

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**Papel protector del TWEAK sobre la resistencia a la insulina asociada
a la obesidad.
Efecto sobre la migración celular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Vázquez Carballo

Directoras

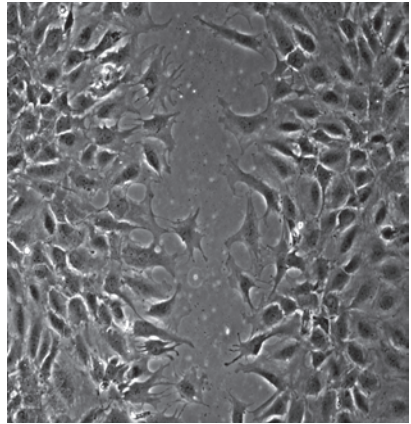
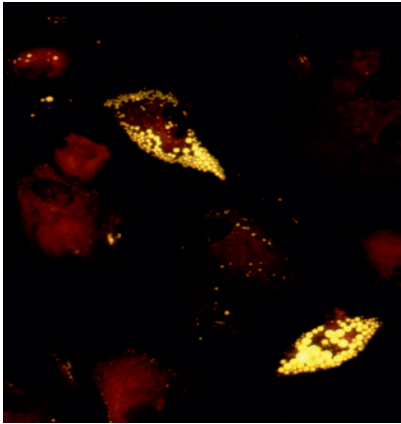
Sonia Fernández Veledo
Almudena Porras Gallo

Madrid, 2014



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**Papel protector del TWEAK sobre la
resistencia a la insulina asociada a la obesidad.
Efecto sobre la migración celular.**

Ana Vázquez Carballo
Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Papel protector del TWEAK sobre
la resistencia a la insulina asociada
a la obesidad. Efecto sobre la
migración celular.

TESIS DOCTORAL

ANA VÁZQUEZ CARBALLO

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Sonia Fernández Veledo y la Dra. Almudena Porrás Gallo.

Para la realización de este trabajo se concedió una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y Competitividad.

Opta al grado de doctor:
Ana Vázquez Carballo

ABREVIATURAS

AG: ácidos grasos.

AKT: del inglés “AK strain Transforming”.

cdNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

DMEM: del inglés “Dulbecco's Modified Eagle Medium”

DT2: diabetes tipo 2.

EGF: del inglés “Epidermal Growth Factor”.

EPCs: células progenitoras endoteliales.

ERKs: del inglés “Extracellular Signals Regulated Kinases”.

FBS: suero fetal bovino.

FGF: del inglés “Fibroblast Growth Factor”.

Fn14: factor de crecimiento de fibroblastos inducible 14 o TWEAKR.

GLUTs: transportadores de glucosa independientes de Na.

IFN- γ : interferón γ .

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1.

ILs: interleuquinas.

IRS1: sustrato para el receptor de insulina 1.

JNK1/2: Jun-N-terminal quinasa 1/2.

KGF: factor de crecimiento de queratinocitos.

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos.

MMPs: metaloproteasas de matriz extracelular.

MSCs: células madre mesenquimales.

mTWEAK: TWEAK de membrana.

NEFA: ácidos grasos no esterificados.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NIK: del inglés, “NF- κ B-inducing kinase”.

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa.

PKC: proteína quinasa C.

PP2A: del inglés “Protein Phosphatase 2A”

PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B.

Rac1: del inglés “Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”

SDS: dodecil sulfato sódico.

SEGF: del inglés “Src homology 3 domain-containing guanine nucleotide exchange factor”.

sTWEAK: TWEAK soluble.

TAG: triacilglicéridos.

TAK1: del inglés “TGF- β Activated Kinase 1”,

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

VEGF-A: factor de crecimiento endothelial vascular A.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.	TNF-LIKE WEAK INDUCER OF APOPTOSIS (TWEAK).....	3
1.1.	ESTRUCTURA.....	5
1.2.	EXPRESIÓN	7
1.3.	RECEPTOR DEL TWEAK (Fn14)	8
1.4.	PAPEL DEL TWEAK EN LA PATOGÉNESIS.....	10
2.	EL TEJIDO ADIPOSO Y SUS FUNCIONES	12
2.1.	METABOLISMO LIPÍDICO	13
2.2.	METABOLISMO GLUCÍDICO	16
2.3.	FUNCIÓN ENDOCRINA	17
3.	OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA	18
3.1.	LIMITACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO	18
3.2.	LA OBESIDAD ES UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA DE BAJO GRADO.....	20
3.3.	sTWEAK Y OBESIDAD	22
4.	PAPEL DEL TWEAK EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	24
4.1.	ALTERACIONES EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN LA DIABETES: CORRELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS	24
4.2.	PAPEL DEL TWEAK EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN: IMPLICACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	29
4.3.	PAPEL DE LAS FIBULINAS EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN	33
	OBJETIVOS.....	37

MATERIALES Y MÉTODOS

1.	CULTIVOS CELULARES	43
1.1.	LÍNEAS CELULARES	43
1.1.1.	MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	43
1.1.2.	LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.....	43
1.1.3.	CULTIVOS PRIMARIOS	45
1.2.	TRATAMIENTOS	46
1.3.	TRANSFECCIONES TRANSITORIAS CON RNAs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA PARA PP2Ac α (siRNA).....	46
2.	ESTUDIO DE LAS FUNCIONES METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.....	48
2.1.	MEDIDA DE LA CAPTACIÓN CELULAR DE GLUCOSA.....	48
2.2.	MEDIDA DE LA LIPÓLISIS	49
3.	TÉCNICAS PARA ANALIZAR LA MUERTE CELULAR Y LA APOPTOSIS.....	50
3.1.	DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	50
3.2.	VALORACIÓN DE LA APOPTOSIS: CUANTIFICACIÓN DE MONO- Y OLIGONUCLEOSOMAS	50
4.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	51
4.1.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	51
4.1.1.	EXTRACTOS CELULARES TOTALES.....	51
4.1.2.	EXTRACTOS NUCLEARES.....	52
4.1.3.	OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE MEMBRANA	52
4.2.	DETERMINACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	54

4.3.	ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT	54
4.3.1.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	54
4.3.2.	TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	56
4.3.3.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	56
4.4.	OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y ANÁLISIS DE FIBULINA-3	59
5.	CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	59
5.1.	AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL	59
5.2.	SÍNTESIS DEL cDNA	60
5.3.	PCR CUANTITATIVA.....	61
6.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	63
6.1.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA PP2A.....	63
6.2.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GELATINASA MMP-9	64
7.	ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR MEDIANTE CIERRE DE HERIDA.....	65
8.	ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	66

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A.	<u>EFFECTOS DEL sTWEAK SOBRE LOS ADIPOCITOS VISCERALES HUMANO</u>	71
1	El sTWEAK presenta propiedades beneficiosas en los adipocitos viscerales humanos.....	71
1.1.	El sTWEAK no sensibiliza a las células frente a la muerte celular por apoptosis inducida por el TNF- α	73
1.2.	El sTWEAK no tiene efectos lipolíticos en los adipocitos viscerales humanos	77

1.3.	El sTWEAK revierte la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α a nivel del transporte de glucosa.....	79
1.4.	El sTWEAK revierte la resistencia a la insulina inducida por TNF- α a nivel de IRS1, AKT y AS160.....	83
2	El sTWEAK activa la ruta no canónica de NF- κ B en los adipocitos viscerales humanos.....	86
3	El pre-tratamiento con el sTWEAK inhibe la asociación de TRAF2 con el receptor de TNF- α de tipo 1 (TNFR1), a través del cual genera la resistencia a la insulina	90
4	El TNF- α genera resistencia a la insulina a través de la cascada de señalización dependiente del TNFR1.....	94
5	La ruta sTWEAK-Fn14 previene la resistencia a la insulina inducida por TNF- α al bloquear la activación de JNK1/2 mediante un mecanismo dependiente de PP2A.....	98
6	El sTWEAK previene el desarrollo de la resistencia a la insulina en los adipocitos primarios humanos	105
B.	<u>EFFECTOS DEL sTWEAK SOBRE LA MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS MURINOS</u>	112
1	Rutas de señalización activadas por el sTWEAK en los fibroblastos embrionarios de ratón.....	112
2	El sTWEAK aumenta la migración celular en los MEFs wt y p38 α -/-.....	114
3	El TWEAK aumenta la actividad de la metaloproteasa MMP-9.....	120

4	El TWEAK es un regulador negativo de la secreción de Fibulina-3, una proteína de matriz extracelular implicada en migración.....	123
	DISCUSIÓN GENERAL	131
	CONCLUSIONES	165
	BIBLIOGRAFÍA	153
	ABSTRACT	187
	ANEXO	201

INTRODUCCIÓN

Las citoquinas son un grupo amplio y diverso de proteínas solubles o asociadas a la membrana plasmática que se unen a receptores de la superficie celular y, por tanto, regulan importantes funciones biológicas como desarrollo, hematopoyesis, inflamación, respuestas inmunológicas o reparación, entre otras. Las adipoquinas son un tipo de citoquinas que pueden ser secretadas por los adipocitos, los preadipocitos y, cuando hay obesidad, por los macrófagos que están infiltrados en el tejido adiposo (Ferrante, Jr. 2007; Neels and Olefsky 2006; Tchernof and Despres 2013; Tontonoz and Spiegelman 2008). Entre estas adipoquinas, encontramos la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) y sus receptores, que presentan un gran interés como potenciales dianas terapéuticas del síndrome metabólico.

1. TWEAK (TNF-LIKE WEAK INDUCER OF APOPTOSIS)

La familia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF), y en especial su miembro más estudiado, el TNF- α , juega un importante papel en el desarrollo de diferentes procesos fisiológicos y patológicos. El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que lleva a cabo su acción biológica en una gran variedad de tejidos de distintas especies. Se ha relacionado el exceso en la producción de esta citoquina o la activación continuada de su cascada de señalización con el desarrollo de numerosas enfermedades, como pueden ser algunos procesos autoinmunes (Chatzantoni and Mouzaki 2006; Upchurch and Kay 2012), el cáncer (Lippitz 2013) o la diabetes (Hotamisligil 2003).

En un principio, los ligandos de la superfamilia TNF son expresados como proteínas transmembrana de tipo II, pero en algunos casos también pueden sufrir un procesamiento que da como resultado una proteína más pequeña y soluble (Bodmer *et al.* 2002; Locksley *et al.* 2001). Ambos tipos, tanto ancladas como solubles, presentan homología en el dominio C-terminal que es el que media la autotrimerización y la unión al receptor, por lo que la proteína soluble también es biológicamente activa. Los miembros de la superfamilia del TNF se unen a uno o más de los miembros de la superfamilia de los receptores del TNF o TNFR. Estos receptores están formados por un dominio extracelular, una región de unión a ligando (con uno a cuatro dominios ricos en cisteína) y una cola citoplasmática que contiene al menos un sitio de unión a proteínas adaptadoras.

En 1997, Chicheportiche y colaboradores identificaron un nuevo miembro de la familia de los TNF que presentaba actividad proapoptótica en células HT-29 de carcinoma de colon tratadas con interferón γ . Como consecuencia, llamaron a esta citoquina TWEAK, del inglés “TNF-like weak inducer of apoptosis” (Chicheportiche *et al.* 1997). En 1998, Marsters y colaboradores describieron la misma proteína buscando secuencias relacionadas con el TNF- α . Encontraron que podía unirse a un TNFR, descrito previamente, conocido por APO3 (DR3), por lo que llamaron al TWEAK ligando de APO3 (APO3L) (Marsters *et al.* 1998). Sin embargo, cuando en los años 1999 y 2000 publicaron que el TWEAK podía actuar sobre células DR3 -/- (Kaptein *et al.* 2000; Schneider *et al.* 1999) y que no siempre inducía muerte celular, (Kaptein *et al.* 2000; Lynch *et al.* 1999)

se puso de manifiesto que, probablemente, podría haber otro receptor para esta citoquina. En el año 2001 (Wiley *et al.* 2001) identificaron el cDNA que codificaba la proteína de unión a TWEAK, a la que llamaron receptor de TWEAK o TWEAKR. La secuencia de aminoácidos del TWEAKR era idéntica a la descrita por el laboratorio del Doctor Jeffrey A. Winkles a finales de los 90, a la que llamaron “fibroblast growth factor-inducible 14” o Fn14, ya que, su expresión se incrementaba cuando las células quiescentes eran expuestas, tanto al factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1) como al FGF2 (Feng *et al.* 2000; Meighan-Mantha *et al.* 1999). Hoy en día se ha demostrado que TWEAK se une a Fn14, pero no a cualquier otro miembro de la familia de los TNFR, incluido DR3 (Bossen *et al.* 2006).

1.1. ESTRUCTURA:

El TWEAK es inicialmente sintetizado como una proteína transmembrana de tipo II con 249 aminoácidos. Presenta una región extracelular C-terminal que comprende 206 aminoácidos, que está formada por la región del tallo y un dominio de homología con un sitio potencial de N-glicosilación (Figura 1); además, tiene un dominio transmembrana formado por 25 aminoácidos y un dominio intracelular N-terminal formado por 18 aminoácidos, que contiene un sitio potencial de fosforilación por la PKC (Chicheportiche *et al.* 1997; Marsters *et al.* 1998). Se ha visto que TWEAK contiene varias posibles secuencias de localización nuclear y que el TWEAK

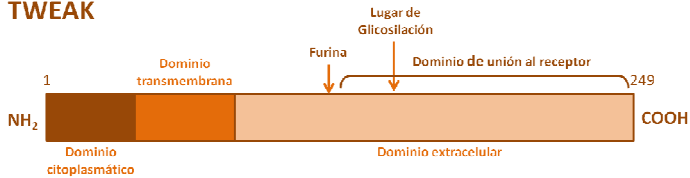
expresado de manera endógena podría entrar en el núcleo celular (Baxter *et al.* 2006; De *et al.* 2004).

Se ha identificado al TWEAK como una proteína anclada a la membrana de monocitos humanos activados por interferón- γ (Nakayama *et al.* 2002) y en células T CD4+ humanas (Kaplan *et al.* 2000). Sin embargo, al igual que la mayoría de los miembros de la superfamilia de los TNF, puede sufrir un procesamiento proteolítico, dando lugar a formas solubles biológicamente activas (Blobel 2002).

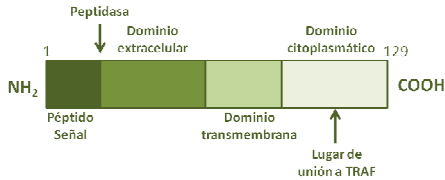
El TWEAK sufre una proteólisis en la región C-terminal por parte de unas proteasas de la familia de las furinas, lo que da como resultado una secuencia de 156 aminoácidos que puede funcionar como una citoquina soluble (Figura 1). Esta región C-terminal es la responsable de la trimerización del ligando y la unión al receptor, por lo que el TWEAK soluble conserva la capacidad de interactuar con su receptor Fn14 y desencadenar las rutas de señalización asociadas a él (Fick *et al.* 2012; Winkles 2008).

Las células pueden co-expresar ambos tipos de TWEAK, el de membrana y el soluble, pero el mecanismo que regula la concentración de ambos todavía no se conoce.

TWEAK



Fn14



Adaptado de Yepes and Winkles, 2006

Figura 1: Estructura del TWEAK y de su receptor en la que se representan los diferentes dominios (citoplasmático, transmembrana y extracelular).

1.2. EXPRESIÓN

TWEAK, en contraste con otros miembros de la familia TNF (como el TNF α 5), es una citoquina de alta expresión. De hecho, el RNAm del TWEAK y/o su proteína han sido detectados en una gran variedad de tejidos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, cerebro, músculo o tejido adiposo (Baxter *et al.* 2006; Chacon *et al.* 2006; Chicheportiche *et al.* 1997; Chicheportiche *et al.* 2000; De *et al.* 2006; Ho *et al.* 2004; Marsters *et al.* 1998) y de tumores, como el adenocarcinoma de colon, el carcinoma hepatocelular o el glioblastoma multiforme (Ho *et al.* 2004; Kawakita *et al.* 2004; Kawakita *et*

al. 2005; Marsters *et al.* 1998; Tran *et al.* 2003). TWEAK se expresa también en neuronas primarias murinas (Yepes *et al.* 2005), astrocitos (splat-Jego *et al.* 2002; Yepes *et al.* 2005) y monocitos/macrófagos (Chicheportiche *et al.* 1997; Chicheportiche *et al.* 2000; Girgenrath *et al.* 2006; Maecker *et al.* 2005; Nakayama *et al.* 2003).

Se ha demostrado que el TWEAK regula la proliferación, la migración, la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular en líneas celulares inmortalizadas o células primarias de humano, ratón o rata. En la mayoría de estos experimentos se utiliza TWEAK soluble (sTWEAK) producido en bacterias, lo que indica que la glicosilación del TWEAK no es necesaria para llevar a cabo su actividad biológica y que el TWEAK humano se puede unir a los receptores Fn14, tanto de rata como de ratón (Brown *et al.* 2006; Chicheportiche *et al.* 1997; Glenney and Wiens 2007).

