered, despite the fact it was expressed at higher levels than PGC-1 $\alpha$  in AC16 cells (data not shown). Expression of *PDK4* was found to be reduced in parallel with PGC-1 $\alpha$  expression (*Figure 1B*), whereas a marked increase in manganese superoxide dismutase (*MnSOD*) expression, an antioxidant enzyme transiently stimulated by PGC-1 $\alpha$ , was observed upon TNF- $\alpha$  stimulation (see Supplementary material online, *Figure S1*). To further confirm our results, studies with cardiac-specific transgenic mice overexpressing TNF- $\alpha$  (TNF1.6 strain) were performed. Consistent with the *in vitro* studies, TNF1.6 transgenic mice displayed reduced PGC-1 $\alpha$  (~50% reduction,  $P < 0.001$ ) and *PDK4* (~60% reduction,  $P < 0.001$ ) expression in the heart, compared with that in control mice (*Figure 1B*).

#### 3.2 NF- $\kappa$ B and p38 MAPK mediate PGC-1 $\alpha$ downregulation by TNF- $\alpha$

To assess the role of NF- $\kappa$ B in the TNF- $\alpha$ -mediated control of PGC-1 $\alpha$  and *PDK4*, we treated cells with the inhibitor parthenolide. As shown in *Figure 1C*, the ~75–80% reduction observed in the transcript levels of PGC-1 $\alpha$  and *PDK4* after treatment with TNF- $\alpha$  was prevented by parthenolide. The induction in *MCP-1*, *IL-6* and *MnSOD* mRNA levels, three well-known targets of NF- $\kappa$ B activity, was also inhibited after parthenolide treatment. Pyrrolidine dithiocarbamate was used to further confirm these results (see Supplementary material online, *Figure S2A*), since it can reduce inflammatory cytokine production in the myocardium as a consequence of NF- $\kappa$ B inhibition. On the other hand, addition of the p38 MAPK inhibitors PD169316 (*Figure 1D*) or SB202190 (see Supplementary material online, *Figure S2B*) to AC16 cells reversed some of the effects of TNF- $\alpha$ . Thus, PGC-1 $\alpha$  and *PDK4* expression reached basal levels after p38 MAPK inhibition, suggesting that this kinase was involved in the TNF- $\alpha$ -mediated PGC-1 $\alpha$  inhibition. PD169316 did not reduce the expression of *IL-6* or *MnSOD*, indicating that the pro-inflammatory profile induced by TNF- $\alpha$  did not require the activation of the p38 MAPK pathway.

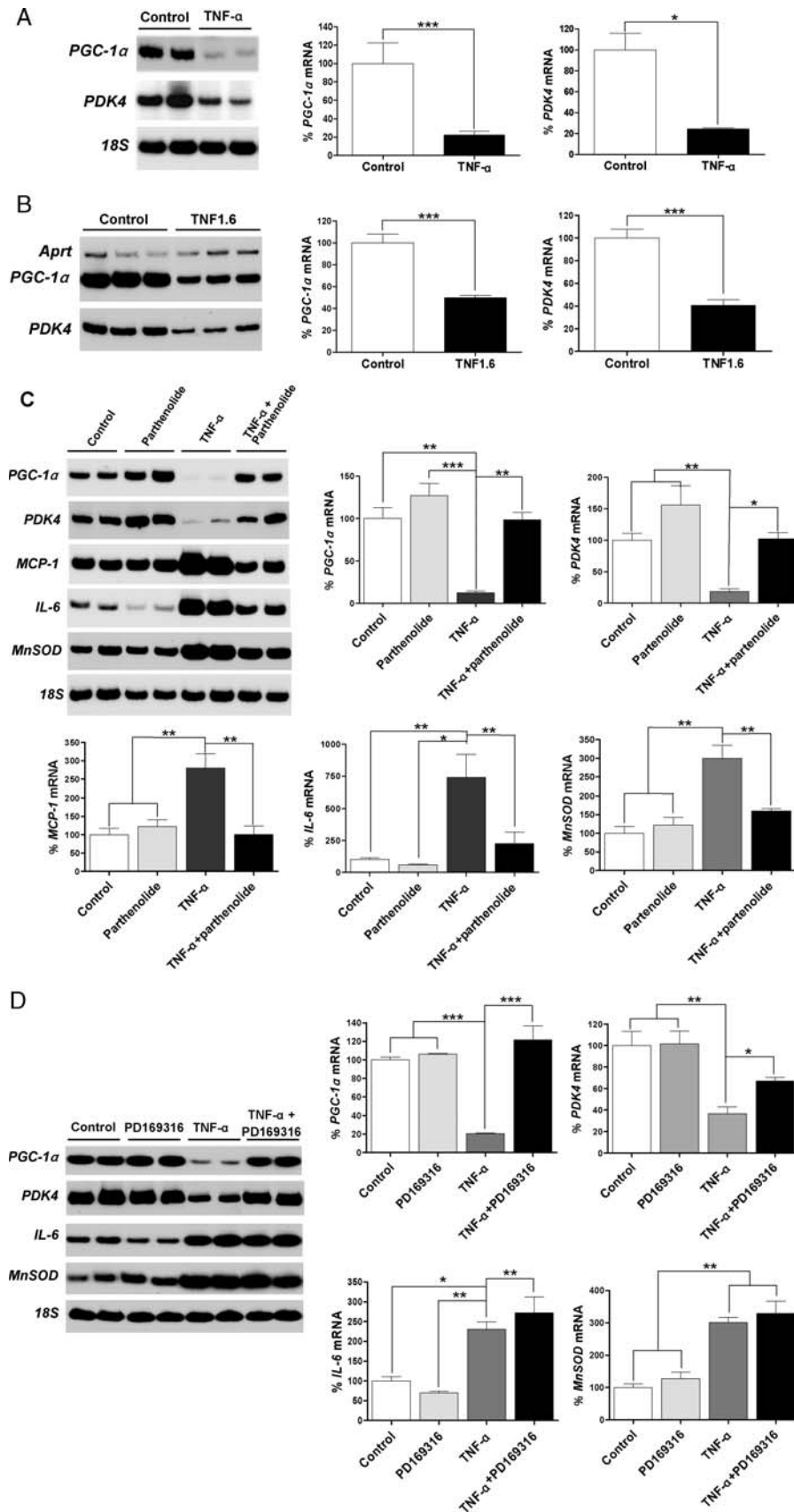
An EMSA was carried out to verify whether incubation of AC16 cells with TNF- $\alpha$  led to increased NF- $\kappa$ B activity. NF- $\kappa$ B formed four specific DNA-binding complexes with nuclear proteins, but supershift analyses demonstrated that only complexes I and II contained the p65 subunit of NF- $\kappa$ B. Complexes I, II, and III increased in TNF- $\alpha$ -treated cells, and this effect was completely reversed by parthenolide (*Figure 2A*). PD169316 addition also prevented complex I formation, although, surprisingly, complexes II and III were induced even more than in TNF- $\alpha$ -treated cells (*Figure 2A*). These results suggest that NF- $\kappa$ B and p38 MAPK interact in mediating the TNF- $\alpha$  response, despite the fact that PD169316 did not prevent pro-inflammatory cytokine upregulation by TNF- $\alpha$ .

The nuclear localization of NF- $\kappa$ B is prevented by interaction with I $\kappa$ B inhibitors, which leads to its cytoplasmic accumulation as an inactive heterodimer. Because the biological effects of NF- $\kappa$ B are dependent at least in part on its translocation to the nucleus after protein I $\kappa$ B kinase-mediated phosphorylation, we also assessed I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels after TNF- $\alpha$  exposure. As expected, cells exposed to TNF- $\alpha$  showed reduced I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels (*Figure 2B*). This reduction in I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels was not prevented after coincubation with parthenolide or PD169316, suggesting that PGC-1 $\alpha$  downregulation by TNF- $\alpha$  did not depend on I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels. Although parthenolide may specifically inhibit NF- $\kappa$ B activity by preventing I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, our results are consistent with another mechanism of parthenolide action, which involves alkylation of p65 at Cys38, thus inhibiting DNA binding of NF- $\kappa$ B.<sup>19</sup> In accordance with this, nuclear p65 protein levels rapidly increased after TNF- $\alpha$  treatment, a phenomenon that was prevented by parthenolide and PD169316 treatments (*Figure 2B*).

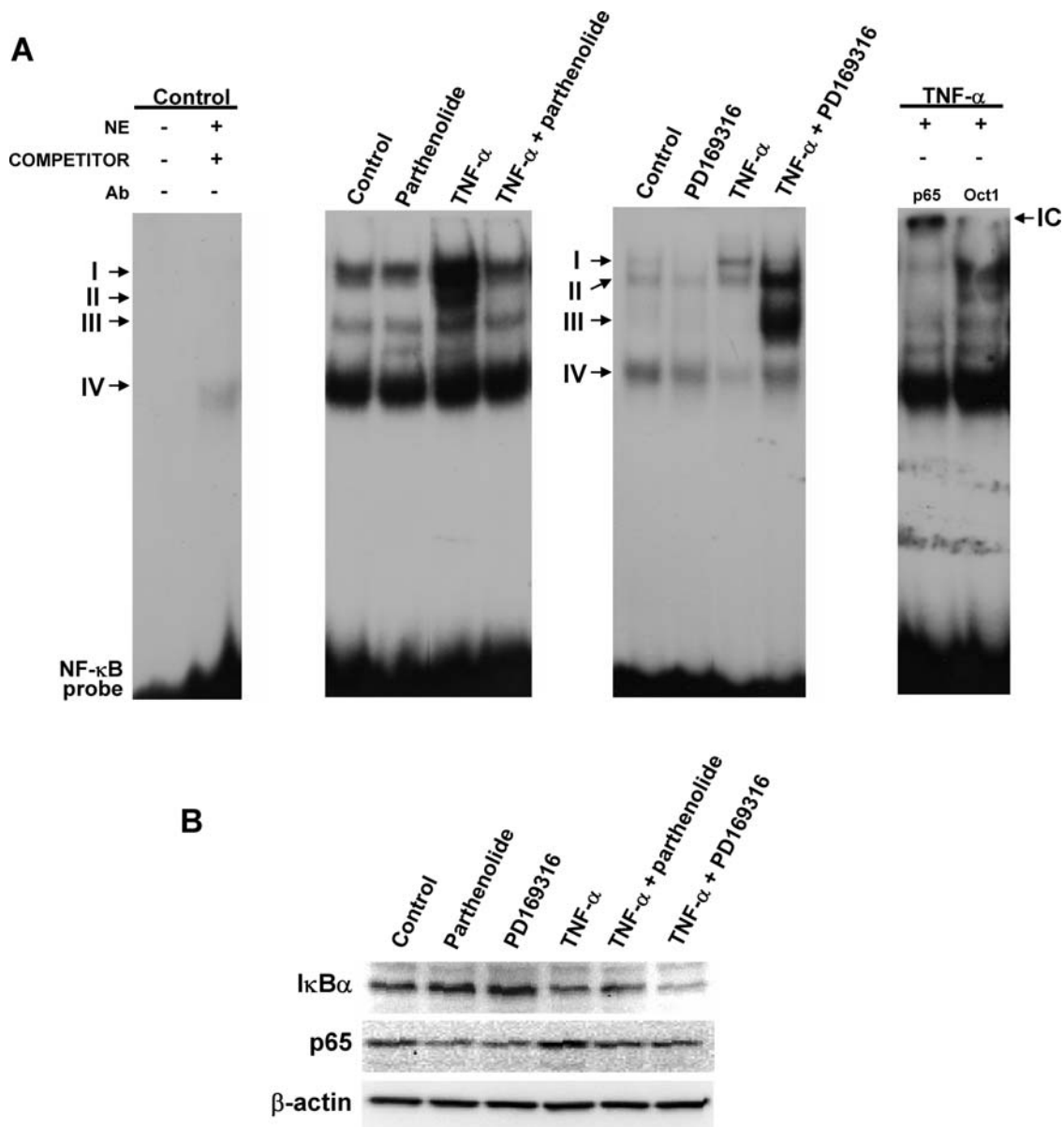
#### 3.3 PPAR $\beta/\delta$ and estrogen-related receptor $\alpha$ might be involved in PDK4 downregulation

A plasmid carrying the PGC-1 $\alpha$  gene under the control of a constitutive CMV promoter was used to overexpress this coactivator in AC16 cells (see Supplementary material online, *Figure S3A*). Exogenous PGC-1 $\alpha$  overexpression for 24 h induced a substantial increase in the expression of this gene, which completely abrogated its downregulation after TNF- $\alpha$  treatment (see Supplementary material online, *Figure S3B*). Expression analysis of *PDK4*, *MnSOD*, and *IL-6* in PGC-1 $\alpha$ -transfected cells after addition of TNF- $\alpha$  clearly demonstrated that only *PDK4* transcription was controlled by this coactivator in human AC16 cells (*Figure 3A*). To exclude any undesired effect owing to unspecific induction of the PGC-1 $\alpha$ -related coactivator PGC-1 $\beta$ , the expression of this gene was also evaluated and no changes were observed (data not shown).

*PDK4* may be activated in various mouse tissues by administration of PPAR ligands. However, there is also a PPAR-independent pathway in skeletal muscle that activates *PDK4* through the orphan nuclear receptor ERR $\alpha$ , in a process which also requires PGC-1 $\alpha$  recruitment. Since previous data obtained in our laboratory had indicated that PPAR inhibition owing to repression of transcriptional activity by NF- $\kappa$ B might be responsible for *PDK4* downregulation, we investigated the role of PPAR by means of EMSA. The PPRE probe formed only one specific complex



**Figure 1** *PGC-1 $\alpha$*  and *PDK4* expression is downregulated by tumour necrosis factor- $\alpha$  in AC16 cells (A) and in left ventricle tissue of transgenic TNF1.6 mice (B) in a process mediated by nuclear factor- $\kappa$ B (C) and p38 mitogen-activated protein kinase (D). AC16 cells were incubated with tumour necrosis factor- $\alpha$  (A, C, and D) in the presence or absence of parthenolide (10  $\mu$ mol/L, C) or PD169316 (10  $\mu$ mol/L, D). The panels display a representative autoradiogram of the reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of the corresponding mRNA levels. Graphics represent the quantification of the 18S-normalized (A, C, and D) or *Aprt*-normalized (B) mRNA levels, expressed as a percentage of control samples. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

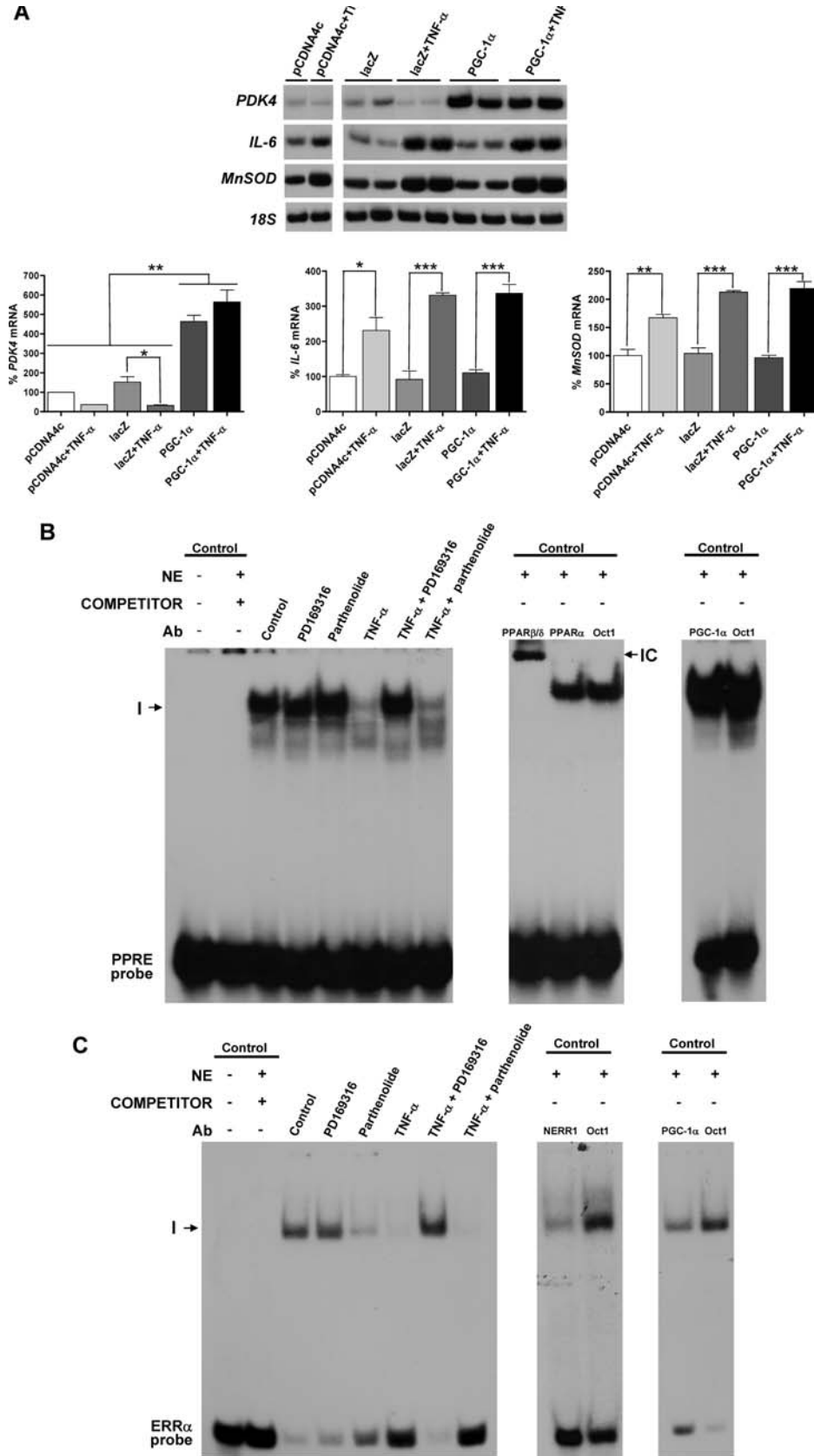


**Figure 2** PGC-1 $\alpha$  downregulation by tumour necrosis factor- $\alpha$  involves both nuclear factor- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase activation. (A) Electrophoretic mobility shift assay showing nuclear factor- $\kappa$ B activity after treatment of AC16 cells with tumour necrosis factor- $\alpha$  in the presence or absence of 10  $\mu$ M parthenolide or 10  $\mu$ M PD169316 (NE, nuclear extracts; IC, immunocomplex). (B) Effect of exogenous tumour necrosis factor- $\alpha$  addition on I $\kappa$ B $\alpha$  and the p65 subunit of nuclear factor- $\kappa$ B protein levels. Total (I $\kappa$ B $\alpha$ ) or nuclear (p65) protein extracts were isolated from AC16 cells incubated with tumour necrosis factor- $\alpha$  in the presence or absence of parthenolide or PD169316. To show equal loading of protein,  $\beta$ -actin signal from the same blot is included. All autoradiograph data are representative of three separate experiments.

with AC16 nuclear proteins, and supershift studies demonstrated that this DNA-binding activity was almost entirely attributable to the PPAR $\beta/\delta$  subtype (Figure 3B). This is not surprising given that PPAR $\beta/\delta$  was expressed at much higher levels than PPAR $\alpha$  in these cells (data not shown). As expected, TNF- $\alpha$  significantly reduced the PPAR DNA-binding activity. Although addition of PD169316 inhibited the ability of TNF- $\alpha$  to alter PPAR $\beta/\delta$  activity, parthenolide had no effect (Figure 3B). In addition, when the synthetic PPAR $\beta/\delta$  agonists L-165041 or GW501516 were added in the presence of TNF- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  or PDK4 transcript levels were not restored (data not shown). To clarify these results, we analysed the expression of two additional enzymes that are known to be PPAR-regulated, acyl CoA-oxidase and the liver form of CPT-I, which are also

expressed in the heart. The expression of these genes was not affected by TNF- $\alpha$  (data not shown). Moreover, in contrast with previous reports,<sup>20</sup> overexpression of PGC-1 $\alpha$  did not increase *M-CPT-I* or *MCAD* expression (data not shown), thus ruling out this protein as a transcriptional coactivator of these genes in AC16 cells. Addition of anti-PGC-1 $\alpha$  antibody in a supershift assay performed with the PPRE probe did not reduce the binding of Complex I (Figure 3B, right panel), whereas addition of this antibody to an EMSA assay performed with the same nuclear extracts but using the ERR $\alpha$  probe yielded a strong reduction of the Complex I (Figure 3C, right panel), thus reinforcing the lack of binding of PGC-1 $\alpha$  to PPAR in these cells.

ERR $\alpha$  DNA-binding activity, as examined by EMSA, yielded only one specific complex, which displayed a reduction in



**Figure 3** (A) *PDK4* is transcriptionally regulated by PGC-1 $\alpha$ . Cells were transfected with pCDNA4/His-myc/PGC-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), or pCDNA4/His-myc (pCDNA4c) and pCDNA4/His-myc/lacZ (lacZ) as control vectors, and treated with or without tumour necrosis factor- $\alpha$ . *PDK4*, *IL-6*, and *MnSOD* mRNA levels were analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction, as described in Figure 1. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . Tumour necrosis factor- $\alpha$  reduces the DNA-binding activity of PPAR $\beta/\delta$  and estrogen-related receptor  $\alpha$  in AC16 cells, in a process that may be reversed by PD169316 but not parthenolide. Electrophoretic mobility shift assay was performed with a  $^{32}$ P-labelled peroxisome proliferator-activated receptor $\beta/\delta$  (B, middle panel) or estrogen-related receptor  $\alpha$  (C, middle panel) nucleotide and crude nuclear protein extracts (NE) as described in Figure 2. Supershift analysis performed by incubation with an antibody directed against peroxisome proliferator-activated receptor $\beta/\delta$  (B, middle panel) or estrogen-related receptor  $\alpha$  (C, middle panel) is also shown.



the presence of TNF- $\alpha$  (Figure 3C). Addition of PD169316 in the presence of TNF- $\alpha$  reversed ERR $\alpha$  transcriptional activity but parthenolide did not. The reduction of ERR $\alpha$  complex I formation after incubation with parthenolide alone might account for the lack of effect of the latter when coincubated with TNF- $\alpha$ , although the underlying mechanisms still remain to be elucidated. Since it has been reported that PGC-1 $\alpha$  may induce the transcription of ERR $\alpha$  in an autoregulatory feed-forward mechanism,<sup>21</sup> in addition to co-activating its transcriptional activity, the expression of this transcription factor was also assessed. However, ERR $\alpha$  expression was not reduced in parallel with PGC-1 $\alpha$  after TNF- $\alpha$  addition (data not shown).

### 3.4 Downregulation of PDK4 increases the glucose oxidation rate

We next sought to determine whether changes in PDK4 expression affected glucose and FA oxidation in AC16 cells. As shown in Figure 4A, TNF- $\alpha$  induced a significant increase in the glucose oxidation rate (1.15 nmol glucose/g h) with respect to untreated AC16 cells (0.79 nmol glucose/g h), and coincubation with parthenolide or PD169316 reduced glucose oxidation to basal levels (0.53 and 0.83 nmol glucose/g h, respectively). By contrast, TNF- $\alpha$  treatment had no effect on FA oxidation as measured by the rate of oleate oxidation (Figure 4B).

## 4. Discussion

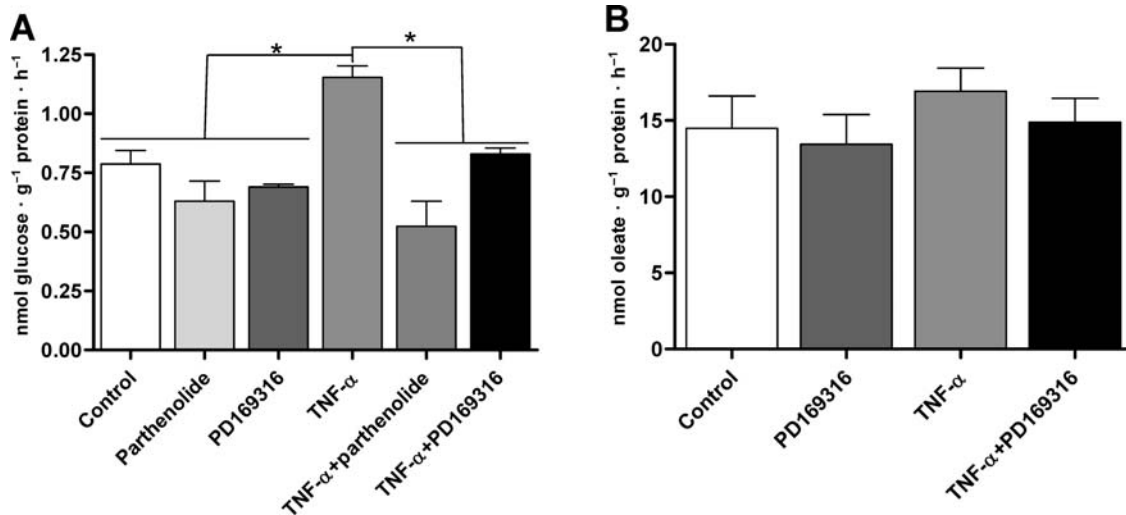
To date, most studies directed at understanding the mechanisms that underlie the shift in glucose metabolism during cardiac hypertrophy have been performed with murine models. In the present study, we have taken advantage of a novel human cardiac model, the AC16 cell line, to examine the metabolic disturbances that may arise from inflammatory processes in the heart. To our knowledge, this is the first report examining such inflammatory processes in an *in vitro* model of human origin, thus potentially overcoming many of the inconsistencies encountered when results obtained with murine models have been extrapolated to human beings. This is important, especially taking into account that some of the transcription factors involved in metabolism and inflammation, such as PPAR,<sup>22</sup> are known to be expressed at lower levels in human cells than in rodent cells. In fact, gene expression is also differentially regulated by PPAR in human vs. rodent cells.<sup>23</sup> A major drawback of the study might be the origin of the AC16 cell line itself, since it consists of a fusion of primary ventricular cells with SV-40-transformed fibroblasts. However, this cell line develops many of the biochemical and morphological properties characteristic of cardiac muscle cells, even though it does not form completely differentiated cardiomyocytes.<sup>12</sup> Cardiomyocytes play an important role in cardiac pathobiology, even though other myocardial cells, such as fibroblasts, which constitute up to 70% of the ventricular myocardial cells, may also contribute to this process.<sup>24</sup> Both cell types secrete and respond to inflammatory TNF- $\alpha$ ,<sup>3,25</sup> although cardiomyocytes have been reported to be the major local source of TNF- $\alpha$  in the myocardium during inflammatory processes.<sup>26</sup>

Results presented here show that a marked inhibition in PGC-1 $\alpha$  expression is produced in the presence of locally

increased TNF- $\alpha$  levels. In agreement with our previous results obtained with human AC16 cells and transgenic TNF1.6 mice, treatment for only 6 h with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  already reduced PGC-1 $\alpha$  expression in rat neonatal cardiomyocytes (data not shown). Numerous studies have indicated that PGC-1 $\alpha$  is a crucial regulator of cardiac metabolism during development and in response to stress. Cardiac PGC-1 $\alpha$  expression, along with its target transcription factors PPAR and ERR $\alpha$ , are all reduced in animal models of heart failure<sup>5,27</sup> and in pathological forms of cardiac hypertrophy,<sup>6</sup> suggesting that this decrease may be responsible for an energetic failure that can eventually lead to cardiac dysfunction. In support of this hypothesis, PGC-1 $\alpha$  null mice were found to develop early heart failure and dysfunction.<sup>27</sup> Not surprisingly, AC16 cells exposed to TNF- $\alpha$  displayed a pro-inflammatory profile as a direct consequence of increased transcriptional activity of NF- $\kappa$ B, which has been implicated in the development of cardiac hypertrophy and failure.<sup>28</sup>

Recent studies suggest that mutations in cardiac mitochondrial DNA may contribute to the development of dilated cardiomyopathy.<sup>15</sup> However, analysis of the expression of genes whose transcription is subjected to PGC-1 $\alpha$  coactivation and that are involved in mitochondrial biogenesis, the electron transport chain, or muscle glucose uptake, such as *mtTFA* (mitochondrial transcription factor A), *CytC* (cytochrome c oxidase), *NRF-1*, *COII* (cytochrome c oxidase, subunit II of complex IV), *ND1* (NADH dehydrogenase subunit 1), and *GLUT4* demonstrated that neither TNF- $\alpha$  nor PGC-1 $\alpha$  regulated their expression in AC16 cells (data not shown). Studies with PGC-1 $\beta$  or PGC-1 $\alpha$  deficient mice have demonstrated that PGC-1 $\alpha$  is not essential for the fundamental mitochondrial biogenesis process in the heart,<sup>6,29</sup> and this might explain the lack of effect on genes involved in mitochondrial biogenesis and oxidative capacity that was observed in our study. Since PGC-1 $\beta$  can also stimulate mitochondrial biogenesis and respiration, it is plausible that this coactivator might compensate for the reduction in PGC-1 $\alpha$  even though its expression was not upregulated in AC16 cells. In fact, TNF1.6 mice displayed marked mitochondrial structural and functional alterations which coincided with reduced PGC-1 $\beta$  expression (data not shown). On the other hand, the possibility that mitochondrial changes driven by PGC-1 $\alpha$  would become apparent over the course of time cannot be ruled out, since our *in vitro* studies limited gene expression analyses to up to 48 h after TNF- $\alpha$  addition.

A recent study has demonstrated that PDK4 modulation is sufficient to cause metabolic inflexibility and exacerbate cardiomyopathy in transgenic mice,<sup>30</sup> and we found that PDK4 expression correlated with PGC-1 $\alpha$  levels in AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  and in myocardial tissue of TNF1.6 mice. Accordingly, TNF- $\alpha$  stimulated the glucose oxidation rate in AC16 cells, and coincubation with parthenolide or PD169316 confirmed that both NF- $\kappa$ B and p38 MAPK pathways controlled glucose metabolism, thus assuring a constant energy supply. Likewise, TNF1.6 mice displayed a shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, suggesting an increase in glucose utilization.<sup>15</sup> These results are attractive, especially taking into account that during chronic ischaemia, cardiac hypertrophy, or heart failure, myocardial energy substrate utilization shifts towards increased glycolysis.<sup>31</sup> The lack of a decrease in FA oxidation rate observed in AC16 cells after TNF- $\alpha$



**Figure 4** PGC-1 $\alpha$  downregulation by tumour necrosis factor- $\alpha$  dysregulates metabolism. (A) Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces glucose oxidation to  $^{14}\text{CO}_2$ . The graph represents the [U- $^{14}\text{C}$ ]-glucose oxidation rates in AC16 cells incubated with tumour necrosis factor- $\alpha$  in the presence or absence of parthenolide or PD169316. (B) Effect of tumour necrosis factor- $\alpha$ -stimulated cells on fatty acid oxidation, measured as the production of  $^{14}\text{CO}_2$  in the incubation medium after treatment with tumour necrosis factor- $\alpha$  in the absence or presence of PD169316. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

treatment further supports our previous results, indicating that the expression of enzymes involved in FA oxidation was not downregulated. Previous studies have already reported that an increase in the activities of several glycolytic enzymes may precede the metabolic changes observed in cardiac hypertrophy.<sup>32</sup> Since in this study AC16 cells were collected for FA oxidation studies just after 24 h TNF- $\alpha$  treatment, it is feasible that changes in the FA oxidation rate took place after the increase in glucose oxidation. Alternatively, the occurrence of other PDK isoforms expressed in the heart might also explain the maintenance of FA oxidation at basal levels.<sup>21</sup>

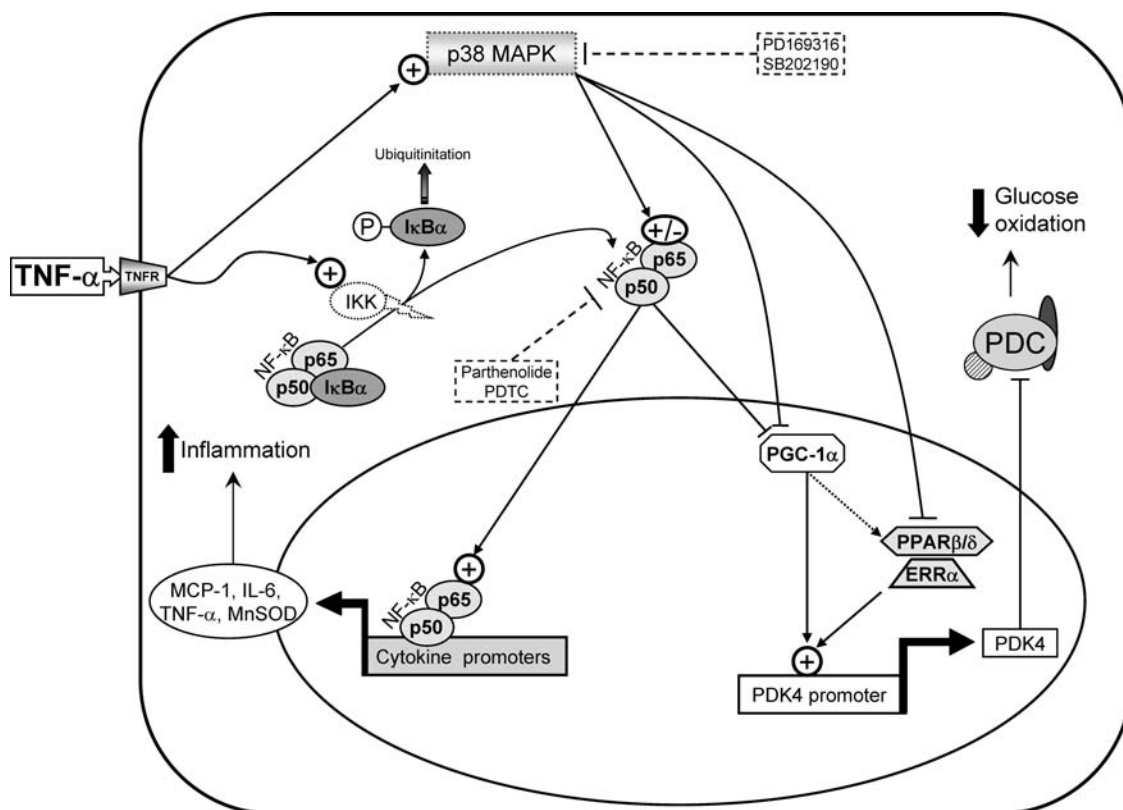
Previous reports have proposed that ERR $\alpha$  and PPAR are able to mediate the PGC-1 $\alpha$ -induced activation of *PDK4* expression,<sup>21</sup> and our *in vitro* results point to a dysregulation of both ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  transcriptional activity after TNF- $\alpha$  treatment. However, addition of PD169316 inhibited ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  downregulation by TNF- $\alpha$ , but parthenolide did not. In spite of this, parthenolide did prevent *PDK4* downregulation, thus suggesting an additional mechanism by which *PDK4* is transcriptionally regulated. In agreement with this, addition of parthenolide to neonatal rat cardiomyocytes stimulated with phenylephrine has been reported to induce *PDK4* expression to levels that far exceed those observed at the basal state.<sup>33</sup>

The pro-inflammatory transcription factor NF- $\kappa\text{B}$  has already been implicated in the regulation of PGC-1 $\alpha$  expression.<sup>4</sup> However, an interesting question arises about the mechanism by which PGC-1 $\alpha$  is downregulated after NF- $\kappa\text{B}$  activation. Stimulation of H9c2 myotubes with lipopolysaccharide caused a fall in the expression of genes involved in FA metabolism, in a process mediated by the physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa\text{B}$  and PPAR $\beta/\delta$ .<sup>33</sup> Since PGC-1 $\alpha$  gene transcription is induced by PPAR, it is possible that PGC-1 $\alpha$  downregulation by TNF- $\alpha$  was a direct consequence of the reduction in PPAR $\beta/\delta$  activity. However, PPAR $\beta/\delta$  expression was not reduced by TNF- $\alpha$  treatment and, addition of PPAR $\beta/\delta$  agonists had no effect on PGC-1 $\alpha$  and *PDK4* expression (data not shown), although PPAR $\beta/\delta$  DNA-binding activity was found to be

strongly inhibited after TNF- $\alpha$  treatment. As reported in PPAR $\alpha^{-/-}$  mice,<sup>34</sup> the compensatory effects on the part of PPAR $\alpha$  might account for our results. However, RT-PCR and EMSA analysis confirmed that PPAR $\beta/\delta$  is the predominant PPAR subtype in AC16 cells<sup>33</sup> and, furthermore, PPAR $\alpha$  mRNA did not increase in cells after TNF- $\alpha$  addition (data not shown). As stated above, PD169316, but not parthenolide, was capable of blocking the reduction in PPAR $\beta/\delta$  transcriptional activity, suggesting that it was not a consequence of increased NF- $\kappa\text{B}$  activity but was due instead to an increase in p38 MAPK activity. These results imply that PPAR $\beta/\delta$  phosphorylation by p38 MAPK inhibits the transcriptional activity of the former. In fact, p38 MAPK inhibition by PD169316 has been related to increased PPAR $\gamma$  activity in adipose cells.<sup>35</sup>

It has been reported that p38 MAPK is necessary for cytokine-induced NF- $\kappa\text{B}$  activation,<sup>36</sup> and both p38 MAPK and NF- $\kappa\text{B}$  may influence PGC-1 $\alpha$  expression.<sup>37</sup> The addition of PD169316 to TNF- $\alpha$ -treated AC16 cells further increased NF- $\kappa\text{B}$  binding with transcriptional complexes II and III, an effect that has also been detected in human HUVEC and HEK293 cells,<sup>38</sup> while almost abolished transcriptional complex I. These results suggest that NF- $\kappa\text{B}$  binding to complex I, which contains the p65 subunit of NF- $\kappa\text{B}$ , is specifically involved in PGC-1 $\alpha$  downregulation. Several reports have stated a positive role for p38 MAPK in the regulation of PGC-1 $\alpha$  activity, not only at the transcriptional<sup>27</sup> but also at the post-transcriptional level.<sup>39</sup> Conversely, we now report that activation of p38 MAPK is responsible for the reduction in PGC-1 $\alpha$  expression. These results are consistent with a recent report in which incubation of C2C12 mouse myoblasts with palmitate decreased the expression of PGC-1 $\alpha$  via p38 MAPK-dependent transcriptional pathways.<sup>37</sup> In support of this, data obtained with transgenic mice overexpressing the p38 MAPK upstream kinase MAPK-kinase-6 suggest that p38 MAPK is involved in the negative regulation of mitochondrial biogenesis.<sup>5</sup>

Based on these data, we propose a new mechanism that may explain the shift in glucose metabolism during cardiac



**Figure 5** Schematic representation of the mechanisms involved in the metabolic dysregulation of AC16 cells treated with tumour necrosis factor- $\alpha$ . Activation of both nuclear factor- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways by tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates, besides a pro-inflammatory profile, the reduction of *PGC-1 $\alpha$*  and *PDK4* expression and subsequent increase in glucose oxidation rate.

hypertrophy induced by pro-inflammatory TNF- $\alpha$  (Figure 5). The suggested hypothesis might involve: (i) activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK by TNF- $\alpha$ ; (ii) NF- $\kappa$ B/p38 MAPK-mediated inhibition of *PGC-1 $\alpha$* ; (iii) reduction of *PDK4* expression; and (iv) stimulation of glucose oxidation. Specific molecular repressors of *PGC-1 $\alpha$*  have not yet been thoroughly studied. Even so, it has been reported that an E3 ubiquitin ligase, SCFCdc4, may reduce *PGC-1 $\alpha$*  protein levels through ubiquitin-mediated proteolysis in a process that requires specific phosphorylation by p38 MAPK on two Cdc4 phosphodegron motifs located within the *PGC-1 $\alpha$*  sequence.<sup>40</sup> This is particularly important, taking into account that *PGC-1 $\alpha$*  contains a suppression domain with several p38 MAPK phosphorylation sites<sup>41</sup> and that *PGC-1 $\alpha$*  is capable of inducing its own expression.<sup>42</sup>

Decreased *PGC-1 $\alpha$*  expression in the human heart may contribute to the metabolic disturbances characteristic of insulin resistance and obesity. Hence it is tempting to speculate that induction of *PGC-1 $\alpha$*  activity might have beneficial effects on cardiac metabolism, and represents a novel molecular target that directly links cytokines with heart metabolism. These results also suggest a possible therapeutic benefit for the inhibition of p38 MAPK and especially NF- $\kappa$ B activity in the heart. Likewise, blocking of local myocardial TNF- $\alpha$  secretion by cardiomyocytes might also be useful after cardiac transplantation, when intracardiac TNF- $\alpha$  secretion contributes to accelerate cardiac allograft hypertrophy and fibrosis. In addition, both of them could be used as early pathophysiological markers of heart failure in the insulin-resistant state.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. W. Wahli (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland) for providing L-165041 and PPAR $\beta/\delta$  antibody, and Dr. T. Finkel (NHLBI, Bethesda, MD, USA) for the pcDNA4/His-myc/*PGC-1 $\alpha$*  plasmid. We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for their helpful assistance.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Fundación Ramón Areces, and the Spanish Government (SAF2006-01475). X.P. (Programa Juan de la Cierva) and T.C. (FPI) were supported by grants from the Spanish Government. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an ISCIII project.