A día de hoy no se conoce el mecanismo mediante el cual la unión TWEAK-Fn14 puede producir efectos tan diferentes. Se ha propuesto que la actividad específica de tejido que presenta el TWEAK podría ser debido a la activación diferencial de diversas rutas de señalización intracelulares.

1.3. RECEPTOR DEL TWEAK (Fn14)

Como ya se ha comentado previamente, el TWEAK es una citoquina multifuncional que ejercería todas sus funciones uniéndose a un solo receptor de la superfamilia de los TNFR, el Fn14 (Winkles 2008). No obstante, en el año 2003 (Polek *et al.*

2003) describieron que la diferenciación mediada por TWEAK de las células murinas RA W264.7 ocurría de manera independiente de Fn14, y propusieron que estas células expresaban un receptor secundario, pero no ha habido más estudios a este respecto.

Además se han identificado péptidos capaces de unirse al TWEAK. Estos péptidos son similares a CD163, un miembro de la familia de receptores “scavenger” ricos en dominios cisteína, que se expresan sólo en monocitos y macrófagos y son responsables de la captación de los complejos haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) circulantes. Los análisis de la secuencia sugieren que el TWEAK imita al ligando natural de CD163 (Hp-Hb) (Bover *et al.* 2007). Asimismo, hay evidencias de que esta interacción interfiere con la unión de TWEAK y Fn14 y da como resultado la internalización de los complejos TWEAK-CD163 por parte de los macrófagos. La unión TWEAK-CD163 parece así actuar como un mecanismo antagonista, pero su relevancia in vivo todavía no se conoce.

La expresión de Fn14 es inducida por factores de crecimiento, y por tanto, aumenta tras un daño tisular. Por ejemplo, se ha visto que Fn14 se sobre-expresa en el tejido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide o psoriásica (van Kuijk *et al.* 2010), en los tejidos renales isquémicos y en las células epiteliales tubulares de pacientes con daño renal (Hotta *et al.* 2011), en hígado tras un daño hepático, como es el caso de la hepatitis C (Jakubowski *et al.* 2005) o del cáncer de hígado (Feng *et al.* 2000), en la denervación del músculo

esquelético (Mittal *et al.* 2010), en la glomerulonefritis en el lupus nefrítico (Lu *et al.* 2011) y en pacientes con obesidad mórbida (Maymo-Masip *et al.* 2013). Además, los tumores sólidos presentan una fuerte expresión de Fn14 (Michaelson and Burkly 2009).

1.4. PAPEL DEL TWEAK EN LA PATOGÉNESIS

Se ha demostrado que el tratamiento con TWEAK activa diversas cascadas de señalización, entre las que se encuentra la ruta NF- κ B, que controla la expresión de una variedad de proteínas implicadas en la respuesta inmune, la inflamación o la apoptosis, así como en la tumorigénesis (Hayden *et al.* 2006; Karin 2006). Como ya hemos descrito anteriormente, el TWEAK se expresa en una variedad de tejidos tumorales y es capaz de activar varios de los procesos celulares asociados a la progresión tumoral, como pueden ser la proliferación, la invasión, la angiogénesis y la inflamación (Winkles *et al.* 2006; Winkles *et al.* 2007). Por otro lado, el TWEAK es una citoquina pro-inflamatoria, así que podría jugar un importante papel en las patologías causadas por una respuesta inflamatoria excesiva o anormal.

En la bibliografía actual hay descritas distintas situaciones en las que la expresión del TWEAK se puede ver incrementada. Esto ocurre por ejemplo cuando se tratan los monocitos primarios humanos con IFN- γ o acetato de forbol miristato (Nakayama *et al.* 2000) o las células monocíticas THP-1 con lipopolisacárido (un potente inductor de la inflamación)

(Chacon *et al.* 2006). Además, la expresión de TWEAK está aumentada en tres modelos murinos de lesión aguda: en el cerebro tras una isquemia (Potrovita *et al.* 2004; Yepes *et al.* 2005), en el riñón tras una inyección intraperitoneal de ácido fólico (Justo *et al.* 2006) y en el músculo esquelético tras una inyección de cardiotoxina (Girgenrath *et al.* 2006). A su vez, estudios recientes sobre modelos murinos han demostrado que el eje TWEAK-Fn14 contribuye al desarrollo de tres enfermedades autoinmunes e inflamatorias: la artritis reumatoide (Kamata *et al.* 2006; Perper *et al.* 2006), el lupus eritematoso sistémico (Campbell *et al.* 2004; Schwartz *et al.* 2006) y la esclerosis múltiple (splat-Jego *et al.* 2002).

En el caso de los humanos, cuando se produce una lesión por quemadura grave, se ha observado que la expresión de TWEAK y de otras citoquinas pro-inflamatorias aumenta en el músculo esquelético de las extremidades no lesionadas, lo que podría contribuir a la atrofia del tejido no dañado directamente por el fuego (Merritt *et al.* 2013). Asimismo, se han encontrado altos niveles de TWEAK en los tumores malignos de ovario y se ha comprobado que, *in vitro*, el TWEAK solamente es capaz de inhibir la proliferación celular en el cáncer de ovario cuando se tratan las células en combinación con el TNF- α , mientras que por separado ninguna de las dos citoquinas afecta a la proliferación. Igualmente, los medios condicionados de macrófagos activados por TWEAK inhiben la proliferación y la invasión de estas células tumorales. En estos cultivos, se ha observado que el TWEAK aumenta la producción de MCP-1 (“Monocyte chemoattractant protein-1”),

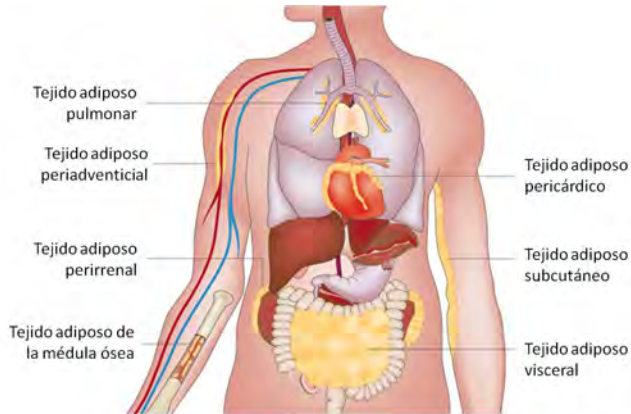
probablemente para reclutar macrófagos, por lo que sugieren que el eje TWEAK/Fn14 podría tener un papel en la supresión de tumores de ovario (Gu *et al.* 2013).

Existen además estudios en los que la situación es la contraria, y la expresión del TWEAK se encuentra disminuida, como por ejemplo cuando los macrófagos intraperitoneales de ratón son tratados con lipopolisacáridos (Chicheportiche *et al.* 2000). Recientemente, se ha descrito que los niveles de TWEAK soluble circulante disminuyen en enfermedades de tipo inflamatorio, como es el caso de los pacientes de obesidad mórbida. Además se ha visto, que cuando estos pacientes son sometidos a una cirugía bariátrica, los niveles de sTWEAK circulantes se incrementan (Maymo-Masip *et al.* 2013).

2. EL TEJIDO ADIPOSO Y SUS FUNCIONES

El órgano adiposo está formado por distintos depósitos de grasa a lo largo del cuerpo (Figura 2). Estos depósitos pueden presentar diferentes funciones fisiológicas y desarrollar un papel importante en la patogenia de diversas enfermedades. Los avances de las últimas décadas demuestran que el tejido adiposo presenta un papel relevante en la regulación del balance energético y el metabolismo intermediario. El tejido adiposo blanco se ha reconocido como el principal lugar de almacenamiento del exceso de energía en forma de triacilglicéridos (TAG) principalmente (Chaves *et al.* 2011).

Las funciones del tejido adiposo comprenden funciones metabólicas como la regulación del metabolismo lipídico y glucídico así como importantes funciones endocrinas.



(Adaptado de Noriyuki Ouchi, 2011)

Figura 2: Distribución de los depósitos de tejido adiposo en el cuerpo humano.

2.1. METABOLISMO LIPÍDICO

El metabolismo lipídico está controlado por tres procesos básicos: la captación de ácidos grasos, la síntesis de ácidos grasos (AG) y de triacilglicéridos (lipogénesis) y la hidrólisis de los triacilglicéridos (lipólisis) (Figura 3). Cada uno de estos procesos metabólicos puede ser regulado en respuesta a diversos estímulos como la insulina, el cortisol, las

catecolaminas, la hormona del crecimiento, la testosterona, los ácidos grasos y las citoquinas.

Los ácidos grasos que se almacenan en los adipocitos derivan principalmente de la captación de los mismos del plasma y, en menor medida, de la síntesis *de novo* que tiene lugar en el citosol de las células. El almacenamiento de los lípidos en forma de gotas de grasa en el interior de los adipocitos constituye una forma de reservar la energía de manera que pueda ser accesible a través de su hidrólisis en función de las necesidades metabólicas.

En momentos en los que hay mayor ingesta de alimentos o una disminución del gasto energético, el exceso de energía se almacena en forma de triacilglicéridos, proceso mediado por las enzimas lipogénicas. Sin embargo, los adipocitos también contienen enzimas que son capaces de hidrolizar los

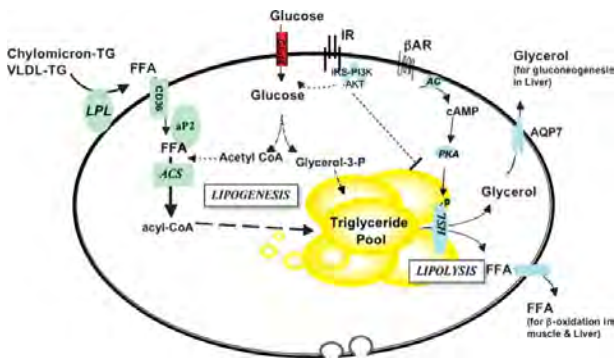


Figura 3: Regulación del almacenamiento y la movilización de los AG en el tejido adiposo blanco. (Sethi and Vidal-Puig 2007)

triacilglicéridos, obteniéndose glicerol y ácidos grasos, que pueden ser transportados por el torrente sanguíneo y ser captados por otros tejidos metabólicamente activos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo marrón. Además, algunos de los ácidos grasos liberados pueden ser reesterificados con el glicerol, formando TAG de nuevo en los adipocitos.

El desequilibrio entre la lipólisis y la síntesis de triacilglicéridos juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Concretamente, la lipólisis se encuentra sometida a un riguroso control, siendo las catecolaminas y la insulina sus principales reguladores, estimulándola e inhibiéndola respectivamente (revisado en (Lafontan and Langin 2009)). Una disminución en la lipólisis puede conducir a situaciones de obesidad. Por el contrario, una tasa lipolítica excesiva, asociada a un defecto en la utilización de los ácidos grasos no esterificados (NEFA) por el hígado y el músculo, pueden constituir las principales razones para los desórdenes metabólicos observados en individuos obesos, pudiendo conducir a la aparición de diabetes tipo 2 (DT2) (revisado por (Langin 2006)). De hecho los NEFA resultan tóxicos para la célula, por lo que su esterificación a TAG es fundamental para la viabilidad celular. Además, los NEFA están implicados en la mayoría de las situaciones patológicas asociadas a la obesidad y la DT2.

2.2. METABOLISMO GLUCÍDICO

El tejido adiposo blanco juega un papel importante en la regulación de la homeostasis glucídica. El tejido adiposo blanco junto con el tejido adiposo marrón, el músculo y el corazón son los únicos órganos conocidos que expresan el transportador de glucosa sensible a insulina, GLUT4. En los adipocitos, la glucosa es el sustrato para la síntesis *de novo* de los AG y del glicerol. Además, la actividad metabólica del tejido adiposo blanco influye sobre otros tejidos periféricos, ya que los ácidos grasos libres tienen efectos negativos sobre la sensibilidad de estos tejidos a la insulina y, por tanto, sobre las funciones reguladas por ella, como la supresión de la gluconeogénesis hepática y el transporte de glucosa en el músculo. Todo ello da lugar a un aumento de los niveles de glucosa plasmática (Kusminski *et al.* 2009).

Por todo ello, el tejido adiposo blanco ejerce un importante papel en el metabolismo glucídico. La insulina hace que el transportador GLUT4 se transporte hasta la membrana plasmática para captar glucosa del torrente sanguíneo y activar la ruta PI3K-AKT (Huang and Czech 2007). El principal órgano responsable de la captación de glucosa en respuesta a la insulina es el músculo, mientras que el tejido adiposo blanco es el responsable del almacenamiento de una pequeña parte de la glucosa circulante. Sin embargo, se ha comprobado que los ratones deficientes en el gen *glut4* específicamente en el tejido adiposo blanco, desarrollan resistencia a la insulina en otros tejidos (como el hígado o el músculo), dando como resultado la

aparición de intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia, por lo que se deduce que la integridad del tejido adiposo blanco es crucial para el correcto mantenimiento de la glucemia (Abel *et al.* 2001). De hecho, la resistencia a la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa en el tejido adiposo blanco es uno de los primeros síntomas en detectarse en los estados prediabéticos.

2.3. FUNCIÓN ENDOCRINA

Tradicionalmente se ha descrito al tejido adiposo blanco como un reservorio de energía en forma de grasa. Hoy en día se considera a este tejido como el mayor órgano endocrino del cuerpo humano, ya que secreta numerosas citoquinas, hormonas y proteínas que afectan y regulan el funcionamiento del resto de los tejidos del organismo. Tras la caracterización de este tejido como el mayor lugar de metabolismo de esteroides y de producción de adiposina, un factor endocrino marcadamente disminuido en ratones obesos (Flier *et al.* 1987), se empezó a considerar este tejido como algo más que un simple lugar de reserva del exceso de energía. Cuando en 1994 se caracterizó la leptina, se consideró definitivamente el tejido adiposo como un órgano endocrino (Zhang *et al.* 1994). El adipocito secreta adipoquinas que pueden actuar a nivel local (función autocrina y paracrina) o a nivel sistémico (función endocrina). Estas adipoquinas incluyen al TNF- α , la IL-6, la adiponectina, el angiotensinógeno y la resistina. Por todo ello, se ha considerado el adiposo blanco como un tejido dinámico, biológicamente activo y un regulador de la

homeostasis energética y del metabolismo (Havel 2004). Cuando la función endocrina de este tejido se ve alterada, puede aparecer resistencia a la acción de la insulina u otros desórdenes metabólicos (Canale *et al.* 2013).

3. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA

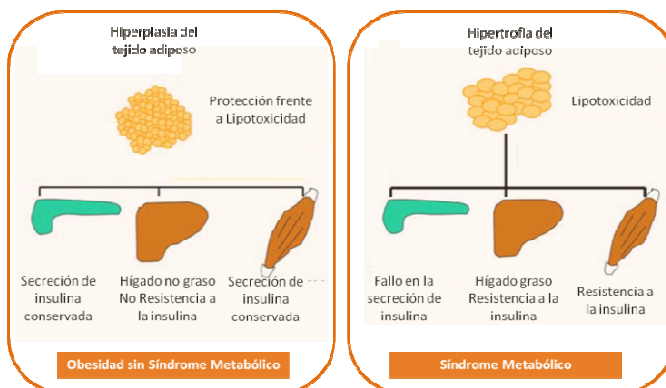
Actualmente existen dos teorías que conectarían la obesidad con el desarrollo de la resistencia a la insulina.

3.1. LIMITACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

Vidal-Puig y colaboradores proponen en el 2007 la teoría de que la capacidad de expansión del tejido adiposo está estrechamente relacionada con las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad (Slawik and Vidal-Puig 2007). De hecho, la expansión del tejido adiposo no es un proceso ilimitado y debe ser un factor importante en la determinación de la aparición de las co-morbilidades asociadas a la obesidad (Medina-Gomez *et al.* 2005). Es evidente que el tejido adiposo juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis energética, ya que se ha comprobado que tanto la lipodistrofia como la obesidad presentan efectos metabólicos severos. En la lipodistrofia, síndrome caracterizado por una reducción sustancial de la capacidad de almacenaje del tejido adiposo a pesar de la ingesta normal de energía, se presenta resistencia a la insulina, mayores cantidades de ácidos grasos libres y acumulación de ácidos grasos en tejidos periféricos, como el hígado, el músculo esquelético y el páncreas. En el otro

extremo está la obesidad, que, con un balance energético positivo, presenta una hipertrofia del tejido adiposo blanco. Las evidencias asocian esta hipertrofia con el desarrollo de resistencia a la insulina (Molina *et al.* 1989) (Figura 4).