## References

- Bergman MR, Kao RH, McCune SA, Holycross BJ. Myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am J Physiol* 1999;277:H543-H550.
- Ding G, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. PPAR $\delta$  modulates lipopolysaccharide-induced TNF $\alpha$  inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:821-828.

3. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 2007;**76**:81–90.
4. Coll T, Jove M, Rodríguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sánchez RM et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and NF- $\kappa$ B activation. *Diabetes* 2006;**55**:2779–2787.
5. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 $\alpha$ . *Cardiovasc Res* 2008;**79**:208–217.
6. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 2007;**115**:2540–2548.
7. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O et al. Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 2005;**1**:259–271.
8. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 2005;**115**:547–555.
9. Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, Weinheimer CJ, Courtois M, Kovacs A et al. The nuclear receptor ERR $\alpha$  is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab* 2007;**6**:25–37.
10. Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S et al. Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J* 2004;**23**:3559–3569.
11. Chang LT, Sun CK, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ, Chua S et al. Downregulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$  in diabetic rats. *Int Heart J* 2006;**47**:901–910.
12. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L et al. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**39**:133–147.
13. Ichida M, Nemoto S, Finkel T. Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ). *J Biol Chem* 2002;**277**:50991–50995.
14. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 1997;**81**:627–635.
15. Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 2001;**104**:2492–2497.
16. Planavila A, Rodríguez-Calvo R, Palomer X, Coll T, Sanchez RM, Merlos M et al. Atorvastatin inhibits GSK-3 $\beta$  phosphorylation by cardiac hypertrophic stimuli. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1781**:26–35.
17. Caruso M, Miele C, Formisano P, Condorelli G, Bifulco G, Oliva A et al. In skeletal muscle, glucose storage and oxidation are differentially impaired by the IR1152 mutant receptor. *J Biol Chem* 1997;**272**:7290–7297.
18. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 2004;**53**:1007–1019.
19. Garcia-Pineres AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL et al. Cysteine 38 in p65/NF- $\kappa$ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J Biol Chem* 2001;**276**:39713–39720.
20. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000;**106**:847–856.
21. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1 $\alpha$  coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR $\alpha$ : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:10684–10694.
22. Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF. Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  expression in human liver. *Mol Pharmacol* 1998;**53**:14–22.
23. Lawrence JW, Li Y, Chen S, DeLuca JG, Berger JP, Umbenhauer DR et al. Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$ . PPAR  $\alpha$  fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression. *J Biol Chem* 2001;**276**:31521–31527.
24. Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2007;**9**:623–652.
25. Ancey C, Menet E, Corbi P, Fredj S, Garcia M, Rucker-Martin C et al. Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:78–85.
26. Peng T, Lu X, Feng Q. Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and myocardial depression. *Circulation* 2005;**111**:1637–1644.
27. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005;**1**:361–370.
28. Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M. NF- $\kappa$ B as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol* 2003;**3**:229–254.
29. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006;**116**:615–622.
30. Zhao G, Jeoung NH, Burgess SC, Rosaen-Stowe KA, Inagaki T, Latif S et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H936–H943.
31. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996;**94**:2837–2842.
32. Taegtmeier H, Overturf ML. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* 1988;**11**:416–426.
33. Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Nuclear factor- $\kappa$ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2005;**280**:17464–17471.
34. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM et al. 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* 2002;**277**:26089–26097.
35. Aouadi M, Laurent K, Prot M, Marchand-Brustel Y, Binetruy B, Bost F. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* 2006;**55**:281–289.
36. Chandrasekar B, Valente AJ, Freeman GL, Mahimainathan L, Mummidi S. Interleukin-18 induces human cardiac endothelial cell death via a novel signaling pathway involving NF- $\kappa$ B-dependent PTEN activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**339**:956–963.
37. Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva WS, Espinoza D et al. Peroxisome proliferator activator receptor ( $\gamma$ ) coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2007;**282**:15439–15450.
38. Weber NC, Blumenthal SB, Hartung T, Vollmar AM, Kiemer AK. ANP inhibits TNF- $\alpha$ -induced endothelial MCP-1 expression—involvement of p38 MAPK and MKP-1. *J Leukoc Biol* 2003;**74**:932–941.
39. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR- $\gamma$  coactivator-1. *Mol Cell* 2001;**8**:971–982.
40. Olson BL, Hock MB, Ekholm-Reed S, Wohlschlegel JA, Dev KK, Kralli A et al. SCF $\beta$  acts antagonistically to the PGC-1 $\alpha$  transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev* 2008;**22**:252–264.
41. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;**24**:78–90.
42. Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, Giralt M. PPAR $\delta$ , but not PPAR $\alpha$ , activates PGC-1 $\alpha$  gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**354**:1021–1027.

Publicació 3

**The p65 subunit of NF- $\kappa$ B binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells**

**David Álvarez-Guardia**, Xavier Palomer, Teresa Coll, Mercy M. Davidson, Tung O. Chan, Arthur M. Feldman, Juan C. Laguna, and Manuel Vázquez-Carrera

Cardiovascular Research (2010) 87, 449–458

Que en la categoria CARDIAC & CARDIOVASCULAR SYSTEMS es troba en la posició 8 de 95 (Q1)

Índex d'impacte (2009): 5,801



El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) és un factor de transcripció induït per una àmplia varietat d'estímuls, entre els que es troben la hiperglucèmia i les citocines proinflamatòries. Aquest factor nuclear està associat amb la hipertròfia i la insuficiència cardíaca. En estudis anteriors s'ha descrit que la inhibició del coactivador-1 $\alpha$  del receptor activat per proliferadors peroxisòmics  $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ) per part de NF- $\kappa$ B podria explicar el canvi en el metabolisme de la glucosa que es produeix en els processos patològics cardíacs induïts per estímuls inflamatoris, malgrat que els mecanismes específics que hi participen encara no es coneixen. En aquest estudi vam voler determinar aquests mecanismes específics pels quals l'exposició al factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) condueix a una disminució de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  en les cèl·lules cardíaca, i com a conseqüència, a la desregulació metabòlica que es manifesta en la disfunció i insuficiència cardíaca.

En aquest treball, mitjançant l'ús d'estudis de coimmunoprecipitació, es presenta per primera vegada que la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B està lligada constitutivament a PGC-1 $\alpha$  tant en cèl·lules cardíaca humanes com en el cor de ratolí, i que l'activació de NF- $\kappa$ B per l'exposició a TNF- $\alpha$  augmenta aquesta unió. Anàlisis de sobreexpressió i silenciament gènic han demostrat que el factor principal que limita el grau d'aquesta associació és p65, perquè només la modulació d'aquesta proteïna modifica la interacció física. Les dades obtingudes mostren que aquesta major interacció física entre p65 i PGC-1 $\alpha$  després de l'activació de NF- $\kappa$ B és responsable de la reducció en l'expressió de PGC-1 $\alpha$  i de la subsegüent desregulació en l'oxidació de la glucosa.

En base a aquestes dades, proposem que p65 reprimeix directament l'activitat PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules cardíaca, fet que condueix a una reducció de l'expressió de la piruvat deshidrogenasa cinasa quatre (PDK4) i el consegüent augment en l'oxidació de la glucosa observat durant l'estat proinflamatori.

**NOTA:** Adjunto l'editorial referent a aquest article, publicada en la mateixa revista, amb el títol *Metabolic disorders in heart diseases with an inflammatory background* de Francois R. Boucher (Cardiovascular Research (2010) 87, 403–405).





# The p65 subunit of NF- $\kappa$ B binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells

David Álvarez-Guardia<sup>1†</sup>, Xavier Palomer<sup>1†</sup>, Teresa Coll<sup>1</sup>, Mercy M. Davidson<sup>2</sup>, Tung O. Chan<sup>3</sup>, Arthur M. Feldman<sup>3</sup>, Juan C. Laguna<sup>1</sup>, and Manuel Vázquez-Carrera<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Diagonal 643, Barcelona E-08028, Spain; <sup>2</sup>Department of Neurology, Columbia University, New York, NY 10032, USA; and <sup>3</sup>Center for Translational Medicine, Department of Medicine, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA

Received 8 January 2010; revised 2 March 2010; accepted 3 March 2010; online publish-ahead-of-print 7 March 2010

Time for primary review: 18 days

## Aims

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a transcription factor induced by a wide range of stimuli, including hyperglycaemia and pro-inflammatory cytokines. It is associated with cardiac hypertrophy and heart failure. It was previously reported that the NF- $\kappa$ B-mediated inhibition of proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) might explain the shift in glucose metabolism during cardiac pathological processes induced by pro-inflammatory stimuli, although the specific mechanisms remain to be elucidated. We addressed the specific mechanisms by which exposure to tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) results in PGC-1 $\alpha$  down-regulation in cardiac cells and, as a consequence, in the metabolic dysregulation that underlies heart dysfunction and failure.

## Methods and results

By using coimmunoprecipitation studies, we report for the first time that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B is constitutively bound to PGC-1 $\alpha$  in human cardiac cells and also in mouse heart, and that NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  exposure increases this binding. Overexpression and gene silencing analyses demonstrated that the main factor limiting the degree of this association is p65, because only the modulation of this protein modified the physical interaction. Our data show that the increased physical interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$  after NF- $\kappa$ B activation is responsible for the reduction in PGC-1 $\alpha$  expression and subsequent dysregulation of glucose oxidation.

## Conclusion

On the basis of these data, we propose that p65 directly represses PGC-1 $\alpha$  activity in cardiac cells, thereby leading to a reduction in pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) expression and the subsequent increase in glucose oxidation observed during the proinflammatory state.

## Keywords

NF- $\kappa$ B • PGC-1 $\alpha$  • Inflammation

## 1. Introduction

Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a pro-inflammatory cytokine secreted by the myocardium in response to several stimuli. Sustained increases in TNF- $\alpha$  have been related to several pathological processes, such as ischaemic myocardial injury, cardiac hypertrophy, and chronic heart failure. For instance, spontaneously hypertensive rats show increased TNF- $\alpha$  production in heart, which contributes to cardiac remodelling, decreased cardiac function, and faster progression to heart failure.<sup>1</sup> Likewise, the failing human heart produces

large amounts of TNF- $\alpha$ ,<sup>2</sup> while it has been proposed that persistent intra-cardiac expression of TNF- $\alpha$  contributes to the development of cardiac allograft hypertrophy.<sup>3</sup> Inflammatory cytokines are under the transcriptional control of the ubiquitous inducible factor named nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), and activation of NF- $\kappa$ B itself is involved in various cardiovascular diseases, such as cardiac hypertrophy and heart failure.<sup>4</sup>

The adult mammalian heart generates ATP primarily from fatty acid  $\beta$ -oxidation by mitochondria; however, under certain circumstances, such as cardiac hypertrophy or heart failure, there is a progressive

<sup>†</sup> The first two authors contributed equally to the study.

\* Corresponding author. Tel: +34 9340 24531; fax: +34 9340 35982, Email: mvazquezcarrera@ub.edu

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

decline in overall mitochondrial oxidative catabolism while reliance on anaerobic glycolytic pathways is increased. This metabolic shift may become maladaptive over time owing to myocyte energy insufficiency and myocardial lipid accumulation, both linked to cardiac dysfunction. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) acts as a key upstream regulator of lipid and glucose oxidative metabolism. In the myocardium, PGC-1 $\alpha$  regulates the expression of genes involved in glucose oxidation, such as pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4). PDK4 is the enzyme responsible for the phosphorylation-induced inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), which catalyzes the rate-limiting step of glucose oxidation. Numerous studies have indicated that PGC-1 $\alpha$  is a crucial regulator of cardiac metabolism in response to stress. Cardiac hypertrophy and heart failure have both been associated with decreased PGC-1 $\alpha$  expression,<sup>5,6</sup> which implicates this decrease in energy failure and perhaps, cardiac dysfunction. Increased levels of TNF- $\alpha$  reduce PGC-1 $\alpha$  and PDK4 expression in human cardiac AC16 cells *in vitro* as well as in heart of TNF1.6 mice, a murine model with cardiac-specific overexpression of TNF- $\alpha$  that has been established as a suitable model of cytokine-induced cardiomyopathy.<sup>2,7</sup> However, an interesting question arises as to the mechanism by which PGC-1 $\alpha$  is down-regulated after NF- $\kappa$ B activation. Here we address the specific mechanisms by which exposure to TNF- $\alpha$  results in PGC-1 $\alpha$  down-regulation in cardiac cells and, as a consequence, in the metabolic dysregulation that underlies heart dysfunction and failure.

## 2. Methods

Supplementary material online section provides a detailed description of the methodology used.

### 2.1 Cell culture and transfection studies

Human AC16 cells were maintained and grown as previously described.<sup>8</sup> Treatment conditions throughout the study were set up in a previous study to 24 h and 100 ng/mL TNF- $\alpha$ , adding 10  $\mu$ M parthenolide 6 h before sample collection (see Supplementary Methods).<sup>7</sup> Cells were transfected or cotransfected for 24–48 h with Lipofectamine 2000 in OPTI-MEM reduced serum medium following the manufacturer's recommendations (Invitrogen).<sup>7</sup> For *in vitro* overexpression studies, the constructs used were pcDNA4/His-myc/PGC-1 $\alpha$  (human gene, Addgene plasmid 10974, Cambridge, MA, USA),<sup>9</sup> pcDNA3/His-myc/PGC-1 $\alpha$  (mouse, Addgene plasmid 1026),<sup>10</sup> pcDNA3/His-myc/PGC-1 $\alpha$ -L2/3A (LXXLL mutant, mouse, Addgene plasmid 48),<sup>11</sup> pcDNA3/His-myc/p65 (mouse, Addgene plasmid 20012),<sup>12</sup> and pCR3.1/Flag/IKK $\alpha$  (mouse, Addgene plasmid 15467).<sup>13</sup> Small-interfering RNA (siRNA)-mediated PGC-1 $\alpha$  and p65 gene silencing was carried out by transfecting AC16 cells with human PGC-1 $\alpha$  or p65 siRNA (Santa Cruz Biotechnology), using a scrambled siRNA as a transfection control.

### 2.2 Preparation of cardiac samples from TNF- $\alpha$ transgenic mice

We used transgenic male TNF1.6 mice (8–12 weeks old) with cardiac-specific overexpression of TNF- $\alpha$ .<sup>2</sup> Ventricular sample tissues were obtained as described previously.<sup>14</sup> The study was approved by The Institutional Animal Care and Use Committee of Thomas Jefferson University and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

### 2.3 RNA preparation and analysis

Relative levels of specific mRNAs were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described.<sup>15</sup> The sequences of the forward and reverse primers used for amplification are shown in Supplementary material online, Table S1.

### 2.4 Electrophoretic mobility shift assay and immunoblot analysis

The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and immunoblot analyses were performed as previously described,<sup>15</sup> using nuclear extracts isolated according to Andrews and Faller.<sup>16</sup>

### 2.5 Coimmunoprecipitation studies

Cell nuclear extracts (10  $\mu$ g) were brought to a final volume of 250  $\mu$ L with buffer containing 10 mM PBS, 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, BSA 2%, and 1 mg/mL non-fat milk for 6 h at 4°C and incubated with 4  $\mu$ g of anti-p65. Immunocomplex was captured by incubating the samples with 50  $\mu$ L protein A-agarose suspension overnight at 4°C. Agarose beads were collected by centrifugation and washed. After microcentrifugation, the pellet was resuspended with SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min at 100°C. The resultant supernatant was subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE.

### 2.6 *In vitro* coimmunoprecipitation assay

pcDNA3.1/His-myc/PGC-1 $\alpha$ , pcDNA3.1/His-myc/PGC-1 $\alpha$ -L2/3A, and pcDNA3/His-myc/p65 were translated *in vitro* by using the TNT T7 polymerase-coupled reticulocyte lysate system and the transcend tRNA chemiluminescent non-radioactive detection system (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. Then, 10  $\mu$ L of the *in vitro* translated proteins were combined and incubated at room temperature for 2 h. Finally, coimmunoprecipitation was performed as described above.

### 2.7 Glucose oxidation

The glucose oxidation rate was measured as reported in previously published protocols<sup>17,18</sup> with some modifications.

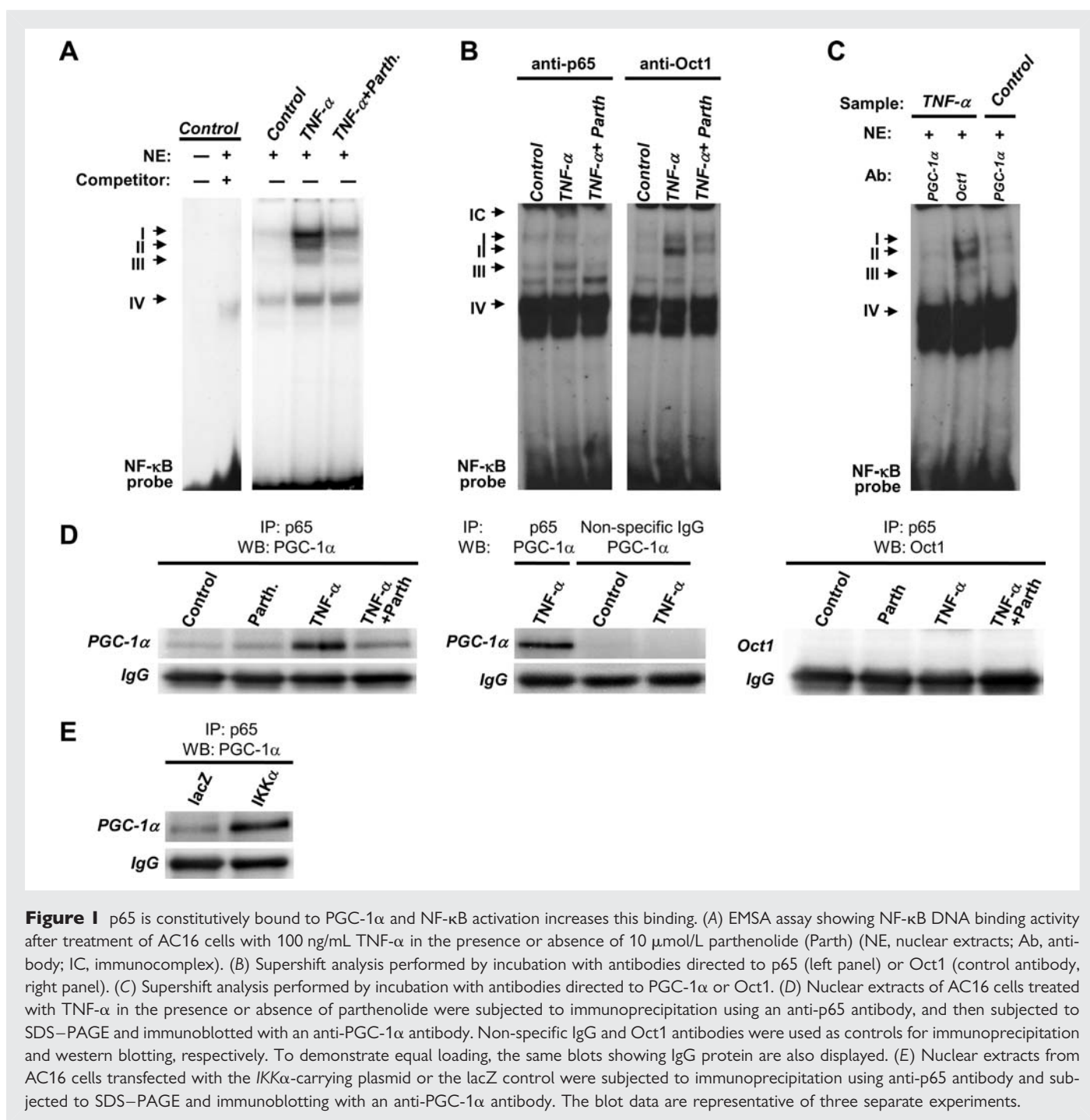
### 2.8 Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of at least three separate experiments. Significant differences were established by either the Student's *t*-test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the computer program GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). In the latter case, when significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons post-test was performed. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 The p65 subunit of NF- $\kappa$ B is constitutively bound to PGC-1 $\alpha$ and NF- $\kappa$ B activation increases this binding

As a first approach, we assessed the binding of PGC-1 $\alpha$  to NF- $\kappa$ B in AC16 cells by means of supershift analyses during an EMSA. Addition of TNF- $\alpha$  to AC16 cells led to increased NF- $\kappa$ B DNA binding activity of complexes I, II, and III, an effect which was reversed by parthenolide (Figure 1A). The competitor lane demonstrated that complexes I–III were specific for the NF- $\kappa$ B probe, whereas supershift analyses demonstrated that only complexes I and II contained the p65



subunit of NF- $\kappa$ B (Figure 1B). Interestingly, incubation with an antibody against PGC-1 $\alpha$ , but not a control antibody against nuclear Oct1 protein, attenuated the NF- $\kappa$ B DNA-binding activity observed in non-induced cells or after stimulation with TNF- $\alpha$  (Figure 1C). These data indicated that PGC-1 $\alpha$  and p65 were present in the same NF- $\kappa$ B DNA binding complexes. Given that the most widespread form of the NF- $\kappa$ B transcription factor in mammalian cells is the p65/p50 heterodimer, we performed coimmunoprecipitation studies to elucidate whether PGC-1 $\alpha$  and, specifically, p65, were bound in AC16 cells. Figure 1D shows that p65 was constitutively bound to PGC-1 $\alpha$  in resting cells, and this binding was increased upon NF- $\kappa$ B activation with TNF- $\alpha$ . Non-specific IgG and Oct1

antibodies were used to verify the specificity of the physical interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$ .

We next transfected AC16 cells with a plasmid carrying the *IKK $\alpha$*  gene, in order to evaluate whether the TNF- $\alpha$ -mediated effects on PGC-1 $\alpha$  resulted solely from NF- $\kappa$ B activation. As expected, the physical interaction between PGC-1 $\alpha$  and p65 was also induced after *IKK $\alpha$*  overexpression (Figure 1E).

### 3.2 PGC-1 $\alpha$ binding to NF- $\kappa$ B depends mostly on the expression of p65

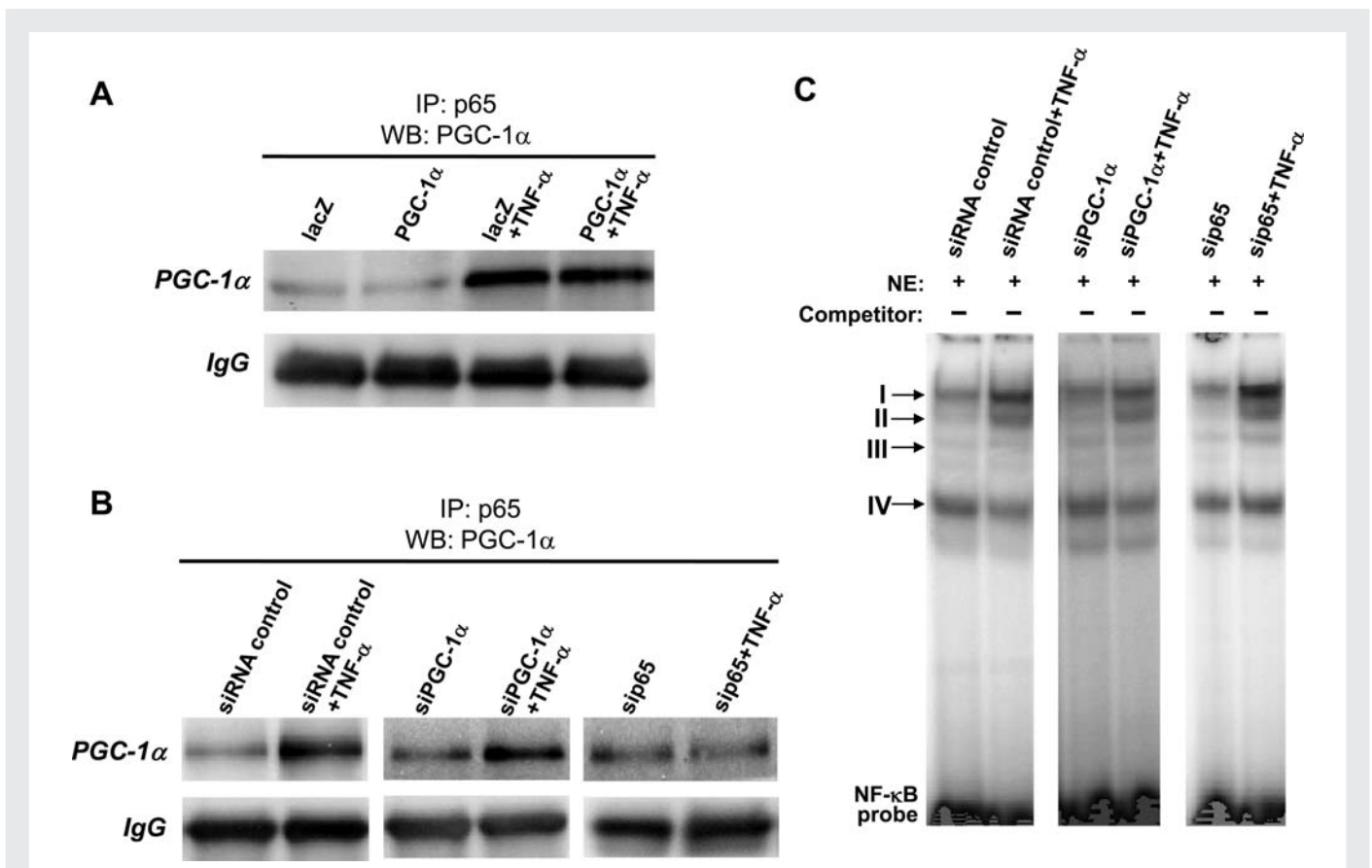
When a plasmid carrying the *PGC-1 $\alpha$*  gene (*pcDNA4/PGC-1 $\alpha$* ) was transfected to AC16 cells, no differences in the interaction between

PGC-1 $\alpha$  and p65 were observed compared with control cells transfected with a lacZ-containing plasmid (pcDNA4/lacZ), as assessed by coimmunoprecipitation analysis (Figure 2A). Furthermore, addition of TNF- $\alpha$  to cells transfected with pcDNA4/PGC-1 $\alpha$  yielded an increase in PGC-1 $\alpha$  binding to p65 that was comparable to that reached in control cells transfected with lacZ. Analogous results were obtained when PGC-1 $\alpha$  expression was knocked down with short-interfering RNA (siPGC-1 $\alpha$ ). Thus, siPGC-1 $\alpha$  did not prevent the basal or induced binding of PGC-1 $\alpha$  to p65 as compared with control cells transfected with a scrambled siRNA (Figure 2B). However, a reduction of up to 70% in PGC-1 $\alpha$  expression was detected (Figure 3). This observation is consistent with the lack of changes in PGC-1 $\alpha$  and PDK4 expression after transfection with siPGC-1 $\alpha$  and treatment with TNF- $\alpha$  (Figure 3). In the presence of siPGC-1 $\alpha$ , the NF- $\kappa$ B DNA binding activity of complexes I and II reached levels similar to those achieved in siRNA control-transfected cells after the addition of TNF- $\alpha$  (Figure 2C). The lack of effect of siPGC-1 $\alpha$  on NF- $\kappa$ B DNA binding activity indicates that the association between PGC-1 $\alpha$  and p65 does not interfere with the transcriptional activity of the latter. In support of this finding, the expression of *IL-6* and monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), two well-known target genes of NF- $\kappa$ B activity, was not further upregulated in stimulated cells compared with control siRNA (Figure 3).

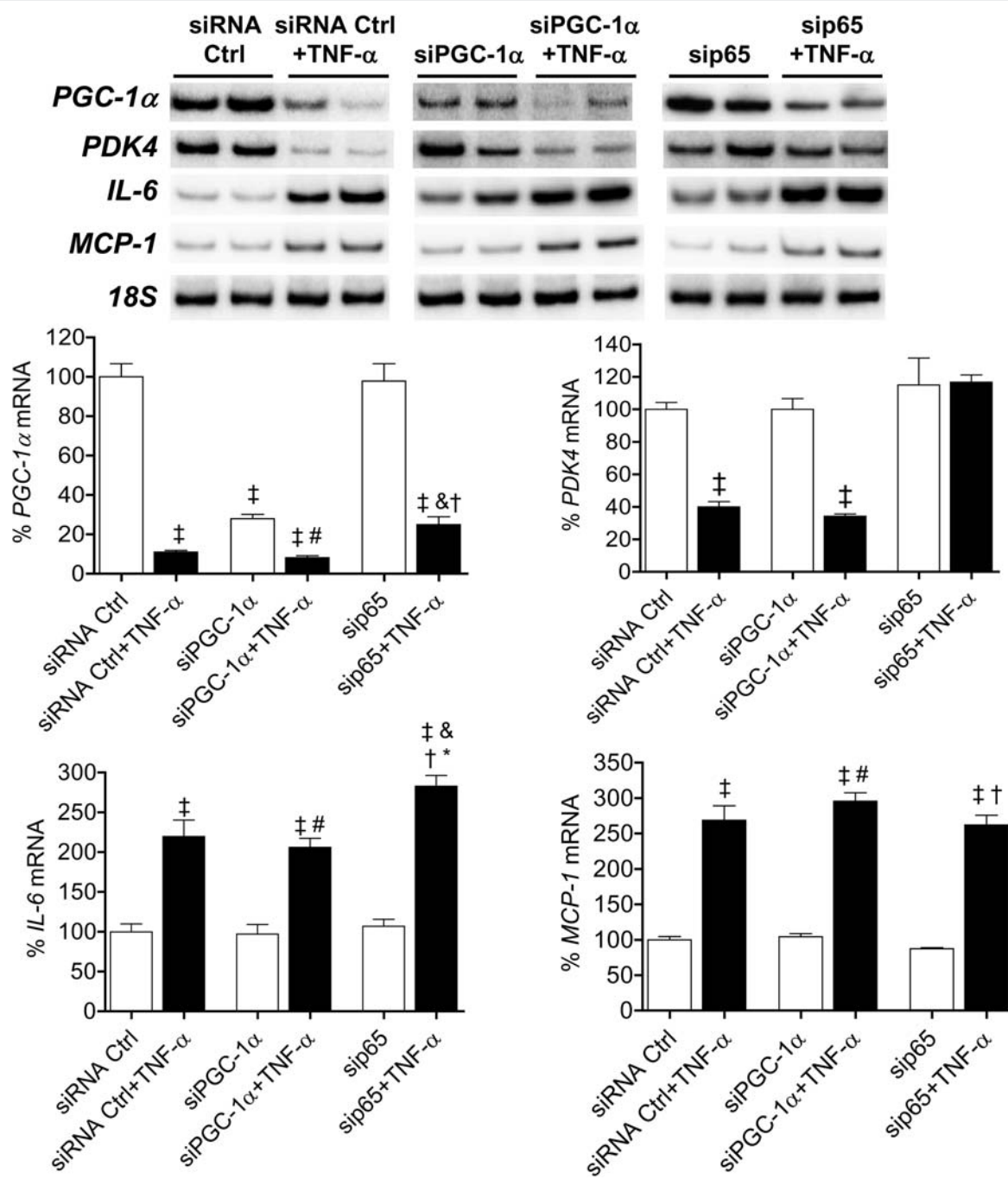
Next we examined the effects of knocking down *p65* with a specific siRNA (sip65). Transfection with sip65 down-regulated the levels of this protein up to 30% when compared with control siRNA (see Supplementary material online, Figure S1), and this reduction was sufficient to prevent the enhanced interaction of p65 with PGC-1 $\alpha$  induced by TNF- $\alpha$  treatment (Figure 2B). Down-regulation of the sequestration of PGC-1 $\alpha$  by p65 had a slight repercussion on PGC-1 $\alpha$  expression, although there was a clear tendency towards weaker inhibition of its expression by TNF- $\alpha$  (88 vs. 75% for siRNA control + TNF- $\alpha$  and sip65 + TNF- $\alpha$ , respectively, Figure 3). Surprisingly, the inhibition of *p65* expression did not result in a minor activation of NF- $\kappa$ B after TNF- $\alpha$  treatment. However, this inhibition promoted the DNA binding activity of complex I (Figure 2C). In accordance with this observation, the expression of *IL-6* was further increased with regard to siRNA control and siPGC-1 $\alpha$  in the presence of TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ , Figure 3).

### 3.3 The LXXLL domains of PGC-1 $\alpha$ are involved in its association with p65

When a plasmid encoding for the mouse PGC-1 $\alpha$  protein, which contained the mutated leucine motifs L2/3A (pCDNA3/PGC-1 $\alpha$ -L2/3A), was transfected into AC16 cells, it failed to suppress the enhanced interaction with p65 in the presence of TNF- $\alpha$  (see Supplementary



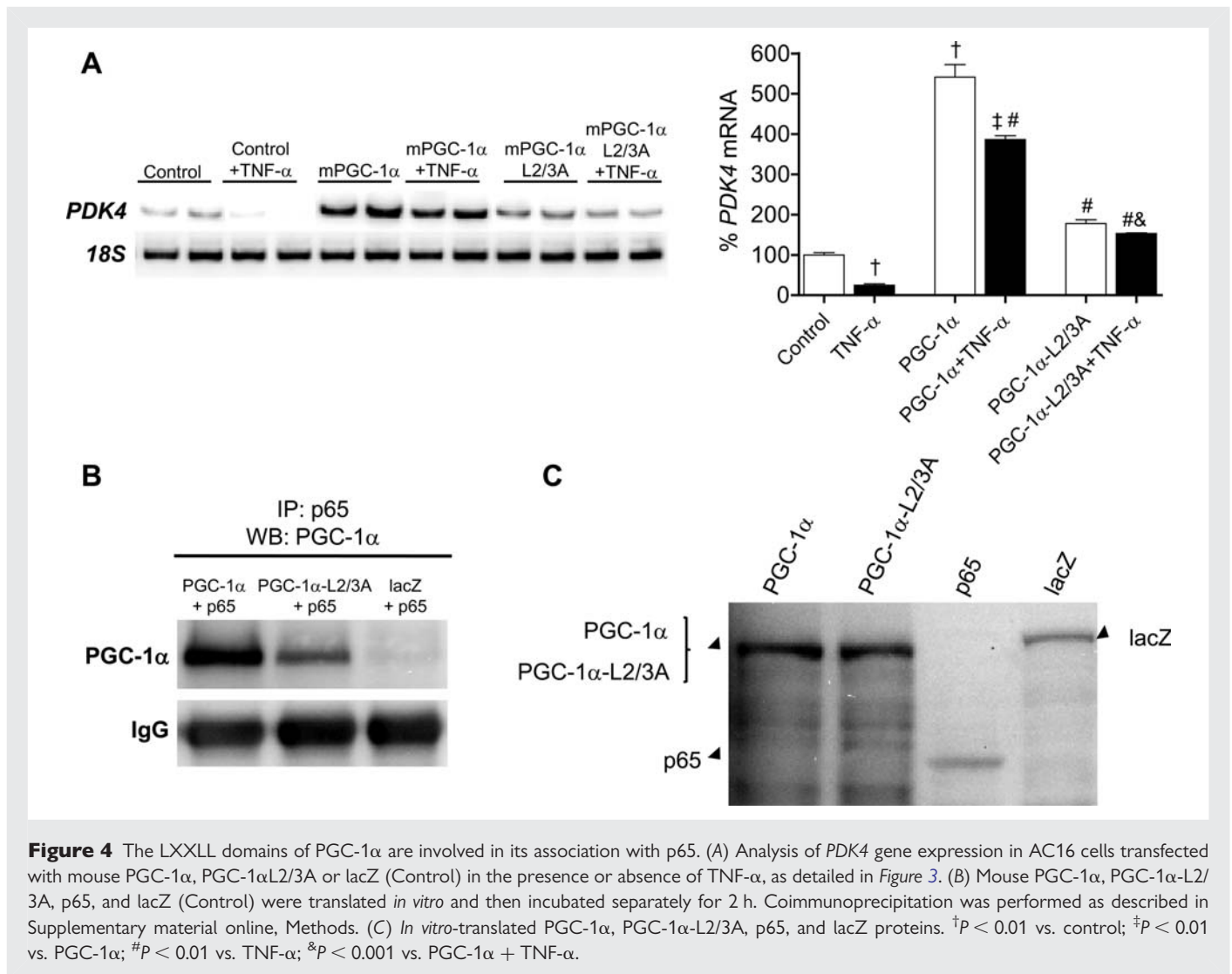
**Figure 2** PGC-1 $\alpha$  binding to NF- $\kappa$ B depends mostly on the expression of p65. Nuclear extracts from AC16 cells transfected with plasmids carrying the PGC-1 $\alpha$  or the lacZ control genes (A) or with specific siRNA to *p65* or PGC-1 $\alpha$  (B), and in the presence or absence of TNF- $\alpha$ , were subjected to immunoprecipitation with anti-p65 antibody and SDS-PAGE was immunoblotted with anti-PGC-1 $\alpha$  antibody as detailed in Figure 1. (C) EMSA assay showing NF- $\kappa$ B DNA binding activity after PGC-1 $\alpha$  or *p65* gene silencing in AC16 cells, and in the presence or absence of TNF- $\alpha$  (NE, nuclear extracts).



**Figure 3** Effects of PGC-1 $\alpha$  and p65 knock down on gene expression. Analysis of PGC-1 $\alpha$ , PDK4, IL-6, and MCP-1 gene expression in siRNA transfected AC16 cells in the presence or absence of TNF- $\alpha$ . The panels display a representative autoradiogram of the RT-PCR analysis of the corresponding mRNA levels. Graphics show the quantification of the 18S-normalized mRNA levels ( $n = 3$ ), expressed as a percentage of control samples  $\pm$  SD. <sup>†</sup> $P < 0.001$  vs. siRNA control; <sup>‡</sup> $P < 0.05$  vs. siPGC-1 $\alpha$ ; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. siRNA control + TNF $\alpha$ ; <sup>&</sup> $P < 0.001$  vs. sip65; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. siPGC-1 $\alpha$  + TNF- $\alpha$ .

material online, Figure S2). This finding is not surprising given that PGC-1 $\alpha$  binding to p65 was not dependent on the protein levels of the former, as indicated by human PGC-1 $\alpha$  overexpression experiments. We then analysed the effect of the mutated PGC-1 $\alpha$ L2/3A protein on PDK4 expression. Overexpression of PGC-1 $\alpha$  strongly induced PDK4 expression when compared with control cells (six-fold,  $P < 0.001$ ), whereas the mutant PGC-1 $\alpha$ -L2/3A led to a smaller increase (1.7-fold,  $P < 0.05$ , Figure 4A). Addition of TNF- $\alpha$  reduced PDK4 expression in control cells (75% reduction vs.

control,  $P < 0.05$ ) and PGC-1 $\alpha$ -transfected cells (30% vs. PGC-1 $\alpha$ ,  $P < 0.01$ ), but not the PGC-1 $\alpha$ -L2/3A mutant. Thus, a new approach was undertaken to confirm the involvement of LXXLL motifs in p65 binding. With this aim, plasmids carrying the PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ -L2/3A or p65 genes were used to translate proteins *in vitro*, followed by binding and a coimmunoprecipitation assay. The binding between PGC-1 $\alpha$  and p65 was markedly reduced when the leucine motifs were mutated to AXXLL (L2) and AAXXL (L3), thus indicating that these motifs are involved in this process (Figure 4B).



**Figure 4** The LXXLL domains of PGC-1 $\alpha$  are involved in its association with p65. (A) Analysis of *PDK4* gene expression in AC16 cells transfected with mouse PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ L2/3A or lacZ (Control) in the presence or absence of TNF- $\alpha$ , as detailed in Figure 3. (B) Mouse PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ -L2/3A, p65, and lacZ (Control) were translated *in vitro* and then incubated separately for 2 h. Coimmunoprecipitation was performed as described in Supplementary material online, Methods. (C) *In vitro*-translated PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ -L2/3A, p65, and lacZ proteins. <sup>†</sup> $P < 0.01$  vs. control; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs. PGC-1 $\alpha$ ; <sup>&</sup> $P < 0.001$  vs. PGC-1 $\alpha$  + TNF- $\alpha$ .

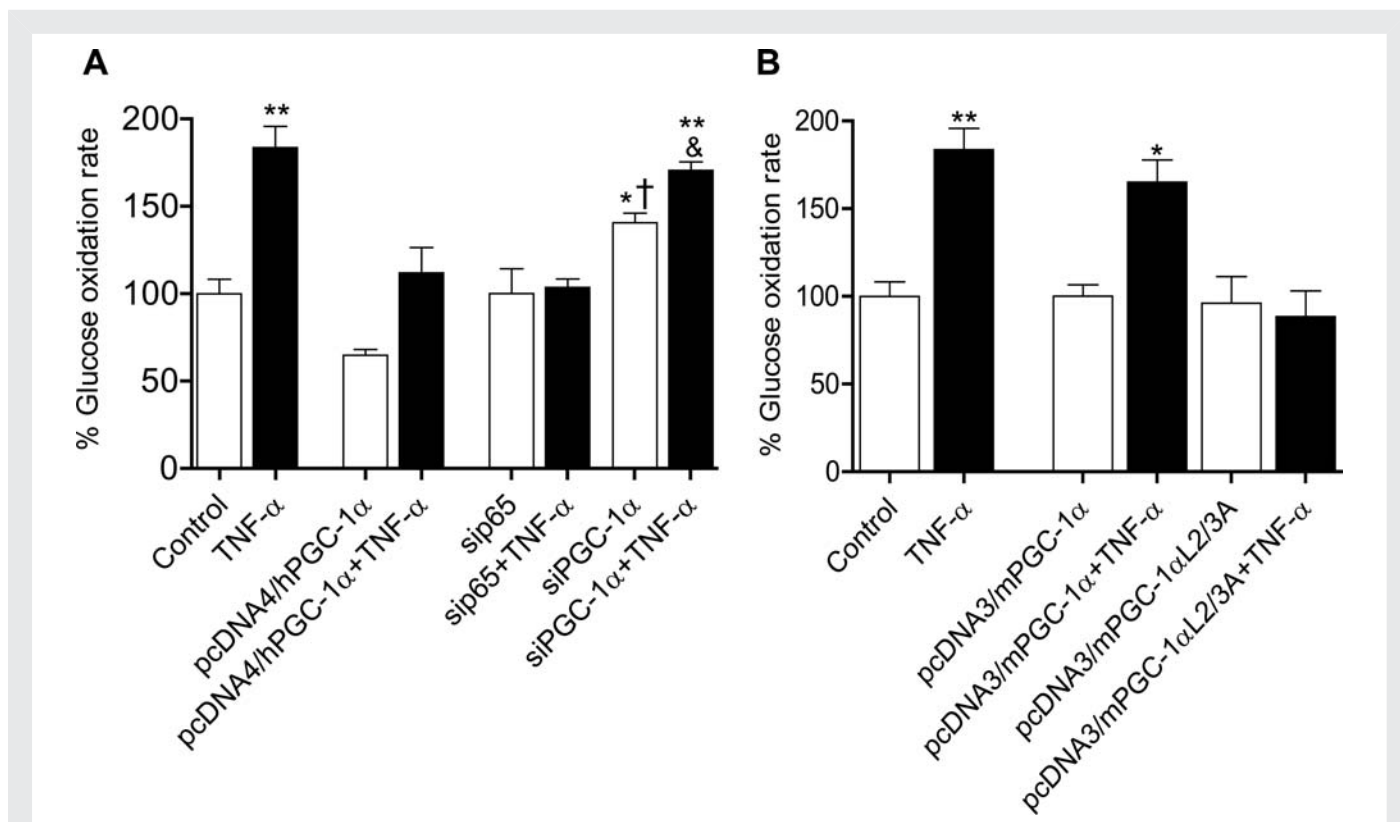
### 3.4 The physical interaction between PGC-1 $\alpha$ and p65 is related to an increased glucose oxidation rate

Treatment with TNF- $\alpha$  induced the glucose oxidation rate up to 80% with regard to control cells and, as expected, down-regulation of *PGC-1 $\alpha$*  expression with siPGC-1 $\alpha$  increased the glucose oxidation rate up to 40% (Figure 5A). The glucose oxidation rate was further increased when TNF- $\alpha$  was added to siPGC-1 $\alpha$  compared with siPGC-1 $\alpha$  alone ( $P < 0.05$  vs. siPGC-1 $\alpha$ , Figure 5A). No effect on the basal glucose oxidation rate was detected after *p65* gene silencing; however, in the presence of TNF- $\alpha$ , the knock down of *p65* prevented AC16 cells from increased glucose oxidation. This effect is consistent with the reduced capacity of p65 to bind to PGC-1 $\alpha$ . Overexpression of the human PGC-1 $\alpha$  protein yielded a slight reduction in glucose oxidation, although this decrease was not statistically significant. Addition of TNF- $\alpha$  to these PGC-1 $\alpha$ -transfected cells increased the catabolism of glucose (64 vs. 111%), although never reaching the increase achieved in control non-transfected cells treated with TNF- $\alpha$ . Finally, when the effect of L2/3A mutation on the glucose oxidation rate was examined, a correlation was found with *PDK4* expression. Thus, addition of TNF- $\alpha$  to mouse

PGC-1 $\alpha$ -transfected AC16 cells yielded a significant increase in the glucose oxidation rate (1.65-fold vs. control,  $P < 0.05$ ). This increase was not observed when the mutant was used (Figure 5B).

### 3.5 The physical interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$ is also increased *in vivo* in heart of TNF1.6 mice

To further confirm the results obtained *in vitro*, we also performed studies with mice. Transgenic TNF1.6 mice displayed enhanced NF- $\kappa$ B transcriptional activity in heart compared with control mice (Figure 6A). However, and as reflected in the supershift analysis, only complex I contained the p65 subunit of NF- $\kappa$ B. Of note was the observation that the addition of anti-PGC-1 $\alpha$  antibodies to the nuclear extracts reduced the DNA binding activity of complex I, thereby indicating that there is a physical interaction between PGC-1 $\alpha$  and p65 also in mice. Consistent with the *in vitro* studies, TNF1.6 transgenic mice displayed enhanced binding of PGC-1 $\alpha$  to p65 in heart compared with wild-type mice, despite the observation that the latter also showed weak binding in the basal state (Figure 6B).



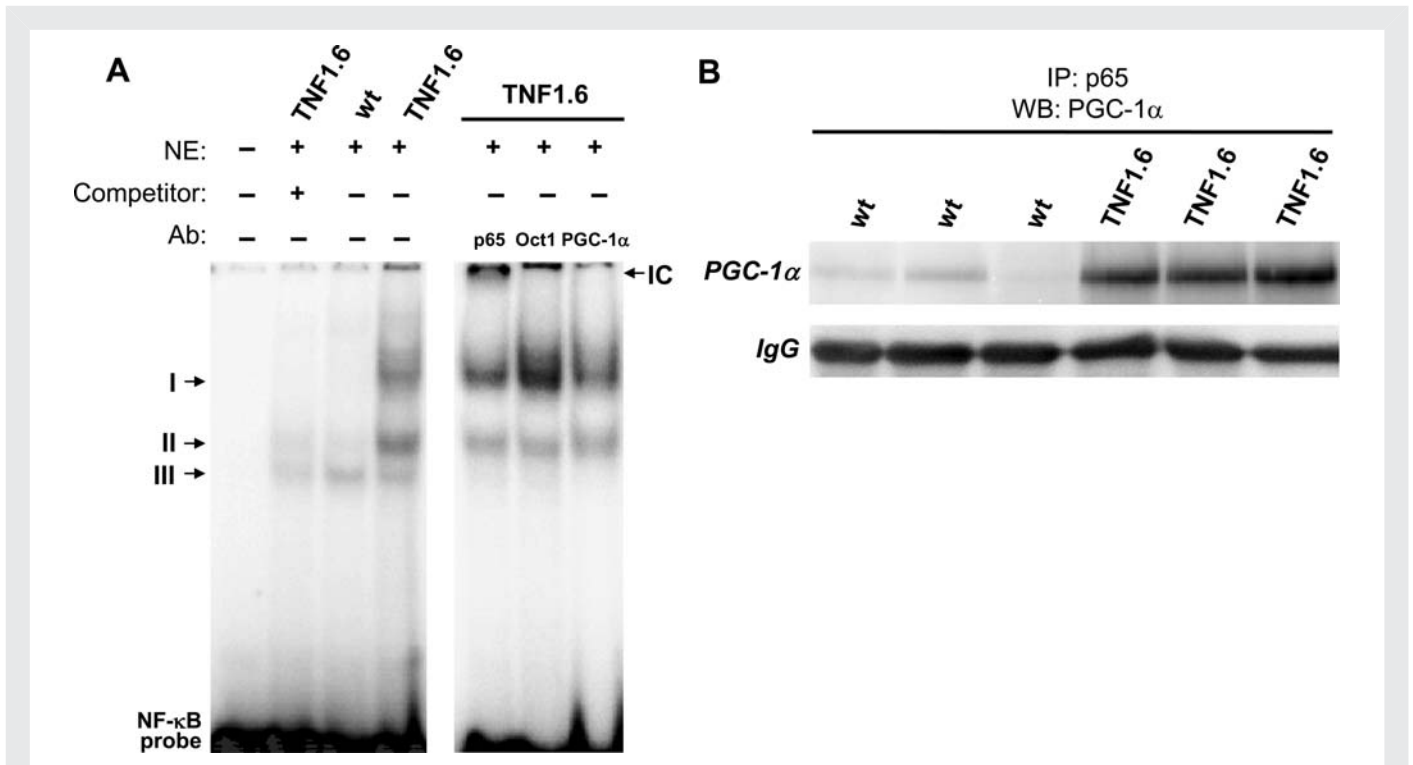
**Figure 5** The modulation of PGC-1 $\alpha$  and p65 levels has a direct effect on glucose oxidation. (A) The graph represents the [U- $^{14}$ C]-glucose oxidation rates in control AC16 cells, and AC16 cells overexpressing the human PGC-1 $\alpha$  gene or with siRNA knock down of p65 or PGC-1 $\alpha$  genes, and incubated with TNF- $\alpha$ . (B) [U- $^{14}$ C]-glucose oxidation rates in AC16 cells overexpressing the mouse PGC-1 $\alpha$  or PGC-1 $\alpha$ L2/3A genes and incubated with TNF- $\alpha$ . Glucose oxidation rates were calculated as nanomoles added glucose  $g^{-1}$  total protein total hour $^{-1}$  ( $n = 3$ ), and then expressed as a percentage with respect to control cells. \* $P < 0.05$  vs. control; \*\* $P < 0.01$  vs. control; † $P < 0.05$  vs. TNF- $\alpha$ , & $P < 0.05$  vs. siPGC-1 $\alpha$ .

## 4. Discussion

The progression of heart failure usually entails a local rise in pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , which act mainly in an autocrine fashion. The pharmacological blockade of TNF- $\alpha$  activity has been associated with improved myocardial function in some animal models of heart failure.<sup>19</sup> The heart has the capacity to adapt to various pathophysiological conditions by adjusting its relative metabolism of carbohydrates and fatty acids. Consequently, the loss of this metabolic flexibility is associated with cardiovascular disease. The transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  plays a critical role in the regulation of cell energy metabolism in the heart, particularly in response to physiological stressors. PGC-1 $\alpha$  expression and activity are diminished in the pathologically hypertrophied and failing heart, as well as in ischaemic heart disease.<sup>20</sup> A recent study proposed the hypothesis that the NF- $\kappa$ B-mediated inhibition of PGC-1 $\alpha$  explains the shift in glucose metabolism during cardiac hypertrophy and heart failure induced by pro-inflammatory TNF- $\alpha$ .<sup>7</sup> However, specific molecular repressors of PGC-1 $\alpha$  have not yet been thoroughly studied. Our results show that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and PGC-1 $\alpha$  interact in AC16 cells. Indeed, our findings not only demonstrate that this binding is increased after stimulation of NF- $\kappa$ B activity, owing to p65 accumulation in the nucleus, but also that these two proteins are constitutively associated in the basal state. This interaction depended on the TNF- $\alpha$  dose, because the binding between p65 and PGC-1 $\alpha$  was not increased after 24 h treatment

with 1 ng/mL TNF- $\alpha$  (data not shown). In accordance with this, PGC-1 $\alpha$  expression was not downregulated either. Despite TNF- $\alpha$  levels are quite lower in ventricle of TNF1.6 mice<sup>2</sup> than those used *in vitro* in AC16 cells, transgenic mice also displayed enhanced physical interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$  with regard to control wild-type mice. Incubation of AC16 cells with the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide reversed the enhanced binding of p65 to PGC-1 $\alpha$  in the presence of TNF- $\alpha$ , while overexpression of a plasmid carrying the human I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) gene increased it. In resting cells, NF- $\kappa$ B is found in the cytoplasm in an inactive form bound to I $\kappa$ B inhibitory proteins. After stimulation, the phosphorylation of I $\kappa$ B proteins by specific I $\kappa$ B kinases renders I $\kappa$ B proteins to ubiquitination and subsequent NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus, where it binds to specific promoter sequences on its target genes to begin the transcription machinery. These observations clearly support the notion that the effects of TNF- $\alpha$  are exclusively NF- $\kappa$ B-dependent in AC16 cells.

NF- $\kappa$ B, and p65, in particular, localize inside the nucleus under basal conditions, where they may constitutively silence gene transcription by competing with other transcription factors.<sup>21</sup> In cardiac cells, sequestration of PGC-1 $\alpha$  protein by p65 in the presence of a pro-inflammatory stimulus might reduce the activity of the former, and this is particularly relevant given that PGC-1 $\alpha$  has the capacity to induce its own expression.<sup>22</sup> Our results are in consonance with those reported in the human marrow stromal HS-5 cell line, where the enhanced NF- $\kappa$ B DNA-binding activity stimulated by TNF- $\alpha$  is supershifted by PGC-1 $\alpha$  antibody.<sup>23</sup> That study proposed that PGC-1 $\alpha$  acts



**Figure 6** The physical interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$  also occurs in mouse heart. (A) EMSA assay showing NF- $\kappa$ B DNA binding activity of transgenic (TNF1.6) or control wild-type (wt) mice (NE, nuclear extracts; Ab, antibody; IC, immunocomplex). Right panel shows the supershift analysis performed by incubation with antibodies directed to the p65 subunit of NF- $\kappa$ B, PGC-1 $\alpha$  or Oct1. (B) Nuclear extracts from TNF1.6 or control wild-type (wt) mice were subjected to immunoprecipitation using an anti-p65 antibody and immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-PGC-1 $\alpha$  antibody. The blot data are representative of three separate experiments. To demonstrate equal loading, the same blots showing IgG protein are also shown.

as a repressor of NF- $\kappa$ B activity by means of p65 sequestration. Conversely, our data rule out repressive activity of PGC-1 $\alpha$  on NF- $\kappa$ B in AC16 cells, since neither the NF- $\kappa$ B DNA binding activity nor the expression of its target genes *MCP-1* and *IL-6* were induced or reduced following PGC-1 $\alpha$  silencing or overexpression, respectively. However, PGC-1 $\alpha$  is a short-lived coactivator that is prone to aggregation and subsequent ubiquitination when it exceeds a critical threshold.<sup>24</sup> Consequently, ubiquitination might account for the lack of repressive activity on NF- $\kappa$ B after PGC-1 $\alpha$  overexpression. Unlike HS-5 cells, PPAR $\beta/\delta$ , the most prevalent PPAR subtype in AC16 cells, was not found to be associated with PGC-1 $\alpha$ .<sup>7</sup> Furthermore, the addition of PPAR $\beta/\delta$  agonists did not reverse PGC-1 $\alpha$  activity, thereby indicating that PPAR $\beta/\delta$  was not involved in NF- $\kappa$ B inhibition. Nevertheless, nor can it be ruled out that PGC-1 $\alpha$  acts as a coregulatory protein of NF- $\kappa$ B in the basal state.

Data herein presented indicate that the main factor limiting the degree of association between p65 and PGC-1 $\alpha$  is the amount of p65 present in the nucleus. Thus, modulation of the PGC-1 $\alpha$  protein levels by means of overexpression or gene silencing did not result in an increase or the blockage, respectively, of its association with p65 after stimulation of cells with TNF- $\alpha$ . On the contrary, down-regulation of p65 levels by means of gene silencing prevented p65 from establishing the TNF- $\alpha$ -induced association with PGC-1 $\alpha$ . Strikingly, and unlike parthenolide, p65 down-regulation with specific siRNA did not reverse PGC-1 $\alpha$  expression in the presence of TNF- $\alpha$ . This observation thus indicates that additional factors are involved in PGC-1 $\alpha$  down-regulation. It is feasible that the up-regulation of other

NF- $\kappa$ B subunits, such as p50, which can also be constitutively associated with PGC-1 $\alpha$ <sup>23</sup> and might compensate for the lack of p65.

PGC-1 $\alpha$  binds nuclear receptors through the leucine-rich LXXLL motifs designated L2 and L3, which are located within the N terminus of the coactivator.<sup>24</sup> In contrast, NF- $\kappa$ B requires the binding to specific LXXLL motifs located within the sequence of the p160 family members of coactivators to drive gene expression.<sup>25</sup> Therefore, it is plausible that p65 was able to bind the LXXLL motifs of PGC-1 $\alpha$  to modulate its activity. The results obtained with the mutant PGC-1 $\alpha$  suggest that the L2/3A motifs play a crucial role in p65 binding, and point to NF- $\kappa$ B as a potential repressor of PGC-1 $\alpha$  activity. In fact, these mutations may block the binding of a putative titratable repressor of PGC-1 $\alpha$ ,<sup>26</sup> and it is widely recognized that PGC-1 $\alpha$  associates with other coregulators via three LXXLL motifs located within the N-terminal domain.<sup>27</sup> The mutant PGC-1 $\alpha$  used in this study contained only two mutated LXXLL motifs, L2 and L3, and this might explain the residual binding to p65 observed after *in vitro* coimmunoprecipitation. However, this remaining binding was not sufficient to up-regulate glucose oxidation after stimulation with TNF- $\alpha$ . Other mechanisms might also account for the down-regulation of PGC-1 $\alpha$  after NF- $\kappa$ B activation. For instance, NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  may result in the indirect stimulation of Akt kinase,<sup>28</sup> and PGC-1 $\alpha$  contains a consensus binding site for Akt phosphorylation which reduces its stability and, as a result, diminishes its transcriptional activity.<sup>29</sup> Akt also has the capacity to phosphorylate the forkhead members of the O class (FOXO) transcription factors,<sup>30</sup> thereby inducing their ubiquitination-dependent degradation and finally leading to a decrease in the



expression of their target genes. In fact, the inhibition of FOXO reduces *PGC-1 $\alpha$*  promoter activity.<sup>31</sup> As TNF- $\alpha$  induces the activation of FOXO1 in human fibroblasts,<sup>32</sup> we analysed the phosphorylation of this transcription factor in the presence of TNF- $\alpha$ . As expected, TNF- $\alpha$  induced the phosphorylation of both FOXO1 and Akt in AC16 cells; however, parthenolide did not reverse this phosphorylation (see Supplementary material online, *Figure S3*), thus indicating that these proteins do not participate in the NF- $\kappa$ B modulation of *PGC-1 $\alpha$* . It has also been reported that the E3 ubiquitin ligase SCFCdc4 reduces *PGC-1 $\alpha$*  protein levels through ubiquitin-mediated proteolysis.<sup>33</sup> This process requires specific phosphorylation by p38 MAPK on a suppression domain held by two Cdc4 phosphodegron motifs located within the *PGC-1 $\alpha$*  sequence.<sup>24,33</sup> Thus, activation of SCFCdc4 would lead to *PGC-1 $\alpha$*  ubiquitination and, as a result, its transcriptional activity would also be reduced.

*PDK4* is a master regulator of cell metabolism and, for instance, its selective overexpression in mouse heart results in a marked decrease in glucose oxidation and exacerbated cardiomyopathy.<sup>34</sup> The expression of *PDK4* was found to correlate with *PGC-1 $\alpha$*  levels in AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  and in myocardial tissue of TNF1.6 mice. In addition, *PDK4* was strongly up-regulated after *PGC-1 $\alpha$*  overexpression *in vitro*.<sup>7</sup> Inhibition of p65 by means of parthenolide treatment<sup>7</sup> or siRNA *p65* transfection is sufficient to reverse *PDK4* expression in cells transfected with sip65 in the presence of TNF- $\alpha$ . In accordance with this observation, glucose oxidation was not reduced in the presence of TNF- $\alpha$  in sip65-transfected cells. This finding, together with the reduced association of p65 and *PGC-1 $\alpha$*  observed in the coimmunoprecipitation studies, further reinforces the notion that NF- $\kappa$ B participates in the regulation of glucose oxidation during the inflammatory state. In agreement with this, the addition of parthenolide to neonatal rat cardiomyocytes induces *PDK4* expression to levels that far exceeded those in the basal state.<sup>35</sup> The present study only considers the modulation of *PDK4* expression as a regulator of glucose oxidation. PDK is the enzyme responsible for the phosphorylation-induced inactivation of PDC. However, PDK activity may also be post-transcriptionally regulated. Negative effectors of PDK are pyruvate, ADP, NAD<sup>+</sup>, and coenzyme A, the levels of which increase when cellular energy levels fall. Moreover, PDC activity is not only regulated by PDKs, but also pyruvate dehydrogenase phosphatases are involved in regulating its state of phosphorylation. Furthermore, additional enzymes such as phosphofruktokinase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase are important regulatory factors of glucose oxidation. Thus, it is feasible that, *in vivo*, additional factors other than the *PDK4* expression are regulating the metabolic shift that occurs in AC16 cells after TNF- $\alpha$  stimulation.

Hyperglycaemia increases the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in monocytes.<sup>36</sup> Thus, it is conceivable that augmented glucose levels inhibited *PGC-1 $\alpha$*  expression in order to increase glucose oxidation by means of *PDK4* down-regulation. In this regard, glucose addition to pancreatic islets *in vitro* represses *PGC-1 $\alpha$*  expression,<sup>37</sup> whereas *PGC-1 $\alpha$* <sup>-/-</sup> knock-out mice exhibit lower cardiac power and increased reliance on glucose oxidation.<sup>38</sup> However, the glucose oxidation rate after transfection with si*PGC-1 $\alpha$*  did not reach the levels achieved after treatment with TNF- $\alpha$ . In a similar way, although increased *PGC-1 $\alpha$*  protein levels partially blocked the higher glucose oxidation rates induced by TNF- $\alpha$ , no significant reduction in glucose oxidation was found after *PGC-1 $\alpha$*  overexpression. This observation indicates that the presence of increased amounts of

*PGC-1 $\alpha$*  hinders the deleterious effects of p65 activation on glucose oxidation.

To our knowledge, this is the first report showing that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B represses *PGC-1 $\alpha$*  activity through physical interaction and, hence, dysregulates glucose oxidation in cardiac cells. These results are of particular relevance given that during chronic ischaemia, cardiac hypertrophy, and heart failure, myocardial energy substrate utilization shifts towards increased glycolysis.<sup>39</sup> A limitation of this study is the origin of the AC16 cell line, since it consists of a fusion of primary ventricular cells with SV-40-transformed fibroblasts. However, fibroblasts account for up to 70% of ventricular myocardial cells. Furthermore, both cell types secrete and respond to inflammatory TNF- $\alpha$ ,<sup>40,41</sup> thus equally contributing to the inflammatory processes that participate in cardiac pathobiology. More importantly, the binding of p65 to *PGC-1 $\alpha$*  was also found in heart of the mouse model TNF1.6, which displays an increase in glucose utilization,<sup>14</sup> thereby indicating that this association also occurs *in vivo* and that it is not species specific. Overall, on the basis of our results, we propose that the down-regulation of *PGC-1 $\alpha$*  activity in heart, as a result of its increased physical interaction with p65, accounts for the metabolic shift that might contribute to dilated cardiomyopathy or the metabolic disturbances characteristic of insulin resistance and obesity.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

We thank Dr T. Finkel (NHLBI, Bethesda, MD, USA) for the pcDNA4/*His-myc/PGC-1 $\alpha$*  plasmid, Dr B.M. Spiegelman (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) for the pcDNA3/*His-myc/PGC-1 $\alpha$*  and pcDNA3/*His-myc/PGC-1 $\alpha$ -L2/3A* plasmids, Dr K. Okumura (Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan) for the pCR3.1/*Flag/IKK $\alpha$*  plasmid and Dr S.T. Smale (UCLA, Los Angeles, CA, USA) for the pcDNA3/*His-myc/p65* plasmid. We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for their assistance.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government (SAF2006-01475 and SAF2009-06939). T.C. was supported by a grant from the Spanish Government. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an ISCIII project.

## References

- Bergman MR, Kao RH, McCune SA, Holycross BJ. Myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am J Physiol* 1999;**277**: H543–H550.
- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP *et al*. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 1997;**81**:627–635.
- Stetson SJ, Perez-Verdia A, Mazur W, Farmer JA, Koerner MM, Weillbaecher DG *et al*. Cardiac hypertrophy after transplantation is associated with persistent expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation* 2001;**104**:676–681.
- Gupta S, Young D, Maitra RK, Gupta A, Popovic ZB, Yong SL *et al*. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF- $\kappa$ B. *J Mol Biol* 2008;**375**:637–649.

5. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 2007;**115**: 2540–2548.
6. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1{alpha}. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:208–217.
7. Palomer X, Álvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM et al. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:703–712.
8. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L et al. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**39**:133–147.
9. Ichida M, Nemoto S, Finkel T. Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1alpha). *J Biol Chem* 2002;**277**:50991–50995.
10. Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 2000;**6**:307–316.
11. Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, Lin J et al. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev* 2004;**18**:278–289.
12. Sanjabi S, Williams KJ, Saccani S, Zhou L, Hoffmann A, Ghosh G et al. A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation. *Genes Dev* 2005;**19**:2138–2151.
13. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H et al. Differential regulation of I{kappa}B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3537–3542.
14. Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 2001;**104**:2492–2497.
15. Coll T, Jove M, Rodríguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sánchez RM et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and NF- $\kappa$ B activation. *Diabetes* 2006;**55**:2779–2787.
16. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**: 2499.
17. Caruso M, Miele C, Formisano P, Condorelli G, Bifulco G, Oliva A et al. In skeletal muscle, glucose storage and oxidation are differentially impaired by the IR1152 mutant receptor. *J Biol Chem* 1997;**272**:7290–7297.
18. Benteibibel A, Sebastian D, Herrero L, Lopez-Vinas E, Serra D, Asins G et al. Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation. *Biochemistry* 2006;**45**:4339–4350.
19. Isic A, Scharin TM, Haugen E, Fu M. TNFalpha-antagonist neither improve cardiac remodeling or cardiac function at early stage of heart failure in diabetic rats. *Autoimmunity* 2008;**41**:473–477.
20. Duncan JG, Finck BN. The PPARalpha-PGC-1alpha axis controls cardiac energy metabolism in healthy and diseased myocardium. *PPAR Res* 2008;**2008**:253817.
21. Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, Weidman D et al. Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:20734–20739.
22. Jager S, Handschin C, St Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1{alpha}. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:12017–12022.
23. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Farrar WL. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPARgamma cross talk with NF-kappaB and C/EBP. *Blood* 2007;**110**:4373–4384.
24. Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K et al. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* 2007;**282**:25970–25980.
25. Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S et al. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:6367–6378.
26. Knutti D, Kressler D, Kralli A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**: 9713–9718.
27. Soyak S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;**49**: 1477–1488.
28. Meng F, Liu L, Chin PC, D'Mello SR. Akt is a downstream target of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002;**277**:29674–29680.
29. Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 2007;**447**:1012–1016.
30. Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H et al. Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* 2007;**19**:519–527.
31. Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 2003;**52**:642–649.
32. Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem* 2005;**280**:12096–12102.
33. Olson BL, Hock MB, Ekholm-Reed S, Wohlschlegel JA, Dev KK, Kralli A et al. SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1{alpha} transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev* 2008;**22**:252–264.
34. Zhao G, Jeoung NH, Burgess SC, Rosaen-Stowe KA, Inagaki T, Latif S et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H936–H943.
35. Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 2005;**280**:17464–17471.
36. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem* 2004;**279**:18091–18097.
37. Zhang P, Liu C, Zhang C, Zhang Y, Shen P, Zhang J et al. Free fatty acids increase PGC-1alpha expression in isolated rat islets. *FEBS Lett* 2005;**579**:1446–1452.
38. Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X, Young DM et al. The Transcriptional coactivator PGC-1{alpha} is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**295**:H185–H196.
39. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996;**94**: 2837–2842.
40. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 2007;**76**:81–90.
41. Ancey C, Menet E, Corbi P, Fredj S, Garcia M, Rucker-Martin C et al. Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation. *Cardiovasc Res* 2003;**59**: 78–85.