Probablemente, el vínculo de unión entre ambos síndromes sea la capacidad de almacenamiento defectuosa de los depósitos de tejido adiposo blanco, en el caso de la lipodistrofia debida a la pérdida del propio tejido y en el caso de la obesidad debida a la saturación de la capacidad de almacenamiento. Además, se ha comprobado que los individuos obesos en los que aumenta el tejido graso mediante un mecanismo hiperplásico (y no hipertrófico) conservan intacta la sensibilidad a la insulina y un patrón favorable de las moléculas secretadas, por lo que actualmente se les conoce como obesos metabólicamente sanos (Holm *et al.* 2000; Hwang *et al.* 2012).



Adaptación de Mare Sliawik, 2007

Figura 4: desarrollo del síndrome metabólico mediante hipertrofia del tejido adiposo.

3.2. LA OBESIDAD ES UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA DE BAJO GRADO

En segundo lugar, se ha comprobado que la obesidad es un factor clave para el desarrollo de la resistencia a la insulina y la DT2, ya que se trata de una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado en la que el balance de la secreción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias se ve alterado, con un aumento de las primeras y una disminución de las segundas. En la obesidad existe un desbalance crónico entre las calorías consumidas y las gastadas, por lo que el almacenaje de TAG por parte de los adipocitos aumenta. Esto se manifiesta con un aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y un incremento del número de adipocitos (hiperplasia) (Salans *et al.* 1973). Este incremento de los lípidos dentro del adipocito, unido a la hipertrofia e hiperplasia, genera una disfunción celular que altera la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, la IL-8 y el TNF- α . Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que los adipocitos no son la única fuente de secreción de estas citoquinas. Las células no adiposas, que constituyen la fracción del estroma vascular, como los pre-adipocitos, las células endoteliales, los fibroblastos, los leucocitos y los macrófagos, llevan a cabo un importante papel en la respuesta inflamatoria crónica existente en la obesidad (Bouloumie *et al.* 2005; Canello and Clement 2006; Ramirez Alvarado and Sanchez 2012).

Estas citoquinas pro-inflamatorias están implicadas en impedir la acción de la insulina en los tejidos periféricos, incluyendo el tejido adiposo y el músculo (Hotamisligil 2003; Trayhurn and Wood 2005). En este contexto, el TNF- α es secretado por el sistema inmune (monocitos, macrófagos, células T y B, células NK, y leucocitos polimorfonucleares) y por otros tipos celulares como los adipocitos. Se ha demostrado que en los pacientes con obesidad existe un aumento del TNF- α en el tejido adiposo y que también presentan mayores niveles séricos (Olszanecka-Glinianowicz *et al.* 2004). Además, la pérdida de peso en obesos hace que los niveles séricos de TNF- α disminuyan (Dandona *et al.* 1998). Por todo ello, se ha propuesto que el TNF- α podría ser uno de los nexos de unión entre la obesidad y la resistencia a la insulina (Moller 2000; Wieser *et al.* 2013).

La insulina actúa sobre el metabolismo lipídico, promoviendo el anabolismo e inhibiendo el catabolismo. Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales, la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de tirosina y serina/treonina quinasas. Estas quinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula. Se ha propuesto que las alteraciones en alguno de los componentes claves de la cascada de señalización de la insulina, incluyendo reguladores negativos, están implicadas en el desarrollo de

resistencia a la insulina (Biddinger and Kahn 2006; White 2003).

Por otro lado, la insulina es una de las responsables de que se produzca la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Huang and Czech 2007; Zaid *et al.* 2008). Se ha descrito que muchos mediadores liberados por los adipocitos y los macrófagos infiltrados alteran la homeostasis de la glucosa a través de la inhibición de la traslocación de GLUT4 dependiente de la insulina mediante mecanismos específicos de tejido (Gregor and Hotamisligil 2011). Estos mecanismos incluyen la activación de quinasas pro-inflamatorias y de estrés, así como de proteínas tirosina fosfatasa, como la PTP1B que reduce la fosforilación en tirosina del receptor de insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRSs) (Fernandez-Veledo *et al.* 2009a; Nieto-Vazquez *et al.* 2008). Además, los resultados previos de nuestro laboratorio con adipocitos humanos, han demostrado que el TNF- α inhibe la captación de glucosa dependiente de insulina en los adipocitos viscerales, pero no en los subcutáneos, afectando a la cascada de señalización de la insulina a nivel del IRS1, mediante un mecanismo dependiente de JNK1/2 (Fernandez-Veledo *et al.* 2009a).

3.3. sTWEAK Y OBESIDAD

En la bibliografía existen diferentes trabajos que han estudiado la expresión del TWEAK y su receptor, Fn14, en el tejido adiposo de individuos delgados y obesos. El tejido

adiposo está compuesto por adipocitos y por la fracción del estroma vascular, una población heterogénea de preadipocitos, células madre mesenquimales, células endoteliales y macrófagos, entre otras. La expresión del TWEAK se detecta, sobre todo, en la superficie de los macrófagos y en las células linfoides (Maecker *et al.* 2005; Maymo-Masip *et al.* 2013), mientras que la expresión de Fn14 se detecta en los adipocitos maduros (Alexaki *et al.* 2009; Chacon *et al.* 2006; Maymo-Masip *et al.* 2013; Tiller *et al.* 2009), preadipocitos (Girgenrath *et al.* 2006; Tiller *et al.* 2009), células madre mesenquimales (Girgenrath *et al.* 2006) y células endoteliales (Harada *et al.* 2002). En el año 2006, el grupo del Dr. Vendrell, describió que los niveles de Fn14 se incrementaban en una situación de obesidad mórbida, mientras que los niveles del TWEAK no se encontraban alterados, al contrario de lo que ocurría con el TNF- α (Chacon *et al.* 2006).

De manera similar al TNF- α , el sTWEAK activa rutas de señalización pro-inflamatorias que incluyen a la ruta canónica y no-canónica del NF- κ B (Saitoh *et al.* 2003), AKT, ERK1/2 y JNK1/2 (Dogra *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2009). La activación de estas rutas puede llevar a una liberación de mediadores pro-inflamatorios que pueden interferir en la ruta de señalización de la insulina (Vendrell *et al.* 2010).

Recientemente se ha descrito al sTWEAK como posible causante de la resistencia a la insulina en los hepatocitos humanos (Feng *et al.* 2008). Sin embargo, no se conoce el

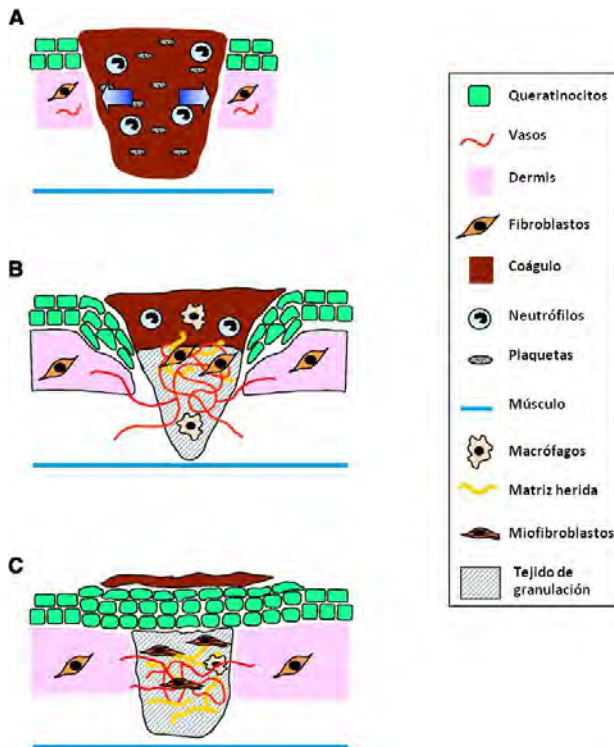
papel del sTWEAK en la patología pro-inflamatoria y la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, así que en base a todo lo mencionado anteriormente sería interesante estudiar sus efectos.

4. PAPEL DEL TWEAK EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

4.1. ALTERACIONES EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN LA DIABETES: CORRELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Una de las complicaciones habituales de los pacientes con Diabetes mellitus es la dificultad en la cicatrización de las heridas, lo que requiere largas temporadas de hospitalización.

Cuando se produce una lesión en la piel, se desencadena de manera inmediata una cascada de eventos que se podría dividir en varias fases (Figura 5): (1) inflamatoria, (2) de granulación con la formación de nuevo tejido conectivo y cierre de la herida, y por último, (3) de remodelación tisular que restaura la barrera epidérmica (Martin 1997; Werner *et al.* 2007).

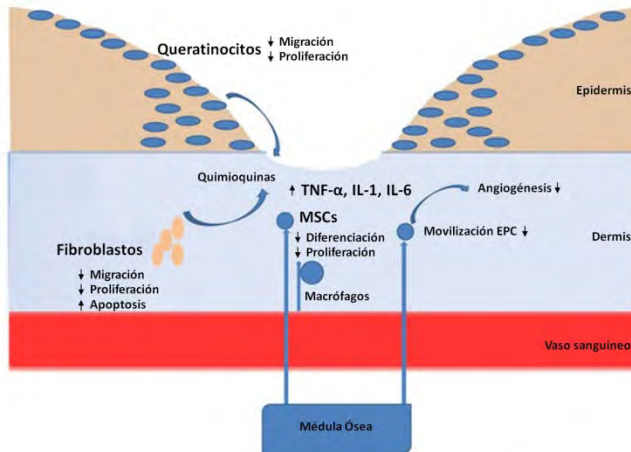


Adaptado de Werner S. y Grose R., 2003.

Figura 5: Representación esquemática de las diferentes etapas del cierre de heridas. **A.** Tras 12-24 horas, la herida se llena con un coágulo de sangre y es invadida por los neutrófilos. **B.** Entre los 3 y los 7 días tras la lesión, la mayoría de los neutrófilos han sufrido apoptosis y abundan los macrófagos. Las células endoteliales migran hacia el coágulo, proliferan y forman nuevos vasos sanguíneos. Los fibroblastos también migran, proliferan y depositan matriz extracelular. El nuevo tejido se llama tejido de granulación. Los queratinocitos proliferan en el borde de la herida y migran hacia la dermis y por encima de la matriz provisional. **C.** 1-2 semanas después de la lesión, la herida se llena con tejido de granulación. Los fibroblastos se transforman en miofibroblastos, lo que facilita la contracción de la herida y el depósito de colágeno. La herida está completamente cubierta con un neopidermis.

El proceso se inicia con la liberación de varios factores de crecimiento y citoquinas desde el suero de los vasos sanguíneos lesionados y la formación de un coágulo de fibrina que facilita la protección frente a microorganismos patógenos y sirve como matriz para las células que se van a infiltrar. Las siguientes etapas incluyen la migración y proliferación de los queratinocitos hacia el borde de la herida, seguidas de la proliferación de los fibroblastos vecinos que migran hacia la matriz provisional formada en donde depositan grandes cantidades de matriz extracelular nueva (Werner and Grose 2003).

En la diabetes, están alterados muchos de los procesos que juegan un papel importante en la cicatrización de las heridas (Figura 6). Entre otras cosas, existe una disminución de la infiltración temprana de células inflamatorias, aunque posteriormente se produce un aumento del número de neutrófilos y macrófagos. Estos cambios en el reclutamiento de células inflamatorias están asociados a alteraciones en la expresión de quimioquinas y factores de crecimiento, entre los que destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Barrientos *et al.* 2008; Ochoa *et al.* 2007). Además, se han encontrado altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias (como $TNF-\alpha$ o IL-6) y bajas concentraciones de las anti-inflamatorias (como la IL-10) en las heridas de pacientes con diabetes tipo 1 cuando son comparadas con las de pacientes no diabéticos (Chatzigeorgiou *et al.* 2010).



Adaptado de Fansing Xu, 2013.

Figura 6: Mecanismos implicados en la alteración de las heridas diabéticas. En la diabetes, las quimioquinas y las citoquinas están elevadas, la migración, proliferación y apoptosis de queratinocitos y fibroblastos están alteradas, la polarización de los macrófagos es anormal (con un incremento de los macrófagos proinflamatorios o M1 y una disminución de los antiinflamatorios o M2), hay problemas de reclutamiento de células madre mesenquimales (MSCs) y células progenitoras endoteliales (EPCs) y existe una disminución de la vascularización.

Asimismo, el reclutamiento de las células madre mesenquimales adultas (MSC) que se lleva a cabo en el tejido dañado para contribuir a su reparación mediante la transdiferenciación a diferentes tipos celulares, también se ve alterado. Estas células participan en la reparación de heridas (Fu and Li 2009), ya que, además de formar fibroblastos y miofibroblastos, secretan factores de

crecimiento implicados en la reparación como VEGF-A, IGF-1, EGF o el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (Sasaki *et al.* 2008).

Por otro lado, se sabe que en la diabetes existe una disminución de la migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos y fibroblastos. La mayoría de estas alteraciones se ha relacionado con la inflamación y la producción de citoquinas, así como con la angiogénesis, el reclutamiento de leucocitos y células madre, y la epitelización (Blakytyn and Jude 2006). Tanto en modelos de heridas humanas como en modelos animales se han encontrado elevados los niveles de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α (Barrientos *et al.* 2008; Wen *et al.* 2006). Algunas de estas citoquinas pro-inflamatorias se sabe que son necesarias para el correcto funcionamiento de la cicatrización (Xu *et al.* 2013), por lo que un cambio de patrón en su expresión alterará dicho proceso.

En un proceso de cicatrización normal, los niveles de TNF- α se incrementan entre las 12 y las 24 horas después de producirse la herida (Han *et al.* 2001) y cuando la fase de proliferación termina, se vuelven a alcanzar los niveles basales. En el caso de la diabetes, los niveles de TNF- α se encuentran elevados en condiciones basales. Esto se ha relacionado con una inhibición de la migración celular (Corredor *et al.* 2003). De hecho, en los pacientes diabéticos, los fibroblastos de las heridas orales o dérmicas presentan una disminución en la migración y proliferación, y un

aumento en la apoptosis (Desta *et al.* 2010; Lamers *et al.* 2011; Siqueira *et al.* 2010). Como ya hemos comentado, la migración de estos fibroblastos hacia la matriz de la herida juega un papel importante en la cicatrización, ya que son las células que, principalmente, secretan material para la formación de una nueva matriz extracelular. Por tanto, si la migración de estos fibroblastos es menor, el proceso de cicatrización se puede ver alterado. Actualmente no existen estudios sobre la implicación del TWEAK en la migración de los fibroblastos durante el proceso de cicatrización pero sería interesante analizar si esta citoquina pro-inflamatoria ejerce la misma función que el TNF- α , ya que recientemente se ha descrito que sus niveles están alterados en los casos de obesidad y diabetes.

4.2. PAPEL DEL TWEAK EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN: IMPLICACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Actualmente existen datos que afirman que el TWEAK aumenta la migración e invasión celular en distintos tipos de células tumorales. Los niveles elevados de TWEAK se han asociado con un peor diagnóstico del cáncer de ovario, ya que es capaz de promover las metástasis aumentando la migración e invasión celular a través de la activación de NF- κ B (Dai *et al.* 2009). Por otro lado, en el caso del glioblastoma, el tumor cerebral de más alto grado en los adultos que es altamente invasivo, el TWEAK promueve la invasividad de las células y su supervivencia por un

mecanismo dependiente de la actividad de las Rho GTPasa, incluida Rac1, y del factor de intercambio de nucleótidos de guanina, SEGF (*Src homology 3 domain-containing guanine nucleotide exchange factor*) (Fortin Ensign *et al.* 2013; Tran *et al.* 2006). Además, se ha visto que en este mismo tipo de tumor, el TWEAK podría actuar como agente quimiotáctico y así guiar la invasión celular (Dhruv *et al.* 2013). Asimismo, en el carcinoma urotelial, TWEAK promueve la invasión y la angiogénesis, por lo que su silenciamiento reduce significativamente dichos procesos (Shimada *et al.* 2012). A su vez, en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, los altos niveles de expresión de Fn14 se correlacionan con la promoción de la migración e invasión tumoral (Whitsett *et al.* 2012). Sin embargo, en el cáncer de mama el papel del TWEAK sobre la invasión celular depende de la expresión de la lipocalina 2, pudiendo promover o inhibir su capacidad invasiva (Gaudineau *et al.* 2012).

En la migración celular están implicadas una gran variedad de proteínas y enzimas. Entre ellas, encontramos a las metaloproteasas de matriz extracelular o MMPs, que son una familia de enzimas que catalizan la degradación de la matriz extracelular, para lo que es necesaria la presencia de un ión metálico (Zn^{2+}) unido al centro activo. Estas proteasas comparten dominios estructurales, como el pro-péptido N-terminal, y dominios catalíticos. Se clasifican en diferentes subfamilias en función de la presencia de otros dominios, como los dominios de repeticiones de tipo fibronectina, los dominios tipo hemopexina C-terminal y los dominios

transmembrana de tipo Ig (Kim and Joh 2012). Las metaloproteasas son sintetizadas como pro-enzimas que serán secretadas, siendo necesario su procesamiento para dar lugar a su forma activa, aunque también se pueden quedar en la membrana plasmática como MMPs transmembrana.