# Metabolic disorders in heart diseases with an inflammatory background

François R. Boucher\*

Laboratoire TIMC, UMR CNRS 5525, Équipe PRETA, Université Joseph Fourier—Grenoble I, Bâtiment Jean Roget, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

Online publish-ahead-of-print 11 June 2010

This editorial refers to 'The p65 subunit of NF- $\kappa$ B binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells', by D. Álvarez-Guardia et al., pp. 449–458, this issue.

## 1. Introduction

Cardiac hypertrophy and heart failure are associated with nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) inhibition. In this issue of *Cardiovascular Research*, the study by Álvarez-Guardia et al.<sup>1</sup> evidences a key step of cellular signalling and makes the link between these two major pathways.

## 2. Link between NF $\kappa$ B and PGC-1 $\alpha$ pathways

The general term NF- $\kappa$ B traditionally refers to the ubiquitous p50/p65 heterodimer. The p65 subunit provides the gene regulatory function. NF- $\kappa$ B is retained in the cytoplasm complexed with I $\kappa$ Bs such as I $\kappa$ B $\alpha$ . The I $\kappa$ B kinase complex (IKK), when activated by diverse upstream kinases, phosphorylates I $\kappa$ Bs, inducing their degradation by the ubiquitin proteasome. Free NF- $\kappa$ B heterodimers then translocate to the nucleus (Figure 1). A previous report has proposed that NF- $\kappa$ B-mediated inhibition of PGC-1 $\alpha$  could explain the shift towards increased glycolysis under pathophysiological conditions with an inflammatory background.<sup>2</sup> The mechanistic study by Álvarez-Guardia et al.<sup>1</sup> was performed on AC16 cells resulting from the fusion of human primary ventricular cells with transformed fibroblasts and on heart extracts from mice overexpressing TNF- $\alpha$ . Co-immunoprecipitation experiments have allowed the authors to demonstrate that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B is constitutively bound to PGC-1 $\alpha$  and that NF- $\kappa$ B activation increases this binding. Moreover, PGC-1 $\alpha$  binding to NF- $\kappa$ B depends mostly on the level of p65. Finally, the interaction between p65 and PGC-1 $\alpha$  after NF- $\kappa$ B activation results in decreased PGC-1 $\alpha$  expression, and as a consequence, in decreased pyruvate dehydrogenase kinase (PDK4) expression, leading in turn to an increased glucose oxidation rate (Figure 1).

## 3. Cardiac metabolism

In the heart, the large amounts of energy necessary to sustain contractile function and cellular homeostasis are generated primarily by mitochondrial oxidative metabolism, with a small proportion derived from glycolysis. The heart is able to use a large variety of energy substrates such as glucose, lactate, ketones and amino acids, but under normal conditions, cardiac mitochondrial ATP is mainly produced by the oxidation of fatty acids, which accounts for 60–90% of the total energy production. The key system at the border between carbohydrate and fatty acid oxidation in the mitochondrion is the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), which catalyses the rate-limiting reaction of pyruvate decarboxylation to acetyl CoA. PDC activity is regulated by glycolysis and inhibited by fatty acid oxidation. As a result, under normal conditions, the high provision of fatty acids to the heart inhibits pyruvate decarboxylation and glucose utilization. In addition, PDC activity can be up-regulated through dephosphorylation by pyruvate dehydrogenase phosphatase, and down-regulated through phosphorylation by pyruvate dehydrogenase kinase. Therefore, the contribution of fatty acids and carbohydrates to oxidative ATP production in the heart is influenced by a number of conditions, including cardiac work, substrate and oxygen supply, but also by interactions with general intracellular signalling.

The transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  plays a key role in the regulation of lipid and glucose oxidation in many cell types. In the myocardium, PGC-1 $\alpha$  activates mitochondrial biogenesis and respiration through powerful induction of nuclear respiratory factor -1 and -2 (NRF1 and NRF2) gene expression.<sup>3</sup> PGC-1 $\alpha$  is highly expressed in tissues with high oxidative activity.<sup>4</sup> The most illustrative example is the developing heart before the burst of mitochondrial biogenesis that precedes birth.<sup>5</sup> In addition, PGC-1 $\alpha$  co-activates the oestrogen-related receptor- $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) transcription factors, inducing the expression of PDK4, a down-regulator of PDC.

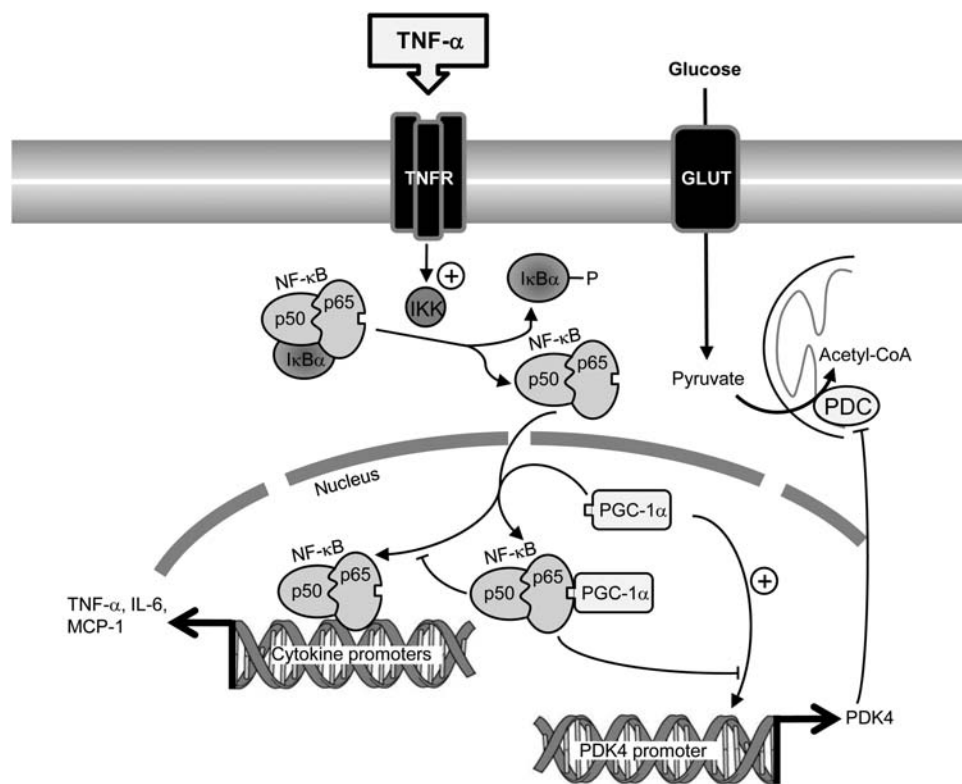
## 4. Inflammation and heart failure

Since the original report of elevated levels of TNF- $\alpha$  in patients with chronic heart failure (CHF),<sup>6</sup> there has been increasing speculation that TNF- $\alpha$  may contribute to the development of this pathology.<sup>7,8</sup>

The opinions expressed in this article are not necessarily those of the Editors of *Cardiovascular Research* or of the European Society of Cardiology.

\* Corresponding author. Tel: +33 476 637 117; fax: +33 476 637 152, Email: Francois.Boucher@ujf-grenoble.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.



**Figure 1** Proposed mechanism for TNF- $\alpha$ -induced increased glucose oxidation.<sup>1</sup> Activation of NF- $\kappa$ B after TNF- $\alpha$  stimulation increases the binding of PGC-1 $\alpha$  to p65 in the nucleus. Binding of PGC-1 $\alpha$  to p65 reduces PDK4 expression, thereby increasing PDC activity and glucose oxidation. GLUT, glucose transporter; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; I $\kappa$ B, inhibitory  $\kappa$ B; IKK, I $\kappa$ B kinase complex; PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; IL-6, interleukin 6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor $\alpha$ ; TNFR, TNF receptor.

For example, it has been shown that pathophysiologically relevant concentrations of TNF- $\alpha$  are sufficient to mimic certain aspects of the CHF phenotype, including left ventricular dysfunction and dilation.<sup>9</sup> The pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  is known to modulate cardiovascular function by a variety of mechanisms. It has been shown to depress myocardial contractility by uncoupling  $\beta$ -adrenergic signalling, increasing cardiac nitric oxide and peroxynitrite, or altering intracellular calcium homeostasis. TNF- $\alpha$  may also induce structural changes in the failing myocardium, such as cardiomyocyte hypertrophy, interstitial fibrosis, and dilation. Additionally, TNF- $\alpha$  may promote cardiomyocyte apoptosis; it may also activate metalloproteinases and impair the expression of their inhibitors, possibly contributing to cardiac remodelling.<sup>10</sup>

In addition, several studies in patients as well as in animal models have clearly established that ATP production is reduced in the failing heart, therefore lowering the kinetics of energy utilization for cell contraction.<sup>11</sup> The energetic impairment of the failing heart includes a switch in energy substrate utilization from fatty acids to glucose, a decreased overall oxidative metabolism, a decreased mitochondrial biogenesis, an impaired transfer of ATP by the creatine kinase system, and an altered energy utilization.<sup>11</sup> The signalling pathways underlying these phenomena still remain largely unknown. Therefore, the study by Álvarez-Guardia *et al.*,<sup>1</sup> by demonstrating for the first time that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in the nucleus directly represses PGC-1 $\alpha$  activity through physical interaction, elucidates

part of the cellular mechanisms linking pro-inflammatory states and increased glucose oxidation in myocardial cells.

## 5. Conclusion

The maintenance of cardiac function requires a perfectly regulated production of energy. Therefore, the control of cell metabolism in the normal heart is complex, and the interactions and links between the diverse signalling pathways are not yet fully elucidated. It is now largely accepted that dysregulation of cardiac fuel metabolism is involved in the development of numerous cardiac diseases. Álvarez-Guardia *et al.* provide improved understanding of the cellular mechanisms responsible for the shift towards glucose metabolism in pro-inflammatory conditions in the heart. A better understanding of these pathways could result in the definition of new therapeutic targets aimed at correcting metabolic disorders in pathological situations such as heart failure.

**Conflict of interest:** none declared.

## References

1. Álvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM *et al.* The p65 subunit of NF- $\kappa$ B binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 2010;**87**:449–458.
2. Palomer X, Álvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM *et al.* TNF- $\alpha$  reduces PGC-1 $\alpha$  expression through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK leading to

- increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 2009;**81**: 703–712.
3. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis; the central role of PGC-1 $\alpha$ . *Cardiovasc Res* 2008;**79**:208–217.
  4. Valle I, Álvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005;**66**:562–573.
  5. Lehman JJ, Barger PM, Kovaks A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000;**106**:847–856.
  6. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in severe heart chronic failure. *N Engl J Med* 1990;**323**: 236–241.
  7. Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE et al. New insights into the pathological role of TNF- $\alpha$  in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure following myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H340–H350.
  8. Moro C, Jouan MG, Rakotovo A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N et al. Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H3014–H3019.
  9. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko V, Hornsby PJ et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;**97**: 1382–1391.
  10. Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D, Spinale FG. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective. *Cardiovasc Res* 2002;**53**:822–830.
  11. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovasc Res* 2009;**81**: 412–419.



Publicació 4

**The interplay between nuclear factor- $\kappa$ B and E2F1  
coordinately regulates inflammation and  
metabolism in human cardiac cells**

Xavier Palomer, **David Álvarez-Guardia**, Mercy M. Davidson, Tung O.  
Chan, Arthur M. Feldman, and Manuel Vázquez-Carrera

PLoS ONE (2011) Volume 6, Issue 5, e19724

Que en la categoria BIOLOGY es troba en la posició 10 de 76 (Q1)

Índex d'impacte (2009): 4,351





La piruvat deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) és l'enzim que catalitza el pas limitant que determina la taxa d'oxidació de la glucosa. La inhibició d'aquest enzim per part del factor nuclear NF- $\kappa$ B es relaciona amb el canvi cap a un augment de la glicòlisi, que es produeix durant els processos patològics cardíacs induïts per estímuls proinflamatoris, com ara la hipertròfia i la insuficiència cardíaca. La inhibició del receptor relacionat amb l'estrogen  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) i del receptor activat per proliferadors peroxisòmics (PPAR) està implicada en aquest canvi metabòlic. En estudis recents s'ha observat que el factor de transcripció E2F1, que és crucial en el control del cicle cel·lular, també pot regular l'expressió *PDK4*.

Amb aquest estudi es pretén determinar si els processos inflamatoris orquestrats per NF- $\kappa$ B participen en la reducció de l'expressió de *PDK4* en cèl·lules cardíaca humanes AC16 a través de la inhibició del factor de transcripció E2F1.

Estudis de coimmunoprecipitació ens van permetre determinar que el possible mecanisme involucrat en la reducció de l'expressió de *PDK4* mitjançat per TNF- $\alpha$ , implica un augment de la interacció física entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i E2F1. Mitjançant anàlisis d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) es va observar que la translocació de p65 evitava el reclutament d'E2F1 en el promotor de *PDK4* i la seva posterior transcripció dependent d'E2F1. La inhibició de NF- $\kappa$ B per partenolide, no només va evitar la translocació de p65 al nucli sinó que també va activar E2F1 tot augmentant la fosforilació de pRB, alliberant així la proteïna inhibidora pRB del complex transcripcional. Curiosament, la sobreexpressió de E2F1 va reduir l'expressió i secreció d'interleucines en cèl·lules cardíaca estimulades.

En base als resultats obtinguts, hipotetitzem sobre un possible model per a la regulació de l'expressió de *PDK4* i del metabolisme de les cèl·lules cardíaca en el que hi participen NF- $\kappa$ B i E2F1, on NF- $\kappa$ B actua com un interruptor molecular que regula la transcripció dependent d'E2F1 del gen de *PDK4*.



# The Interplay between NF-kappaB and E2F1 Coordinately Regulates Inflammation and Metabolism in Human Cardiac Cells

Xavier Palomer<sup>1,9</sup>, David Álvarez-Guardia<sup>1,9</sup>, Mercy M. Davidson<sup>2</sup>, Tung O. Chan<sup>3</sup>, Arthur M. Feldman<sup>3</sup>, Manuel Vázquez-Carrera<sup>1\*</sup>

**1** Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona) and CIBERDEM, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Radiation Oncology, Columbia University, New York, New York, United States of America, **3** Department of Medicine, Center for Translational Medicine, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

## Abstract

Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) inhibition by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is related to a shift towards increased glycolysis during cardiac pathological processes such as cardiac hypertrophy and heart failure. The transcription factors estrogen-related receptor- $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) regulate *PDK4* expression through the potent transcriptional coactivator PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). NF- $\kappa$ B activation in AC16 cardiac cells inhibit ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  transcriptional activity, resulting in reduced *PGC-1 $\alpha$*  and *PDK4* expression, and an enhanced glucose oxidation rate. However, addition of the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide to these cells prevents the downregulation of *PDK4* expression but not ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity, thus suggesting that additional transcription factors are regulating *PDK4*. Interestingly, a recent study has demonstrated that the transcription factor E2F1, which is crucial for cell cycle control, may regulate *PDK4* expression. Given that NF- $\kappa$ B may antagonize the transcriptional activity of E2F1 in cardiac myocytes, we sought to study whether inflammatory processes driven by NF- $\kappa$ B can downregulate *PDK4* expression in human cardiac AC16 cells through E2F1 inhibition. Protein coimmunoprecipitation indicated that *PDK4* downregulation entailed enhanced physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1. Chromatin immunoprecipitation analyses demonstrated that p65 translocation into the nucleus prevented the recruitment of E2F1 to the *PDK4* promoter and its subsequent E2F1-dependent gene transcription. Interestingly, the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide prevented the inhibition of E2F1, while E2F1 overexpression reduced interleukin expression in stimulated cardiac cells. Based on these findings, we propose that NF- $\kappa$ B acts as a molecular switch that regulates E2F1-dependent *PDK4* gene transcription.

**Citation:** Palomer X, Álvarez-Guardia D, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. (2011) The Interplay between NF-kappaB and E2F1 Coordinately Regulates Inflammation and Metabolism in Human Cardiac Cells. PLoS ONE 6(5): e19724. doi:10.1371/journal.pone.0019724

**Editor:** Holger K. Eltzschig, University of Colorado Denver, United States of America


**Received:** February 2, 2011; **Accepted:** April 8, 2011; **Published:** May 23, 2011

**Copyright:** © 2011 Palomer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government (SAF2006-01475 and SAF2009-06939). CIBERDEM is an Instituto de Salud Carlos III project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

 These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Enlargement of the mammalian heart occurs principally by cell hypertrophy, since post-natal cardiac myocytes lack the ability to undergo cell division. This adaptive physiological growth allows the heart to maintain sufficient cardiac output. Myocardial injury owing to myocardial infarction or chronic hypertension leads to pathological hypertrophic growth that may result in heart failure. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine secreted by the myocardium that has been related to cardiac hypertrophy and chronic heart failure [1,2]. Inflammatory cytokines are under the transcriptional control of the ubiquitous inducible factor named nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which has been linked to various cardiovascular diseases, such as cardiac hypertrophy and heart failure [3].

The development of pathological cardiac hypertrophy occurs together with re-activation of the cell cycle machinery of myocytes [4]. The transcription factor E2F1 is one of the key proteins in the

regulation of the G1/S phase transition, hence it acts as a critical regulator of cell survival and proliferation [4]. However, E2F1 activity has antagonistic functions, since it may induce cell proliferation or apoptosis [5]. To form functional transcription complexes on DNA, E2F1 requires heterodimerization with the partner differentiation regulated transcription factor (DRTF) polypeptide DP-1. The transcriptional activity of E2F1 is sterically inhibited by the retinoblastoma protein (pRB) family of pocket proteins [6]. When pRB proteins are phosphorylated, the E2F-DP complex is released, hence E2F-mediated gene transcription commences.

The heart can adapt to various pathophysiological conditions by adjusting its relative metabolism of carbohydrates and fatty acids. Consequently, loss of this metabolic flexibility is associated with cardiovascular disease. Metabolic changes in cardiac substrate utilization entail the dysregulation of genes involved in the transport and catabolism of fatty acids and glucose. The transcription factors estrogen-related receptor- $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and

peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) regulate the pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) expression, a key enzyme in glucose homeostasis modulation [7,8]. In particular, they regulate *PDK4* expression through the potent transcriptional coactivator PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) [9,10]. A previous study performed in our laboratory revealed that NF- $\kappa$ B activation in cardiac cells inhibited ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity, which resulted in reduced *PGC-1 $\alpha$*  and *PDK4* expression, and an enhanced glucose oxidation rate [11]. However, addition of the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide prevented the downregulation of *PGC-1 $\alpha$*  and *PDK4* expression but not ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity [11]. Besides, addition of this NF- $\kappa$ B inhibitor in the absence of TNF- $\alpha$  to human cardiac AC16 cells [11] or neonatal rat cardiomyocytes [12] induces *PDK4* expression to levels that far exceed those observed at the basal state. Importantly, this induction is not correlated with an upregulation in *PGC-1 $\alpha$*  expression or ERR $\alpha$ -PPAR $\beta/\delta$  transcriptional activity. These findings reinforce the notion that additional PGC-1 $\alpha$ -independent transcription factors regulate *PDK4* to keep cardiac cell metabolism within a balanced physiological margin in these cells. Interestingly, recent studies report that E2F1 may regulate other genes besides those involved in cell-cycle regulation [13,14]. For instance, loss of E2F1 in vivo blunts PDK4 expression, while exogenous E2F1 overexpression up-regulates PDK4 levels in mouse myoblasts and IMR90 fibroblasts [14]. Such effects are driven by the binding of E2F1 to the E2F binding sites located within the promoter of the gene that encodes for *PDK4*. On the other hand, other studies demonstrate that NF- $\kappa$ B may antagonize the transcriptional activity of E2F1 in cardiac myocytes [15] and human fibroblasts [16]. Therefore, since NF- $\kappa$ B may antagonize the transcriptional activity of E2F1, and E2F1 is able to regulate PDK4, the present study aimed to elucidate whether E2F1 was involved in the downregulation of PDK4 expression induced by NF- $\kappa$ B activation in cardiac myocytes.

## Results

### Inhibition of PDK4 expression by TNF- $\alpha$ coincides with dysregulation of E2F1 activity in AC16 cells

Addition of TNF- $\alpha$  (100 ng/mL for 24 h) to AC16 cells inhibited *PDK4* expression (~60% reduction,  $P < 0.01$ , **Figure 1A**). Parthenolide not only prevented this, but was also capable of inducing *PDK4* mRNA to levels beyond those observed in non-stimulated cells. As a first approach, we investigated whether these changes correlated with dysregulation of the E2F1 signaling pathway. No changes in *E2F1* expression were observed after treatment with TNF- $\alpha$  for 6 h (see Supplementary **Figure S1A**) or 24 h (**Figure 1A**). *Cyclin A*, whose expression is induced by E2F1 [17], was not modified in these conditions. Nevertheless, E2F1 DNA-binding activity displayed some changes when examined by means of an EMSA (**Figure 1B**). E2F1 formed four DNA-binding complexes, namely I to IV, with nuclear proteins. However, the competitor lane demonstrated that only complexes I to III were specific for the E2F1 probe, while complex IV corresponded to a non-specific band. Supershift analyses demonstrated that complexes I and II contained the E2F1 transcription factor, while pRB was exclusively present in complex I. Thus, complex I might correspond to a complex containing the E2F1-DP heterodimer along with pocket proteins such as pRB, while complexes II and III might represent the free E2F1-DP. Independently of the presence of TNF- $\alpha$ , parthenolide downregulated complex I. This NF- $\kappa$ B inhibitor also increased complex II, particularly in the absence of TNF- $\alpha$ . This suggests that the levels of pRB bound to E2F1 were downregulated by parthenolide. In

contrast, treatment with TNF- $\alpha$  enhanced the DNA-binding of complexes I and II (**Figure 1B**). We next evaluated the protein levels of E2F1 and pRB. E2F1 remained unaltered in nuclear protein extracts from AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  for 6 h (see Supplementary **Figure S1B**) or 24 h (**Figure 1C**). The addition of parthenolide did not alter E2F1 protein levels either, although it significantly enhanced the phosphorylation of pRB at serine 780.

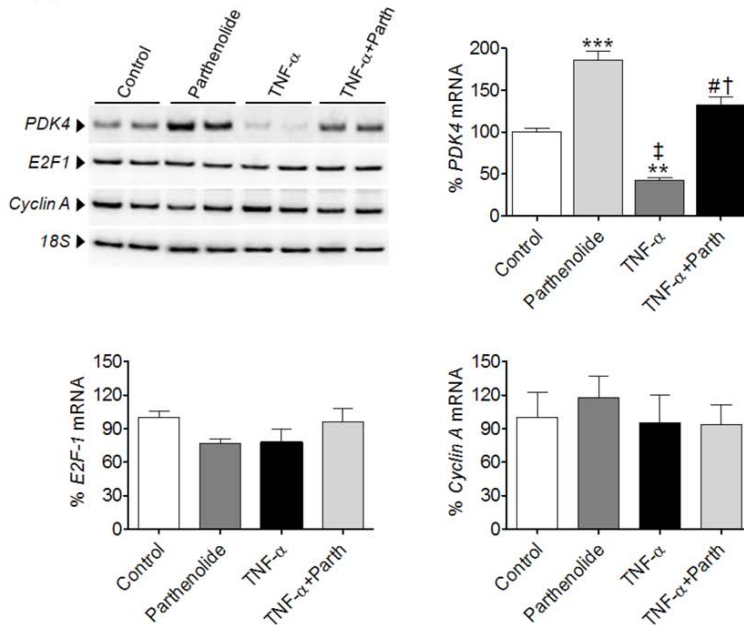
### PDK4 expression is regulated by E2F1 in AC16 cells

E2F1 overexpression significantly enhanced *E2F1* mRNA levels (**Figure 2A**) in human AC16 cells, even in the presence of TNF- $\alpha$ , compared to control cells transfected with a lacZ-containing plasmid. Despite the huge increment in *E2F1* expression, *cyclin A* was not modified. In contrast, *PDK4* expression correlated with E2F1 mRNA levels, which demonstrates that this kinase is transcriptionally induced by E2F1 in cardiac AC16 cells (**Figure 2A**). Furthermore, overexpression of E2F1 partially counteracted TNF- $\alpha$ -induced *PDK4* downregulation in these cells. Forced *E2F1* expression in AC16 cells induced a significant increase in E2F1 protein accumulation (**Figure 2B**). Strikingly, this rise was further enhanced in nuclear protein extracts when TNF- $\alpha$  was added to the medium. E2F1 levels correlated with those of total pRB protein, while the ratio phospho-pRB<sup>Ser780</sup>/pRB was reduced in cells overexpressing E2F1 (**Figure 2B**). Overexpression of *E2F1* enhanced the DNA-binding activity of complexes II and III of E2F1 in comparison to the control cells (**Figure 2C**), although TNF- $\alpha$  did not alter this activity. The overall results might explain why *PDK4* expression was not enhanced by TNF- $\alpha$  in cells overexpressing E2F1 when compared to cells lacking the stimulus, in spite of the increase of E2F1 protein. Subsequently, small interfering RNA (siRNA)-mediated *E2F1* gene silencing was carried out by transfecting AC16 cells with human *E2F1* siRNA. A reduction of up to 40% in *E2F1* expression by means of siE2F1 did not reduce *PDK4* or *cyclin A* expression as compared to control cells transfected with scrambled siRNA (**Figure 3**).

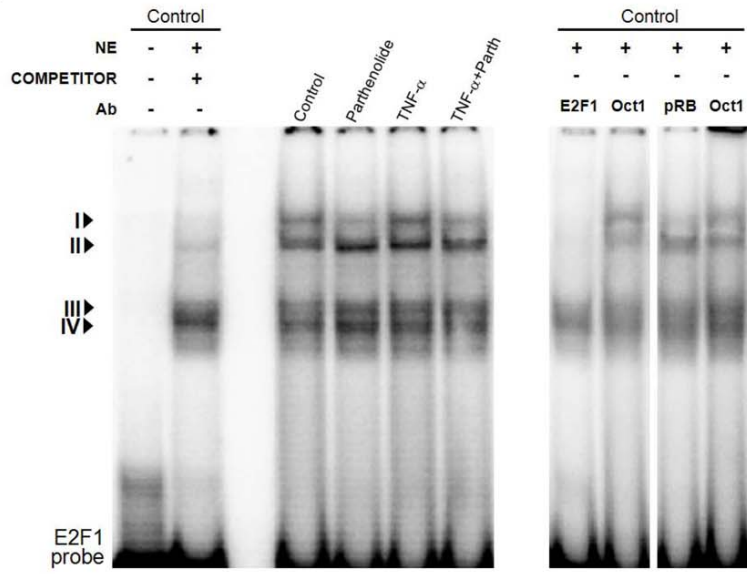
### TNF- $\alpha$ enhances the physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1 in human and mouse cardiac cells

In non-stimulated mammalian cells, NF- $\kappa$ B mostly consists of an inactive heterodimeric complex comprised of p50 and p65 subunits sequestered in the cytoplasm by association with the inhibitory I $\kappa$ B protein. In response to proinflammatory cytokines, I $\kappa$ B is phosphorylated by the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which leads to its degradation by the proteasome. Once I $\kappa$ B is degraded, NF- $\kappa$ B translocates into the nucleus where it binds to specific promoter sites on its target genes. However, NF- $\kappa$ B may also localize to the nucleus in non-stimulated cells, where it would act as a transcriptional repressor [15]. Since NF- $\kappa$ B may associate with E2F, we next investigated whether this mechanism might be involved in the regulation of *PDK4* expression in cardiac cells. Coimmunoprecipitation studies revealed that p65 was constitutively bound to E2F1 in resting cells, and this binding was increased upon NF- $\kappa$ B activation with TNF- $\alpha$  (**Figure 4A**). The opposite behavior was observed after parthenolide addition. Next, we investigated the effects of knocking down p65 with a specific siRNA (sip65). Transfection with sip65 downregulated the levels of this protein by up to 30% when compared to control siRNA [18], and this reduction was sufficient to prevent the enhanced interaction of p65 with E2F1 induced by TNF- $\alpha$  (**Figure 4B**). Then we examined the effect of E2F1 protein overexpression on its association with the p65 subunit. As shown in the graph in **Figure 4C**, overexpression of E2F1 increased the p65-

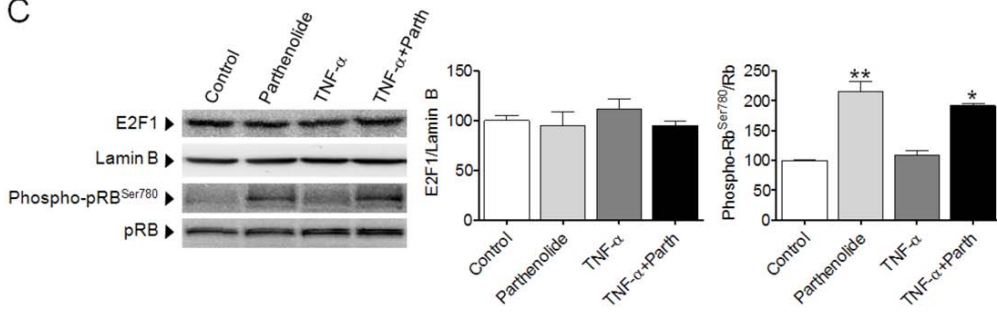
A



B



C



**Figure 1. NF- $\kappa$ B modulation influences E2F1 activity in human cardiac cells.** (A) Relative quantification of *PDK4*, *E2F1* and *Cyclin A* mRNA levels assessed by RT-PCR in human cardiac AC16 cells incubated with TNF- $\alpha$  (100 ng/mL) for 24 h in the presence or absence of parthenolide (Parth, 10  $\mu$ mol/L). The graphics represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD. (B) EMSA assay showing E2F1 DNA-binding activity after treatment of AC16 cells with TNF- $\alpha$  in the presence or absence of parthenolide (NE, nuclear extracts; Ab, antibody). (C) E2F1, phospho-pRB<sup>Ser780</sup> and total pRB protein levels in nuclear protein extracts isolated from samples as described in panel A. To show equal loading of protein, the Lamin B signal is also included. The graphics represent the quantification of the normalized protein levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD. All autoradiograph data are representative of three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. Control; †P<0.01, ‡ P<0.001 vs. Parth; # P<0.001 vs. TNF $\alpha$ . doi:10.1371/journal.pone.0019724.g001

E2F1 association (2-fold, P<0.01 vs. LacZ), which was further enhanced when TNF- $\alpha$  was added to E2F1-transfected cells (4-fold, P<0.001 vs. LacZ). In contrast, E2F1 gene silencing by means of siRNA did not influence the binding between E2F1 and p65 proteins (data not shown).

To further confirm the results obtained in vitro, we performed studies with mice. Transgenic TNF1.6 mice, which present reduced *PDK4* expression in the heart compared with wild-type mice (see Supplementary Figure S2A), also displayed enhanced binding of p65 to E2F1 in heart (Figure 4D). Analyses of *E2F1* and *cyclin A* mRNA, as well as E2F1 protein levels, showed no differences between wild-type and transgenic TNF1.6 mice (Supplementary Figure S2A and B).

#### The physical interaction between p65 and E2F1 results in a diminution of the binding of E2F1 to the PDK4 promoter

Retinoblastoma family proteins (pRB, p107 and p130) inhibit E2F transcriptional activity by disrupting histone acetyltransferase binding and the recruitment of histone deacetylases. Since we observed that parthenolide induced the phosphorylation of pRB at Ser780, the release of E2F1 and its subsequent acetylation might account for the enhanced *PDK4* expression in AC16 cells. Therefore, acetylation of E2F1 was examined by means of coimmunoprecipitation analysis. E2F1 acetylation was not modified after NF- $\kappa$ B inhibition with parthenolide. In fact, it appeared to be enhanced by TNF- $\alpha$  (Figure 5A). These results were further confirmed when E2F1 acetylation was examined in AC16 cells overexpressing E2F1 (Figure 5B). Thus, we hypothesize that enhanced acetylation was not involved in *PDK4* upregulation, but it might be a response of the cell to counteract the TNF- $\alpha$ -induced inhibition of E2F1.

Subsequently, a ChIP assay was employed to determine whether E2F1 is recruited to the promoter of the *PDK4* gene in cardiac AC16 cells. This analysis showed that the specific anti-E2F1 antibody, but not the non-immune IgG control, successfully co-immunoprecipitated E2F1 and significant quantities of *PDK4* promoter under basal conditions (Figure 5C). Figure 5C also reveals that the E2F1 antibody pulled down significantly more of the *PDK4* promoter when the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide was added to the medium. In contrast, E2F1-binding to the *PDK4* promoter region was largely reduced in the presence of TNF- $\alpha$ . In support of a role for E2F1 in the transcriptional control of *PDK4*, AC16 cells transfected with the pSG5L/E2F1 plasmid displayed enhanced PDK4 promoter occupancy by E2F1 (Figure 5D). The negative effect of NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  on the PDK4 promoter occupancy by E2F1 was further corroborated in cells overexpressing E2F1 (Figure 5D).

#### The crosstalk between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1 influences TNF- $\alpha$ -induced inflammation and glucose oxidation in human cardiac cells

Gene expression analyses of *IL-6* in cardiac AC16 cells carrying pSG5L/E2F1 revealed that this transcription factor might inhibit

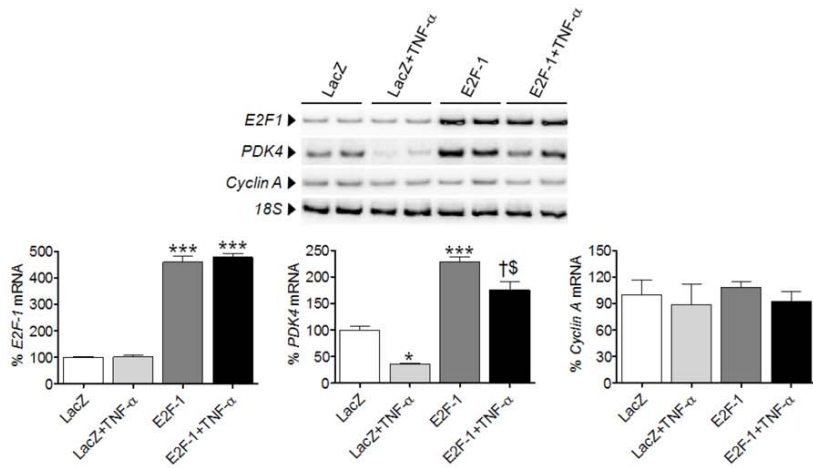
NF- $\kappa$ B activity in the presence of a proinflammatory stimulus. Thus, the mRNA for *IL-6* was partially inhibited by E2F1 overexpression in the presence of TNF- $\alpha$  when compared to control LacZ samples (Figure 6A). In contrast, *IL-6* mRNA was upregulated when *E2F1* expression was downregulated by siRNA technology (Figure 6B). The levels of IL-6 secreted into the medium correlated with the expression of the gene in both cases (Figure 6C).

Finally, overexpression of the human E2F1 protein reduced the glucose oxidation rate (~25% reduction, P<0.05, Figure 6D). Addition of TNF- $\alpha$  to these E2F1-transfected cells increased the catabolism of glucose (75% vs. 115%), although the increase observed in control LacZ-transfected cells treated with TNF- $\alpha$  was not reached (Figure 6D).

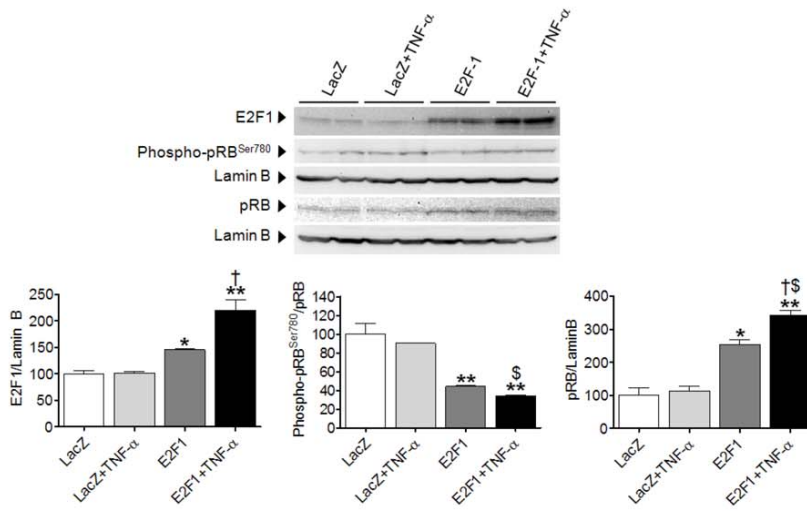
#### Discussion

The progression of heart failure usually entails a local rise in pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , which mainly act in an autocrine fashion. In cardiac cells exposed to TNF- $\alpha$ , the inhibition of *PDK4* expression by NF- $\kappa$ B is related to the shift towards increased glycolysis that is observed during cardiac pathological processes induced by pro-inflammatory stimuli, such as cardiac hypertrophy and heart failure [11]. A previous study performed in our laboratory revealed that NF- $\kappa$ B activation in cardiac cells inhibited ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity, which resulted in reduced *PDK4* expression and an enhanced glucose oxidation rate [11]. Addition of the NF- $\kappa$ B inhibitor parthenolide prevented the downregulation of *PDK4* expression but not ERR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  DNA binding activity, thus suggesting an additional mechanism by which *PDK4* is transcriptionally regulated. Besides ERR $\alpha$  and PPAR, a plethora of different transcription factors have been proposed to regulate *PDK4* expression, such as FOXO1 (Forkhead box protein O1), HNF4 (hepatic nuclear factor 4), LXR (liver xreceptor) or RXR (retinoid xreceptor) [7,8]. For instance, glucocorticoids stimulate *PDK4* transcription in McA-RH7777 hepatoma cells through two glucocorticoid receptor binding sites located within the distal promoter region of the *PDK4* gene [19]. Interestingly, PGC-1 $\alpha$  does not appear to be necessary for the acute regulation of *PDK4* by glucocorticoids [19]. Nevertheless, we did not find any change in FOXO1 activity in human cardiac AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  (data not shown), thus ruling out this transcription factor as a regulator of *PDK4* expression in our conditions. For the first time, we propose a novel mechanism by which the inflammatory processes driven by NF- $\kappa$ B can downregulate PDK4 through inhibition of the E2F1 transcription factor in a PPAR- and ERR $\alpha$ -independent manner. The results demonstrate that inhibition of *PDK4* expression by TNF- $\alpha$  in cardiac AC16 cells coincides with dysregulation in E2F1 activity. In addition, we show that E2F1 can transcriptionally regulate the *PDK4* gene. E2F1 overexpression did not completely keep AC16 cells away from the downregulation in *PDK4* transcription observed after TNF- $\alpha$  addition, while silencing *E2F1* through siRNA technology had no effect on *PDK4* expression either. In consonance with this,

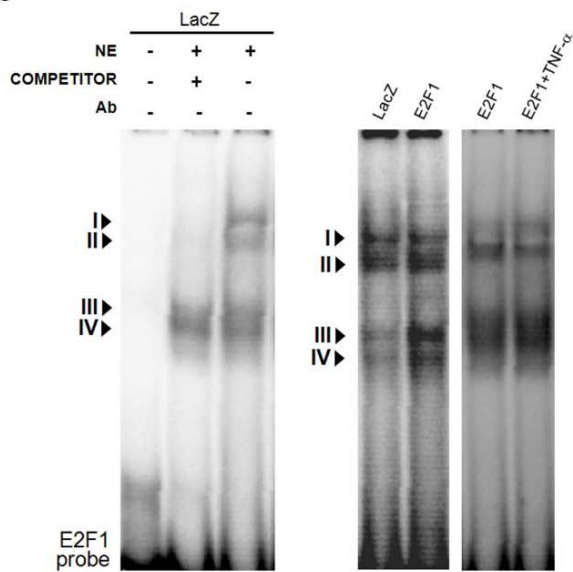
A



B



C



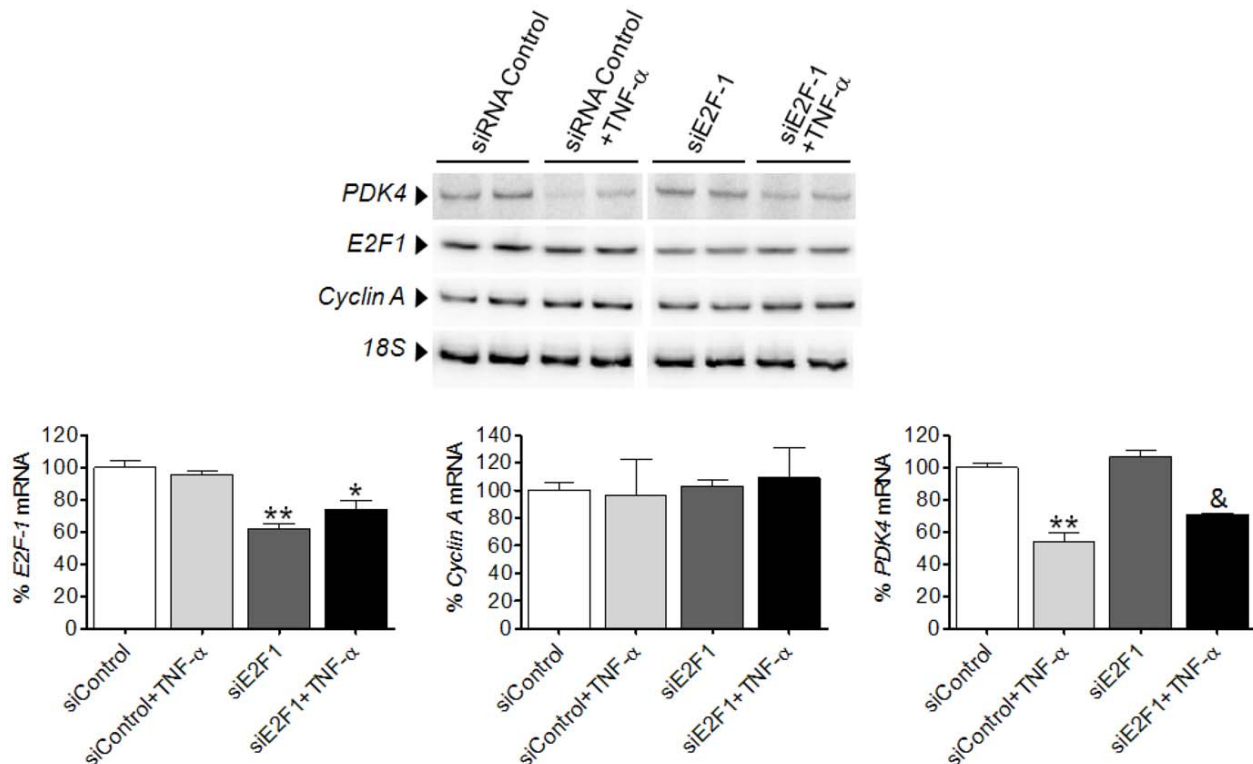
**Figure 2. E2F1 overexpression induces *PDK4* transcription in human cardiac AC16 cells.** (A) Relative quantification of *E2F1*, *PDK4* and *cyclin A* mRNA levels assessed by RT-PCR in human cardiac AC16 cells treated with or without TNF- $\alpha$  (100 ng/ml, 24 h) and transfected with LacZ- or E2F1-carrying plasmids, as described in Figure 1A. (B) E2F1, phospho-pRB<sup>Ser780</sup> and total pRB protein levels in nuclear protein extracts. To show equal loading of protein, the Lamin B signal from the same blot is included. The graphics represent the quantification of the normalized protein levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD. (C) EMSA assay showing E2F1 DNA-binding activity after treatment of AC16 cells as described in panel A (NE, nuclear extracts; Ab, antibody). All autoradiograph data are representative of three separate experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. LacZ; † $P < 0.05$  vs. E2F1; § $P < 0.01$  vs. LacZ+TNF- $\alpha$ . doi:10.1371/journal.pone.0019724.g002

enforced *PDK4* expression did not completely suppress glucose oxidation in human AC16 cells. These data indicate that additional regulatory mechanisms control *PDK4* transcription and glucose metabolism in cardiac cells, to prevent the deleterious effects of unrestrained E2F1 activities. Previous studies have already reported a link between E2F1 and glucose oxidation in muscle through the transcriptional regulation of *PDK4* expression [14]. This direct interaction between E2F1 and PDK4 might be aimed at sparing the glycolysis end-product pyruvate for the synthesis of the lipid and protein intermediates needed for cell doubling. E2F1 itself stimulates 6-phosphofructo-2-kinase-fructose-2,6-bisphosphatase, a potent stimulator of glycolysis [20].

The activity and specificity of E2F1 is tightly regulated through its gene expression and subcellular localization, as well as its interaction with pRB, phosphorylation or acetylation. These mechanisms of control do not act in isolation in time and space. We found that NF- $\kappa$ B activity modulation did not change E2F1 mRNA and protein levels in non-transfected AC16 cells. However, TNF- $\alpha$  significantly raised the E2F1 protein levels in cells carrying the pSG5L/E2F1 construct compared to non-stimulated cells.

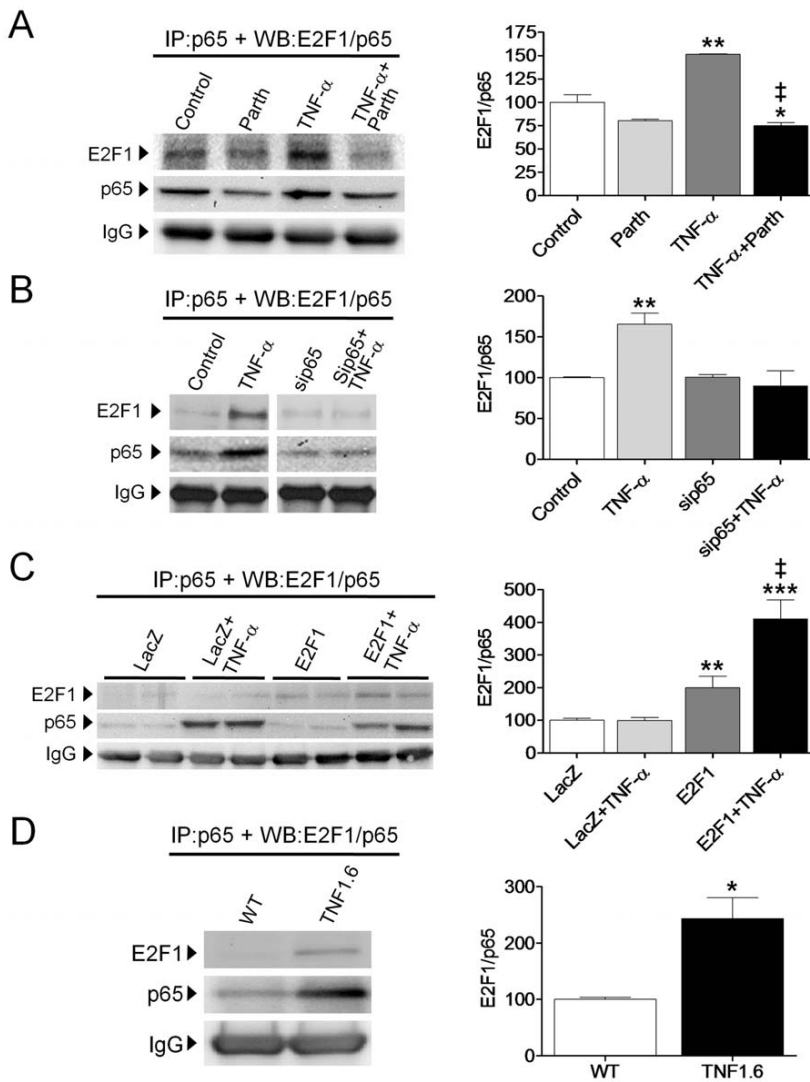
There is no simple explanation for this anomalous E2F1 accumulation, since it was not observed in control LacZ-transfected cells. However, increased protein stability owing to its interaction with p65 cannot be excluded. Regardless of the reason for the accumulation, the occurrence of higher levels of pRB concomitantly with a reduction in phospho-pRB levels suggests that E2F1 activity is tightly controlled in these cells. E2F1 acetylation enhances its transcriptional activity [21] but, unexpectedly, we found that E2F1 acetylation was induced by TNF- $\alpha$ , but not parthenolide. This indicates that enhanced acetylation might be a response of the cell to counteract the inhibition of E2F1 activity. Alternatively, it might be a consequence of the ability of IKK to potentiate E2F1 acetylation [22]. Consequently, parthenolide would then completely abrogate such acetylation.

NF- $\kappa$ B, and p65 in particular, is localized inside the nucleus also under basal conditions, where they may constitutively silence gene transcription by competing with other transcription factors [15]. The mechanism involved in the E2F1-mediated TNF- $\alpha$  downregulation of *PDK4* expression in AC16 cells entails enhanced physical interaction between the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1.



**Figure 3. E2F1 gene silencing does not enhance the TNF- $\alpha$ -mediated PDK4 inhibition.** Relative quantification of *E2F1*, *PDK4* and *cyclin A* mRNA levels assessed by RT-PCR in human cardiac AC16 cells treated with or without TNF- $\alpha$  and transfected with scrambled siRNA (siControl) or siE2F1. The graphics represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD. All autoradiograph data are representative of three separate experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. siRNA Control; & $P < 0.01$  vs. siE2F1. doi:10.1371/journal.pone.0019724.g003

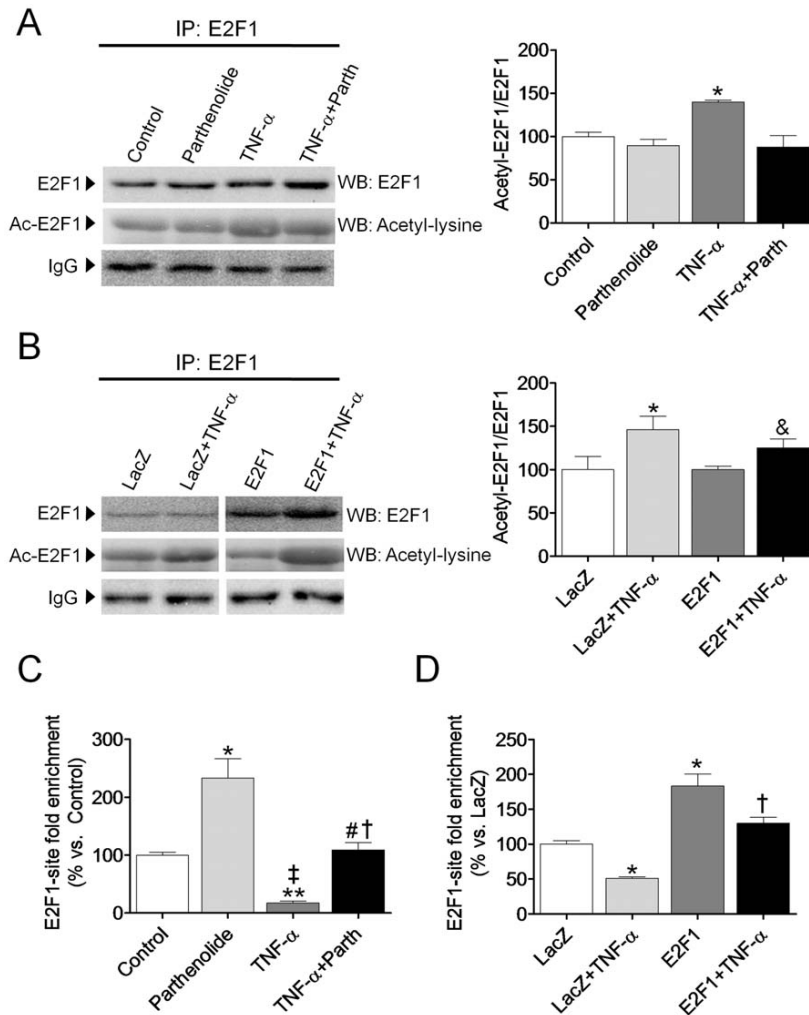




**Figure 4. p65 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1 are physically associated in cardiac cells.** Protein extracts were immunoprecipitated using an anti-p65 antibody and then subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-E2F1 antibody. The graphics represent the quantification of the immunoprecipitated protein normalized to its corresponding control samples, expressed as a percentage  $\pm$ STD. The blot data are representative of three separate experiments. (A) AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  (100 ng/ml, 24 h) in the presence or absence of parthenolide (Parth, 10  $\mu$ mol/L). (B) AC16 cells treated with or without TNF- $\alpha$  and transfected with specific siRNA to p65. (C) AC16 cells treated with or without TNF- $\alpha$  and transfected with LacZ- or E2F1-carrying plasmids. (D) TNF1.6 or control wild type (WT) mice. (A) and (B) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. Control; † $P$ <0.01 vs. TNF- $\alpha$ . (C) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. LacZ; † $P$ <0.001 vs. E2F1. (D) \* $P$ <0.05 vs. WT. doi:10.1371/journal.pone.0019724.g004

Importantly, this association was also observed in vivo in heart of TNF1.6 mice. Chromatin immunoprecipitation analyses demonstrated that NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus prevented the recruitment of E2F1 to the *PDK4* promoter and its subsequent E2F1-mediated gene transcription. This view is supported by two observations: E2F1 binding to the *PDK4* promoter was reduced in TNF- $\alpha$ -treated cells; and parthenolide prevented this reduction. Importantly, parthenolide not only prevented the binding between p65-E2F1 by reducing translocation of the former into the nucleus, but would also activate E2F1 through enhanced pRB phosphorylation, thus releasing the active E2F-DP complex. This latter mechanism might account for the upregulation of *PDK4* expression induced by parthenolide in the absence of a proinflammatory stimulus. The association between p65 and

E2F1 has already been established in human fibroblasts, in which this physical interaction disrupts the E2F-responsive gene expression [16]. Likewise, E2F1 has been reported to disrupt antiapoptotic NF- $\kappa$ B signaling through downregulation of the NF- $\kappa$ B activator TNF receptor-associated factor 2 [23,24], by competing with p50 for RelA/p65 binding in murine fibroblasts [24] or inhibiting the phosphorylation of I $\kappa$ B [25]. In human AC16 cardiac cells, IL-6 expression and secretion was further induced after *E2F1* gene silencing, but downregulated by E2F1 overexpression. This indicates that E2F1 in these cells acts as a repressor of NF- $\kappa$ B activity. Although we only demonstrate the physical association of E2F1 with p65, it is feasible that other NF- $\kappa$ B subunits interact with this transcription factor, since other studies have revealed that exogenous E2F1 can associate with both

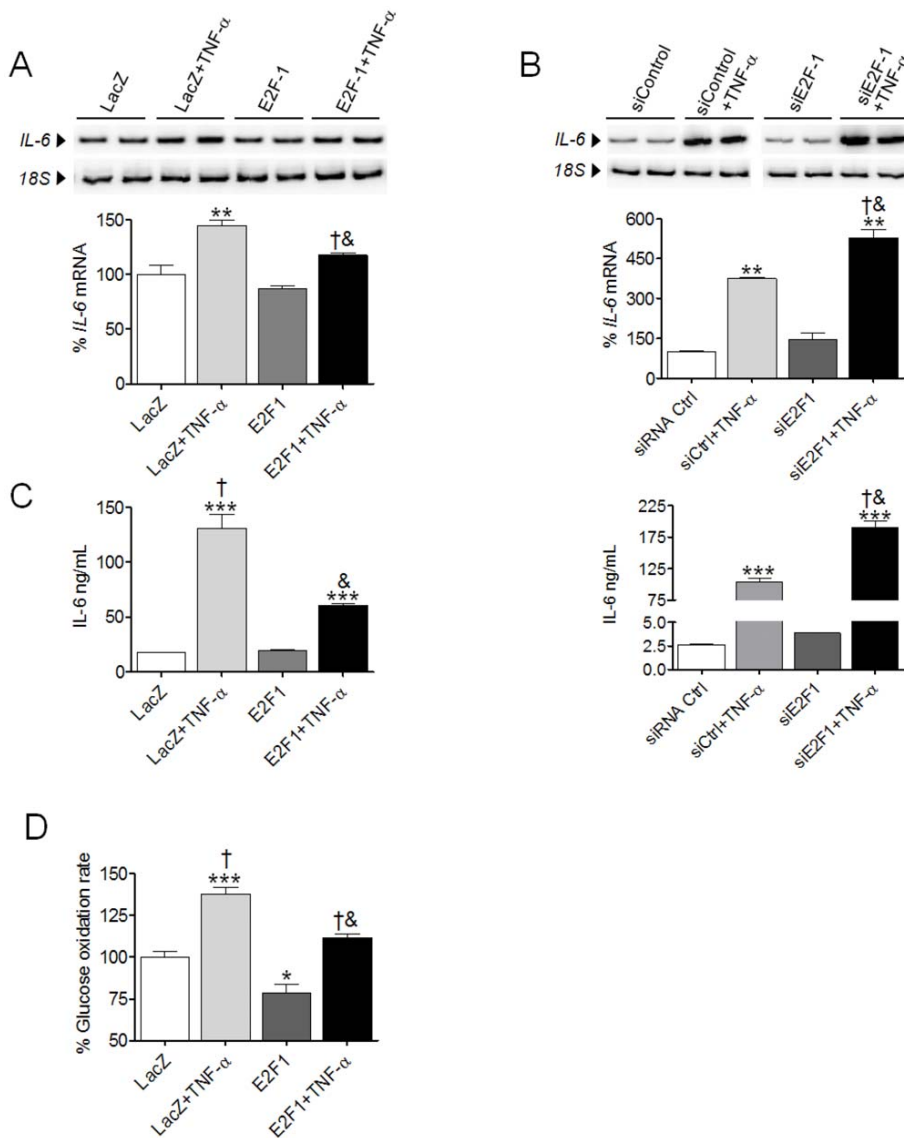


**Figure 5. TNF- $\alpha$  inhibits *PDK4* promoter occupancy by E2F1.** (A) and (B), protein extracts of AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  (100 ng/mL, 24 h) in the presence or absence of 10  $\mu$ mol/L parthenolide (A) or transfected with LacZ- or E2F1-carrying plasmids (B) were subjected to immunoprecipitation using an anti-E2F1 antibody. They were then subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-acetyl-lysine antibody. The graphics represent the quantification of the immunoprecipitated protein normalized to its corresponding control samples, expressed as a percentage  $\pm$ STD. The blot data are representative of three separate experiments. (C) and (D), chromatin immunoprecipitation from AC16 cells incubated with TNF- $\alpha$  in the presence or absence of parthenolide (C); or AC16 cells treated with TNF- $\alpha$  and transfected with LacZ- or E2F1-carrying plasmids (D). The graphics represent the E2F1-site fold enrichment at the *PDK4* promoter, expressed as a percentage of control (C) or LacZ (D) samples  $\pm$ STD. (A) and (C) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. Control; † $P$ <0.05, ‡ $P$ <0.01 vs. Parth; #  $P$ <0.05 vs. TNF $\alpha$ . (B) and (D) \* $P$ <0.05 vs. LacZ; † $P$ <0.05 vs. LacZ+TNF- $\alpha$ ; & $P$ <0.05 vs. E2F1. doi:10.1371/journal.pone.0019724.g005

RelA and p50 upon LPS stimulation [26]. The occurrence of additional mechanisms involving other E2Fs on the effects induced by NF- $\kappa$ B activation cannot be excluded either. Thus, it has been reported that IKKs may directly phosphorylate E2F4 in human fibroblasts. This results in nuclear accumulation of E2F4 and subsequent replacement of the activator E2F1 at the E2F-binding element in responsive gene promoters [16].

In the myocardium, glucose is catabolized predominantly by the aerobic glycolytic pathway [27]. *PDK4* is the kinase responsible for the phosphorylation-induced inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex, which catalyzes the rate-limiting step of aerobic glucose oxidation. Under certain circumstances, such as cardiac hypertrophy or heart failure, reliance on the glycolytic pathways is increased due to the downregulation of *PDK4* activity.

Based on our findings, we envision a model for the regulation of *PDK4* expression and cardiac cell metabolism by NF- $\kappa$ B and E2F1, in which NF- $\kappa$ B serves as a molecular switch that regulates E2F1-dependent *PDK4* gene transcription. As inappropriate *PDK4* activity would have catastrophic consequences in high-metabolic-rate organs, the basal repression of E2F1-dependent *PDK4* expression by NF- $\kappa$ B might be crucial for normal cardiac function. Since E2F1 plays an important role in cardiac myocyte growth and is also involved in metabolism regulation through *PDK4* modulation, targeting this transcription factor could provide us with an effective therapy for treating detrimental left ventricular hypertrophy leading to heart failure. This is of particular relevance, since cardiac hypertrophy and chronic heart failure have both been related to inflammatory processes in the



**Figure 6. The crosstalk between the p5 subunit of NF- $\kappa$ B and E2F1 influences inflammation and glucose oxidation.** (A) and (B), Relative quantification of *IL-6* mRNA levels assessed by RT-PCR in human cardiac AC16 cells transfected with LacZ- or E2F1-carrying plasmids (A) or with control siRNA (siCtrl) and siE2F1 (B) and treated with or without TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 8 h (A) or 24 h (B). Graphics represent the quantification of the 18S-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD. The blot data are representative of three separate experiments. (C) Levels of IL-6 (ng/mL) in the same samples as described in Panels A and B. (D) [ $^{14}$ C]-glucose oxidation rates in AC16 cells overexpressing the human *LacZ*-control or the *E2F1* genes incubated with TNF- $\alpha$ . (A), (C), and (D) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. LacZ; † $P$ <0.01 vs. E2F1; & $P$ <0.01 vs. LacZ+TNF- $\alpha$ . (B) \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs. siCtrl; † $P$ <0.001 vs. siCtrl+TNF- $\alpha$ ; & $P$ <0.001 vs. siE2F1. doi:10.1371/journal.pone.0019724.g006

myocardium and we have also demonstrated that triggering E2F1 in human cardiac cells partially abrogates cytokine secretion.

## Methods

### Reagents

D-[U- $^{14}$ C]-glucose, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP were purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). All chemicals, except when indicated, were purchased from Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain). The antibodies utilized throughout the study were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), except Oct-1 and p65, which were from

Santa Cruz Biotechnology (Inc., Heidelberg, Germany), and Lamin B (from Sigma-Aldrich Química).

### Cell culture and transient transfection studies

Human cardiac AC16 cells were maintained and grown as previously described [28]. In brief, non-differentiated AC16 cells were maintained in medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM):F12 (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 12.5% foetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 1% Fungizone (Invitrogen), and grown at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO $_2$ /95% air until they reached 70–80% confluence. For in vitro overexpression

studies, cells were transfected with Lipofectamine 2000 in OPTI-MEM reduced serum medium, following the manufacturer's recommendations (Invitrogen). For in vitro overexpression studies, the constructs used were pSG5L/E2F1 construct (human gene, Addgene plasmid 10736, Cambridge, MA, USA) [6] and the corresponding *LacZ*-carrying plasmid as a control. Transfection time and the DNA to Lipofectamine ratio for overexpression studies were set after optimization with the corresponding *LacZ*-carrying plasmid and using a  $\beta$ -galactosidase reporter gene staining kit (Sigma-Aldrich Química). Small interfering RNA (siRNA)-mediated *E2F1* gene silencing was carried out by transfecting AC16 cells with human *E2F1* siRNA (Santa Cruz Biotechnology), using scrambled siRNA as a transfection control. Fluorescein-labeled siRNA was used to optimize siRNA transfections by means of fluorescence microscopy.

### Preparation of cardiac samples from TNF- $\alpha$ transgenic mice

We used transgenic male TNF1.6 mice (8 to 12-weeks old) with cardiac-specific overexpression of TNF- $\alpha$ , which has been established as a suitable model of cytokine-induced cardiomyopathy [29]. Mice were anaesthetized with 5% isoflurane and, after monitoring the adequacy of anaesthesia by testing of rear foot reflexes, they were euthanized by cervical dislocation. After this, the heart was excised, rinsed in ice-cold PBS and snap-frozen in liquid nitrogen [30]. The study was approved by the Thomas Jefferson University's Institutional Animal Care and Use Committee and conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

### RNA preparation and analysis

Relative levels of specific mRNAs were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [31]. Briefly, total RNA was isolated using the Ultraspec reagent (Biotech, Houston, TX). RNA samples were cleaned (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel, Düren, Germany) and checked for integrity by agarose gel electrophoresis. The total RNA isolated by this method was undegraded and free of protein and DNA contamination. Reverse transcription was performed from 0.5  $\mu$ g total RNA using Oligo(dT)<sub>23</sub> and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Preliminary experiments were carried out with various amounts of cDNA to determine nonsaturating conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed by the RT-PCR method described in this study [32]. Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning. The results for the expression of specific mRNAs are always presented relative to the expression of the control gene. The sequences of the forward and reverse primers used for amplification are shown in Supplementary Table S1.

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and immunoblot analysis

Nuclear extracts (NE) from AC16 cells were isolated as previously reported [31]. To obtain total proteins, AC16 cardiac cells or frozen tissue slides were homogenized in cold lysis buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, and 5.4  $\mu$ g/mL aprotinin). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford method [33].

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were performed using double-stranded oligonucleotides for the consensus binding

site of E2F1 (Santa Cruz Biotechnology). Oligonucleotides were labeled by incubating the following reaction at 37°C for 2 hours: 2  $\mu$ L oligonucleotide (1.75 pmol/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L of 5 $\times$  kinase buffer, 1  $\mu$ L of T4 polynucleotide kinase (10 U/ $\mu$ L), and 2.5  $\mu$ L [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol at 10 mCi/mL). The reaction was stopped by adding 90  $\mu$ L of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 1 mM EDTA). To separate the labeled probe from the unbound ATP, the reaction mixture was eluted in a Nick column (Pharmacia, Sant Cugat, Spain) according to the manufacturer's instructions. Five micrograms of crude nuclear protein were incubated for 10 min on ice in binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 5% glycerol, 5 mg/mL BSA, and 50  $\mu$ g/ml poly[dI-dC]) in a final volume of 15  $\mu$ L. Then, specific competitor oligonucleotide or antibody for supershift assays were added and incubated for 15 minutes on ice. Subsequently, the labeled probe (100,000 cpm) was added and the reaction was incubated for an additional 15 minutes on ice. Finally, protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4°C on 5% polyacrylamide gels in 0.5 $\times$  Tris-borate-EDTA buffer and subjected to autoradiography.

Protein extracts were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA), as previously described [31]. Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). The size of detected proteins was estimated using protein molecular mass standards (Invitrogen).

### Coimmunoprecipitation and Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies

For coimmunoprecipitation, cell nuclear extracts (25  $\mu$ g) were brought to a final volume of 250  $\mu$ L with buffer containing 10 mM PBS, 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, BSA 2% and 1 mg/ml nonfat milk for 6 hours at 4°C and incubated with 4  $\mu$ g of anti-p65. Immunocomplex was captured by incubating the samples with 50  $\mu$ L protein A-agarose suspension (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C on a rocker platform. Agarose beads were collected by centrifugation and washed three times with PBS containing protease inhibitors. After microcentrifugation, the pellet was washed with 25  $\mu$ L of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min at 100°C. The resultant supernatant was subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE and immunoblotted with the corresponding antibodies.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed with the ChIP Kit (Abcam, Cambridge, UK), using an E2F1-specific antibody. Input DNA, mock samples and E2F1-immunoprecipitated DNA were subjected to real-time PCR analysis with sequence-specific primers surrounding the E2F1 sites in the PDK4 promoter, along with primers capable of amplifying the genomic sequence lacking E2F binding sites (negative control, data not shown) [11]. Mock immunoprecipitations correspond to control reactions lacking antibodies. Results are reported as E2F1 site fold enrichment, expressed as a percentage of control samples  $\pm$ STD, after normalization to the sample specific background and to the total input DNA.

### Glucose oxidation

AC16 cells were grown in 6-well plates as described above. Following transfection, 1 mL of reaction mixture (25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, 1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES, 1  $\mu$ Ci/mL D-[U-<sup>14</sup>C]-glucose) containing

1  $\mu\text{mol/L}$  insulin was added to each well. After incubation for 60 minutes at  $37^\circ\text{C}$  in a water bath with gentle shaking, reactions were stopped by the injection of 100  $\mu\text{L}$  60% (w:v) perchloric acid, and the plates were kept at  $4^\circ\text{C}$  overnight to trap the  $\text{CO}_2$  produced. The release of  $^{14}\text{CO}_2$  from glucose was measured by scintillation counting of the filter paper for 1 minute in a  $\beta$ -counter. Wells containing no cells were used as blanks. Glucose oxidation rates were calculated as nanomoles of added glucose  $\cdot\text{g}^{-1}$  total protein total  $\cdot\text{hour}^{-1}$ , and then expressed as a percentage with respect to control cells.

### Statistical Analysis

Results are expressed as the mean  $\pm\text{SD}$  of at least three separate experiments. Significant differences were established by either the Student's *t* test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the computer program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc V4.03, San Diego, CA, USA). When significant variations were found by one-way ANOVA, the Tukey-Kramer multiple comparisons post-test was performed.

### Supporting Information

**Figure S1 E2F1 levels are not modified after NF-kB modulation.** (A) Relative quantification of *E2F1* mRNA levels assessed by RT-PCR in human cardiac AC16 cells incubated with TNF- $\alpha$  (100 ng/mL) for 6 h in the presence or absence of parthenolide (Parth, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). The graphics represent the quantification of the *18S*-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm\text{STD}$ . (B) E2F1 protein levels in nuclear protein extracts isolated from samples as described in panel A. To show equal loading of protein, the Lamin B signal is

also included. All autoradiograph data are representative of three separate experiments.

(TIIF)

**Figure S2 NF-kB activation in transgenic TNF1.6 mice does not modulate E2F1 levels.** (A) Relative quantification of *PDK4*, *E2F1* and *Cyclin A* mRNA levels assessed by RT-PCR in left ventricle tissue of transgenic TNF1.6 and control wild-type (WT) mice. Graphs represent the quantification of the *Aprt*-normalized mRNA levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm\text{STD}$ . (B) E2F1 protein levels in nuclear protein extracts isolated from samples as described in panel A. To show equal loading of protein, the Lamin B signal is also included. The graphics represent the quantification of the normalized protein levels, expressed as a percentage of control samples  $\pm\text{STD}$ . All autoradiograph data are representative of three separate experiments. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , and \*\*\* $P<0.001$  vs. WT (TIIF)

**Table S1** Primers used for the RT-PCR reactions. (DOC)

### Acknowledgments

We thank Dr. W.G. Kaelin, Jr. (The Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School, Boston, MA, USA) for the pSG5L/E2F1 plasmid. We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for their assistance.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MVC XP. Performed the experiments: XP DAG. Analyzed the data: MVC XP DAG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MMD TOC AMF. Wrote the paper: MVC XP.