Actualmente, se conocen 23 miembros de esta familia, 17 solubles y 6 asociadas a membrana. Inicialmente, se clasificaban según el componente de la matriz extracelular que eran capaces de degradar, quedando agrupadas en colagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromilisinias (MMP-3, -10 y -11) y matrilisinias (MMP-7). Sin embargo, hoy en día, esta clasificación se ha quedado obsoleta, por lo que actualmente se clasifican según su dominio estructural. La estructura básica de las MMP presenta tres dominios: un péptido señal, situado en el extremo amino-terminal que se encarga de determinar si la proteína será secretada o de membrana; un pro-péptido, que contiene una cisteína que mantiene la enzima en estado latente hasta que es procesado; y un dominio catalítico carboxiterminal que contiene el sitio activo altamente conservado y que se une a un ión de zinc (Radisky and Radisky 2010; Tallant *et al.* 2010). Así, en la actualidad se clasifican en ocho grupos estructurales: cinco de MMPs secretadas y tres de membrana (revisado en (Sternlicht and Werb 2001).

Estas enzimas juegan un papel importante en procesos como la migración celular, la invasión, la proliferación o la apoptosis. Además, regulan muchos procesos del desarrollo, como la morfogénesis, la angiogénesis, la cicatrización de heridas y la degradación de la matriz extracelular.

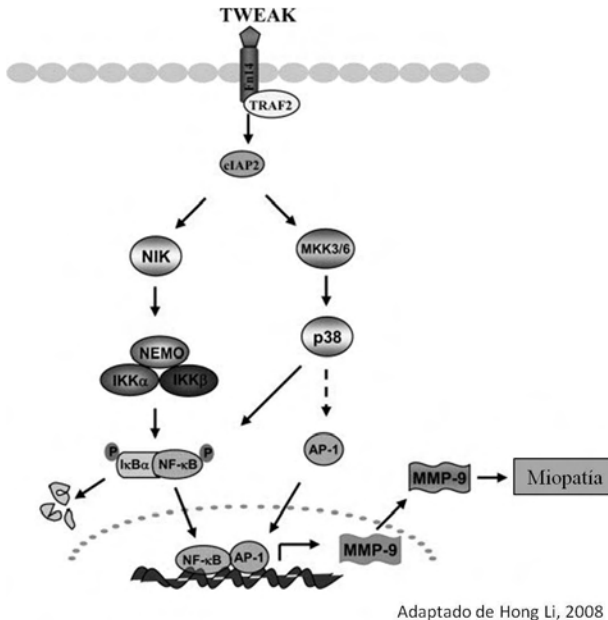


Figura 7: Mecanismos implicados en la inducción de la producción de MMP9 por TWEAK en los miotubos. El TWEAK activa las rutas NF- κ B y MAPKs, provocando un aumento de la expresión de MMP-9.

La matriz extracelular es una barrera para la migración celular, ya que, las células para moverse, tienen que perder su fenotipo de células adhesivas y adquirir un fenotipo de

células migratorias, lo que incluye la activación de la función motora del citoesqueleto, la modulación de los sitios y moléculas adhesivas de la superficie celular, la eliminación de la matriz extracelular para romper las barreras físicas, y la presencia de factores quimiotácticos para guiar la migración. Existen numerosos estudios que demuestran la relevancia de las MMPs en la migración de diferentes tipos de células. De hecho, en el proceso migratorio por ejemplo de los queratinocitos también se ha comprobado que es necesaria la alteración del fenotipo y la expresión de las MMPs, adquiriendo la MMP-9 un papel importante (Jiang *et al.* 2013).

Se ha visto que el TWEAK aumenta la expresión de MMP-9 en miotubos murinos a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B y de p38MAPK (Figura 7). Además, los ratones deficientes en MMP-9 (knock-out) presentan menor degradación de la membrana basal tras la administración crónica de TWEAK (Li *et al.* 2009).

En base a todo lo anteriormente mencionado, sería interesante analizar el efecto del TWEAK sobre la migración celular y sobre la expresión y/o actividad de MMP-9 en los fibroblastos.

4.3. PAPEL DE LAS FIBULINAS EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN

Como ya se ha comentado previamente, los fibroblastos son considerados la principal fuente de

proteínas de la matriz extracelular, como pueden ser el colágeno y la fibronectina (Werner *et al.* 2007). Además de éstas, existen otras proteínas de matriz extracelular que sirven para modular el comportamiento y la función celular. Entre ellas está la familia de las fibulinas. Desde que en 1989 se identificó la primera fibulina (Argraves *et al.* 1989), se han descubierto otros 6 miembros de esta familia. En un primer momento se identificó a la fibulina-1 como una proteína intracelular que actuaba como unión entre las moléculas de adhesión y los componentes del citoesqueleto, por lo que se denominó “fibula” que en latín significa cierre o hebilla. Posteriormente, con métodos de secuenciación e inmuno-histoquímica, se vio que se trataba de una proteína secretada por las células implicada en la unión y estabilización de la matriz y en la mediación de distintos procesos celulares implicados en la remodelación tisular como el crecimiento, la adhesión o la motilidad celular (de *et al.* 2009; Timpl *et al.* 2003).

Las fibulinas se pueden dividir en dos clases, la I y la II, clasificadas según la longitud y los dominios estructurales (Yanagisawa *et al.* 2009). Entre las de clase II, o fibulinas cortas, se encuentra la fibulina-3. La fibulina-3 fue identificada por primera vez sobre-expresada en fibroblastos humanos senescentes provenientes de un paciente con Síndrome de Werner, que se caracteriza por un envejecimiento acelerado (Lecka-Czernik *et al.* 1995). Debido al papel que la fibulina-3 juega en la unión de las células con la matriz extracelular, se ha estudiado su

expresión y secreción en diferentes tipos de cáncer. No está claro todavía su papel, ya que se han encontrado los niveles séricos aumentados en mesotelioma (Pass *et al.* 2012), cáncer pancreático (Seeliger *et al.* 2009), carcinoma cervical (En-lin *et al.* 2010) y gliomas malignos (Hu *et al.* 2009). Sin embargo, se han encontrado niveles más bajos en cáncer colorrectal (Tong *et al.* 2011), de pulmón (Yue *et al.* 2007), de mama (Sadr-Nabavi *et al.* 2009), de próstata (Kim *et al.* 2011), carcinomas nasofaríngeos (Hwang *et al.* 2010) y carcinoma hepatocelular (Luo *et al.* 2013). En estos casos, la disminución en la expresión de la fibulina-3 se asocia con peor pronóstico del paciente y con un papel inhibitorio de la migración e invasión celular y se ha visto que en el caso del carcinoma nasofaríngeo podría ser llevado a cabo a través de la supresión de la actividad de AKT (Hwang *et al.* 2010).

Por otro lado, se ha comprobado que los niveles de fibulina-3 disminuyen tras un tratamiento con TNF- α de células amnióticas mantenidas en cultivo, aunque todavía no se conoce el mecanismo por el cual ocurre (Moore *et al.* 2009). Ya que la fibulina-3 puede tener un papel inhibitorio de la migración e invasión celular y que se ha descrito que el TNF- α disminuye la expresión de algunas de las fibulinas, parece interesante estudiar los efectos que el TWEAK podría tener sobre su expresión.

En resumen y como ya habíamos comentado, el TWEAK es una citoquina multifuncional que regula muchas

actividades celulares, entre las que encontramos la invasión y la migración (Wiley and Winkles 2003), ambos procesos implicados en la cicatrización de las heridas. Es interesante estudiar la implicación de esta citoquina en este proceso.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación es la caracterización de los efectos de TWEAK sobre la lipólisis, apoptosis y sensibilidad a la insulina en los adipocitos y su papel regulador de los procesos de migración de los fibroblastos, los cuales están implicados en la cicatrización de las heridas. Esto se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis comparativo de los efectos del TWEAK con los del TNF- α en adipocitos viscerales humanos: caracterización del papel de TWEAK como protector de la resistencia a la acción de la insulina inducida por el TNF- α .
2. Análisis del papel de TWEAK en los procesos de migración celular implicados en la cicatrización de las heridas utilizando fibroblastos embrionarios de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LÍNEAS CELULARES

1.1.1. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células fueron cultivadas en un incubador a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ y a una humedad relativa del 80%.

Para mantener la viabilidad celular y, en el caso de los adipocitos impedir que se indujera la diferenciación que ocurre cuando las células llegan a confluencia, se procedió a dividir las cuando cubrían el 80-90% de la placa. Para ello, se lavaban las células con PBS 1X un par de veces, y se incubaban alrededor de un minuto a 37°C con una solución al 0,25% de tripsina y 0,02% de EDTA. Pasado este tiempo, la reacción se detenía con DMEM/F12 o DMEM al 10% de suero, ya que el suero inhibe cualquier actividad enzimática posterior.

1.1.2. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

- LiSa-2. Liposarcoma Humano

LiSa-2 es una línea celular humana que proviene de un liposarcoma humano y que conserva una alta capacidad de diferenciación a adipocito maduro. (Wabitsch *et al.* 2000). Esta línea se utilizó como modelo celular de adipocitos humanos viscerales para los estudios de las rutas de señalización del TNF- α like Weak inducer of apoptosis (sTWEAK). Las células fueron cedidas por el Dr. Peter Möller (Universidad de Ulm, Alemania).

Se utilizó para su mantenimiento DMEM/F12 (1:1) al 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina y antibióticos. Para inducir su diferenciación a adipocitos maduros se utilizó un cóctel durante 10 días, compuesto por DMEM/F12, libre de suero, con antibióticos y suplementado con los reactivos que se indican a continuación:

Compuesto	Concentración
Transferrina	10µg/ml
NaHCO ₃	15mM
HEPES	15mM
Biotina	33µM
Pantotenato	17µM
Insulina	10nM
Triiodotironina	20pM
Cortisol	1µM

Tabla 1: composición del medio de diferenciación.

Transcurridos 3 ó 4 días de incubación con el cóctel de diferenciación, las LiSa-2 comienzan a acumular lípidos en su interior. Los ensayos los realizamos en el décimo día de diferenciación, cuando las células tienen ya fenotipo de adipocito maduro (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b).

- **Fibroblastos embrionarios murinos o MEFs**

Los MEFs p38α^{+/+} (wt) y p38α^{-/-} fueron inmortalizados por pases en nuestro laboratorio, a partir de embriones de

estadio E10.5. Estas células fueron mantenidas en DMEM con 10% de suero fetal bovino y antibióticos, y divididas al llegar a confluencia. A partir de estas líneas celulares se obtuvieron también en nuestro laboratorio MEFs wt y p38 α -/- con silenciamiento génico estable de fibulina-3, mediante la transfección con partículas lentivirales portadoras de un shRNA específico para fibulina-3 de ratón y selección posterior con puomicina. En este caso, las células fueron mantenidas con 1 μ g/ml de puomicina, la cual, se eliminaba para hacer el experimento.

1.1.3. CULTIVOS PRIMARIOS

Los adipocitos primarios humanos provienen de dos donantes con sobrepeso, con un Índice de Masa Corporal (IMC) menor de 20. Fueron obtenidos a partir de preadipocitos de origen visceral (riñón y vejiga) y adquiridos en Lonza Ibérica. Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, los preadipocitos se crecieron en un medio basal suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2mM de L-Glutamina y GA-1000 SingleQuots (50 μ g/ml de Gentamicina Sulfato y 37ng/ml de Anfotericina-B). De este medio, se reservaron 100ml que sirvieron para preparar el medio de diferenciación, al que se le añadió insulina, dexametasona, indometacina e isobutilmetilxantina a concentraciones que la casa comercial no especifica, pero que generaría un medio de diferenciación 2x.

Las células se crecieron hasta el 80-90% de confluencia, momento en el que se tripsinizaron y sembraron a una

confluencia de 9000 células/cm², para su posterior diferenciación a adipocitos maduros durante 12 días.

1.2. TRATAMIENTOS

Las células se privaron toda la noche en medio DMEM libre de suero, con baja concentración de glucosa (5,55 mM) y, en el caso de las LiSa-2 y los adipocitos primarios, suplementado con el 0,2% de albúmina sérica bovina. Al día siguiente se sustituyó el medio de cultivo por 1,5ml de medio fresco. Los tratamientos se realizaron sobre este medio con TNF α (20 ng/ml) o sTWEAK (100 ng/ml) a tiempos variables. En el caso de los pre-tratamientos con sTWEAK, se realizó una incubación de seis horas con sTWEAK, tras lo cual se añade el TNF α a las mismas concentraciones citadas.

Para estudiar la ruta de la insulina, se realizaron tratamientos a 50nM durante 10-20 minutos. En el caso de la apoptosis se trataron las células con 10 μ g/ml cicloheximida durante 24h.

1.3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS CON RNAs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA PARA PP2AC α (siRNA)

Para realizar la transfección, las células se sembraron y se diferenciaron durante diez días. A continuación, se realizó la transfección del siRNA de PP2AC α y de una mezcla de RNAs control (procedentes de Dharmacon; Lafayette, CO), en medio OPTIMEM libre de antibióticos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó en tubos separados la cantidad adecuada

del siRNA (tubo 1) y del agente de transfección, en este caso el DharmaFECT 1 (tubo 2). Tratando de mejorar las condiciones de transfección ajustamos los volúmenes de la siguiente manera:

Tipo de placa	TUBO 1		TUBO 2		Volumen de transfección
Pocillos	siRNA 100nM	OPTIMEM	Dharma-FECT 1	OPTIMEM	
6	20	180	10	190	1000
12	8	72	4	76	400

Tabla 2: Volúmenes, en μ l, por pocillo para diferentes formatos de placas de cultivo.

El contenido de los tubos se mezcló suavemente mediante pipeteo y se incubó cinco minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el contenido del tubo 1 se añadió al del tubo 2, se mezcló de nuevo pipeteando suavemente y se incubó durante 20 minutos. Finalmente, se añadió un volumen suficiente de medio OPTIMEM sin antibióticos hasta alcanzar el volumen de transfección elegido. Las células se incubaron en las condiciones habituales durante 24 horas, tras lo cual se cambió el medio, incubándolas con medio de mantenimiento. Las células fueron lisadas transcurridas setenta y dos horas de la transfección y se prosiguió con su análisis por western-blot.

2. ESTUDIO DE LAS FUNCIONES METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

2.1. MEDIDA DE LA CAPTACIÓN CELULAR DE GLUCOSA

El método utilizado para estudiar la captación celular de glucosa consistió en la incubación simultánea de las células en presencia de un sustrato no radiactivo (frío) y otro marcado radiactivamente a una concentración conocida durante un tiempo determinado. En este caso, utilizamos un análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-deoxi-D-(1-3H)-glucosa 11 Ci/mmol (GE Healthcare). Estos estudios se realizaron en ausencia de suero y glucosa, en un medio llamado KRP y compuesto por:

Compuesto	Concentración
NaCl	136 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1 mM
Na ₂ HPO ₄	5 mM
Hepes	20 mM
BSA	1% (p/v)

Tabla 3: composición del medio KRP.

Las células se lavaron 3 veces con medio KRP, y seguidamente se incubaron durante 30 minutos a 37°C en KRP en presencia o ausencia de insulina. La incorporación de 2-deoxi-

D-(1-3H)-glucosa, se determinó durante los últimos 10 minutos de la incubación con insulina, siendo la concentración final de glucosa del cóctel de reacción 50 mM (*D-Glucosa*, Sigma-Aldrich, G7528) y añadiendo 2-deoxi-D-(1-3H)-glucosa (250 nCi/ml). Transcurrido este tiempo las células se lavaron 3 veces consecutivas con KRP, se solubilizaron en 0.5 ml de NaOH 0.05N y la radiactividad de las mismas se determinó en un contador de centelleo líquido (LKB wallac, modelo 1209 Rackbeta). El número de desintegraciones por minuto (DPMs) obtenidas, se relativizó a la concentración de proteína previamente determinada mediante cuantificación de una alícuota de cada muestra, expresándose los resultados como pmol glucosa/mg proteína.

2.2. MEDIDA DE LA LIPÓLISIS

Para medir la lipólisis en las células se determinó la concentración de glicerol en el medio de cultivo. Para realizar esta determinación se utilizó un kit (Free Glycerol Determination Kit, Product Code FG0100 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) que permite determinar el glicerol liberado llevando a cabo una serie de reacciones acopladas, lo que produce quinoneimina, un compuesto que presenta un máximo de absorbancia a 540 nm. El incremento de la absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de glicerol en la muestra.