### References

- Bergman MR, Kao RH, McCune SA, Holycross BJ (1999) Myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am J Physiol* 277: H543–H550.
- Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'regan DJ, Ball SG, et al. (2007) Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 76: 81–90.
- Gupta S, Young D, Maitra RK, Gupta A, Popovic ZB, et al. (2008) Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J Mol Biol* 375: 637–649.
- Vara D, Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G (2003) Inhibition of E2F abrogates the development of cardiac myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 278: 21388–21394.
- La Thangue NB (2003) The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. *Nat Cell Biol* 5: 587–589.
- Sellers WR, Novitch BG, Miyake S, Heith A, Otterson GA, et al. (1998) Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev* 12: 95–106.
- Zhang Y, Ma K, Sadana P, Chowdhury F, Gaillard S, et al. (2006) Estrogen-related receptors stimulate pyruvate dehydrogenase isoform 4 gene expression. *J Biol Chem* 281: 39897–39906.
- Sugden MC, Holness MJ (2006) Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* 112: 139–149.
- Finck BN, Kelly DP (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115: 2540–2548.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 $\{\alpha\}$ . *Cardiovasc Res* 79: 208–217.
- Palomer X, Álvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, et al. (2009) TNF- $\alpha$  reduces PGC-1 $\alpha$  expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 81: 703–712.
- Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M (2005) Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 280: 17464–17471.
- Hlaing M, Spitz P, Padmanabhan K, Cabezas B, Barker CS, et al. (2004) E2F-1 regulates the expression of a subset of target genes during skeletal myoblast hypertrophy. *J Biol Chem* 279: 43625–43633.
- Hsieh MC, Das D, Sambandam N, Zhang MQ, Nahle Z (2008) Regulation of the PDK4 Isozyme by the Rb-E2F1 Complex. *J Biol Chem* 283: 27410–27417.
- Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, et al. (2008) Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20734–20739.
- Araki K, Kawauchi K, Tanaka N (2008) IKK/NF-kappaB signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. *Oncogene* 27: 5696–5705.
- Wells J, Graveel CR, Bartley SM, Madore SJ, Farnham PJ (2002) The identification of E2F1-specific target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3890–3895.
- Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, et al. (2010) The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1 $\alpha$ , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 87: 449–458.
- Connaughton S, Chowdhury F, Attia RR, Song S, Zhang Y, et al. (2010) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 315: 159–167.
- Darville MI, Rousseau GG (1997) E2F-dependent mitogenic stimulation of the splicing of transcripts from an S phase-regulated gene. *Nucleic Acids Res* 25: 2759–2765.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19: 662–671.
- Tu Z, Prajapati S, Park KJ, Kelly NJ, Yamamoto Y, et al. (2006) IKK alpha regulates estrogen-induced cell cycle progression by modulating E2F1 expression. *J Biol Chem* 281: 6699–6706.
- Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* 4: 771–781.
- Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, et al. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* 9: 1017–1029.
- Chen M, Capps C, Willerson JT, Zoldhelyi P (2002) E2F-1 regulates nuclear factor-kappaB activity and cell adhesion: potential antiinflammatory activity of the transcription factor E2F-1. *Circulation* 106: 2707–2713.

26. Lim CA, Yao F, Wong JJ, George J, Xu H, et al. (2007) Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol Cell* 27: 622–635.
27. Lydell CP, Chan A, Wambolt RB, Sambandam N, Parsons H, et al. (2002) Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts. *Cardiovasc Res* 53: 841–851.
28. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, et al. (2005) Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39: 133–147.
29. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, et al. (1997) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 81: 627–635.
30. Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM (2001) Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 104: 2492–2497.
31. Coll T, Jove M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, et al. (2006) Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and NF- $\kappa$ B activation. *Diabetes* 55: 2779–2787.
32. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26: 112–115.
33. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

# DISCUSSIÓ

---





Cada cop són més les evidències que ens mostren l'existència d'un possible vincle entre la inflamació crònica de baix grau i els trastorns metabòlics que s'associen amb un augment del consum d'àcids grassos saturats, com ara la resistència a la insulina, l'obesitat i la diabetis mellitus de tipus 2. Al cor, l'excés de greix procedent de la dieta afecta l'expressió gènica, l'estructura, el metabolisme i la funció contràctil, factors dels quals en poden derivar tota una sèrie d'efectes adversos sobre la fisiologia cardiovascular. De fet, dietes amb un elevat contingut en greixos (HFD) s'han relacionat amb una sèrie d'efectes cardíacs directes com són la inflamació, hipertròfia i disfunció contràctil [Tikellis i col., 2008]. En ratolins obesos alimentats amb una dieta HFD durant 6 setmanes, el metabolisme cardíac de la glucosa es veu alterat, en un procés que està associat a un increment del nivell de citocines proinflamatòries [Ko i col., 2009]. En altres estudis s'han descrit resultats similars en ratolins alimentats amb una HFD, que presenten un augment significatiu de l'expressió d'*IL-6*, *TNF- $\alpha$*  i *MCP-1* en cor [Tikellis i col., 2008], citocines que estan implicades en el desenvolupament i progressió de la insuficiència i la hipertròfia cardíques. En front aquestes patologies, el cor adult, que obté principalment l'energia necessària de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos, veu compromesa la seva flexibilitat de substrat, passant a usar de forma preferencial la glucosa en detriment dels àcids grassos [van Bilsen i col., 1998]. Aquests canvis metabòlics comporten una desregulació del control transcripcional de gens relacionats amb el transport i catabolisme d'àcids grassos i glucosa, molts dels quals es troben sota el control del factor de transcripció anomenat receptor activat per proliferadors peroxisòmics (PPAR). En el miocardi, la isoforma majoritària de PPAR és PPAR $\beta/\delta$ . En diferents estudis s'ha descrit que PPAR $\beta/\delta$  presenta activitat antiinflamatòria [Kino i col., 2007; Coll i col., 2010], ja que s'ha observat que l'activació d'aquest factor de transcripció pot inhibir la via de senyalització de NF- $\kappa$ B, tot evitant la hipertròfia dels cardiomiòcits. En aquestes cèl·lules també s'ha descrit que PPAR $\beta/\delta$  evita la reducció de l'expressió de gens involucrats en el metabolisme dels àcids grassos característica de processos inflamatoris. D'altra banda, en treballs recents també s'ha observat un increment de l'activació de PPAR $\beta/\delta$  en el creixement de

diferents tipus de càncer [Wagner i Wagner, 2010], malgrat que el paper d'aquest factor de transcripció en la carcinogènesi presenta certes contradiccions, ja que, ara per ara, no es coneix si l'increment de PPAR $\beta/\delta$  és una conseqüència del procés carcinogènic, i no té cap efecte sobre aquest, o bé juga una paper rellevant en el desenvolupament d'aquest procés [Wagner i Wagner, 2010]. De fet, en la bibliografia actual es descriu amb freqüència rols paradoxals i oposats de PPAR $\beta/\delta$  en càncer, així, mentre que en alguns estudis impliquen a aquest factor de transcripció en l'aparició i desenvolupament del càncer, en altres han presentat evidències d'un paper protector de PPAR $\beta/\delta$  en processos cancerígens [Youssef i Badr, 2011].

Per tal d'abordar els objectius que ens vam proposar, vam utilitzar diferents models murins, ratolins CD-1 alimentats amb una HFD i ratolins *knockout* PPAR $\beta/\delta$ , així com la línia cel·lular AC16, resultant de la fusió de cèl·lules ventriculars procedents d'un cultiu primari amb fibroblasts, als que se'ls havia desproveït de l'ADN mitocondrial i s'havien transformat amb l'oncogen SV-40 [Davidson i col., 2005]. Aquestes cèl·lules ens han permès examinar les alteracions metabòliques que deriven de processos inflamatoris en cor. Aquest fet es força rellevant ja que l'estudi del nostre grup ha estat el primer en examinar processos inflamatoris en un model *in vitro* de cèl·lules cardíques d'origen humà, permetent sobrepassar certes inconsistències trobades a l'extrapolar resultats obtinguts en models murins a humans. Per exemple, s'ha vist que alguns dels factors de transcripció implicats en el metabolisme i en processos inflamatoris, com és el cas de PPAR, s'expressen en menor quantitat en cèl·lules humanes que no en cèl·lules de rosegadors [Palmer i col., 1998]. De fet, la regulació de l'expressió gènica per part de PPAR presenta certes diferències entre models murins i humans [Lawrence i col., 2001].

En ratolins alimentats amb una HFD el metabolisme cardíac de la glucosa es veu alterat en un procés que està associat amb un increment del nivell de citocines i quimiocines proinflamatòries, entre les que hi trobem IL-6, TNF- $\alpha$  i MCP-1 [Ko i col., 2009]. En concordança amb aquest fet trobem que la inflamació induïda per la dieta i la desregulació del metabolisme de la glucosa es veuen atenuades en ratolins *knockout*

per IL-6 [Ko i col., 2009]. El tractament de cèl·lules AC16 amb palmitat va generar resultats anàlegs als obtinguts en ratolins alimentats amb una HFD, en els quals també s'observava un augment de l'expressió d'*IL-6*, *TNF- $\alpha$*  i *MCP-1*. En el mecanisme pel qual IL-6 suprimeix el metabolisme de la glucosa tot derivant cap a una resistència a la insulina en cor, sembla estar-hi involucrada la inhibició d'IRS-1 (de l'anglès *Insulin Receptor Substrate*) per part de SOCS-3 [Ko i col., 2009]. Malgrat això, nosaltres no vam observar cap canvi en els nivells d'IRS-1 després de l'augment de l'activitat de SOCS en cor de ratolins CD-1 alimentats amb una HFD, ni tampoc en cèl·lules AC16 exposades a palmitat, indicant-nos que o bé en aquests models la degradació de IRS-1 no està induïda per SOCS o, el que és més plausible, que el període de tractament va ser massa curt com per observar canvis. A banda d'un augment en l'expressió de citocines proinflamatòries, a l'administrar una HFD a ratolins CD-1 i en el tractament amb palmitat en cèl·lules AC16, vam observar una major activitat d'unió de NF- $\kappa$ B a l'ADN, així com un increment dels nivells de la proteïna p65. Aquests resultats concordaven amb una major degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  per part del proteasoma en les cèl·lules AC16, i l'increment de la fosforilació en el residu serina 32 d'I $\kappa$ B $\alpha$  en ratolins CD-1. De la mateixa manera, en altres estudis s'ha observat una lleugera degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  en miotubs C2C12 després d'exposar-los a palmitat [Kadotani i col., 2009], fet que ens suggereix que les cèl·lules AC16 són més sensibles a la inflamació induïda per palmitat que no pas les cèl·lules musculars esquelètiques.

Tal i com hem descrit, PPAR $\beta/\delta$  és un dels factors principals implicats en la relació entre processos inflamatoris i alteracions metabòliques en cor, de manera que en aquest estudi vam voler profunditzar en el mecanisme responsable. En primer lloc, vam examinar els efectes de l'agonista de PPAR $\beta/\delta$  GW501516 en la inflamació induïda per àcids grassos en cèl·lules cardíques. Aquest agonista és un lligand selectiu de PPAR $\beta/\delta$  amb una afinitat 1000 vegades major respecte a les altres isoformes de PPAR [Oliver, Jr. i col., 2001]. PPAR $\beta/\delta$  juga un important paper en el cor, on desenvolupa funcions similars a les de PPAR $\alpha$ . L'activació de la isoforma PPAR $\beta/\delta$  sembla que pot inhibir la via de senyalització de NF- $\kappa$ B tot evitant la hipertròfia cardíaca i la reducció de l'expressió dels gens implicats en el metabolisme del àcids grassos. Diferents

estudis corroboren l'activitat antiinflamatòria de PPAR $\beta/\delta$  tant en malalties del sistema immune [Kino i col., 2007] com en models experimentals d'hipertròfia cardíaca [Planavila i col., 2005b]. En el nostre estudi vam observar com l'activació de PPAR $\beta/\delta$  per part de GW501516 reduïa la inducció de *MCP-1* i *TNF- $\alpha$* , gens diana de NF- $\kappa$ B, tant en cèl·lules cardíques estimulades amb palmitat com en el cor de ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos, suggerint-nos un bloqueig de l'activitat de NF- $\kappa$ B per part de PPAR $\beta/\delta$ . Per una altra banda, en el cor de ratolins *knockout* PPAR $\beta/\delta$  vam observar una inducció de l'expressió d'*IL-6* i de l'activitat d'unió de NF- $\kappa$ B a l'ADN en relació als ratolins *wild-type*, tot reforçant l'efecte antiinflamatori de PPAR $\beta/\delta$ . La major expressió a nivell cardíac de *MCP-1* pot derivar cap a la infiltració i activació de cèl·lules inflamatòries en el cor, fet que podria derivar en una remodelació ventricular i el desenvolupament d'una insuficiència cardíaca, de manera que l'activació de PPAR $\beta/\delta$  podria ser d'utilitat per tal de reduir l'expressió de *MCP-1* en cor i les cardiopaties derivades.

En el miocardi, IL-6 activa la via del factor de transcripció STAT, tot induint STAT3 i en menor mesura STAT1, els gens diana dels quals codifiquen per proteïnes activades en condicions d'estrès com són l'infart agut de miocardi i estímuls hipertròfics [Boengler i col., 2008]. També s'ha descrit que ratolins amb una sobreexpressió de STAT3 o IL-6 desenvolupen hipertròfia cardíaca, de manera que les teràpies enfocades a disminuir la secreció d'IL-6 en cor, que es dona en l'obesitat, podrien millorar l'estat cardíac tot reduint l'aparició de processos cardiovasculars adversos. Sorprenentment però, GW501516 va evitar l'activació de la via de senyalització IL-6/JAK/STAT en ratolins alimentats amb una HFD, però no en cèl·lules AC16 tractades amb palmitat. Aquesta discrepància pot ser explicada, entre altres motius, per l'existència de diferències entre espècies o pel fet de que els efectes d'una HFD en el cor depenen de la composició dels diferents àcids grassos presents en la dieta. En una dieta equilibrada els lípids haurien d'aportar un 30-35% del total de calories provinents de la dieta (dels quals només el 10% haurien de ser àcids grassos saturats), mentre que en una HFD els lípids representen un 60% del total de calories. Entre els àcids grassos saturats el més abundant és el palmitat, del que s'ha descrit que presenta efectes proinflamatoris

[French i col., 2002; Ajuwon i Spurlock, 2005]. En altres estudis s'ha descrit que un augment dels àcids grassos en la dieta pot induir processos inflamatoris com a conseqüència d'un increment de lipopolisacàrids en plasma i la subsegüent activació de TLR-4 (de l'anglès *Toll-Like Receptor-4*) [Cani i col., 2007]. En concordança amb aquests resultats, les diferents respostes observades al tractar amb GW501516 els ratolins CD-1 alimentats amb una HFD i les cèl·lules AC16 tractades amb palmitat, es podrien explicar pel fet de que una HFD i el palmitat desencadenin processos inflamatoris diferents.

D'altra banda, al tractar les cèl·lules AC16 amb partenolide, un inhibidor de NF- $\kappa$ B, vam observar una disminució de l'expressió d'*IL-6* i *MCP-1* induïda pel palmitat, malgrat que el tractament amb GW501516 només va revertir l'expressió de *MCP-1*. Per tant, és factible que en la transcripció d'aquestes citocines en cèl·lules AC16 hi estigui implicat NF- $\kappa$ B, i que un cop induïda la transcripció d'*IL-6*, aquesta possiblement estigui controlada per altres vies de senyalització. Així, aquesta reducció en l'expressió d'*IL-6* per part del partenolide es podria atribuir als efectes inhibitoris d'aquest compost sobre altres factors de transcripció que regulen *IL-6*, com és el cas de AP-1 (de l'anglès *Activating Protein-1*) [Zhou i col., 2007]. Entre els nostres resultats vam observar que GW501516 incrementava la interacció física entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i PPAR $\beta/\delta$  en cèl·lules AC16, mentre que l'addició de GSK0660, antagonista de PPAR $\beta/\delta$ , bloquejava parcialment aquest increment. D'altra banda, vam observar que l'addició de l'inhibidor de l'AMPK *compound C*, en cèl·lules AC16 tractades prèviament amb GW501516 i palmitat, revertia la reducció de l'expressió de *MCP-1* produïda per GW501516 després de tractar amb palmitat, indicant-nos també la participació d'AMPK en aquest procés. Aquests resultats ens suggereixen que els efectes antiinflamatoris de GW501516 són deguts a mecanismes dependents de PPAR $\beta/\delta$  i d'AMPK. De fet s'ha descrit que AMPK podria bloquejar la via de senyalització de NF- $\kappa$ B mitjançant la inhibició de l'activitat I $\kappa$ B cinasa [Kramer i col., 2007]. Així, entre els diferents mecanismes proposats per tal d'explicar els efectes antiinflamatoris de l'activació de PPAR $\beta/\delta$ , hi trobem l'esmentada interacció física entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i PPAR $\beta/\delta$ , la inducció de gens d'efecte antioxidant o l'alliberament de

corepressors nuclears. De fet, és molt probable que PPAR $\beta/\delta$  exerceixi els seus efectes inhibitoris sobre NF- $\kappa$ B a través de diferents mecanismes que depenen de les condicions i del tipus cel·lular. En altres estudis s'han descrit resultats similars en altres tipus de cèl·lules cardíques, com són els cardiomiòcits neonatals de rata i els miotubs H9c2 [Planavila i col., 2005b; Planavila i col., 2005a]. En adipòcits PPAR $\beta/\delta$  inhibeix l'augment de citocines evitant l'activació de NF- $\kappa$ B en un procés en que hi participa ERK1/2 [Rodríguez-Calvo i col., 2008]. En el nostre treball no vam observar, ni *in vivo* ni *in vitro*, una activació d'ERK1/2 després de tractar amb GW501516, tot descartant la participació d'aquesta cinasa en els efectes mitjançats per GW501516. En futurs estudis seria interessant determinar si després de l'activació de PPAR $\beta/\delta$  es produeixen altres mecanismes addicionals, a part dels descrits en el nostre treball, que puguin inhibir el perfil proinflamatori induït en el cor per palmitat i per HFD, com podria ser el cas de la inhibició d'altres factors de transcripció com AP-1 (de l'anglès *Activating Protein-1*) o NFAT (de l'anglès *Nuclear Factor of Activated T lymphocyte*).

Tenint en compte que les respostes inflamàtores produïdes en el cor per un augment mantingut de citocines, com IL-6, TNF- $\alpha$  i MCP-1, s'han associat amb diferents processos patològics entre els que es troben la hipertròfia i la insuficiència cardíques, i que, com hem descrit prèviament, nombroses evidències mostren un vincle entre les cardiomiopaties i un trastorn en el metabolisme energètic a nivell cardíac, vam voler profunditzar en els mecanismes que ens podrien permetre explicar la relació existent entre un perfil proinflamatori i les alteracions metabòliques observades en cor en els nostres models. Per tal d'afrontar aquest plantejament vam continuar usant com a model les cèl·lules AC16, esmentades anteriorment, caracteritzades per presentar la majoria de les propietats bioquímiques i morfològiques pròpies de les cèl·lules musculars cardíques [Davidson i col., 2005], a les que vam tractar amb TNF- $\alpha$  per tal de reproduir un estat inflamatori. Així, al tractar cèl·lules AC16 amb la citocina TNF- $\alpha$  vam observar un augment del perfil proinflamatori, acompanyat d'una marcada inhibició de l'expressió de *PGC-1 $\alpha$* , al que nombrosos estudis han descrit com a un regulador crucial del metabolisme cardíac durant el desenvolupament i en resposta a l'estrès. L'expressió de *PGC-1 $\alpha$* , així com

l'activitat de PPAR i  $ERR\alpha$ , factors de transcripció coactivats pel propi PGC-1 $\alpha$ , disminueixen en models animals d'insuficiència cardíaca [Lin i col., 2005; Ventura-Clapier i col., 2008] i en la hipertròfia cardíaca patològica [Finck i Kelly, 2007], suggerint que aquesta reducció participa en el desequilibri energètic que podria conduir cap a una disfunció cardíaca. Aquesta hipòtesi es veu recolzada pel fet de que els ratolins *knockout* per PGC-1 $\alpha$  desenvolupen una ràpida progressió cap a la insuficiència cardíaca [Lin i col., 2005]. En treballs de Li i col de 2001 s'ha suggerit que mutacions en l'ADN cardíac mitocondrial podrien contribuir al desenvolupament d'una cardiomiopatia dilatada, de manera que vam realitzar una anàlisi de l'expressió dels gens, la transcripció dels quals està coactivada per PGC-1 $\alpha$ , i que es troben involucrats en la biogènesi mitocondrial, la cadena de transport d'electrons o la captació de glucosa. Entre els gens implicats en aquest processos hi trobem *mtTFA* (de l'anglès *mitochondrial Transcription Factor A*), *Cyt C* (de l'anglès *Cytochrome C oxidase*), o *GLUT4*, dels que vam observar que l'addició de TNF- $\alpha$  no en modificava la seva expressió en cèl·lules AC16. D'acord amb això, en altres estudis en que es van emprar ratolins deficients en PGC-1 $\alpha$  o PGC-1 $\beta$  es va demostrar que PGC-1 $\alpha$  no és essencial per al correcte funcionament de la biogènesi mitocondrial en cor [Finck i Kelly, 2006; Finck i Kelly, 2007]. La manca d'efectes sobre els gens involucrats en la biogènesi mitocondrial i en la capacitat oxidativa davant l'expressió disminuïda de PGC-1 $\alpha$ , observada en els nostres resultats, es podria explicar per una compensació per part de PGC-1 $\beta$ , malgrat que en cèl·lules AC16 no es va observar un augment de la seva expressió, o bé pel fet de que aquests canvis orquestrats per PGC-1 $\alpha$  no es produeixen en el rang de temps en que realitzem els anàlisis d'expressió, que en el nostre cas es va limitar a les 48 hores posteriors a l'addició de TNF- $\alpha$ .

En diferents estudis s'ha determinat que p38 MAPK és necessària per l'activació de NF- $\kappa$ B induïda per citocines [Chandrasekar i col., 2006], i que tant la p38 MAPK com NF- $\kappa$ B poden afectar en els nivells d'expressió de PGC-1 $\alpha$  [Crunkhorn i col., 2007]. Quan nosaltres vam determinar l'activitat d'unió de NF- $\kappa$ B a l'ADN vam observar que l'addició de l'inhibidor de p38 MAPK PD169316 a cèl·lules AC16 tractades amb TNF- $\alpha$  incrementava l'activitat transcripcional dels complexos II i III de NF- $\kappa$ B, efecte que

també s'ha observat en cèl·lules humanes HUVEC i HEK293 [Weber i col., 2003], mentre que n'abolia per complet la del complex I. Aquests resultats ens suggereixen que el complex I, que conté la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B, està involucrat en la disminució de l'expressió de *PGC-1 $\alpha$* . En diversos estudis s'ha determinat que p38 MAPK presenta un paper positiu en la regulació de l'activitat de *PGC-1 $\alpha$* , tant en a nivell transcripcional [Lin i col., 2005] com post-transcripcional [Puigserver i col., 2001]. Contràriament a aquests treballs, els nostres resultats semblen suggerir que l'activació de p38 MAPK participa en la reducció de la expressió de *PGC-1 $\alpha$* , fet que es veu recolzat per els resultats observats en mioblasts de ratolí C2C12 incubats amb palmitat en què es produeix una reducció de l'expressió de *PGC-1 $\alpha$*  depenent de la via de p38 MAPK [Crunkhorn i col., 2007], i per la presència de múltiples llocs de fosforilació per p38 MAPK en el domini supressor present en *PGC-1 $\alpha$*  [Puigserver i Spiegelman, 2003]. En concordança amb aquests fets, els resultats obtinguts en ratolins que sobreexpressen MKK6 (de l'anglès *MAPK-Kinase-6*), cinasa de p38 MAPK, suggereixen que la p38 MAPK està implicada en la inhibició de la biogènesi mitocondrial [Ventura-Clapier i col., 2008]. De fet, en altres treballs s'ha determinat que SCFCdc4, una ubiquitina lligasa de la família E3, podria reduir els nivells de proteïna de *PGC-1 $\alpha$*  mitjançant proteòlisis, en un procés que requereix de la fosforilació per part de p38 MAPK de dos motius Cdc4, implicats en la degradació proteica, i localitzats en la seqüència de *PGC-1 $\alpha$*  [Olson i col., 2008]. Així, l'activació de SCFCdc4 produiria una ubiquitinització de *PGC-1 $\alpha$*  tot reduint-ne la seva activitat transcripcional. Aquests resultats, conjuntament amb que *PGC-1 $\alpha$*  conté un domini de repressió amb diferents llocs de fosforilació de p38 MAPK [Puigserver i Spiegelman, 2003] i que *PGC-1 $\alpha$*  és capaç d'induir la seva pròpia expressió [Hondares i col., 2007], semblen suggerir una possible inhibició de *PGC-1 $\alpha$*  per part de p38 MAPK.

Tal i com hem descrit, la inhibició de *PGC-1 $\alpha$*  mitjançada per NF- $\kappa$ B podria explicar el canvi cap a la utilització de la glucosa en detriment dels àcids grassos en el desenvolupament de la insuficiència i la hipertròfia cardíaca induïdes per TNF- $\alpha$ , però no es coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars involucrats en aquest procés. Per aquesta raó, vam voler determinar de forma més detallada els mecanismes



implicats en el vincle existent entre la inflamació crònica de baixa intensitat i les alteracions en el metabolisme energètic a nivell de cor. S'ha descrit que la hiperglicèmia augmenta l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B en monòcits [Miao i col., 2004], de manera que és raonable pensar que nivells augmentats de glucosa poden inhibir l'expressió de *PGC-1 $\alpha$*  tot incrementant la taxa d'oxidació de la glucosa a través d'una disminució en l'expressió de *PDK4*. En aquest sentit, s'ha descrit que l'addició de glucosa en illots pancreàtics *in vitro* redueix l'expressió de *PGC-1 $\alpha$*  [Zhang i col., 2005] i que en ratolins *knockout* per *PGC-1 $\alpha$*  s'observa una major dependència de la glucosa acompanyada d'una menor potència cardíaca [Lehman i col., 2008]. No obstant això, la taxa d'oxidació de la glucosa després de la transfecció amb si*PGC-1 $\alpha$*  no va assolir els nivells que havíem observat al tractar amb TNF- $\alpha$ . De manera semblant, malgrat que els nivells augmentats de *PGC-1 $\alpha$*  bloquejaven parcialment les taxes d'oxidació de la glucosa induïdes per TNF- $\alpha$ , no es va observar una reducció significativa de la taxa d'oxidació de la glucosa al sobreexpressar *PGC-1 $\alpha$* . Aquests resultats semblen indicar que nivells augmentats de *PGC-1 $\alpha$*  participen en la reducció dels efectes deleteris de l'activació p65 sobre la taxa d'oxidació de la glucosa. Així, les nostres dades ens suggereixen que la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B reprimeix l'activitat de *PGC-1 $\alpha$*  a través de la interacció física entre aquestes dues proteïnes tot conduint cap a una alteració de la taxa d'oxidació de la glucosa en cèl·lules cardíques. Aquesta unió de p65 a *PGC-1 $\alpha$*  també es va observar en el model de ratolins TNF1.6, en els que també s'ha descrit un augment de la utilització de la glucosa [Li i col., 2001], tot suggerint que aquesta interacció entre p65 i *PGC-1 $\alpha$*  també es dona *in vivo* i que no és específica d'espècie. Els nostres resultats han demostrat que aquesta interacció descrita anteriorment entre *PGC-1 $\alpha$*  i NF- $\kappa$ B no només augmentava després de la estimulació de NF- $\kappa$ B, sinó que també es donava de forma constitutiva en estat basal en les cèl·lules AC16. La interacció entre aquestes proteïnes depenia de la dosi de TNF- $\alpha$ , de manera que en tractaments amb una baixa concentració de TNF- $\alpha$  (1ng/ml) no es veia augmentada així com tampoc no es veia reduïda l'expressió de *PGC-1 $\alpha$* . Recolzant aquests resultats, en ratolins TNF1.6, que sobreexpressen TNF- $\alpha$  a nivell cardíac, també es va observar una major associació entre *PGC-1 $\alpha$*  i la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B. A l'incubar cèl·lules AC16 amb partenolide revertia l'augment de la interacció entre *PGC-1 $\alpha$*  i NF- $\kappa$ B

observat al tractar amb TNF- $\alpha$ , mentre que la sobreexpressió de la cinasa d'IKB (IKK), mitjançant la transfecció d'un plasmidi que en contenia el gen, l'augmentava. S'ha descrit que, en condicions basals, la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B es troba en el nucli on pot silenciar la transcripció de gens, de forma constitutiva, per competició directa amb altres factors de transcripció [Shaw i col., 2008]. En cèl·lules cardíques, el segrest de PGC-1 $\alpha$  per part de p65 en presència d'estímuls proinflamatoris, pot reduir-ne l'activitat, fet força rellevant tenint en compte que PGC-1 $\alpha$  té la capacitat d'induir la seva pròpia expressió [Jager i col., 2007]. Els nostres resultats es veuen recolzats pels obtinguts en cèl·lules humanes de moll de l'os HS-5, en les que l'augment de l'activitat d'unió a l'ADN de NF- $\kappa$ B, al tractar amb TNF- $\alpha$ , coincideix amb un retardament de la mobilitat electroforètica al afegir un anticòs contra PGC-1 $\alpha$  [Wang i col., 2007]. En aquest mateix estudi es planteja PGC-1 $\alpha$  com a repressor de l'activitat de NF- $\kappa$ B per la seva unió a p65. Malgrat això, en cèl·lules AC16 no vam observar aquesta activitat repressiva de PGC-1 $\alpha$ , ja que ni l'activitat d'unió a l'ADN de NF- $\kappa$ B, ni l'expressió de gens diana d'aquest factor de transcripció, com *MCP-1* i *IL-6*, es van veure afectades després de silenciar o sobreexpressar PGC-1 $\alpha$ .

Segons els resultats obtinguts en aquest estudi, el principal factor limitant en el grau d'interacció entre p65 i PGC-1 $\alpha$  sembla ser la quantitat de p65 present en el nucli, ja que la modulació dels nivells de PGC-1 $\alpha$  tant per sobreexpressió com per silenciament no van alterar el grau d'associació amb p65 en cèl·lules AC16, després d'estimular-les amb TNF- $\alpha$ . En canvi, la disminució dels nivells de p65 mitjançant silenciament gènic va evitar l'augment de la interacció entre aquestes dues proteïnes observat al tractar amb TNF- $\alpha$ . Curiosament, a diferència del partenolide, el silenciament gènic de p65 no va revertir la reducció en l'expressió de *PGC-1 $\alpha$*  produïda per TNF- $\alpha$ , suggerint-nos que en la regulació de *PGC-1 $\alpha$*  hi estan implicats altres factors, com podria ser l'augment de l'activitat d'altres subunitats de NF- $\kappa$ B, com és el cas de p50, que també es podria trobar constitutivament unit a PGC-1 $\alpha$  [Wang i col., 2007] tot compensant el dèficit de p65. S'ha publicat que PGC-1 $\alpha$  s'uneix als receptors nuclears mitjançant els motius LXXLL, una regió rica en leucines, anomenats L2 i L3 que es troben a l'extrem N-terminal del coactivador [Sano i col., 2007]. D'altra banda,

també ha estat descrit que NF- $\kappa$ B s'uneix a motius LXXLL específics localitzats en la seqüència de la família de coactivadors p160 per tal de regular-ne l'expressió [Sheppard i col., 1999], de manera que seria possible que p65 s'unís als motius LXXLL de PGC-1 $\alpha$  per tal de modular-ne l'activitat. Els resultats obtinguts amb el PGC-1 $\alpha$  mutat en el motius L2 (mutat a AXXLL) i L3 (mutat a AAXXL) semblen indicar que aquests motius juguen un paper crucial en la unió a p65, tot suggerint que NF- $\kappa$ B actua com a repressor de l'activitat de PGC-1 $\alpha$ . Recolzant aquests resultats, en determinats estudis s'ha observat que mutacions en aquestes regions riques en leucines poden bloquejar la unió de possibles repressors de PGC-1 $\alpha$  [Knutti i col., 2001]. De fet, sembla ser que PGC-1 $\alpha$  s'associa a altres coreguladors mitjançant tres motius LXXLL localitzats en el domini N-terminal [Soyal i col., 2006]. El PGC-1 $\alpha$  mutant usat en el nostre treball tan sols contenia dos motius LXXLL mutats, L2 i L3, fet que podria explicar la unió residual a p65 observada *in vitro* en les coimmunoprecipitacions. Malgrat tot, aquesta unió residual no va ser suficient com per augmentar la taxa d'oxidació de glucosa després d'estimular amb TNF- $\alpha$ . Altres mecanismes també podrien participar en la davallada de PGC-1 $\alpha$  observada a l'activar NF- $\kappa$ B. De fet, aquesta activació de NF- $\kappa$ B al tractar amb TNF- $\alpha$  podria donar a lloc a l'estimulació indirecta de la cinasa Akt [Meng i col., 2002], i ja que PGC-1 $\alpha$  conté un lloc *consensus* de fosforilació d'Akt, la fosforilació per part d'Akt podria reduir l'estabilitat de PGC-1 $\alpha$ , tot resultant en una disminució de la seva activitat [Li i col., 2007]. Per altra banda s'ha descrit que Akt pot fosforilar factors de transcripció com FOXO (de l'anglès *Forkhead box protein O*) [Asada i col., 2007], induint la seva degradació, mitjançant ubiquitinització, tot resultant en una disminució de l'expressió dels seus gens diana. Donat que TNF- $\alpha$  indueix l'activació de FOXO1 en fibroblasts humans [Alikhani i col., 2005] i que la inhibició de FOXO redueix l'activitat de PGC-1 $\alpha$  [Daitoku i col., 2003] vam analitzar la fosforilació d'aquest factor de transcripció en presència de TNF- $\alpha$ . Com era d'esperar TNF- $\alpha$  va induir la fosforilació de FOXO1 i Akt en les cèl·lules AC16, malgrat que el partenolide no va revertir aquesta fosforilació, tot indicant-nos que cap d'aquestes dues proteïnes no intervé la modulació de PGC-1 $\alpha$  per part de NF- $\kappa$ B.

Entre els gens regulats per PGC-1 $\alpha$  hi trobem *PDK4*, que és una peça clau en la regulació del metabolisme cel·lular ja que participa en la inactivació, mitjançant fosforilació, de la PDC (de l'anglès *Pyruvate Dehydrogenase Complex*), un complex enzimàtic que catalitza el pas limitant en l'oxidació de la glucosa. Recentment s'ha demostrat que la modulació de *PDK4* és suficient per causar un desequilibri metabòlic i agreujar la cardiomiopatia en ratolins transgènics [Zhao i col., 2008]. Aquest fet concorda amb què en els cardiomiòcits AC16 tractats amb TNF- $\alpha$  observéssim que la disminució de *PGC-1\alpha* coincidia amb una reducció de l'expressió de *PDK4*, reducció que en diferents treballs s'ha associat a un augment de l'oxidació de la glucosa [Jeoung i Harris, 2010; Sugden i Holness, 2003]. Per tal de determinar els mecanismes implicats en la reducció de l'expressió de *PDK4*, vam emprar diferents inhibidors com el partenolide, i PD169316, inhibidor selectiu de la p38 MAPK. Així, al tractar cèl·lules AC16 amb TNF- $\alpha$  vam observar una estimulació de la taxa d'oxidació de la glucosa, que es veia revertida al coincubar amb partenolide i PD169316, confirmant-nos la participació de les vies de NF- $\kappa$ B i p38 MAPK en el control del metabolisme de la glucosa. De la mateixa manera ratolins transgènics TNF1.6, caracteritzats per una sobreexpressió de TNF- $\alpha$  específica en cor, mostren un canvi de la fosforilació oxidativa cap a la glucòlisi com a principal font d'energia, suggerint un increment en la utilització de la glucosa [Li i col., 2001]. Malgrat tot, en cèl·lules AC16 tractades amb TNF- $\alpha$  durant 24 hores no es va produir una disminució en la taxa d'oxidació dels àcids grassos, fet que concorda amb què, tal i com hem descrit prèviament, no haguéssim observat una menor expressió dels enzims implicats en la oxidació dels àcids grassos. Aquest fet podria ser degut a que els canvis en la taxa d'oxidació dels àcids grassos apareguin de forma posterior al increment de l'oxidació de la glucosa, o bé que altres isoformes de PDK expressades en cor mantinguin l'oxidació dels àcids grassos en nivells basals [Wende i col., 2005]. D'altra banda, la sobreexpressió de *PDK4* en cor de ratolí es produeix una forta disminució de l'oxidació de la glucosa, i malgrat que no indueix directament el desenvolupament d'una cardiomiopatia si que n'augmenta la severitat en cas de ser induïda per altres factors [Zhao i col., 2008]. En cèl·lules AC16 tractades amb TNF- $\alpha$  i en teixit miocàrdic de ratolins TNF1.6 l'expressió de *PDK4* correlacionava amb els nivells de *PGC-1\alpha*. De la mateixa manera *PDK4* es trobava

fortament augmentat al sobreexpressar PGC-1 $\alpha$  en els cardiomiòcits AC16. La inhibició de NF- $\kappa$ B ja sigui mitjançant partenolide, com amb silenciament gènic, usant siRNA per p65, és suficient per revertir l'expressió de *PK4* en cèl·lules tractades amb TNF- $\alpha$ , fet que concorda amb què la taxa d'oxidació de glucosa no va disminuir en cèl·lules exposades a TNF- $\alpha$  que van ser transfectades amb siRNA per p65. Aquests resultats conjuntament amb la menor associació de p65 i PGC-1 $\alpha$  observada en les coimmunoprecipitacions reforcen la hipòtesi de que NF- $\kappa$ B participa en la regulació de la taxa d'oxidació de la glucosa en estats inflamatoris, fet que concorda amb la major expressió de *PK4* observada en cardiomiòcits neonatals de rata en presència de partenolide respecte a la situació basal [Planavila i col., 2005a]. En aquest estudi, tan sols es considera la modulació de l'expressió de *PK4* com a regulador de la taxa d'oxidació de glucosa, malgrat que l'activitat de PDK també pot ser modificada postranscripcionalment. Entre els efectors negatius de PDK hi trobem el piruvat, ADP, NAD<sup>+</sup> i el coenzim A, els nivells dels quals augmenten quan l'energia de la cèl·lula disminueix [Stanley i col., 2005]. D'altra banda la PDC no només és modulada per PDK, ja que les piruvat deshidrogenases fosfatases (PDP) també participen en la regulació del seu estat de fosforilació, així com altres enzims, com la fosfofructocinasa o la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH de l'anglès *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), que també són factors importants en la regulació de la taxa d'oxidació de la glucosa. Tenint en compte tot això és força possible que, *in vivo*, altres factors diferents als nivells d'expressió de *PK4* participin en la regulació del canvi metabòlic que succeeix en les cèl·lules AC16 després de l'estimulació amb TNF- $\alpha$ .

Entre els principals factors de transcripció que participen en la inducció de PDK4 mitjançada per PGC-1 $\alpha$  hi trobem ERR $\alpha$  i PPAR [Wende i col., 2005], dels que havíem observat una reducció de l'activitat transcripcional després de tractar amb TNF- $\alpha$  en cèl·lules AC16. A l'afegir PD169316 va revertir la inhibició dels dos factors de transcripció per part de TNF- $\alpha$ , fet que no es va donar en el cas del partenolide, malgrat que aquest inhibidor de NF- $\kappa$ B si que evitava la davallada d'expressió de *PK4* al tractar amb TNF- $\alpha$ , tot suggerint la existència d'altres mecanismes que es troben regulant *PK4*. Malgrat que s'ha descrit que el factor de transcripció NF- $\kappa$ B està

implicat en la regulació de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  [Coll i col., 2006], no queda clar quin és el mecanisme mitjançant el qual es produeix aquesta davallada de PGC-1 $\alpha$  després de l'activació de NF- $\kappa$ B. S'ha descrit que l'estimulació de miotubs H9c2 amb lipopolisacàrids causa una reducció en l'expressió de gens involucrats en el metabolisme dels àcids grassos, a través d'un procés mitjançat per la interacció física entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i PPAR $\beta/\delta$  [Planavila i col., 2005a]. Tenint en compte que NF- $\kappa$ B participa en la regulació de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  i que la transcripció gènica d'aquest últim es troba induïda per PPAR, seria possible que la disminució de PGC-1 $\alpha$  per part de TNF- $\alpha$  fos conseqüència d'una reducció de l'activitat de PPAR $\beta/\delta$  mitjançada per NF- $\kappa$ B, fet que es veu recolzat per la forta inhibició de l'activitat d'unió a l'ADN de PPAR $\beta/\delta$  observada en les cèl·lules AC16 després de tractar-les amb TNF- $\alpha$ . Malgrat tot, l'expressió de PPAR $\beta/\delta$  no es va veure reduïda amb el tractament amb TNF- $\alpha$  i l'addició d'agonistes PPAR $\beta/\delta$  tampoc va tenir efectes sobre l'expressió de PGC-1 $\alpha$  i de PDK4. Aquests resultats podrien ser deguts, tal i com succeeix en ratolins *knockout* per PPAR $\alpha$ , a efectes compensatoris per part d'altres isoformes de PPAR [Muoio i col., 2002]. No obstant, en cèl·lules AC16 no vam observar que els nivells d'expressió de PPAR $\alpha$  es veiessin augmentats al tractar amb TNF- $\alpha$  i, a més, PPAR $\beta/\delta$  és la isoforma de PPAR predominant en aquestes cèl·lules. Al tractar els cardiomiòcits AC16 amb PD169316 va revertir la reducció de l'activitat transcripcional de PPAR $\beta/\delta$  observada a l'afegir TNF- $\alpha$ , fet que no es va produir al tractar amb partenolide, tot suggerint que aquesta reducció de l'activitat PPAR $\beta/\delta$  no era conseqüència d'un increment de l'activitat NF- $\kappa$ B, sinó que sembla ser degut a un augment en l'activitat de la p38 MAPK. Aquests resultats semblen indicar que la fosforilació de PPAR $\beta/\delta$  per part de p38 MAPK n'inhibeix l'activitat transcripcional. De fet, s'ha descrit que la inhibició de p38 MAPK per part de PD169316 està relacionada amb un increment de l'activitat PPAR $\gamma$  en adipòcits [Aouadi i col., 2006].

Tal i com s'ha descrit fins ara, en la progressió de la insuficiència cardíaca es dona un augment local de les citocines proinflamatòries, com és el cas de TNF- $\alpha$ . En cèl·lules cardíques exposades a aquesta citocina, la inhibició de l'expressió de PDK4 per part de NF- $\kappa$ B està relacionada amb el canvi cap a un increment de la glucòlisi observat

durant els processos patològics en cor, induïts per estímuls proinflamatoris com la hipertròfia i insuficiència cardíques. Els resultats obtinguts en aquest treball suggereixen que a part d'ERR $\alpha$  i PPAR $\beta/\delta$  es donen altres mecanismes que també participen en la regulació de *PDK4*, per tal de mantenir el metabolisme dels cardiomiòcits dins d'un rang fisiològic adequat. En estudis previs s'ha descrit un vincle entre E2F1 i l'oxidació de la glucosa en múscul a través de la regulació transcripcional de *PDK4* [Hsieh i col., 2008], de manera que vam investigar la possibilitat de que els processos inflamatoris regulats per NF- $\kappa$ B disminuïssin l'expressió de *PDK4* a través de la inhibició del factor de transcripció E2F1, de forma independent a ERR $\alpha$  i PPAR. En els nostres resultats hem observat que la inhibició de la expressió de *PDK4* al tractar amb TNF- $\alpha$  cèl·lules AC16 coincideix amb una alteració en l'activitat d'E2F1 i que aquest factor de transcripció és capaç de regular l'activitat transcripcional de *PDK4*. Les anàlisis de coimmunoprecipitació de cromatina ens indiquen que la reducció en l'expressió de *PDK4* implica una interacció directa entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i E2F1. Aquesta interacció física entre E2F1 i *PDK4* s'ha relacionat amb la participació d'E2F1 en el creixement cel·lular durant la fase S i podria estar encaminada a prioritzar l'ús del piruvat per a la síntesi d'intermediaris necessaris per a la síntesi de lípids i proteïnes necessàries per la divisió cel·lular. Altrament, E2F1 estimula la 6-fosfofructosa-2 cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPase-2), un enzim homodimèric bifuncional, que actua com a un potent estimulador de la glicòlisi [Darville i Rousseau, 1997]. Per tant, és lògic que cèl·lules cancerígenes, caracteritzades per anomalies en el complex E2F/pRB, mostrin alteracions en l'oxidació mitocondrial de la glucosa, coneguda com glucòlisi aeròbica, i en la producció de lactat [Hsieh i col., 2008]. Així, el control transcripcional de *PDK4* mitjançat per E2F1 podria explicar la manca d'una oxidació mitocondrial de la glucosa eficient en cèl·lules cancerígenes, malgrat la necessitat d'ATP en cèl·lules hiperproliferatives.

La sobreexpressió d'E2F1 en cèl·lules AC16, no va revertir completament la disminució de la transcripció de *PDK4* observada a l'afegir TNF- $\alpha$ . D'altra banda, el silenciament d'aquest factor de transcripció, mitjançant siRNA, no sembla tenir cap efecte sobre l'expressió de *PDK4*. Aquests resultats ens suggereixen la coexistència de

diferents mecanismes de regulació de la transcripció de *PDK4* i del metabolisme de la glucosa en cèl·lules cardíques, que evitarien els efectes nocius derivats d'un descontrol en l'activitat d'E2F1. De fet, l'activitat i especificitat d'E2F1 està altament regulada per múltiples factors com la seva expressió gènica, la localització subcel·lular, la seva interacció amb pRB, i modificacions postranscripcionals com són la fosforilació o l'acetilació. Tots aquests mecanismes no actuen de forma aïllada, sinó que es poden donar de forma simultània. En els nostres resultats hem observat que, malgrat que la modulació de l'activitat de NF- $\kappa$ B no canviava ni els nivells de mRNA ni els de proteïna d'E2F1 en cèl·lules AC16 no transfectades, l'addició de TNF- $\alpha$  sí que va incrementar els nivells d'E2F1 en cèl·lules transfectades amb un plasmidi que contenia el constructe pSG5L/E2F1 en relació a cèl·lules no estimulades. No hi ha una explicació senzilla per aquesta acumulació d'E2F1, ja que en cèl·lules control transfectades amb lacZ no es va observar. No obstant, no es pot excloure un augment de l'estabilitat de la proteïna degut a la seva interacció amb p65. Independentment dels motius que deriven cap aquesta situació, els majors nivells de pRB observats, acompanyats d'una disminució dels nivells de pRB fosforilada ens suggerien que l'activitat d'E2F1 es troba altament regulada en aquestes cèl·lules. E2F1 també pot ser regulat per l'acetilació en tres residus de lisina conservats (lisina 117, 120 i 125) resultant en un augment de l'activitat transcripcional així com de la vida mitja de la proteïna [Martinez-Balbas i col., 2000]. Els nostres resultats han demostrat que l'acetilació d'E2F1 es trobava induïda per TNF- $\alpha$  però no per partenolide, suggerint-nos que aquest increment en l'acetilació podria ser una resposta cel·lular per tal de contrarestar la inhibició de l'activitat d'E2F1. Aquest fet també podria ser explicat per l'habilitat d'IKK de potenciar l'acetilació d'E2F1, tal i com s'ha descrit en la línia cel·lular de càncer de mama MCF7 [Tu i col., 2006]. Per tant, el partenolide hauria d'abolir per complet aquesta acetilació. NF- $\kappa$ B, i p65 en particular, pot trobar-se també en el nucli en condicions basals, on poden silenciar la transcripció de gens de forma constitutiva per competició amb altres factors de transcripció [Shaw i col., 2008]. Com ja s'ha comentat anteriorment, el mecanisme involucrat en la disminució de l'expressió de *PDK4* mitjançada per E2F1 al tractar amb TNF- $\alpha$  cèl·lules AC16 correlaciona amb un augment de la interacció física entre p65 i E2F1, associació que també es va observar en el cor de ratolins TNF1.6. Les



anàlisis d'immunoprecipitació de cromatina van mostrar que la translocació al nucli de NF- $\kappa$ B evitava el reclutament de E2F1 al promotor del gen de *PDK4* i, subseqüentment, la transcripció gènica mitjançada per E2F1. Aquests resultats es van veure reforçats per la reducció de la unió d'E2F1 al promotor de *PDK4* en cèl·lules tractades amb TNF- $\alpha$  i pel fet de que l'addició de partenolide va evitar aquesta reducció. El partenolide no només va evitar la unió entre p65 i E2F1 per reducció de la translocació al nucli de p65 sinó que també podria activar E2F1 mitjançant un augment de la fosforilació de pRB, tot alliberant el complex E2F-DP actiu. Aquest darrer mecanisme podria explicar l'increment dels nivells de *PDK4* induïts per partenolide en absència d'estímuls proinflamatoris. La interacció entre p65 i E2F1, de la que vam observar que no depenia dels nivells de pRB, s'ha descrit també en fibroblasts humans on aquesta interacció entre factors de transcripció altera l'expressió de gens regulats per E2F1 [Araki i col., 2008]. També s'ha descrit que E2F1 és capaç d'interferir en la via de senyalització antiapoptòtica de NF- $\kappa$ B mitjançant diferents mecanismes, com la disminució de l'activador de NF- $\kappa$ B TRAF2 (de l'anglès *TNF Receptor-Associated Factor 2*) [Phillips i col., 1999], competint amb p50 per la seva unió a p65 en models murins de fibroblasts [Tanaka i col., 2002] o bé inhibint la fosforilació d'I $\kappa$ B [Chen i col., 2002]. Per contra, altres treballs mantenen que E2F1 és necessari per la completa activació de la transcripció dels gens diana de NF- $\kappa$ B com és el cas de la *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$* , en cèl·lules monocítiques humanes estimulades amb lipopolisacàrid (LPS) [Lim i col., 2007]. En les cèl·lules cardíques humanes AC16, l'expressió i la secreció d'IL-6 es va veure induïda després del silenciament gènic d'E2F1, mentre que la sobreexpressió d'E2F1 va disminuir-les, suggerint-nos que E2F1 en les cèl·lules AC16 actua com a repressor de l'activitat de NF- $\kappa$ B. Encara que en aquest treball només demostrem la interacció física d'E2F1 amb p65, es possible que altres subunitats de NF- $\kappa$ B interactuïn amb aquest factor de transcripció ja que, com s'ha vist en altres estudis, E2F1 és capaç d'associar-se tant a p65 com a p50 quan la cèl·lula és estimulada amb LPS [Lim i col., 2007]. Tampoc es pot excloure el fet de que es puguin donar mecanismes addicionals en els efectes induïts per l'activació de NF- $\kappa$ B en els que hi estiguin implicades altres isoformes d'E2F1. De fet s'ha descrit que en fibroblasts humans les IKK podrien fosforilar directament E2F4, tot produint-ne una acumulació al nucli, seguida d'un

reemplaçament de l'activador E2F1 en el lloc d'unió d'E2F en la regió promotora del seus gens diana [Araki i col., 2008]. Una de les limitacions del nostre estudi és l'origen de la línia cel·lular AC16, ja que al tractar-se d'una línia proliferativa algun dels resultats podria estar distorsionat pel fet de que E2F1 està involucrat en el control de cicle cel·lular. Malgrat tot, vam observar que ni l'expressió de gens diana d'E2F1, com la *ciclina A*, o el mateix *E2F1*, que estan implicats en el cicle cel·lular, no estaven alterats ni en les cèl·lules AC16 ni tampoc en els ratolins transgènics TNF1.6. D'acord amb aquestes dades, en altres treballs s'ha mostrat que la hipertròfia induïda per l'angiotensina II produeix una activació d'E2F1 sense que es doni un increment de l'expressió de la *ciclina E* [Hlaing i col., 2004]. De fet, la sobreexpressió d'E2F1 pot derivar els cardiomiòcits primaris de rata cap a la fase S del cicle cel·lular, malgrat que aquestes cèl·lules no van més enllà de la fase G2 [von Harsdorf i col., 1999]. Per tant, els nostres resultats suggereixen que un alliberament parcial de la inhibició per part de pRB podria donar lloc a una menor repressió d'un conjunt de gens diana d'E2F1 involucrats en la síntesi proteica i en el metabolisme cel·lular, però sense induir l'expressió de gens que promouen la divisió cel·lular.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en el miocardi la glucosa és catabolitzada preferentment per la via de la glucòlisi aeròbica [Lydell i col., 2002], i la glucosa que no és oxidada pot ser convertida a lactat en un procés anomenat glucòlisi anaeròbica. En aquest punt és on PDK4 hi juga un important paper, ja que és la cinasa responsable de la inhibició induïda per fosforilació de la PDC, enzim que catalitza el pas limitant de l'oxidació aeròbica de la glucosa. En certes circumstàncies, com són la hipertròfia i la insuficiència cardíaca, augmenta la dependència de la via glucolítica com a conseqüència d'una disminució de l'activitat de PDK4. Tenint en compte els nostres resultats, hipotetitzem un model en el qual en la regulació de l'expressió de *PDK4* i del metabolisme de les cèl·lules cardíaca hi participarien E2F1 i NF- $\kappa$ B, on NF- $\kappa$ B actuaria com un interruptor molecular en la regulació de la transcripció gènica de *PDK4* de manera dependent d'E2F1. Donat que una inadequada activitat de PDK4 pot arribar a tenir conseqüències nocives en els òrgans amb una elevada taxa metabòlica, la repressió basal per part de NF- $\kappa$ B de l'expressió de *PDK4* controlada per E2F1 podria

arribar a ser crucial per a un correcte funcionament del cor. Així, donat que E2F1 juga un important paper en el creixement dels cardiomiòcits alhora que també està implicat en la regulació del metabolisme, a través de la modulació de PDK4, aquest factor de transcripció seria un bon candidat en la recerca d'una teràpia efectiva per al tractament de la hipertròfia ventricular, i possiblement podria evitar que aquesta última derivés en insuficiència cardíaca. Tenint en compte que tant la hipertròfia com la insuficiència cardíaca han estat relacionades amb processos inflamatoris en el miocardi i que en els nostres resultats hem observat com un augment d'E2F1 en cèl·lules humanes cardíaca redueix la secreció de citocines, es veu reforçada la hipòtesi de que l'estudi d'E2F1, i del seu paper en la regulació de *PDK4*, podria ser un punt de partida per el desenvolupament d'una teràpia encaminada a millorar el tractament de determinades cardiomiopaties.

En conjunt en aquest treball es presenten una sèrie de resultats que ens permeten conèixer de forma més detallada els mecanismes moleculars que relacionen les alteracions metabòliques i els processos inflamatoris en cor. L'aprofundiment en aquests mecanismes és un primer pas en la recerca de potencials dianes farmacològiques, encaminades a prevenir i tractar aquests estats patològics que es donen en el cor. Els resultats obtinguts en el nostre treball ens suggereixen que l'activació induïda per GW501516 de PPAR $\beta/\delta$ , isoforma de PPAR predominant en les cèl·lules cardíaca, és capaç d'atenuar la resposta inflamatòria observada en cardiomiòcits humans AC16 exposats a l'àcid gras saturat palmitat i en cor de ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos. Dietes amb un elevat contingut en greixos s'han relacionat amb una sèrie d'efectes cardíacs directes com la hipertròfia i la disfunció contràctil [Tikellis i col., 2008], en les que la inflamació crònica de baix grau juga un paper important. Altrament s'ha mostrat que GW501516 millora les alteracions metabòliques en cor causades per aquestes dietes riques en greixos, de manera que és lògic pensar que els agonistes PPAR $\beta/\delta$  podrien ser emprats terapèuticament per tal de prevenir la hipertròfia i la insuficiència cardíaca que apareixen associades a aquests trastorns metabòlics. Tal i com hem descrit, el metabolisme cardíac de la glucosa es veu alterat en un procés que està associat a un

increment del nivell de citocines proinflamatòries, de manera que vam prosseguir per tal de proposar nous mecanismes que contribuïssin a explicar aquest canvi en el metabolisme de la glucosa observat durant la hipertròfia cardíaca induïda per citocines proinflamatòries, en el nostre cas TNF- $\alpha$ . La hipòtesi que suggerim, implicaria l'activació de NF- $\kappa$ B per part de TNF- $\alpha$  així com una inhibició de PGC-1 $\alpha$  mitjançada per NF- $\kappa$ B i p38 MAPK. La inhibició de PGC-1 $\alpha$  va acompanyada d'una reducció en l'expressió de *PKD4*, conseqüència d'una disminució de l'activitat ERR $\alpha$  i PPAR, amb la conseqüent estimulació de l'oxidació de glucosa. Els nostres resultats també ens suggereixen que aquesta disminució en l'activitat de PGC-1 $\alpha$  en cor, que conduiria cap a una menor expressió de *PKD4*, es dona, almenys en part, per l'augment de la interacció física d'aquest coactivador amb la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B. Així, una reducció en l'expressió *PGC-1\alpha* en cor podria contribuir a l'aparició de les alteracions metabòliques característiques de la resistència a la insulina i l'obesitat. D'altra banda, també vam observar que la interacció de p65 amb la isoforma de PPAR majoritària en cor, PPAR $\beta/\delta$ , un cop ha estat induïda per agonistes, podria atenuar les vies de senyalització inflamatòries i, per tant, interferir en la remodelació cardíaca [Planavila i col., 2005b]. Per tant, és temptador especular que tant la inducció de *PGC-1\alpha* com l'activació de PPAR $\beta/\delta$  en cor podrien tenir efectes beneficiosos en el metabolisme cardíac, i representen interessants dianes moleculars terapèutiques que relacionen de forma directa citocines amb el metabolisme cardíac. Aquests resultats també suggereixen un possible efecte terapèutic beneficiós resultant de la inhibició de l'activitat p38 MAPK i especialment de la inhibició de NF- $\kappa$ B en cor. Igualment, el bloqueig de la secreció local de TNF- $\alpha$  per part dels cardiomiòcits podria també ser útil després d'un trasplantament de cor, ja que aquesta secreció intracardíaca de TNF- $\alpha$  contribueix a un rebuig per hipertròfia i fibrosis cardíaca accelerada [Stetson i col., 2001]. Per una altra banda, donada la importància de *PKD4* en la modulació del metabolisme energètic de la glucosa en cor, és força probable que en la seva regulació hi participin altres factors addicionals a la modulació observada per part de PGC-1 $\alpha$ , mitjançant ERR $\alpha$  i PPAR $\beta/\delta$ , com és el cas d'E2F1. Aquesta hipòtesi es va veure palesa en els nostres resultats, que ens suggereixen la participació d'aquest factor de transcripció en la regulació de *PKD4*.

## **CONCLUSIONS**



Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral ens permeten establir les següents conclusions:

- I. En el cor de ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos (HFD) i en cèl·lules cardíaques humanes AC16 tractades amb palmitat s'observa un estat proinflamatori caracteritzat per un augment de l'expressió de citocines proinflamatòries, com és el cas de TNF- $\alpha$ , així com per un increment de l'activitat del factor de transcripció NF- $\kappa$ B.
  
- II. L'activació de PPAR $\beta/\delta$  per part de GW501516 resulta en la transrepressió de l'activitat de NF- $\kappa$ B com a conseqüència d'un augment de la interacció física entre aquests dos factors de transcripció. Aquesta interacció reverteix l'estat proinflamatori induït en el cor de ratolins per una dieta rica en greixos i pel palmitat en cèl·lules cardíaques humanes. En ratolins *knockout* per PPAR $\beta/\delta$  s'observa un estat proinflamatori incrementat en cor, tot recolzant la participació de PPAR $\beta/\delta$  en el mecanisme antiinflamatori. En els efectes antiinflamatoris de GW501516 també hi participa AMPK.
  
- III. L'addició de TNF- $\alpha$  a cèl·lules cardíaques humanes o la seva sobreexpressió constitutiva i específica en el cor de ratolins TNF1.6 indueix una reducció de l'expressió del coactivador transcripcional PGC-1 $\alpha$  mitjançant un procés que depèn de NF- $\kappa$ B.
  
- IV. La reducció de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  s'associa amb una disminució de l'expressió de PDK4. Aquesta inhibició resulta en un augment de la taxa d'oxidació de la glucosa en cardiomiòcits humans AC16, alteració que en humans s'ha relacionat amb el desenvolupament de la hipertròfia i insuficiència cardíaques.

- V.** La reducció de l'expressió de *PDK4* en cardiomiòcits humans AC16 depèn, almenys, de dos mecanismes diferents:
- 1.** La inhibició de PGC-1 $\alpha$ , coactivador de dos dels factors de transcripció que regulen l'expressió de *PDK4*, PPAR $\beta/\delta$  i ERR $\alpha$ . Aquesta inhibició de PGC-1 $\alpha$  depèn de la interacció física de la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B amb PGC-1 $\alpha$  a través dels motius LXXLL presents en aquest coactivador transcripcional.
  - 2.** La inhibició de l'activitat transcripcional d'E2F1 per part de NF- $\kappa$ B. Aquesta inhibició es produeix per la interacció física entre la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B i E2F1, fet que resulta en una disminució de la unió d'E2F1 al promotor de *PDK4*, i per tant, de l'expressió d'aquest enzim.



# **BIBLIOGRAFIA**



**A**

Abbot,E.L., McCormack,J.G., Reynet,C., Hassall,D.G., Buchan,K.W., i Yeaman,S.J. (2005). *Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells*. FEBS J. 272, 3004-3014.

Acheson,K.J. (2010). *Carbohydrate for weight and metabolic control: where do we stand?* Nutrition 26, 141-145.

Ajuwon,K.M. i Spurlock,M.E. (2005). *Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes*. J. Nutr. 135, 1841-1846.

Akhter,S.A., Luttrell,L.M., Rockman,H.A., Iaccarino,G., Lefkowitz,R.J., i Koch,W.J. (1998). *Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy*. Science 280, 574-577.

Alikhani,M., Alikhani,Z., i Graves,D.T. (2005). *FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis*. J. Biol. Chem. 280, 12096-12102.

Ancey,C., Menet,E., Corbi,P., Fredj,S., Garcia,M., Rucker-Martin,C., Bescond,J., Morel,F., Wijdenes,J., Lecron,J.C., i Potreau,D. (2003). *Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation*. Cardiovasc. Res. 59, 78-85.

Aouadi,M., Laurent,K., Prot,M., Le Marchand-Brustel,Y., Binetruy,B., i Bost,F. (2006). *Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages*. Diabetes 55, 281-289.

Araki,K., Kawauchi,K., i Tanaka,N. (2008). *IKK/NF-kappaB signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors*. Oncogene 27, 5696-5705.

Arcaro,G., Zamboni,M., Rossi,L., Turcato,E., Covi,G., Armellini,F., Bosello,O., i Lechi,A. (1999). *Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity*. Int. J. Obes. Relat Metab Disord. 23, 936-942.

Arenzana-Seisdedos,F., Thompson,J., Rodriguez,M.S., Bachelerie,F., Thomas,D., i Hay,R.T. (1995). *Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B*. Mol. Cell Biol. 15, 2689-2696.

Asada,S., Daitoku,H., Matsuzaki,H., Saito,T., Sudo,T., Mukai,H., Iwashita,S., Kako,K., Kishi,T., Kasuya,Y., i Fukamizu,A. (2007). *Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1*. Cell Signal. 19, 519-527.

## B

Baena-Diez,J.M., Byram,A.O., Grau,M., Gomez-Fernandez,C., Vidal-Solsona,M., Ledesma-Ulloa,G., Gonzalez-Casafont,I., Vasquez-Lazo,J., Subirana,I., i Schroder,H. (2010). *Obesity is an independent risk factor for heart failure: zona franca cohort study*. Clin. Cardiol. 33, 760-764.

Beadle,R.M. i Frenneaux,M. (2010). *Modification of myocardial substrate utilisation: a new therapeutic paradigm in cardiovascular disease*. Heart 96, 824-830.

Benton,C.R., Koonen,D.P., Calles-Escandon,J., Tandon,N.N., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Heikkila,J.J., i Bonen,A. (2006). *Differential effects of contraction and PPAR agonists on the expression of fatty acid transporters in rat skeletal muscle*. J. Physiol 573, 199-210.

Berger,J. i Moller,D.E. (2002). *The mechanisms of action of PPARs*. Annu. Rev. Med. 53, 409-435.

Black,R.A., Rauch,C.T., Kozlosky,C.J., Peschon,J.J., Slack,J.L., Wolfson,M.F., Castner,B.J., Stocking,K.L., Reddy,P., Srinivasan,S., Nelson,N., Boiani,N., Schooley,K.A., Gerhart,M., Davis,R., Fitzner,J.N., Johnson,R.S., Paxton,R.J., March,C.J., i Cerretti,D.P. (1997). *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature 385, 729-733.

- Blanquart,C., Barbier,O., Fruchart,J.C., Staels,B., i Glineur,C. (2003). *Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 85, 267-273.
- Boengler,K., Hilfiker-Kleiner,D., Drexler,H., Heusch,G., i Schulz,R. (2008). *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure*. Pharmacol. Ther. 120, 172-185.
- Bonnefont,J.P., Demaugre,F., Prip-Buus,C., Saudubray,J.M., Brivet,M., Abadi,N., i Thuillier,L. (1999). *Carnitine palmitoyltransferase deficiencies*. Mol. Genet. Metab 68, 424-440.
- Bowker-Kinley,M. i Popov,K.M. (1999). *Evidence that pyruvate dehydrogenase kinase belongs to the ATPase/kinase superfamily*. Biochem. J. 344 Pt 1, 47-53.
- Bowker-Kinley,M.M., Davis,W.I., Wu,P., Harris,R.A., i Popov,K.M. (1998). *Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex*. Biochem. J. 329 ( Pt 1), 191-196.
- Bradley,J.R. (2008). *TNF-mediated inflammatory disease*. J. Pathol. 214, 149-160.
- Braissant,O., Foufelle,F., Scotto,C., Dauca,M., i Wahli,W. (1996). *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat*. Endocrinology 137, 354-366.
- Brasier,A.R. (2010). *The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation*. Cardiovasc. Res. 86, 211-218.
- Braunwald E, Colucci WS, and Grossman W (1999). Aspectos clínicos de la insuficiencia cardiaca: insuficiencia cardiaca de alto gasto; edema pulmonar. In En Braunwald, ed.: Tratado de Cardiología. Interamericana-McGraw-Hill, pp. 479-506.
- Brinkmann,J.F., Abumrad,N.A., Ibrahim,A., van,d., V, i Glatz,J.F. (2002). *New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36*. Biochem. J. 367, 561-570.

Brown,D.W., Giles,W.H., i Croft,J.B. (2000). *Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension*. Am. Heart J. 140, 848-856.

## C

Cani,P.D., Amar,J., Iglesias,M.A., Poggi,M., Knauf,C., Bastelica,D., Neyrinck,A.M., Fava,F., Tuohy,K.M., Chabo,C., Waget,A., Delmee,E., Cousin,B., Sulpice,T., Chamontin,B., Ferrieres,J., Tanti,J.F., Gibson,G.R., Casteilla,L., Delzenne,N.M., Alessi,M.C., i Burcelin,R. (2007). *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes 56, 1761-1772.

Casale,P.N., Devereux,R.B., Milner,M., Zullo,G., Harshfield,G.A., Pickering,T.G., i Laragh,J.H. (1986). *Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men*. Ann. Intern. Med. 105, 173-178.

Cha,B.S., Ciaraldi,T.P., Carter,L., Nikoulina,S.E., Mudaliar,S., Mukherjee,R., Paterniti,J.R., Jr., i 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.

Chandrasekar,B., Valente,A.J., Freeman,G.L., Mahimainathan,L., i Mummidi,S. (2006). *Interleukin-18 induces human cardiac endothelial cell death via a novel signaling pathway involving NF-kappaB-dependent PTEN activation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 339, 956-963.

Chen,H.Z., Tsai,S.Y., i Leone,G. (2009). *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control*. Nat. Rev Cancer 9, 785-797.

Chen,M., Capps,C., Willerson,J.T., i Zoldhelyi,P. (2002). *E2F-1 regulates nuclear factor-kappaB activity and cell adhesion: potential antiinflammatory activity of the transcription factor E2F-1*. Circulation 106, 2707-2713.

Chien,K.R. (1999). *Stress pathways and heart failure*. Cell 98, 555-558.

Clark,J., Vagenas,P., Panesar,M., i Cope,A.P. (2005). *What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term?* Ann. Rheum. Dis. 64 Suppl 4, iv70-iv76.

Cleland,J.G., Khand,A., i Clark,A. (2001). *The heart failure epidemic: exactly how big is it?* Eur. Heart J. 22, 623-626.

Coll,T., Barroso,E., Alvarez-Guardia,D., Serrano,L., Salvado,L., Merlos,M., Palomer,X., i Vazquez-Carrera,M. (2010). *The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease.* PPAR. Res. 2010.

Coll,T., Jove,M., Rodriguez-Calvo,R., Eyre,E., Palomer,X., Sanchez,R.M., Merlos,M., Laguna,J.C., i Vazquez-Carrera,M. (2006). *Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation.* Diabetes 55, 2779-2787.

Coort,S.L., Bonen,A., van,d., V, Glatz,J.F., i Luiken,J.J. (2007). *Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters.* Mol. Cell Biochem. 299, 5-18.

Cortina,A., Reguero,J., Segovia,E., Rodriguez Lambert,J.L., Cortina,R., Arias,J.C., Vara,J., i Torre,F. (2001). *Prevalence of heart failure in Asturias (a region in the north of Spain).* Am. J. Cardiol. 87, 1417-1419.

Crunkhorn,S., Dearie,F., Mantzoros,C., Gami,H., da Silva,W.S., Espinoza,D., Faucette,R., Barry,K., Bianco,A.C., i Patti,M.E. (2007). *Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation.* J. Biol. Chem. 282, 15439-15450.

Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., i 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

Daitoku,H., Yamagata,K., Matsuzaki,H., Hatta,M., i Fukamizu,A. (2003). *Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR*. Diabetes 52, 642-649.

Darville,M.I. i Rousseau,G.G. (1997). *E2F-dependent mitogenic stimulation of the splicing of transcripts from an S phase-regulated gene*. Nucleic Acids Res. 25, 2759-2765.

Davidson,M.M., Nesti,C., Palenzuela,L., Walker,W.F., Hernandez,E., Protas,L., Hirano,M., i Isaac,N.D. (2005). *Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes*. J. Mol. Cell Cardiol. 39, 133-147.

Daynes,R.A. i Jones,D.C. (2002). *Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity*. Nat. Rev. Immunol. 2, 748-759.

Depre,C., Rider,M.H., i Hue,L. (1998). *Mechanisms of control of heart glycolysis*. Eur. J. Biochem. 258, 277-290.

Depre,C., Vanoverschelde,J.L., i Taegtmeyer,H. (1999). *Glucose for the heart*. Circulation 99, 578-588.

Desvergne,B. i Wahli,W. (1999). *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocr. Rev. 20, 649-688.

Doege,H. i Stahl,A. (2006). *Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models*. Physiology. (Bethesda. ) 21, 259-268.

Doenst,T., Bugger,H., Schwarzer,M., Faerber,G., Borger,M.A., i Mohr,F.W. (2008). *Three good reasons for heart surgeons to understand cardiac metabolism*. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 33, 862-871.

Dorn,G.W. i Force,T. (2005). *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. J. Clin. Invest 115, 527-537.



Dowell,P., Ishmael,J.E., Avram,D., Peterson,V.J., Nevriy,D.J., i Leid,M. (1999). *Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein*. J. Biol. Chem. 274, 15901-15907.

Dufour,C.R., Wilson,B.J., Huss,J.M., Kelly,D.P., Alaynick,W.A., Downes,M., Evans,R.M., Blanchette,M., i Giguere,V. (2007). *Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma*. Cell Metab 5, 345-356.

Duncan,J.G. i Finck,B.N. (2008). *The PPARalpha-PGC-1alpha Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium*. PPAR. Res. 2008, 253817.

## E

East,M.A., Jollis,J.G., Nelson,C.L., Marks,D., i Peterson,E.D. (2003). *The influence of left ventricular hypertrophy on survival in patients with coronary artery disease: do race and gender matter?* J. Am. Coll. Cardiol. 41, 949-954.

Ennis,I.L. and Escudero,E.M. (2008). Hipertrofia cardíaca. In Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología.

Esposito,G., Rapacciuolo,A., Naga Prasad,S.V., Takaoka,H., Thomas,S.A., Koch,W.J., i Rockman,H.A. (2002). *Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress*. Circulation 105, 85-92.

## F

Fan,M., Rhee,J., St-Pierre,J., Handschin,C., Puigserver,P., Lin,J., Jaeger,S., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., i Spiegelman,B.M. (2004). *Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK*. Genes Dev. 18, 278-289.

Ferreira,R., Naguibneva,I., Pritchard,L.L., it-Si-Ali,S., i Harel-Bellan,A. (2001). *The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion*. Oncogene 20, 3128-3133.

Finck,B.N. (2007). *The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease*. Cardiovasc. Res. 73, 269-277.

Finck,B.N. i Kelly,D.P. (2007). *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease*. Circulation 115, 2540-2548.

Finck,B.N. i Kelly,D.P. (2006). *PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease*. J. Clin. Invest 116, 615-622.

French,M.A., Sundram,K., i Clandinin,M.T. (2002). *Cholesterolaemic effect of palmitic acid in relation to other dietary fatty acids*. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 11 Suppl 7, S401-S407.

Frey,N. i Olson,E.N. (2003). *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu. Rev Physiol 65, 45-79.

## G

Gallet,M. i Vanacker,J.M. (2010). *ERR receptors as potential targets in osteoporosis*. Trends Endocrinol. Metab.