Los ensayos de medida de lipólisis se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en este kit. A partir de la medida de la absorbancia se puede calcular la concentración de glicerol, y ésta se relativiza a la cantidad de proteína,

previamente determinada mediante cuantificación de una alícuota de cada muestra. Los resultados se expresan como mmoles de glicerol/mg de proteína (% sobre el basal).

3. TÉCNICAS PARA ANALIZAR LA MUERTE CELULAR Y LA APOPTOSIS

3.1. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se analizó mediante una tinción con cristal violeta. Este método consiste en la cuantificación de las células que sobreviven a un proceso de toxicidad o muerte celular y se mantienen adheridas a las placas de cultivo (Drysdale *et al.* 1983).

Tras realizar los tratamientos correspondientes, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de Cristal Violeta (Sigma) al 0,2% en etanol al 2%. Posteriormente, se lavaron las placas con agua destilada para eliminar el exceso de cristal violeta y se dejaron secar. Por último, las células (que estarán teñidas con cristal violeta) se resuspendieron en SDS al 1% durante 20 minutos y se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 560 nm para cuantificar el cristal violeta.

3.2. VALORACIÓN DE LA APOPTOSIS: CUANTIFICACIÓN DE MONO- Y OLIGONUCLEOSOMAS.

La apoptosis fue medida mediante cuantificación de los

nucleosomas del citoplasma tras un estímulo apoptótico utilizando un kit comercial (Cell Death Detection ELISA, Roche, 11544675001) y siguiendo las instrucciones del fabricante,

4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

4.1.1. EXTRACTOS CELULARES TOTALES

Las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 80-150 μ l de tampón de lisis a 4°C, cuya composición es la siguiente:

Compuesto	Concentración
EDTA	5 mM
NaCl	50 mM
Pirofosfato sódico	30 mM
NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	100 μ M
Tris pH 7,6	10 mM

Tabla 4: composición del tampón de lisis.

Este tampón se conserva a 4°C y en el momento de su uso se añade 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina y 10 μ g/ml leupeptina. Las células se levantaron de la placa mediante raspado con un rascador. La suspensión resultante se homogenizó con un agitador tipo vórtex. Los lisados se centrifugaron a 13.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C y los

sobrenadantes obtenidos, donde se encontraban las proteínas totales, se transfirieron a tubos nuevos para su uso inmediato o congelación a -80°C .

4.1.2. EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos nucleares de los adipocitos maduros tratados con sTWEAK fueron obtenidos mediante el kit “Nuclear and Cytoplasmic Kit” siguiendo las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific, 78835). Las células se recogieron en PBS y se centrifugaron a 2300 r.p.m. durante 5 minutos y a 4°C . A continuación se eliminó el sobrenadante, dejando el precipitado lo más seco posible. Las células se lisaron utilizando un tampón comercial llamado CER I, agitándolas con un agitador tipo vórtex durante 15 segundos, tras lo que se incubaron 10 minutos en hielo. Luego se añadió otro tampón, CER II, se agitó 5 segundos, se incubó en hielo 1 minuto, se volvió a agitar 5 segundos y se centrifugó 5 minutos a 13.200 r.p.m. El sobrenadante contenía la fracción citoplasmática, que se transfirió a un tubo nuevo frío. El precipitado se resuspendió en el tampón CER frío, se agitó 15 segundos y se incubó en hielo durante 40 minutos, agitando 10 segundos en vórtex cada 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 10 minutos y a 4°C . El sobrenadante resultante de esta centrifugación contiene el extracto nuclear. Ambas fracciones se pueden usar en el momento o guardarse a -80°C .

4.1.3. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE MEMBRANA

Para realizar un fraccionamiento de membrana, las

células se lavaron con PBS 2 veces y se lisaron con el siguiente tampón:

Compuesto	Concentración
EDTA	2 mM
EGTA	2 mM
PMSF	1 mM
2-Mercaptoetanol	10 mM
Aprotinina	10 µg/ml
Leupeptina	10 µg/ml
Tris pH 7,4	20 mM

Tabla 5: composición del tampón de homogeneización.

A continuación, se homogenizaron con la ayuda de un homogenizador mecánico (Dounce) de vidrio. Posteriormente, se centrifugaron las células durante diez minutos, a 13.200 rpm y a 4°C. Tras esta primera centrifugación precipitaron los núcleos. Se centrifugó el sobrenadante a 13.200 rpm durante 45 min – 1 h y también a 4°C. El sobrenadante resultante de esta centrifugación será la fracción citosólica, que se puede usar en el momento o guardarse a -80°C.

Por otro lado, el precipitado se lavó tres veces con el tampón de homogenización; luego se resuspendió en 50µl de tampón de homogenización con Tritón X-100 al 1% y se dejó 1h en hielo, tras lo que se centrifugó nuevamente a 4°C y 13.200 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación es la fracción de membrana (que se puede usar en el momento o

guardarse a -80°C), mientras que el precipitado es el citoesqueleto.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó con el método de Bradford (1976), utilizando como patrón concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina (BSA). Se utilizó la solución comercial "Bio-Rad Protein Assay", diluida 1/5 (v/v) con agua destilada. La cuantificación se realizó mediante la adición del reactivo de Bradford y la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm.

4.3. ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT

4.3.1. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Las proteínas de los extractos celulares totales, nucleares o de la fracción de membrana se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) o mediante el uso de geles Anderson (sin SDS en el gel), con los que se obtiene una mejor separación de las proteínas fosforiladas con movilidad electroforética semejante.

El gel de poliacrilamida que se utilizó tenía la siguiente composición:

Compuesto	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida/Bis-acrilamida	30%	30%
Tris	1M pH 6,8	1,5M pH 8,8
SDS	10% (p/v)	10% (p/v)
Persulfato amónico (PSA)	10% (p/v)	10% (p/v)
TEMED	0,243%	0,243%

Tabla 6: composición de los geles de poliacrilamida.

En el caso de los geles Anderson, la composición fue la siguiente:

Compuesto	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida	30%	30%
Bis-acrilamida	1%	1%
Tris	1M pH 6,8	1,5M pH 8,8
Persulfato amónico (PSA)	10% (p/v)	10% (p/v)
TEMED	0,243%	0,243%

Tabla 7: composición de los geles de poliacrilamida.

La composición del tampón de electroforesis para los geles de poliacrilamida con SDS fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
Tris pH 8,3	25 mM
Glicina	200 mM
SDS	0,1% (p/v)

Tabla 8: composición del tampón de electroforesis.

La composición del tampón de electroforesis para los geles tipo Anderson fue la siguiente:

Compuesto	Concentración
Tris pH 8,3	50 mM
Glicina	400 mM
SDS	0,1% (p/v)

Tabla 9: composición del tampón de electroforesis.

Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100V.

4.3.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P©, Millipore, España) mediante transferencia húmeda. La composición del tampón de transferencia es la siguiente:

Compuesto	Concentración
Tris pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% (v/v)

Tabla 10: composición del tampón de transferencia.

La transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V durante 60-70 minutos.

4.3.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Tras la transferencia, la membrana se incubó durante 1-2

horas en una solución de bloqueo, preparada con TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) para bloquear las uniones inespecíficas.

Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20) durante toda la noche y a 4°C. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 11. Tras esta incubación se realizaron 4 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con el tampón de lavado TTBS. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario y con él se incubó la membrana durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron otros 4 lavados con TTBS y se procedió al revelado, utilizando el reactivo de detección ECL comercializado por GE Healthcare, GB (www.gehealthcare.com).

Anticuerpo	Laboratorio	Referencia
β -Actina	Sigma-Aldrich	A-5441
Lamin A	Sigma-Aldrich	L1293
Fosfo-IRS-1 Tyr 612	Millipore	PS1010-10T
IRS-1	Millipore	06-248
GLUT4	Millipore	AB-1346
Fosfo-ERK 1/2	Cell Signaling	9101
Fosfo-AKT Ser 473	Cell Signaling	9271
AKT	Cell Signaling	9272
Fosfo-JNK ½	Cell Signaling	9251
Fosfo-p38 MAPK	Cell Signaling	9211
Fn14	Cell Signaling	4403

Anticuerpo	Laboratorio	Referencia
IκB-α	Santa Cruz	sc-371
IκB-β	Santa Cruz	sc-945
TRAF2	Santa Cruz	sc-876
Caveolin-1	Santa Cruz	sc-894
NFκB p52	Santa Cruz	sc-298
TNF-R1	Santa Cruz	sc-73195
TNF-R2	Santa Cruz	sc-80379
Fibulin-3	Santa Cruz	sc-99177
P-TAK1 (T187)	Abcam	ab79583
TAK1	Abcam	ab79354
TNF-RII (p75/p80)	Hycult Biotech	HM2007
TNFR1/TNFRSF1A	R&D Systems	AF225

Tabla 11: Anticuerpos empleados en el análisis de proteínas mediante *Western Blot*.

⁽¹⁾ Millipore, Bedford, MA, USA. <http://www.millipore.com>

⁽²⁾ Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA.
www.cellsignal.com

⁽³⁾ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.
www.scbt.com

⁽⁴⁾ Abcam, Cambridge, UK. www.abcam.com

⁽⁵⁾ Hycult Biotech, Plymouth Meeting, PA, USA.
<http://www.hycultbiotech.com>

⁽⁶⁾ R&D Systems, Abingdon, UK. www.chemicon.com

4.4. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y ANÁLISIS DE FIBULINA-3

Los medios de cultivo se recogieron tras el tratamiento con los estímulos y las proteínas totales se cuantificaron para poder normalizar los medios respecto a la cantidad de células existentes. A continuación, se analizaron mediante western-blot, en las mismas condiciones que los extractos totales de proteínas, para estudiar la cantidad de Fibulina-3 secretada por las células.

5. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.

La cuantificación de los niveles de RNAm mediante PCR cuantitativa requiere tres pasos: el aislamiento del RNA total, la conversión del RNA en cDNA mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa (retrotranscriptasa (RT) y la amplificación y cuantificación del cDNA usando la técnica de PCR a tiempo real (Nolan *et al.* 2006).

5.1. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL

Tras incubar las células con los distintos estímulos, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las placas 3 veces con PBS frío. Posteriormente, se aisló el RNA utilizando un sistema comercial de columnas RNeasy Mini Kit (Quiagen; Cat No 74104)/ Ribospin (Geneall Biotechnology; 304-150) según las indicaciones del fabricante y añadiendo una digestión con DNasa (Quiagen; Cat No 79254) para evitar posibles contaminaciones con DNA genómico.

Tras la elución con agua de las muestras, se pueden guardar a -80°C o continuar con su análisis. Se cuantifican y se determina su pureza mediante una lectura espectrofotométrica a 260, 280 y 310nm en una cubeta de cuarzo. La relación A_{260}/A_{280} refleja el grado de pureza de las muestras, y en condiciones óptimas debe situarse entre 1.8 y 2. Para calcular la concentración del RNA hay que tener en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cubeta.

5.2. SÍNTESIS DEL cDNA

Para la síntesis del cDNA se utilizaron entre 1 y 3 μg del RNA total. En primer lugar, se preparó un tubo para cada muestra con los μl de RNA necesarios, oligonucleótidos (“random primers” para la síntesis de cDNA; Roche 10814270001), 0,5mM de la mezcla de desoxirribonucleótidos (MBL 017) y se ajustó con H_2O hasta un volumen final de 13 μl . Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización del RNA, eliminando así las posibles estructuras secundarias formadas. Posteriormente, y tras una incubación a 4°C durante 1 minuto, se añadió a cada tubo 7 μl de una mezcla formada por: tampón de reacción 5x , 20 Unidades del inhibidor de RNasas (Promega; N2118), 5 mM DTT (Invitrogen) y 200 unidades de transcriptasa inversa (Superscript III Reverse Transcriptase; Invitrogen 18080-040), completándose con H_2O hasta un volumen final de 20 μl . Finalmente, se incubaron los tubos a 50°C durante 1 hora para llevar a cabo el proceso de síntesis del cDNA. La reacción se

detuvo inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. El cDNA se guardó a -20°C.

5.3. PCR CUANTITATIVA

El cDNA obtenido a partir del RNA fue analizado por PCR a tiempo real en un 7900 Fast Real Time System (Life Technologies), utilizando primers específicos (recogidos en la Tabla 12) y el reactivo SYBR Green (Life Technologies).

Se amplificaron 2,5 µl de cada cDNA en un volumen final de reacción de 10 µl. Se utilizó una placa de 384 pocillos en la que cada muestra se analizó por triplicado utilizando como controles muestras de RNA y H₂O (por duplicado). La cantidad de cDNA de cada muestra se normalizó amplificando GAPDH como control endógeno.

Gen	Forward (5'-3')	Tm	Reverse (5'-3')	Tm
Fibulina-3	GAATGTGATGCCA GCAACC	64,2°C	TCACAGTTGAGTCT GTCACTGC	63,2°C
MMP-9	CAAACCCTGTGTG TTCCCGT	67,1°C	TGGTCATAGTTGGC TGTGG	65,9°C
MMP-10	AACACGGAGACTT TTACCTT	62,7°C	GGTGCAAGTGCCA TTTCTCA	65,1°C
MMP-13	TTGGTCCCTGCC CCTTCCCTA	72,2°C	CGCAAGAGTCGC AGGATGGT	69,9°C
GAPDH	CATCGAAGGTG GAAGAGT	64,6°C	CATCAAGAAGGT GGTGAA	62,3°C

Tabla 12: Secuencias de los Primers utilizados en la PCR cuantitativa.

Es importante saber que la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se analiza en la zona en la que la reacción se hace lineal. El programa informático que analiza la emisión de fluorescencia de cada muestra, coloca el nivel de detección o umbral en dicha zona, que suele coincidir con la parte baja de la curva en las representaciones exponenciales. El punto de corte del umbral con la curva, se conoce como Ct y hace referencia al ciclo de amplificación de la muestra. Por tanto, el ciclo en el que comienza a detectarse la fluorescencia debida al producto de PCR se designa como Ct. En nuestros ensayos, como cada análisis se realizó por triplicado, se calculó la media de los Ct, y a ésta se le restó la media del Ct de GAPDH, gen que en nuestro caso consideramos como control endógeno. De esta forma, se obtuvo el ΔCt . A su vez, a este valor, se le restó el ΔCt de la muestra que vaya a tomarse como referencia de expresión normal (control) y se obtiene así el $\Delta\Delta Ct$. Su valor negativo en potencia de base 2 será el RQ. El dato de RQ se calcula debido a que supone una ayuda visual a la hora de entender el resultado, pero no constituye una escala lineal. La interpretación del valor RQ es la siguiente:

- $RQ < 0,5$: Se considera que existe menos del 50 % de número de copias que la muestra considerada como referencia normal de expresión.
- $RQ = [0,5 - 2]$: Se considera como nivel de expresión normal al estar comprendido entre ± 50 % de lo considerado como normal, valor representado por la unidad.

- RQ > 2: Indica niveles superiores al 50 % de la expresión designada como normal.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

6.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA PP2A

La actividad PP2A fue determinada en los adipocitos humanos usando un kit comercial que permite valorar la actividad de distintas serina/treonina fosfatasas (Ser/Thr Phosphatase assay kit, Promega V22460) según el tampón que se utilice. Mediante este método se cuantifica el fosfato libre generado en la reacción espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 600-630 nm de un complejo formado por una sonda de molibdato/verde malaquita unida a fosfatos. Los lisados celulares fueron obtenidos a 4°C con un tampón cuya composición se describe a continuación:

Compuesto	Concentración
Hepes pH 7,4	20 mM
Glicerol	10 %
NP40	0,1 %
2-Mercaptoetanol	30 mM
EGTA	1 mM

Tabla 13: composición del tampón de lisis para medir la actividad PP2A.

Los lisados celulares suelen contener concentraciones milimolares de fosfato libre que podrían interferir con el análisis. Por ello, fue necesario eliminar esos componentes de las

muestras utilizando un paso previo de cromatografía de exclusión. El kit proporciona columnas y resinas de sephadex para realizarlo. La actividad fosfatasa fue analizada siguiendo el protocolo del fabricante y usando un tampón específico para PP2A, compuesto por:

Compuesto	Concentración
Imidazol pH 7,2	50 mM
EGTA	0,2 mM
2-Mercaptoetanol	0,03 %
BSA	0,1 mg/ml

Tabla 14: composición del tampón de reacción para medir la actividad PP2A.