Ghali,J.K., Liao,Y., i Cooper,R.S. (1998). *Influence of left ventricular geometric patterns on prognosis in patients with or without coronary artery disease*. J. Am. Coll. Cardiol. 31, 1635-1640.

Giguere,V. (2008). *Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors*. Endocr. Rev. 29, 677-696.

Gimeno,R.E. (2007). *Fatty acid transport proteins*. Curr. Opin. Lipidol. 18, 271-276.

Gloire,G., Legrand-Poels,S., i Piette,J. (2006). *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem. Pharmacol. 72, 1493-1505.

Gould,G.W. i Holman,G.D. (1993). *The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression*. Biochem. J. 295 ( Pt 2), 329-341.

Grell,M., Douni,E., Wajant,H., Lohden,M., Clauss,M., Maxeiner,B., Georgopoulos,S., Lesslauer,W., Kollias,G., Pfizenmaier,K., i Scheurich,P. (1995). *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell 83, 793-802.

Grundy,S.M. (2007). *Cardiovascular and metabolic risk factors: how can we improve outcomes in the high-risk patient?* Am. J. Med. 120, S3-S8.

Gudi,R., Bowker-Kinley,M.M., Kedishvili,N.Y., Zhao,Y., i Popov,K.M. (1995). *Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans*. J. Biol. Chem. 270, 28989-28994.

Gupta,S., Das,B., i Sen,S. (2007). *Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxid. Redox. Signal. 9, 623-652.

Gupta,S., Young,D., Maitra,R.K., Gupta,A., Popovic,Z.B., Yong,S.L., Mahajan,A., Wang,Q., i Sen,S. (2008). *Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB*. J. Mol. Biol. 375, 637-649.

## H

Hall,A.M., Smith,A.J., i Bernlohr,D.A. (2003). *Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1*. J. Biol. Chem. 278, 43008-43013.

Hardt,S.E. i Sadoshima,J. (2004). *Negative regulators of cardiac hypertrophy*. Cardiovasc. Res. 63, 500-509.

Harris,R.A., Huang,B., i Wu,P. (2001). *Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression*. Adv. Enzyme Regul. 41, 269-288.

Hayden,M.S. i Ghosh,S. (2004). *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev. 18, 2195-2224.

Heard,D.J., Norby,P.L., Holloway,J., i Vissing,H. (2000). *Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult.* Mol. Endocrinol. 14, 382-392.

Heery,D.M., Kalkhoven,E., Hoare,S., i Parker,M.G. (1997). *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors.* Nature 387, 733-736.

Hehner,S.P., Heinrich,M., Bork,P.M., Vogt,M., Ratter,F., Lehmann,V., Schulze-Osthoff,K., Droge,W., i Schmitz,M.L. (1998). *Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta.* J. Biol. Chem. 273, 1288-1297.

Heiden K., Cuhlmann,S., Luong,I.A., Zakkar,M., i Evans,P.C. (2010). *Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease.* Clin. Sci. (Lond) 118, 593-605.

Heineke,J. i Molckentin,J.D. (2006). *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.* Nat. Rev Mol. Cell Biol. 7, 589-600.

Heinrich,P.C., Behrmann,I., Muller-Newen,G., Schaper,F., i Graeve,L. (1998). *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.* Biochem. J. 334 ( Pt 2), 297-314.

Heinzel,T., Lavinsky,R.M., Mullen,T.M., Soderstrom,M., Laherty,C.D., Torchia,J., Yang,W.M., Brard,G., Ngo,S.D., Davie,J.R., Seto,E., Eisenman,R.N., Rose,D.W., Glass,C.K., i Rosenfeld,M.G. (1997). *A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.* Nature 387, 43-48.

Hlaing,M., Spitz,P., Padmanabhan,K., Cabezas,B., Barker,C.S., i Bernstein,H.S. (2004). *E2F-1 regulates the expression of a subset of target genes during skeletal myoblast hypertrophy.* J. Biol. Chem. 279, 43625-43633.

Holness,M.J. i Sugden,M.C. (2003). *Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation.* Biochem. Soc. Trans. 31, 1143-1151.

Hondares,E., Pineda-Torra,I., Iglesias,R., Staels,B., Villarroya,F., i Giralt,M. (2007a). *PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 354, 1021-1027.

Hondares,E., Pineda-Torra,I., Iglesias,R., Staels,B., Villarroya,F., i Giralt,M. (2007b). *PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 354, 1021-1027.

Horard,B. i Vanacker,J.M. (2003). *Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand*. J. Mol. Endocrinol. 31, 349-357.

Hsieh,M.C., Das,D., Sambandam,N., Zhang,M.Q., i Nahle,Z. (2008). *Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex*. J. Biol. Chem. 283, 27410-27417.

Huang,B., Gudi,R., Wu,P., Harris,R.A., Hamilton,J., i Popov,K.M. (1998). *Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation*. J. Biol. Chem. 273, 17680-17688.

Huang,B., Wu,P., Bowker-Kinley,M.M., i Harris,R.A. (2002). *Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin*. Diabetes 51, 276-283.

Hunter,J.J. i Chien,K.R. (1999). *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. N. Engl. J. Med. 341, 1276-1283.

Huss,J.M., Imahashi,K., Dufour,C.R., Weinheimer,C.J., Courtois,M., Kovacs,A., Giguere,V., Murphy,E., i Kelly,D.P. (2007). *The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload*. Cell Metab 6, 25-37.

Huss,J.M. i Kelly,D.P. (2005). *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. J. Clin. Invest 115, 547-555.

Huss,J.M., Torra,I.P., Staels,B., Giguere,V., i Kelly,D.P. (2004). *Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle*. Mol. Cell Biol. 24, 9079-9091.

## J

Jager,S., Handschin,C., St-Pierre,J., i Spiegelman,B.M. (2007). *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 104, 12017-12022.

Jeoung,N.H. i Harris,R.A. (2010). *Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels*. Korean Diabetes J. 34, 274-283.

Jones,W.K., Brown,M., Ren,X., He,S., i McGuinness,M. (2003). *NF-kappaB as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling?* Cardiovasc. Toxicol. 3, 229-254.

Jove,M., Planavila,A., Laguna,J.C., i Vazquez-Carrera,M. (2005). *Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells*. Endocrinology 146, 3087-3095.

## K

Kadotani,A., Tsuchiya,Y., Hatakeyama,H., Katagiri,H., i Kanzaki,M. (2009). *Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C(2)C(12) myotubes*. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab 297, E1291-E1303.

Kajstura,J., Cheng,W., Reiss,K., i Anversa,P. (1994). *The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro*. Exp. Cell Res. 215, 273-283.

Kannel,W.B., Dannenberg,A.L., i Levy,D. (1987). *Population implications of electrocardiographic left ventricular hypertrophy*. Am. J. Cardiol. 60, 85I-93I.

- Kasper,E.K., Hruban,R.H., i Baughman,K.L. (1992). *Cardiomyopathy of obesity: a clinicopathologic evaluation of 43 obese patients with heart failure*. Am. J. Cardiol. 70, 921-924.
- Kato,M., Chuang,J.L., Tso,S.C., Wynn,R.M., i Chuang,D.T. (2005). *Crystal structure of pyruvate dehydrogenase kinase 3 bound to lipoyl domain 2 of human pyruvate dehydrogenase complex*. EMBO J. 24, 1763-1774.
- Kerner,J. i Hoppel,C. (2000). *Fatty acid import into mitochondria*. Biochim. Biophys. Acta 1486, 1-17.
- Kerr,I.M., Costa-Pereira,A.P., Lillemeier,B.F., i Strobl,B. (2003). *Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains*. FEBS Lett. 546, 1-5.
- Kersten,S., Desvergne,B., i Wahli,W. (2000). *Roles of PPARs in health and disease*. Nature 405, 421-424.
- Kino,T., Rice,K.C., i Chrousos,G.P. (2007). *The PPARdelta agonist GW501516 suppresses interleukin-6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition*. Eur. J. Clin. Invest 37, 425-433.
- Knutti,D., Kressler,D., i Kralli,A. (2001). *Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 9713-9718.
- Ko,H.J., Zhang,Z., Jung,D.Y., Jun,J.Y., Ma,Z., Jones,K.E., Chan,S.Y., i Kim,J.K. (2009). *Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart*. Diabetes 58, 2536-2546.
- Kodde,I.F., van der,S.J., Smolenski,R.T., i de Jong,J.W. (2007). *Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference*. Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol 146, 26-39.
- Kolobova,E., Tuganova,A., Boulatnikov,I., i Popov,K.M. (2001). *Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites*. Biochem. J. 358, 69-77.

Korotchkina,L.G. i Patel,M.S. (2001). *Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 276, 37223-37229.

Kramer,D.K., Al-Khalili,L., Guigas,B., Leng,Y., Garcia-Roves,P.M., i Krook,A. (2007). *Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle*. J. Biol. Chem. 282, 19313-19320.

Kumar,S., Seqqat,R., Chigurupati,S., Kumar,R., Baker,K.M., Young,D., Sen,S., i Gupta,S. (2010). *Inhibition of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules*. Free Radic. Biol. Med.

Kwok,B.H., Koh,B., Ndubuisi,M.I., Elofsson,M., i Crews,C.M. (2001). *The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase*. Chem. Biol. 8, 759-766.

Kwon,H.S. i Harris,R.A. (2004). *Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression*. Adv. Enzyme Regul. 44, 109-121.

## L

La Thangue,N.B. (2003). *The yin and yang of E2F-1: balancing life and death*. Nat. Cell Biol. 5, 587-589.

Laganiere,J., Tremblay,G.B., Dufour,C.R., Giroux,S., Rousseau,F., i Giguere,V. (2004). *A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha control of ERRalpha expression*. J. Biol. Chem. 279, 18504-18510.

Lakhani,M. i Fein,S. (2011). *Effects of obesity and subsequent weight reduction on left ventricular function*. Cardiol. Rev 19, 1-4.



Lawrence,J.W., Li,Y., Chen,S., DeLuca,J.G., Berger,J.P., Umbenhauer,D.R., Moller,D.E., i Zhou,G. (2001). *Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression.* J. Biol. Chem. 276, 31521-31527.

Lehman,J.J., Barger,P.M., Kovacs,A., Saffitz,J.E., Medeiros,D.M., i Kelly,D.P. (2000). *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis.* J. Clin. Invest 106, 847-856.

Lehman,J.J., Boudina,S., Banke,N.H., Sambandam,N., Han,X., Young,D.M., Leone,T.C., Gross,R.W., Lewandowski,E.D., Abel,E.D., i Kelly,D.P. (2008). *The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis.* Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol 295, H185-H196.

Levy,D., Garrison,R.J., Savage,D.D., Kannel,W.B., i Castelli,W.P. (1990). *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.* N. Engl. J. Med. 322, 1561-1566.

Levy,D., Salomon,M., D'Agostino,R.B., Belanger,A.J., i Kannel,W.B. (1994). *Prognostic implications of baseline electrocardiographic features and their serial changes in subjects with left ventricular hypertrophy.* Circulation 90, 1786-1793.

Lewin,T.M. i Coleman,R.A. (2003). *Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism.* Biochim. Biophys. Acta 1634, 63-75.

Li,X., Monks,B., Ge,Q., i Birnbaum,M.J. (2007). *Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator.* Nature 447, 1012-1016.

Li,Y.H., Yan,Z.Q., Brauner,A., i Tullus,K. (2002). *Activation of macrophage nuclear factor-kappa B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS.* Respir. Res. 3, 23.

Li,Y.Y., Chen,D., Watkins,S.C., i Feldman,A.M. (2001). *Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity*. *Circulation* 104, 2492-2497.

Lim,C.A., Yao,F., Wong,J.J., George,J., Xu,H., Chiu,K.P., Sung,W.K., Lipovich,L., Vega,V.B., Chen,J., Shahab,A., Zhao,X.D., Hibberd,M., Wei,C.L., Lim,B., Ng,H.H., Ruan,Y., i Chin,K.C. (2007). *Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation*. *Mol. Cell* 27, 622-635.

Lin,J., Handschin,C., i Spiegelman,B.M. (2005). *Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators*. *Cell Metab* 1, 361-370.

Locksley,R.M., Killeen,N., i Lenardo,M.J. (2001). *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. *Cell* 104, 487-501.

Loehr,L.R., Rosamond,W.D., Poole,C., McNeill,A.M., Chang,P.P., Deswal,A., Folsom,A.R., i Heiss,G. (2010). *The Potentially Modifiable Burden of Incident Heart Failure Due to Obesity: The Atherosclerosis Risk in Communities Study*. *Am. J. Epidemiol.*

Lopaschuk,G.D. i Stanley,W.C. (1997). *Glucose metabolism in the ischemic heart*. *Circulation* 95, 313-315.

Lydell,C.P., Chan,A., Wambolt,R.B., Sambandam,N., Parsons,H., Bondy,G.P., Rodrigues,B., Popov,K.M., Harris,R.A., Brownsey,R.W., i Allard,M.F. (2002). *Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts*. *Cardiovasc. Res.* 53, 841-851.

## M

MacEwan,D.J. (2002). *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. *Cell Signal.* 14, 477-492.

Makowski,L. i Hotamisligil,G.S. (2004). *Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses*. *J. Nutr.* 134, 2464S-2468S.

Manson,J.E. i Bassuk,S.S. (2003). *Obesity in the United States: a fresh look at its high toll*. JAMA 289, 229-230.

Marin-Garcia,J., Goldenthal,M.J., i Moe,G.W. (2001). *Mitochondrial pathology in cardiac failure*. Cardiovasc. Res. 49, 17-26.

Martinez-Balbas,M.A., Bauer,U.M., Nielsen,S.J., Brehm,A., i Kouzarides,T. (2000). *Regulation of E2F1 activity by acetylation*. EMBO J. 19, 662-671.

Mathew,J., Sleight,P., Lonn,E., Johnstone,D., Pogue,J., Yi,Q., Bosch,J., Sussex,B., Probstfield,J., i Yusuf,S. (2001). *Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril*. Circulation 104, 1615-1621.

McGarry,J.D. i Brown,N.F. (1997). *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. Eur. J. Biochem. 244, 1-14.

McKenna,N.J., Lanz,R.B., i O'Malley,B.W. (1999). *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr. Rev 20, 321-344.

McMurray,J.J. i Pfeffer,M.A. (2005). *Heart failure*. Lancet 365, 1877-1889.

Meng,F., Liu,L., Chin,P.C., i D'Mello,S.R. (2002). *Akt is a downstream target of NF-kappa B*. J. Biol. Chem. 277, 29674-29680.

Miao,F., Gonzalo,I.G., Lanting,L., i Natarajan,R. (2004). *In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions*. J. Biol. Chem. 279, 18091-18097.

Miguel-Carrasco,J.L., Zambrano,S., Blanca,A.J., Mate,A., i Vazquez,C.M. (2010). *Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB*. J. Inflamm. (Lond) 7, 21.

Misra,A., Singhal,N., i Khurana,L. (2010). *Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils*. J. Am. Coll. Nutr. 29, 289S-301S.

- Miyata,K.S., McCaw,S.E., Meertens,L.M., Patel,H.V., Rachubinski,R.A., i Capone,J.P. (1998). *Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha*. Mol. Cell Endocrinol. 146, 69-76.
- Moller,D.E. i Berger,J.P. (2003). *Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation*. Int. J. Obes. Relat Metab Disord. 27 Suppl 3, S17-S21.
- Moore,M.L., Park,E.A., i McMillin,J.B. (2003). *Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-Ibeta expression by PGC-1*. J. Biol. Chem. 278, 17263-17268.
- Morgan,D.O. (1997). *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. Annu. Rev Cell Dev. Biol. 13, 261-291.
- Moule,S.K. i Denton,R.M. (1997). *Multiple signaling pathways involved in the metabolic effects of insulin*. Am. J. Cardiol. 80, 41A-49A.
- Mueckler,M. (1994). *Facilitative glucose transporters*. Eur. J. Biochem. 219, 713-725.
- 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., i 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.
- Murray,P.J. (2007). *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J. Immunol. 178, 2623-2629.
- Musters,M.W., Bassingthwaighte,J.B., van Riel,N.A., i van,d., V (2006). *Computational evidence for protein-mediated fatty acid transport across the sarcolemma*. Biochem. J. 393, 669-678.

## N

Nagy,L., Kao,H.Y., Chakravarti,D., Lin,R.J., Hassig,C.A., Ayer,D.E., Schreiber,S.L., i Evans,R.M. (1997). *Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase*. Cell 89, 373-380.

Naimi,M., Arous,C., i Van,O.E. (2010). *Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis*. Trends Endocrinol. Metab 21, 75-82.

Nakano,H., Shindo,M., Sakon,S., Nishinaka,S., Mihara,M., Yagita,H., i Okumura,K. (1998). *Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 3537-3542.

Neglia,D., De,C.A., Marraccini,P., Natali,A., Ciardetti,M., Vecoli,C., Gastaldelli,A., Ciociaro,D., Pellegrini,P., Testa,R., Menichetti,L., L'Abbate,A., Stanley,W.C., i Recchia,F.A. (2007). *Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol 293, H3270-H3278.

## O

Oliver,W.R., Jr., Shenk,J.L., Snaith,M.R., Russell,C.S., Plunket,K.D., Bodkin,N.L., Lewis,M.C., Winegar,D.A., Sznaidman,M.L., Lambert,M.H., Xu,H.E., Sternbach,D.D., Kliewer,S.A., Hansen,B.C., i Willson,T.M. (2001). *A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 5306-5311.

Olson,B.L., Hock,M.B., Ekholm-Reed,S., Wohlschlegel,J.A., Dev,K.K., Kralli,A., i Reed,S.I. (2008). *SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1alpha transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis*. Genes Dev. 22, 252-264.

Oral,H., Kapadia,S., Nakano,M., Torre-Amione,G., Lee,J., Lee-Jackson,D., Young,J.B., i Mann,D.L. (1995). *Tumor necrosis factor-alpha and the failing human heart*. Clin. Cardiol. 18, IV20-IV27.

### P

Palmer,C.N., Hsu,M.H., Griffin,K.J., Raucy,J.L., i Johnson,E.F. (1998). *Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver*. Mol. Pharmacol. 53, 14-22.

Patel,M.S. i Korotchkina,L.G. (2001). *Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases*. Exp. Mol. Med. 33, 191-197.

Perkins,N.D. (2007). *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 49-62.

Pessin,J.E. i Bell,G.I. (1992). *Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation*. Annu. Rev. Physiol 54, 911-930.

Phillips,A.C., Ernst,M.K., Bates,S., Rice,N.R., i Vousden,K.H. (1999). *E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways*. Mol. Cell 4, 771-781.

Planavila,A., Laguna,J.C., i Vazquez-Carrera,M. (2005a). *Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy*. J. Biol. Chem. 280, 17464-17471.

Planavila,A., Rodriguez-Calvo,R., Jove,M., Michalik,L., Wahli,W., Laguna,J.C., i Vazquez-Carrera,M. (2005b). *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes*. Cardiovasc. Res. 65, 832-841.

Plomgaard,P., Penkowa,M., i Pedersen,B.K. (2005). *Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles*. Exerc. Immunol. Rev. 11, 53-63.

Polager,S., Ofir,M., i Ginsberg,D. (2008). *E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes*. Oncogene 27, 4860-4864.

Poole,R.C. i Halestrap,A.P. (1993). *Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes*. Am. J. Physiol 264, C761-C782.

Printz,R.L., Koch,S., Potter,L.R., O'Doherty,R.M., Tiesinga,J.J., Moritz,S., i Granner,D.K. (1993). *Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution*. J. Biol. Chem. 268, 5209-5219.

Puigserver,P. (2005). *Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha*. Int. J. Obes. (Lond) 29 Suppl 1, S5-S9.

Puigserver,P., Rhee,J., Lin,J., Wu,Z., Yoon,J.C., Zhang,C.Y., Krauss,S., Mootha,V.K., Lowell,B.B., i Spiegelman,B.M. (2001). *Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1*. Mol. Cell 8, 971-982.

Puigserver,P. i Spiegelman,B.M. (2003). *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator*. Endocr. Rev. 24, 78-90.

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

## R

Ratnayake,W.M. i Galli,C. (2009). *Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper*. Ann. Nutr. Metab 55, 8-43.

Reddy,J.K. i Hashimoto,T. (2001). *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system*. Annu. Rev. Nutr. 21, 193-230.

Reiss,K., Kajstura,J., Capasso,J.M., Marino,T.A., i Anversa,P. (1993). *Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats*. Exp. Cell Res. 207, 348-360.

Richieri,G.V., Anel,A., i Kleinfeld,A.M. (1993). *Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB*. *Biochemistry* 32, 7574-7580.

Roberts,W.C. i Roberts,J.D. (1983). *The floating heart or the heart too fat to sink: analysis of 55 necropsy patients*. *Am. J. Cardiol.* 52, 1286-1289.

Robyr,D., Wolffe,A.P., i Wahli,W. (2000). *Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks*. *Mol. Endocrinol.* 14, 329-347.

Roche,T.E., Hiromasa,Y., Turkan,A., Gong,X., Peng,T., Yan,X., Kasten,S.A., Bao,H., i Dong,J. (2003). *Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1*. *Eur. J. Biochem.* 270, 1050-1056.

Rodgers,J.T., Lerin,C., Gerhart-Hines,Z., i Puigserver,P. (2008). *Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways*. *FEBS Lett.* 582, 46-53.

Rodriguez-Artalejo,F., Banegas,B., Jr., i Guallar-Castillon,P. (2004). *[Epidemiology of heart failure]*. *Rev. Esp. Cardiol.* 57, 163-170.

Rodriguez-Calvo,R., Serrano,L., Coll,T., Moullan,N., Sanchez,R.M., Merlos,M., Palomer,X., Laguna,J.C., Michalik,L., Wahli,W., i Vazquez-Carrera,M. (2008). *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2*. *Diabetes* 57, 2149-2157.

Rosamond,W., Flegal,K., Furie,K., Go,A., Greenlund,K., Haase,N., Hailpern,S.M., Ho,M., Howard,V., Kissela,B., Kittner,S., Lloyd-Jones,D., McDermott,M., Meigs,J., Moy,C., Nichol,G., O'Donnell,C., Roger,V., Sorlie,P., Steinberger,J., Thom,T., Wilson,M., i Hong,Y. (2008). *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. *Circulation* 117, e25-146.



Rowles,J., Scherer,S.W., Xi,T., Majer,M., Nickle,D.C., Rommens,J.M., Popov,K.M., Harris,R.A., Riebow,N.L., Xia,J., Tsui,L.C., Bogardus,C., i Prochazka,M. (1996). *Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human*. J. Biol. Chem. 271, 22376-22382.

Ruderman,N.B. i Saha,A.K. (2006). *Metabolic syndrome: adenosine monophosphate-activated protein kinase and malonyl coenzyme A*. Obesity. (Silver. Spring) 14 Suppl 1, 25S-33S.

Russell,B., Motlagh,D., i Ashley,W.W. (2000). *Form follows function: how muscle shape is regulated by work*. J. Appl. Physiol 88, 1127-1132.

## S

Sadoshima,J. i Izumo,S. (1997). *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu. Rev. Physiol 59, 551-571.

Sano,M., Tokudome,S., Shimizu,N., Yoshikawa,N., Ogawa,C., Shirakawa,K., Endo,J., Katayama,T., Yuasa,S., Ieda,M., Makino,S., Hattori,F., Tanaka,H., i Fukuda,K. (2007). *Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*. J. Biol. Chem. 282, 25970-25980.

Schillaci,G., Verdecchia,P., Porcellati,C., Cuccurullo,O., Cosco,C., i Perticone,F. (2000). *Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension*. Hypertension 35, 580-586.

Schilling,J. i Kelly,D.P. (2010). *The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure*. J. Mol. Cell Cardiol.

Schmidt,M.I. i Duncan,B.B. (2003). *Diabesity: an inflammatory metabolic condition*. Clin. Chem. Lab Med. 41, 1120-1130.

Schneider,C.A., Nguyen,V.T., i Taegtmeyer,H. (1991). *Feeding and fasting determine postischemic glucose utilization in isolated working rat hearts*. Am. J. Physiol 260, H542-H548.

## BIBLIOGRAFIA

---

Schwartz,G.K. i Shah,M.A. (2005). *Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy*. J. Clin. Oncol. 23, 9408-9421.

Sellers,W.R., Novitch,B.G., Miyake,S., Heith,A., Otterson,G.A., Kaye,F.J., Lassar,A.B., i Kaelin,W.G., Jr. (1998). *Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth*. Genes Dev. 12, 95-106.

Shaw,J., Yurkova,N., Zhang,T., Gang,H., Aguilar,F., Weidman,D., Scramstad,C., Weisman,H., i Kirshenbaum,L.A. (2008). *Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105, 20734-20739.

Shepherd,P.R. i Kahn,B.B. (1999). *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N. Engl. J. Med. 341, 248-257.

Sheppard,K.A., Rose,D.W., Haque,Z.K., Kurokawa,R., McInerney,E., Westin,S., Thanos,D., Rosenfeld,M.G., Glass,C.K., i Collins,T. (1999). *Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators*. Mol. Cell Biol. 19, 6367-6378.

Shikany,J.M., Vaughan,L.K., Baskin,M.L., Cope,M.B., Hill,J.O., i Allison,D.B. (2010). *Is dietary fat "fattening"? A comprehensive research synthesis*. Crit Rev Food Sci. Nutr. 50, 699-715.

Smolle,M., Prior,A.E., Brown,A.E., Cooper,A., Byron,O., i Lindsay,J.G. (2006). *A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex*. J. Biol. Chem. 281, 19772-19780.

Soyal,S., Krempler,F., Oberkofler,H., i Patsch,W. (2006). *PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetologia 49, 1477-1488.

Spiegelman,B.M. i Heinrich,R. (2004). *Biological control through regulated transcriptional coactivators*. Cell 119, 157-167.

Stanley,W.C., Recchia,F.A., i Lopaschuk,G.D. (2005). *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. *Physiol Rev* 85, 1093-1129.

Stetson,S.J., Perez-Verdia,A., Mazur,W., Farmer,J.A., Koerner,M.M., Weilbaecher,D.G., Entman,M.L., Quinones,M.A., Noon,G.P., i Torre-Amione,G. (2001). *Cardiac hypertrophy after transplantation is associated with persistent expression of tumor necrosis factor-alpha*. *Circulation* 104, 676-681.

Steussy,C.N., Popov,K.M., Bowker-Kinley,M.M., Sloan,R.B., Jr., Harris,R.A., i Hamilton,J.A. (2001). *Structure of pyruvate dehydrogenase kinase. Novel folding pattern for a serine protein kinase*. *J. Biol. Chem.* 276, 37443-37450.

Stewart,S., Macintyre,K., Hole,D.J., Capewell,S., i McMurray,J.J. (2001). *More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure*. *Eur. J. Heart Fail.* 3, 315-322.

Sturm,R. i Wells,K.B. (2001). *Does obesity contribute as much to morbidity as poverty or smoking?* *Public Health* 115, 229-235.

Sugden,M.C. i Holness,M.J. (2003b). *Trials, tribulations and finally, a transporter: the identification of the mitochondrial pyruvate transporter*. *Biochem. J.* 374, e1-e2.

Sugden,M.C. i Holness,M.J. (2003a). *Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs*. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 284, E855-E862.

Sznajdman,M.L., Haffner,C.D., Maloney,P.R., Fivush,A., Chao,E., Goreham,D., Sierra,M.L., LeGrumelec,C., Xu,H.E., Montana,V.G., Lambert,M.H., Willson,T.M., Oliver,W.R., Jr., i Sternbach,D.D. (2003). *Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 1517-1521.

### T

Taegtmeyer,H. (1994). *Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications*. Curr. Probl. Cardiol. 19, 59-113.

Taegtmeyer,H., King,L.M., i Jones,B.E. (1998). *Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy*. Am. J. Cardiol. 82, 54K-60K.

Taegtmeyer,H., McNulty,P., i Young,M.E. (2002). *Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts*. Circulation 105, 1727-1733.

Tanaka,H., Matsumura,I., Ezo,S., Satoh,Y., Sakamaki,T., Albanese,C., Machii,T., Pestell,R.G., i Kanakura,Y. (2002). *E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination*. Mol. Cell 9, 1017-1029.

Tang,P., Hung,M.-C., i Klostergaard,J. (1996). *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry 35, 8216-8225.

Terstegen,L., Gatsios,P., Bode,J.G., Schaper,F., Heinrich,P.C., i Graeve,L. (2000). *The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130*. J. Biol. Chem. 275, 18810-18817.

Tikellis,C., Thomas,M.C., Harcourt,B.E., Coughlan,M.T., Pete,J., Bialkowski,K., Tan,A., Bierhaus,A., Cooper,M.E., i Forbes,J.M. (2008). *Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs*. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab 295, E323-E330.

Torre-Amione,G., Kapadia,S., Lee,J., Bies,R.D., Lebovitz,R., i Mann,D.L. (1995). *Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium*. Circulation 92, 1487-1493.

Tremblay,A.M. i Giguere,V. (2007). *The NR3B subgroup: an ovERRview*. Nucl. Recept. Signal. 5, e009.

Tu,Z., Prajapati,S., Park,K.J., Kelly,N.J., Yamamoto,Y., i Gaynor,R.B. (2006). *IKK alpha regulates estrogen-induced cell cycle progression by modulating E2F1 expression*. J. Biol. Chem. 281, 6699-6706.

Turner,N.A., Mughal,R.S., Warburton,P., O'Regan,D.J., Ball,S.G., i Porter,K.E. (2007). *Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones*. Cardiovasc. Res. 76, 81-90.

## V

van Bilsen,M., van der Vusse,G.J., i Reneman,R.S. (1998). *Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism*. Pflugers Arch. 437, 2-14.

van der Vusse,G.J., Glatz,J.F., Stam,H.C., i Reneman,R.S. (1992). *Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart*. Physiol Rev. 72, 881-940.

van Empel,V. i De Windt,L.J. (2004). *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc. Res. 63, 487-499.

Van Hall G. (2000). *Lactate as a fuel for mitochondrial respiration*. Acta Physiol Scand. 168, 643-656.

Vara,D., Bicknell,K.A., Coxon,C.H., i Brooks,G. (2003). *Inhibition of E2F abrogates the development of cardiac myocyte hypertrophy*. J. Biol. Chem. 278, 21388-21394.

Ventura-Clapier,R., Garnier,A., i Veksler,V. (2008). *Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha*. Cardiovasc. Res. 79, 208-217.

Verdecchia,P., Schillaci,G., Borgioni,C., Ciucci,A., Gattobigio,R., Zampi,I., Reboldi,G., i Porcellati,C. (1998). *Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension*. Circulation 97, 48-54.

Vermeulen,L., De,W.G., Van,D.P., Vanden,B.W., i Haegeman,G. (2003). *Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)*. EMBO J. 22, 1313-1324.

Viollet,B., Athea,Y., Mounier,R., Guigas,B., Zarrinpashneh,E., Horman,S., Lantier,L., Hebrard,S., vin-Leclerc,J., Beauloye,C., Foretz,M., Andreelli,F., Ventura-Clapier,R., i Bertrand,L. (2009). *AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals*. *Front Biosci.* *14*, 19-44.

von Harsdorf, ., Hauck,L., Mehrhof,F., Wegenka,U., Cardoso,M.C., i Dietz,R. (1999). *E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I*. *Circ. Res.* *85*, 128-136.

## W

Wagner,K.D. i Wagner,N. (2010). *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions*. *Pharmacol. Ther.* *125*, 423-435.

Wajant,H., Pfizenmaier,K., i Scheurich,P. (2003). *Tumor necrosis factor signaling*. *Cell Death. Differ.* *10*, 45-65.

Wang,L.H., Yang,X.Y., Zhang,X., i Farrar,W.L. (2007). *Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPARgamma cross talk with NF-kappaB and C/EBP*. *Blood* *110*, 4373-4384.

Wang,Q., Li,H., Liu,S., Wang,G., i Wang,Y. (2005). *Cloning and tissue expression of chicken heart fatty acid-binding protein and intestine fatty acid-binding protein genes*. *Anim Biotechnol.* *16*, 191-201.

Wang,X., Hole,D.G., Da Costa,T.H., i Evans,R.D. (1998). *Alterations in myocardial lipid metabolism during lactation in the rat*. *Am. J. Physiol* *275*, E265-E271.

Weber,N.C., Blumenthal,S.B., Hartung,T., Vollmar,A.M., i Kiemer,A.K. (2003). *ANP inhibits TNF-alpha-induced endothelial MCP-1 expression--involvement of p38 MAPK and MKP-1*. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 932-941.

Weigert,C., Brodbeck,K., Staiger,H., Kausch,C., Machicao,F., Haring,H.U., i Schleicher,E.D. (2004). *Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB*. J. Biol. Chem. 279, 23942-23952.

Wells,J., Graveel,C.R., Bartley,S.M., Madore,S.J., i Farnham,P.J. (2002). *The identification of E2F1-specific target genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 3890-3895.

Wende,A.R., Huss,J.M., Schaeffer,P.J., Giguere,V., i 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.

Wettschureck,N., Rutten,H., Zywietz,A., Gehring,D., Wilkie,T.M., Chen,J., Chien,K.R., i Offermanns,S. (2001). *Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes*. Nat. Med. 7, 1236-1240.

Willy,P.J., Murray,I.R., Qian,J., Busch,B.B., Stevens,W.C., Jr., Martin,R., Mohan,R., Zhou,S., Ordentlich,P., Wei,P., Sapp,D.W., Horlick,R.A., Heyman,R.A., i Schulman,I.G. (2004). *Regulation of PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) signaling by an estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) ligand*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 8912-8917.

Winther,M.P., Kanters,E., Kraal,G., i Hofker,M.H. (2005). *Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25, 904-914.

Wolf,I.M., Heitzer,M.D., Grubisha,M., i DeFranco,D.B. (2008). *Coactivators and nuclear receptor transactivation*. J. Cell Biochem. 104, 1580-1586.

Wu,P., Peters,J.M., i Harris,R.A. (2001). *Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 391-396.

Wynn,R.M., Kato,M., Chuang,J.L., Tso,S.C., Li,J., i Chuang,D.T. (2008). *Pyruvate dehydrogenase kinase-4 structures reveal a metastable open conformation fostering robust core-free basal activity*. J. Biol. Chem. 283, 25305-25315.

## Y

Yang,D., Gong,X., Yakhnin,A., i Roche,T.E. (1998). *Requirements for the adaptor protein role of dihydrolipoyl acetyltransferase in the up-regulated function of the pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase*. J. Biol. Chem. 273, 14130-14137.

Yessoufou,A. i Wahli,W. (2010). *Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels*. Swiss. Med. Wkly. 140, w13071.

Yndestad,A., Damas,J.K., Oie,E., Ueland,T., Gullestad,L., i Aukrust,P. (2007). *Role of inflammation in the progression of heart failure*. Curr. Cardiol. Rep. 9, 236-241.

Yokoyama,T., Vaca,L., Rossen,R.D., Durante,W., Hazarika,P., i Mann,D.L. (1993). *Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart*. J. Clin. Invest 92, 2303-2312.

Youssef,J. i Badr,M. (2011). *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Cancer Challenges and Opportunities*. Br. J. Pharmacol.

Yudkin,J.S., Stehouwer,C.D., Emeis,J.J., i Coppack,S.W. (1999). *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19, 972-978.*

## Z

Zandi,E., Rothwarf,D.M., Delhase,M., Hayakawa,M., i Karin,M. (1997). *The IkkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. Cell 91, 243-252.



Zhang,P., Liu,C., Zhang,C., Zhang,Y., Shen,P., Zhang,J., i Zhang,C.Y. (2005). *Free fatty acids increase PGC-1alpha expression in isolated rat islets*. FEBS Lett. 579, 1446-1452.

Zhang,Y., Ma,K., Sadana,P., Chowdhury,F., Gaillard,S., Wang,F., McDonnell,D.P., Unterman,T.G., Elam,M.B., i Park,E.A. (2006). *Estrogen-related receptors stimulate pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 gene expression*. J. Biol. Chem. 281, 39897-39906.

Zhao,G., Jeoung,N.H., Burgess,S.C., Rosaaen-Stowe,K.A., Inagaki,T., Latif,S., Shelton,J.M., McAnally,J., Bassel-Duby,R., Harris,R.A., Richardson,J.A., i Kliewer,S.A. (2008). *Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy*. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol 294, H936-H943.

Zhou,Y., Yau,C., Gray,J.W., Chew,K., Dairkee,S.H., Moore,D.H., Eppenberger,U., Eppenberger-Castori,S., i Benz,C.C. (2007). *Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer*. BMC. Cancer 7, 59.