6.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GELATINASA MMP-9

Para el estudio de la actividad de la gelatinasa MMP-9 se utilizaron geles de poliacrilamida con un 1% de gelatina en condiciones no desnaturalizantes. Los medios de cultivo (sin suero) se recogieron tras el tratamiento y las proteínas se cuantificaron para poder normalizar los medios respecto a la cantidad de células existentes. Se analizó el medio correspondiente a 100-140 μg de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS al 8%, copolimerizados con 1 mg/ml de gelatina. Los geles se corrieron a 100V durante 4 horas. Tras la electroforesis, los geles se lavaron en una solución de Tritón X-100 al 2,5% en agua durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente, para eliminar el SDS. La actividad

gelatinasa se desencadenó durante la incubación con Tampón Gelatinasa o Tampón Sustrato durante la noche y a 37°C. Este tampón está compuesto por:

Compuesto	Concentración
NaCl	0,2 M
CaCl ₂	5 mM
Tritón X-100	1 %
NaN ₃	0,02%
Tris-HCl pH 7,5	50 mM

Tabla 15: composición del tampón gelatinasa para medir la actividad de MMP9.

Por último, se tiñeron los Zimogramas con una solución de Azul de Coomasie al 30% de metanol y 10% de ácido acético glacial a temperatura ambiente y durante 60 minutos.

7. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR MEDIANTE CIERRE DE HERIDA

Para estudiar la velocidad de migración de las células, éstas se sembraron en placas de cultivo de 6 cm de diámetro a confluencia. Al día siguiente se lavaron con PBS atemperado para eliminar los restos de FBS y se sustituyó el medio por medio sin suero (para restringir la proliferación celular). A continuación, se trataron durante 30 minutos con Mitomicina C (25 µg/ml), un inhibidor de la mitosis celular, para asegurarnos de que la migración que vemos se debe

solamente al movimiento celular y no a la proliferación. Tras el tratamiento con Mitomicina C, se realizó una brecha en la monocapa celular con una punta de pipeta estéril y se lavaron con PBS para eliminar todas las células que se hubieran levantado de la placa. Luego, se incubaron con medio sin suero fresco, con los tratamientos a estudiar.

La migración de las células se monitorizó mediante un microscopio de contraste de fases (Eclipse TE300, Nikon) y con una cámara digital acoplada a él (Nikon digital sight DS-U2). Se tomaron fotografías a 10X a tiempo 0 (tras la realización de la herida) y tras 8, 12, 20, 24, 30, 36 y 48 horas de incubación. Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones, se midió la superficie que ésta ocupaba a los distintos tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de cierre.

8. ESTUDIO ESTADÍSTICO

En esta memoria, las representaciones gráficas se expresan como la media aritmética de valores de entre 3-10 experimentos independientes y su error estándar (S.E.M.). En experimentos en los que se utilizan autoradiografías, se emplearon diferentes tiempos de exposición para asegurar que las bandas no estaban saturadas y posteriormente se cuantificaron por análisis densitométrico.

Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia de dos medias, se ha utilizado el test de la t de Student. Una vez calculado el valor de t, se obtiene el grado de

significación de la diferencia correspondiente, considerándose significativo a partir de $p < 0.01$. En el caso en el que se comparen más de dos medias, el cálculo del grado de significación estadística se ha determinado mediante el análisis de la varianza (ANOVA)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EFECTOS DEL sTWEAK SOBRE LOS ADIPOCITOS VISCERALES HUMANO

1. El sTWEAK presenta propiedades beneficiosas en los adipocitos viscerales humanos

Numerosos estudios demuestran la relación existente entre obesidad visceral y diabetes de tipo 2 (Despres 2006; Fernandez-Veledo *et al.* 2009a; Montague and O'Rahilly 2000; Smith *et al.* 2012; van Greevenbroek *et al.* 2013). En este sentido, el tejido adiposo es clave en el estado inflamatorio crónico de baja intensidad presente en los individuos obesos (Bouloumie *et al.* 2005; Canello and Clement 2006; Ramirez Alvarado and Sanchez 2012). El sTWEAK es una citoquina multifuncional, de la familia del TNF- α , capaz de controlar muchas actividades celulares, como proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis e inflamación (Winkles 2008), que dependen del contexto celular. Se ha visto que sus efectos pueden ser similares a los del TNF- α o, por el contrario, modular sus efectos metabólicos. En 2008 se había descrito al sTWEAK como la citoquina causante de la resistencia a la insulina en dos líneas celulares de hepatocarcinoma y en hepatocitos primarios de rata, inhibiendo la señalización temprana a nivel del receptor de insulina (Feng *et al.* 2008). Por ello, proponían que esta citoquina podría estar relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina en el hígado y probablemente, de la diabetes tipo 2 a nivel sistémico. Sin embargo, las funciones que el sTWEAK podría tener sobre el desarrollo de la resistencia a la insulina en los adipocitos

humanos no se habían estudiado. Por otro lado, se ha descrito que el sTWEAK juega un papel importante en la etiología de algunas enfermedades inflamatorias crónicas (Dohi and Burkly 2012; Izquierdo *et al.* 2012; Michaelson *et al.* 2012).

Para estudiar los posibles efectos que esta citoquina podría ejercer sobre los adipocitos, se utilizó la línea celular humana LiSa2 como modelo celular de adipocito humano maduro (Fernandez-Veledo *et al.* 2008; Fernandez-Veledo *et al.* 2009b; van Beek *et al.* 2008; Wabitsch *et al.* 2000) así como cultivos primarios de adipocitos viscerales humanos.

Se ha postulado que, en el contexto de la obesidad, el TNF- α podría jugar un papel importante en la regulación auto/paracrina de la expansión del tejido adiposo, a expensas de inducir resistencia a la acción de la insulina (Hube and Hauner 1999). Así, el TNF- α estimularía la liberación de ácidos grasos (AG) a partir de triacilglicéridos (TAG) y afectaría a la viabilidad celular, pero también disminuiría la sensibilidad a la insulina. Por todo ello, y en base a la bibliografía existente, se decidió abordar el estudio desde dos ángulos diferentes:

- Comparando los efectos del sTWEAK con los del TNF- α en los adipocitos humanos maduros.
- Estudiando una posible modulación de los efectos del TNF- α por parte del sTWEAK. Para ello, se llevó a cabo un pre-tratamiento de las células con sTWEAK durante 6h y posteriormente se

realizaron los tratamientos con TNF- α . Se decidió hacer un pre-tratamiento de las células en base a la bibliografía existente, en la que comprobaban que un pre-tratamiento con sTWEAK sensibilizaba a las células frente a la apoptosis inducida por el TNF- α (Wicovsky *et al.* 2009).

1.1 El sTWEAK no sensibiliza a las células frente a la muerte celular por apoptosis inducida por el TNF- α

El TNF- α disminuye de manera significativa la viabilidad celular en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la traducción que impide la síntesis de proteínas de supervivencia inducidas por NF- κ B (Reid *et al.* 1989). Se cree que éste podría ser uno de los mecanismos que el TNF- α utiliza para controlar la masa de tejido adiposo. En este sentido, podría considerarse que el TNF- α presenta un papel “beneficioso” en el control de la expansión de los adipocitos. Por ello, decidimos analizar la sensibilidad de los adipocitos humanos viscerales a la muerte celular inducida por el sTWEAK, así como una posible modulación de los efectos apoptóticos del TNF- α por el sTWEAK.

Analizamos en primer lugar la viabilidad celular en presencia del TNF- α y el sTWEAK, mediante la tinción con Cristal Violeta. Observamos que el sTWEAK, al igual que el TNF- α , inducía muerte celular sólo en el caso de que existiera un tratamiento conjunto con cicloheximida

(Figura 8). Hay que destacar, que el efecto producido por el sTWEAK sobre la viabilidad celular era menor que el detectado en aquellas células que habían sido tratadas con TNF- α . Así, en el caso del TNF- α , la muerte generada alcanzaba al 75-80% de las células y en el del sTWEAK sólo al 30-40%.

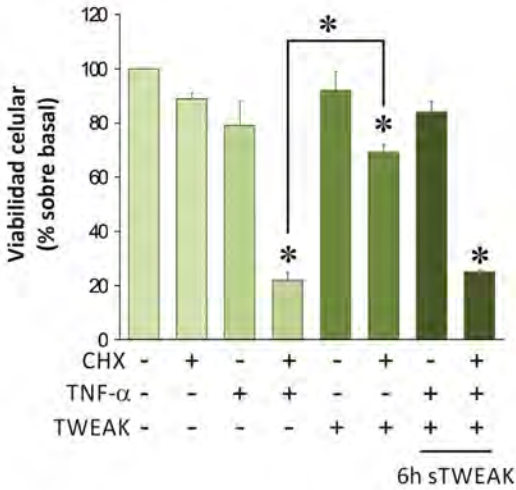


Figura 8: Medida de la viabilidad celular tras el tratamiento con TNF- α y sTWEAK. Las células LiSa diferenciadas durante 10 días fueron tratadas en presencia o ausencia de cicloheximida 10 μ g/ml, TNF- α 20 ng/ml y/o sTWEAK 100 ng/ml durante 24 horas. La medida de la viabilidad celular se realizó mediante una tinción con cristal violeta y su posterior lectura de absorbancia a 560nm. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de 4 experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje sobre el basal (control = 100). * p <0.01

Por otro lado, comprobamos que el pre-tratamiento con sTWEAK durante 6 horas no sensibilizaba a la muerte celular inducida por TNF- α , al contrario de los que se había descrito previamente en diferentes células tumorales (Vince *et al.* 2008).

Con el objetivo de saber si los cambios detectados en la viabilidad celular eran consecuencia de la activación de procesos apoptóticos, analizamos la liberación de nucleosomas en las diferentes condiciones experimentales. La acumulación de los nucleosomas en el citoplasma nos permite detectar las células apoptóticas. Tal y como se observa en la Figura 9, el tratamiento de los adipocitos tanto con el TNF- α como con el sTWEAK aumenta de manera considerable la cantidad de nucleosomas presente en las células. Además, y en consonancia con los resultados de viabilidad celular (Figura 8), observamos que el pre-tratamiento con el sTWEAK no altera los niveles de nucleosomas que genera el TNF- α por sí sólo. Por tanto, la cuantificación de la liberación de nucleosomas nos indica que el tipo de muerte celular que está teniendo lugar es apoptosis y confirma los resultados previos obtenidos con cristal violeta.

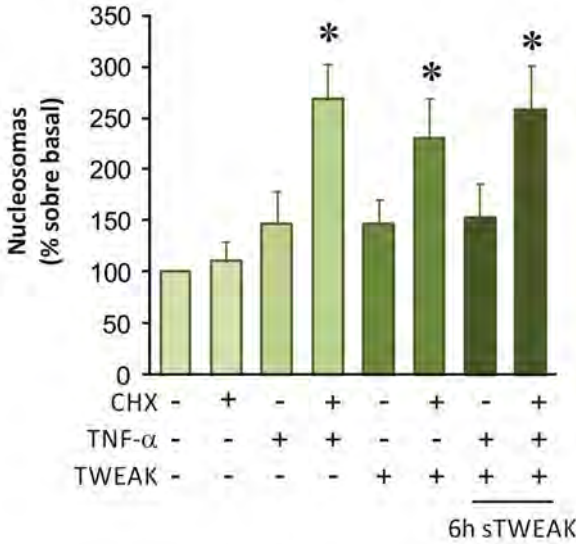


Figura 9: Medida de la apoptosis tras los tratamientos con TNF- α y sTWEAK. Las células fueron tratadas como en la FIG . La medida de apoptosis se realizó mediante la valoración del % de nucleosomas respecto al control. Los resultados están representados como media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.01$

En resumen, tanto el TNF- α (Carbo *et al.* 2002; Reid *et al.* 1989; Shakibaei *et al.* 2005; Sidoti-de *et al.* 1998; Varfolomeev and Ashkenazi 2004) como el sTWEAK (Chicheportiche *et al.* 1997; Marsters *et al.* 1998; Wiley and Winkles 2003)(Echeverry *et al.* 2012; Haile *et al.* 2010; Lynch *et al.* 1999; Nakayama *et al.* 2002; Potrovita *et al.* 2004; splat-Jego *et*

al. 2002) pueden inducir apoptosis en adipocitos humanos. Sin embargo, en este contexto, el sTWEAK no es capaz de sensibilizar a las células frente a la muerte inducida por TNF- α , tal y como se había descrito en modelos tumorales (Vince *et al.* 2008). Por tanto, estos resultados parecen indicar que los efectos del sTWEAK son, probablemente, específicos de tejido.

1.2. El sTWEAK no tiene efectos lipolíticos en los adipocitos viscerales humanos

La lipólisis es el proceso en el que los TAG son hidrolizados dando lugar a la liberación de AG y glicerol, por lo que la medida de la lipólisis se puede llevar a cabo cuantificando cualquiera de los productos generados en la reacción. En este caso, analizamos el grado de lipólisis mediante la cuantificación de la liberación de glicerol al medio de cultivo. Tal y como se observa en la Figura 10, comprobamos que, en los adipocitos humanos, el TNF- α presenta un potente efecto lipolítico, tal y como se había descrito previamente (Ryden *et al.* 2004; Souza *et al.* 2003; Yang *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2002). Por el contrario, el tratamiento con el sTWEAK no incrementa la liberación de glicerol al medio, en concordancia también con lo descrito anteriormente (Tiller *et al.* 2009). Esto indica que, a pesar de que ambas citoquinas pertenecen a la misma familia, difieren en sus efectos metabólicos, al menos, en el caso de los adipocitos. Además, observamos que el pre-tratamiento con el sTWEAK no altera la lipólisis dependiente del TNF- α , lo que parece indicar que el

sTWEAK no altera ni los efectos sobre la apoptosis ni sobre la lipólisis que el TNF- α lleva a cabo en los adipocitos.

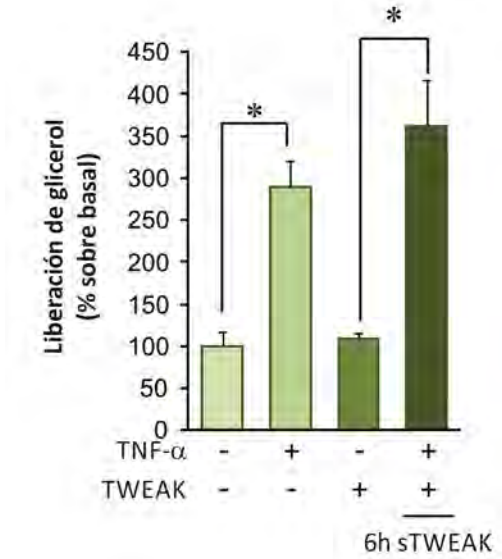


Figura 10: Medida de la liberación de glicerol tras los tratamientos con TNF- α y sTWEAK. Las células diferenciadas fueron tratadas en presencia o ausencia de TNF- α 20 ng/ml y/o sTWEAK 100 ng/ml durante 24 horas. Se midió la tasa lipolítica cuantificando la liberación de glicerol al medio. Los resultados son la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado y están expresados como porcentaje de estimulación sobre el basal (control = 10,69 \pm 0,75 nmol glicerol/mg proteína/3h). *p<0.01

1.3. El sTWEAK revierte la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α a nivel del transporte de glucosa

Evaluamos los efectos del sTWEAK sobre el transporte de glucosa con el objetivo de analizar si, al igual que el TNF- α , podría estar modulando la captación basal de glucosa y/o la sensibilidad a la insulina. De acuerdo a los resultados previos de nuestro laboratorio, el TNF- α genera resistencia a la insulina a nivel de la captación de glucosa en los adipocitos viscerales humanos y no en los subcutáneos (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b). Por el contrario, en nuestro contexto celular, observamos que el sTWEAK no modula la captación de glucosa, ni en estado basal, ni tras la estimulación con insulina (Figura 11), de manera similar a resultados previos obtenidos en adipocitos de origen subcutáneo, donde no se habían detectado cambios en la sensibilidad a la insulina sobre la captación de glucosa (Tiller *et al.* 2009).

Sorprendentemente, al estudiar el posible efecto del pre-tratamiento con el sTWEAK (al igual que se había hecho en la apoptosis y la lipólisis sin detectar cambios) se comprobó que se recuperaba el transporte de glucosa en respuesta a la insulina que el TNF- α alteraba. Por tanto, se revertía la resistencia a la insulina inducida por TNF- α . Se obtuvieron resultados similares cuando el tratamiento con ambas citoquinas se realizaba de manera simultánea (datos no mostrados).

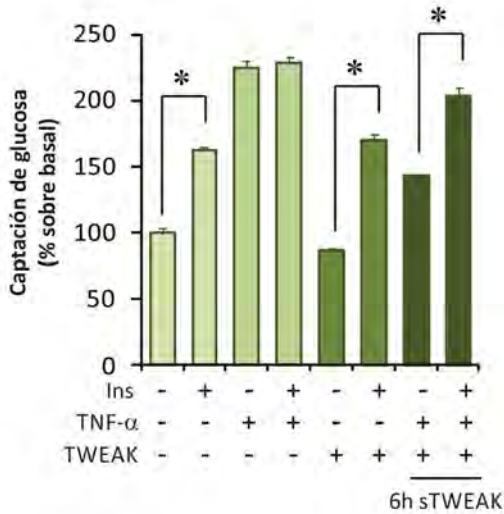


Figura 11: Medida de la captación de glucosa tras los tratamientos con TNF- α y sTWEAK. Las células fueron tratadas con 50nM de insulina durante 30 minutos, en presencia o ausencia de TNF- α 20 ng/ml y/o sTWEAK 100 ng/ml. La captación de glucosa se midió durante los últimos 10 minutos de estimulación con insulina mediante la incorporación de 2-deoxiglucosa en las células. Se muestra la media \pm S.E.M. de los resultados de 5 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados como porcentaje de estimulación sobre el basal (control = $7,26 \pm 0,53$ pmol glucosa/mg proteína/ 10min). * $p < 0.01$.

En los adipocitos maduros la captación de glucosa está mediada principalmente por los transportadores de glucosa independientes de Na (GLUTs). Concretamente, los adipocitos expresan principalmente los transportadores GLUT1, responsable de la captación basal

de glucosa, y GLUT4, el transportador de glucosa dependiente de la acción de la insulina (Wood and Trayhurn 2003). Otros transportadores, como el GLUT3, aumentan mucho su expresión en adipocitos en determinadas condiciones como puede ser la hipoxia (Wood *et al.* 2007). Comprobamos en primer lugar si los niveles de expresión de estos transportadores se veían alterados tras los tratamientos con el TNF- α y/o el sTWEAK. Como se observa en la Figura 12, ni el TNF- α ni el sTWEAK modulan los niveles proteicos de los transportadores GLUT1, GLUT3 o GLUT4.

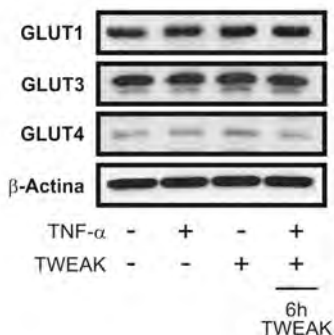


Figura 12: Análisis de los niveles de expresión de los transportadores de glucosa tras el tratamiento con TNF- α y sTWEAK. Las células fueron cultivadas como en la figura 10. Las proteínas totales fueron analizadas por western-blot utilizando anticuerpos para GLUT1, GLUT3, GLUT4 y β -actina. Se presentan inmunoblots representativos de 3 experimentos.

Posteriormente, analizamos un posible efecto del sTWEAK sobre la redistribución de los diferentes transportadores a la membrana plasmática, para lo cual las células se sometieron a fraccionamiento subcelular y la fracción de membrana se analizó mediante western-blot.

Como se muestra en la Figura 13, ni la insulina, el TNF- α o el sTWEAK son capaces de causar la traslocación de GLUT1 o GLUT3 a la membrana plasmática. Por el contrario, tal y como se había descrito previamente en nuestro laboratorio (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b), el TNF- α induce la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática de manera similar a la inducida por la insulina (Figura 13). Este efecto se correlaciona con el incremento en el transporte basal de glucosa (Figura 11). No obstante, el TNF- α disminuye claramente la translocación de GLUT4 a la membrana dependiente de insulina, datos que corroboran los resultados del transporte (Figura 11) y son indicativos de resistencia a la acción de la insulina. El pre-tratamiento con el sTWEAK por el contrario, restaura la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Figura 13) y la captación de glucosa (Figura 11), en respuesta a la insulina, a pesar de la presencia de TNF- α .

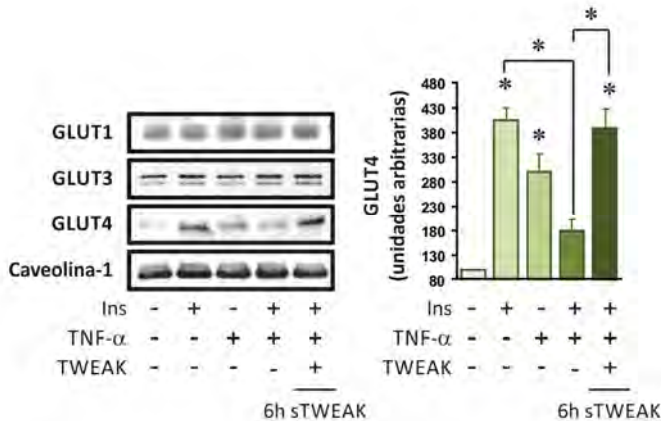


Figura 13: Medida de los niveles de GLUTs tras los tratamientos con TNF- α y sTWEAK. Las células fueron cultivadas como en la figura 10 antes de ser tratadas con 50nM de insulina durante 20 minutos y ser sometidas a fraccionamiento subcelular. Las proteínas de la membrana plasmática fueron analizadas por western-blot utilizando anticuerpos para GLUT1, GLUT3, GLUT4 y caveolina-1. Se presentan inmunoblots representativos y las medias \pm S.E.M. de las cuantificaciones mediante análisis densitométricos de 3 experimentos. *, P<0,01.

1.4. El sTWEAK revierte la resistencia a la insulina inducida por TNF- α a nivel de IRS1, AKT y AS160

Nuestros estudios sobre la sensibilidad a insulina en el transporte de glucosa y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática sugerían que el pre-tratamiento con el sTWEAK protegía frente a la resistencia a insulina inducida por TNF- α . A nivel molecular corroboramos dicha

hipótesis analizando diferentes elementos de la cascada de señalización de la insulina. Tal y como se había demostrado previamente, el TNF- α disminuye la fosforilación de IRS1 (Tyr612) y de AKT (Ser473), provocando una menor respuesta a la insulina a nivel de la captación de glucosa (Figura 14) (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b).

Por el contrario, y en concordancia con los

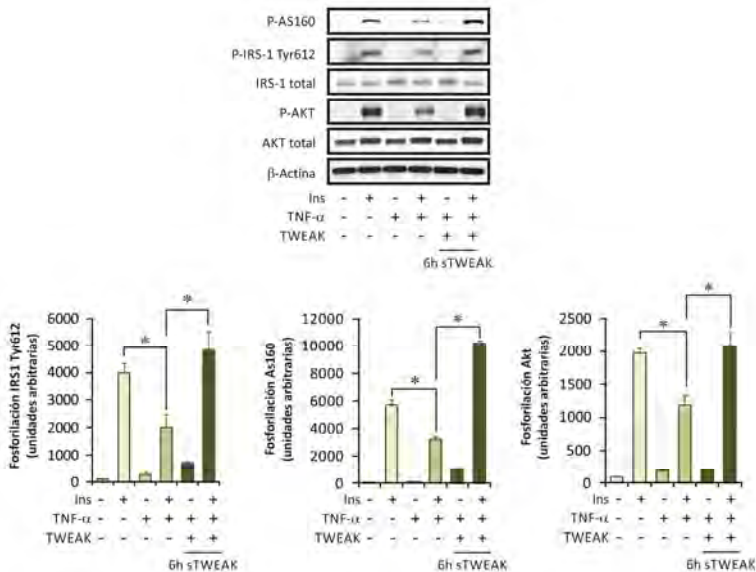


Figura 14: El tratamiento con sTWEAK revierte la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α a nivel de IRS1/AKT/AS160. Los lisados de células diferenciadas cultivadas en presencia o ausencia de TNF- α y/o sTWEAK antes de ser tratadas con insulina (50nM) durante 10 minutos, se analizaron por western-blot utilizando anticuerpos contra las formas totales o fosforiladas de IRS1 (Tyr612), AKT (ser473) y AS160 (Thr642). Se presentan inmunoblots representativos junto con sus cuantificaciones (media \pm S.E.M.) mediante análisis densitométrico de las formas fosforiladas respecto a las totales (3 experimentos independientes). *, P<0,01.

resultados sobre el transporte de glucosa, se observó que un pre-tratamiento con el sTWEAK en los adipocitos viscerales humanos recuperaba la ruta de señalización de la insulina, tanto a nivel de AKT como de IRS1 (Figura 14). Además, la fosforilación del sustrato de AKT, AS160, que controla la retención y liberación de GLUT4 hacia la superficie celular (Lansey *et al.* 2012), que también está afectada cuando tratamos las células con el TNF- α , se restaura con el pre-tratamiento con el sTWEAK (Figura 14).

En resumen, el sTWEAK induce apoptosis en los adipocitos maduros en menor medida que el TNF- α . Sin embargo, no altera las funciones metabólicas de los adipocitos maduros en lo que a lipólisis o transporte de glucosa se refiere, a diferencia de lo que estaba descrito para células de hepatocarcinoma humano y hepatocitos primarios de rata (Feng *et al.* 2008) y al contrario de lo que ocurre con el TNF- α (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b). Esto parece indicar que, a pesar de que estas dos citoquinas son de la misma familia, las rutas de señalización desencadenan en los adipocitos viscerales humanos deben ser diferentes. Por otro lado, al analizar la posible modulación que el sTWEAK podría ejercer sobre los efectos del TNF- α cuando pre-tratamos 6h las células, nos encontramos con resultados dispares. Al estudiar la apoptosis y la lipólisis no se observó ninguna modificación de los efectos del TNF- α , que producía un aumento de ambos procesos en los adipocitos humanos. Por otro lado,

al analizar los efectos del pre-tratamiento con el sTWEAK sobre el transporte de glucosa, descubrimos que éste ejercía un papel protector sobre la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α en los adipocitos viscerales humanos. Estos resultados sugerirían un posible efecto beneficioso del sTWEAK en un contexto de obesidad, restaurando la sensibilidad a la insulina sin modificar los efectos del TNF- α dirigidos a limitar la masa de adipocitos, como la lipólisis o la apoptosis.

2. El sTWEAK activa la ruta no canónica de NF- κ B en los adipocitos viscerales humanos

Para intentar dilucidar las posibles diferencias en las rutas de señalización activadas por TNF- α y/o sTWEAK, decidimos analizar varias vías. El NF- κ B es un factor de transcripción importante para la regulación de las respuestas inflamatorias (Hayden *et al.* 2006) y normalmente se encuentra de forma inactiva en el citoplasma (Gloire *et al.* 2006). Muchos estudios han descrito el importante papel que juega la ruta IKK/NF- κ B en la inducción y el mantenimiento del estado inflamatorio que existe en enfermedades como la obesidad o la diabetes tipo 2 (Tornatore *et al.* 2012). Se ha descrito que el sTWEAK puede activar tanto la ruta canónica como la no-canónica de NF- κ B (Feng *et al.* 2008). Por otro lado, estudiamos las rutas de las MAPKs, también relacionadas con las respuestas de estrés y pro-inflamatorias y con la vía de señalización del TNF- α , especialmente, p38 MAPKs y JNKs

(Cawthorn and Sethi 2008; Nieto-Vazquez *et al.* 2008; Williams *et al.* 2008).

Observamos que las rutas intracelulares activadas por el TNF- α y el sTWEAK son diferentes. Como ya se había descrito, el TNF- α activa la ruta clásica de NF- κ B (Ruan *et al.* 2002), lo que detectamos de manera indirecta midiendo la degradación de I κ B- α y - β . Como se observa en la Figura 15, en respuesta al TNF- α , I κ B- α se degrada entre los diez minutos y las seis horas de estimulación, pero no I κ B- β .

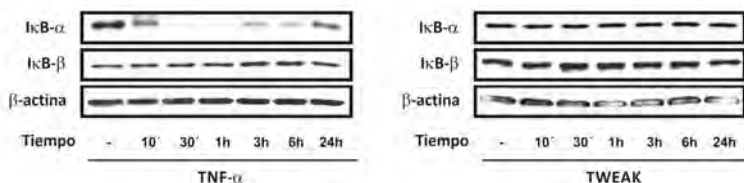


Figura 15: Análisis de la activación de la ruta NF- κ B por TNF- α y sTWEAK. Los lisados de las células LiSa-2 diferenciadas y cultivadas en presencia de 20 ng/ml de TNF- α o 100ng/ml de sTWEAK, fueron analizados por western-blot utilizando anticuerpos frente a I κ B- α e I κ B- β . Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes.

Cuando estudiamos si el sTWEAK activaba la ruta clásica de NF- κ B observamos que no se inducía la degradación de I κ B- α , como ocurría en el caso del TNF- α . Por ello, analizamos una posible activación de la ruta no canónica (medida por la translocación al núcleo de p52 tras producirse el procesamiento de NF- κ B2 (p100)) y comprobamos (Figura 16) que el sTWEAK aumenta la translocación de p52 hacia el núcleo celular, como ocurre en células renales tubulares de ratón (Sanz *et al.* 2010). Estos resultados indicarían que, en nuestro contexto celular, el sTWEAK estaría activando exclusivamente la ruta no canónica de NF- κ B.

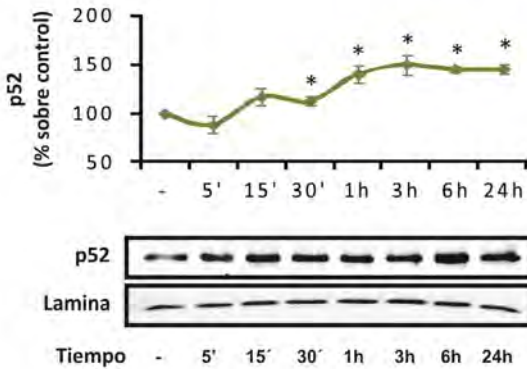


Figura 16: Análisis de la activación de la ruta no canónica de NF- κ B por sTWEAK. Las fracciones nucleares de las células LiSa-2 cultivadas en presencia de 100ng/ml de sTWEAK fueron analizados por western-blot utilizando un anticuerpo para p52. La Lamina A se utilizó como marcador nuclear. *p<0.01

Nuestro grupo había descrito que el TNF- α generaba resistencia a la insulina en los adipocitos viscerales humanos mediante un mecanismo dependiente de la activación de JNK1/2 y la inhibición de la ruta de señalización de la insulina a nivel de AKT e IRS1 (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b).

Por ello, decidimos analizar la activación de diferentes miembros de la superfamilia de las MAPKs (Figura 17). Observamos que ambas citoquinas inducían la activación de ERK1/2 y p38 MAPK, aunque el sTWEAK lo hacía de una manera más moderada. Por el contrario, y a diferencia del TNF- α , el tratamiento con el sTWEAK no inducía la activación de JNK1/2, directamente relacionada con la resistencia a la insulina como habíamos demostrado previamente en nuestro laboratorio (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b).

Estos resultados estarían en concordancia con los efectos sobre la sensibilidad a la insulina a nivel del transporte de glucosa (Figura 11) y sobre la cascada de señalización de dicha hormona (Figura 14). Así, el TNF- α , a través de la activación de JNK1/2, induciría resistencia a la acción de la insulina (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b), efectos que no se observan con el sTWEAK.

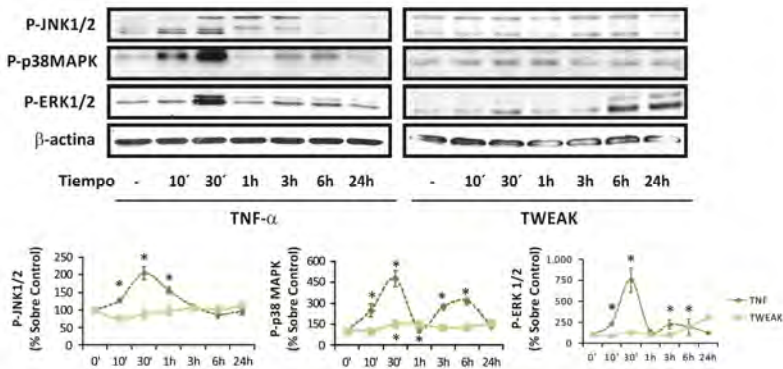


Figura 17: Activación diferencial de rutas de señalización en respuesta al TNF- α y el sTWEAK. Se analizó la activación de las MAPKs en los extractos proteicos correspondientes, mediante western-blot utilizando los anticuerpos frente a P-Thr183/Tyr185-JNK 1/2, P-Thr180/Tyr182-p38 MAPK y P-Thr202/Tyr204-ERK 1/2 y β -actina para normalizar. Se muestra un experimento representativo, y la media \pm S.E.M. de las densitometrías de 3 experimentos diferentes. *, $p < 0,01$.

3. El pre-tratamiento con el sTWEAK inhibe la asociación de TRAF2 con el receptor de TNF- α de tipo 1 (TNFR1), a través del cual genera la resistencia a la insulina

Los receptores de la súper-familia de los TNFs (TNFRs) necesitan unirse a proteínas adaptadoras para activar las rutas intracelulares de señalización. Entre estas proteínas adaptadoras se encuentra la proteína TRAF2 (del inglés *TNF Receptor-associated Factor 2*), a través de la cual el TNF- α y el sTWEAK desencadenan sus respuestas celulares. Estudios

previos sugieren que la modulación de los efectos del TNF- α por el sTWEAK en ciertos modelos celulares puede deberse a la competencia por la unión a esta proteína adaptadora. (Wicovsky *et al.* 2009). Para estudiar el posible mecanismo mediante el cual el sTWEAK protege a los adipocitos de los efectos negativos del TNF- α sobre la sensibilidad a la insulina, analizamos en primer lugar la posible competencia entre los receptores de ambas citoquinas por su unión a moléculas como TRAF2.

El sTWEAK desencadena numerosas respuestas celulares a través de la cascada Fn14/TRAF2 (Saitoh *et al.* 2003). En nuestro contexto celular, los experimentos de co-immunoprecipitación muestran que las formas endógenas de TRAF2 y Fn14 se encuentran formando un complejo en condiciones basales, y que en presencia del TNF- α esta interacción se rompe parcialmente (Figura 18). Por el contrario, la presencia del sTWEAK hace que la unión Fn14-TRAF2 se vea incrementada en torno a un 20%. Además, un pre-tratamiento con el sTWEAK previene la disrupción parcial que genera el TNF- α , sugiriendo que los receptores de ambas citoquinas (TNFR1 y TNFR2 para el TNF- α y Fn14 para el sTWEAK) pueden estar compitiendo por la unión a TRAF2. En adipocitos humanos, el tratamiento con el TNF- α , pero no con el sTWEAK, disminuye de manera significativa la expresión de TRAF2, tal y como se había descrito previamente en otros modelos celulares (Hu *et al.* 2006; Wicovsky *et al.* 2009).

Es importante destacar que el complejo Fn14-TRAF2 que detectamos en las células humanas no estimuladas se ha correlacionado con un estado basal de activación constitutiva de la ruta no canónica del NF- κ B, ya que TRAF2, a través de la degradación de NIK (del inglés, NF- κ B-inducing kinase), se encuentra promoviendo la inhibición de esta ruta y mediante la activación de IKK (IkB kinase) activa la ruta clásica de NF- κ B. (Roos *et al.* 2010). Al estar TRAF2 secuestrado por Fn14 no puede inhibir la ruta no canónica, por lo que se encuentra activa de manera constitutiva.

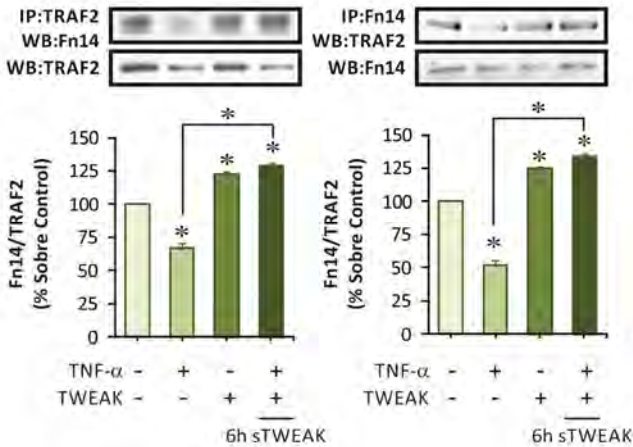


Figura 18: Ensayo de co-inmuno-precipitación del complejo Fn14/TRAF2. Los lisados celulares totales de adipocitos diferenciados cultivados durante 24h en presencia o ausencia de TNF- α y/o sTWEAK fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-TRAF2 o anti-Fn14 y se analizaron los inmuno-complejos resultantes por western-blot utilizando anticuerpos frente a Fn14 y TRAF2, respectivamente. Se muestra un experimento representativo, y la media \pm S.E.M. de las densitometrías de 3 experimentos diferentes. *, $p < 0,01$.

De acuerdo con la disminución de la asociación Fn14-TRAF2 en respuesta a TNF- α (Figura 17), en los adipocitos viscerales tratados con TNF- α se detecta un incremento significativo de la asociación entre TRAF2 y el receptor 1 del TNF- α (TNFR1), pero no con el receptor 2, de hecho, se detecta una disminución de dicha asociación (Figura 18). En condiciones basales parece que el sTWEAK no modula la asociación entre TRAF2 y los receptores del TNF- α . Sin embargo, cuando pre-tratamos a las células con 100ng del sTWEAK, se previene la formación del complejo entre TRAF2 y TNFR1 inducida por el TNF- α .

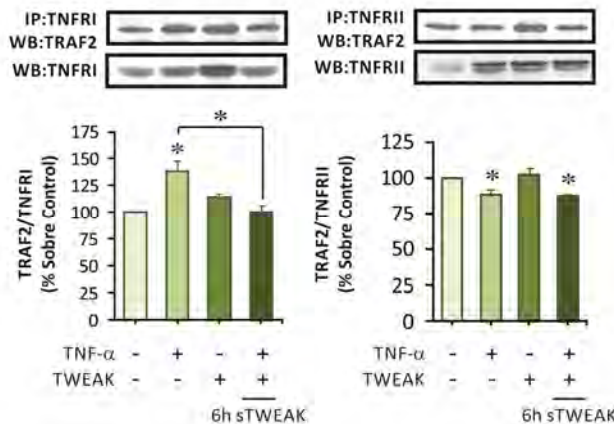


Figura 18: Efecto del sTWEAK sobre la formación de los complejos TNFR1-TRAF2 y TNFR2-TRAF2. Los lisados celulares totales de adipocitos diferenciados cultivados durante 24h en presencia o ausencia de TNF- α y/o sTWEAK fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-TNFR1 o anti-TNFR2 y se analizaron los inmuno-complejos resultantes por western-blot utilizando un anticuerpo frente a TRAF2. Se muestran inmunoblots representativos y la media \pm S.E.M. de las densitometrías de la proteína unida al complejo respecto a sus niveles totales de 3 experimentos diferentes. *, $p < 0,01$.

En resumen, nuestros datos sugieren que en los adipocitos viscerales humanos, el receptor del sTWEAK (Fn14) y el receptor tipo 1 del TNF- α (TNFR1) compiten de manera endógena por la unión a TRAF2, de manera similar a lo que ocurre en modelos tumorales, en los que un pre-tratamiento con el sTWEAK hace que TRAF2 se una a Fn14 inhibiendo la señalización desencadenada por el TNF- α a través del TNFR1. (Wicovsky *et al.* 2009). Así, el pre-tratamiento con el sTWEAK tendría un efecto negativo sobre la cascada de señalización del TNF- α a través de TNFR1, lo que podría estar bloqueando el efecto inhibitorio de esta citoquina sobre la cascada de señalización de la insulina.

4. El TNF- α genera resistencia a la insulina a través de la cascada de señalización dependiente del TNFR1

Aunque numerosos estudios han descrito que la mayoría de los efectos del TNF- α son mediados por el TNFR1, la contribución relativa de estos receptores sobre los efectos del TNF- α regulando la sensibilidad a la insulina de los adipocitos no está clara. Estudios realizados en adipocitos murinos sugieren que el TNF- α ejerce sus efectos inhibitorios sobre la ruta de señalización de la insulina a través de la estimulación del TNFR1 (Peraldi *et al.* 1996), mientras que en adipocitos humanos subcutáneos se ha propuesto la implicación de los receptores tipo 1 y 2 (Hube and Hauner 2000).

Con el objetivo de analizar si la competencia molecular a nivel de TRAF2 entre Fn14 y TNFR1 era el mecanismo responsable del efecto protector del sTWEAK sobre la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α , decidimos estudiar la sensibilidad a la insulina en la captación de glucosa utilizando anticuerpos con actividad agonista, tanto para el TNFR1 como para el TNFR2 (Jupp *et al.* 2001; Peraldi *et al.* 1996). Como se puede observar en la Figura 19, la activación de TNFR1, y no de TNFR2, induce un estado de resistencia a la insulina, similar al generado por el TNF- α .

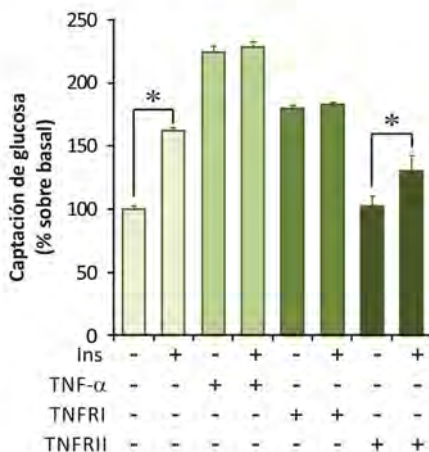


Figura 19: Análisis de la captación de glucosa inducida por agonistas específicos para TNFR1 y TNFR2.

Las células LiSa-2 diferenciadas se incubaron con agonistas específicos del TNFR1 y el TNFR2 (2 μ g/ml) y con TNF- α (20ng/ml). Tras 24h de tratamiento, las células se incubaron con insulina (50nM) durante 30 minutos y se analizó el transporte de glucosa durante los últimos 10 minutos de tratamiento con insulina, mediante la cuantificación de la incorporación de 2-deoxiglucosa en las células. Se muestra la media \pm S.E.M. de los resultados de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado, expresados como porcentaje de estimulación sobre el basal (control = 100). *, P<0,01.

Al comprobar que la resistencia a la insulina se producía única y exclusivamente cuando utilizábamos el agonista del TNFR1 para TNF- α , quisimos analizar si, efectivamente, inducía una cascada de señalización similar a la del TNF- α . En la figura 20 se puede observar que la activación de JNK1/2, directamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina en nuestro modelo celular (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b), se detecta exclusivamente cuando las células son tratadas con el agonista del TNFR1. De manera similar ocurre cuando estudiamos la activación de p38MAPK, mientras que la activación de ERK1/2 y la degradación de I κ B- α ocurren a través de ambos receptores.

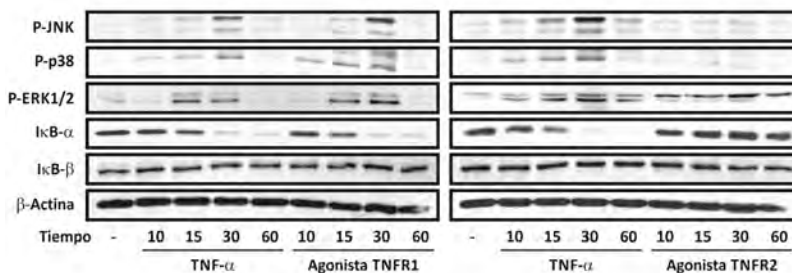


Figura 20: Análisis de la cascada de transducción de señales activadas por los agonistas específicos de TNFR1 y TNFR2. Las células LiSa-2 diferenciadas se incubaron con agonistas específicos del TNFR1 y el TNFR2 (2 μ g/ml) y con TNF- α (20ng/ml). Tras 24h de tratamiento, los lisados celulares fueron analizados mediante western-blot utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas de JNK1/2 (Thr183/Tyr185), p38MAPK (Thr180/Tyr182), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), I κ B- α e I κ B- β . Se usó β -actina para normalizar.

Además, analizamos la activación de IRS1 y AKT en respuesta a insulina para confirmar que la resistencia a la insulina causada por el TNF- α ocurre vía TNFR1. De manera similar a lo que sucede con el TNF- α , el anticuerpo con actividad agonista para TNFR1 inhibe las fosforilaciones en tirosina de IRS1 y en serina de AKT inducidas por la insulina (Figura 21).

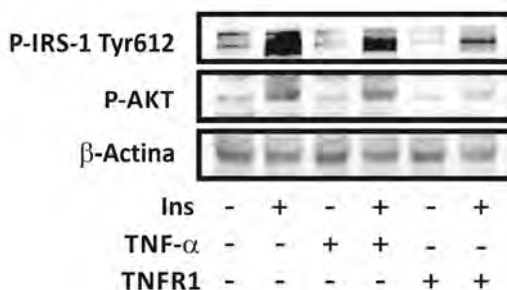


Figura 21: Efecto del agonista específico de TNFR1 sobre la cascada de señalización de la insulina. Los lisados de las células LiSa-2 diferenciadas cultivadas en presencia de agonistas específicos del TNFR1 (2 μ g/ml), o de TNF- α (20ng/ml) durante 24h, antes de la estimulación con insulina 50nM, fueron analizados por western-blot con anticuerpos frente a las formas fosforiladas de IRS1 (Tyr612) y AKT (Ser473). Se usó β -actina para normalizar. Se muestran inmunoblots representativos de 3 experimentos independientes. *, P<0,01.

El hecho de que el Fn14 compita con TNFR1 por la unión a TRAF2 podría explicar el efecto inhibitorio del sTWEAK en la resistencia a la insulina generada por el TNF- α . Sin embargo, el

pre-tratamiento con el sTWEAK modula específicamente los efectos generados por el TNF- α en la captación de glucosa, pero no altera los efectos sobre la lipólisis o la apoptosis (Figuras 11, 10, 8 y 9, respectivamente), también mediados por el TNFR1 (Cabal-Hierro and Lazo 2012; Ryden *et al.* 2002). Esto sugiere que a pesar de que TNFR1 y Fn14 compiten a nivel de TRAF2, el mecanismo molecular responsable del efecto protector del sTWEAK mejorando la sensibilidad a la insulina sería dependiente de la modulación de la cascada de señalización del TNF- α a otros niveles.

5. La ruta sTWEAK-Fn14 previene la resistencia a la insulina inducida por TNF- α al bloquear la activación de JNK1/2 mediante un mecanismo dependiente de PP2A

En base a la hipótesis planteada según la cual el mecanismo molecular de protección del sTWEAK frente a la resistencia a la insulina generada por el TNF- α debe ocurrir en pasos posteriores a la interacción de TRAF2 con el receptor, decidimos analizar la activación de las rutas de NF- κ B y de las distintas MAPKs, ya que están implicadas en la resistencia a la insulina inducida por TNF- α (Cawthorn and Sethi 2008; Fernandez-Veledo *et al.* 2009b; Nieto-Vazquez *et al.* 2008; Williams *et al.* 2008).

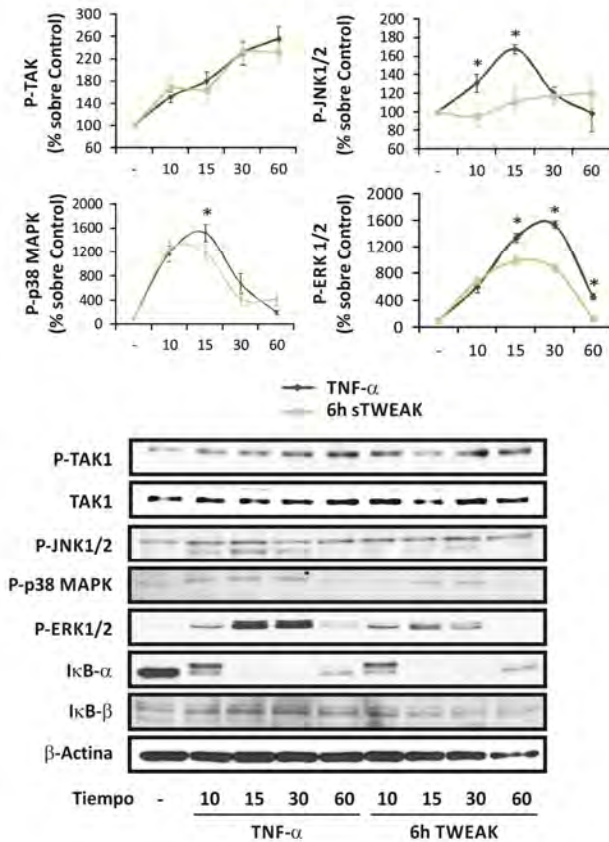


Figura 22: El pre-tratamiento con sTWEAK previene la activación de JNK1/2 dependiente del TNF- α . Las células diferenciadas se incubaron con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h antes de tratarlas con TNF- α (20ng/ml). Análisis mediante western-blot con anticuerpos frente a las formas fosforiladas de TAK1 (Tyr187), JNK1/2 (Thr183/Tyr185), p38MAPKs (Thr180/Tyr182), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), I κ B- α e I κ B- β . Se usó β -actina para normalizar. Se muestran imágenes representativas y las medias \pm S.E.M. de las densitometrías de 3 experimentos independientes. *, $P < 0,01$.

En primer lugar, nos centramos en el estudio de la activación de TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1), un efector de TRAF2 que regula las rutas de NF- κ B y de MAPKs en fibroblastos embrionarios y mioblastos de ratón tratados con TWEAK (Kumar *et al.* 2009) y en células tumorales humanas o embrionarias de riñón (murinas) tratadas con TNF- α (Nishimura *et al.* 2009). Tal y como se observa en la Figura 22, a pesar de que el Fn14 y el TNFR1 compiten por su unión a TRAF2, el pre-tratamiento con el sTWEAK no altera la activación de TAK1 inducida por TNF α . Sin embargo, el sTWEAK impide que el TNF- α active a JNK1/2, lo que está directamente relacionado con el desarrollo de la resistencia a la insulina, como ya hemos comentado previamente (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b). Además, se detectó una leve disminución de la actividad de p38MAPK y ERK1/2 (Figura 22), mientras que la degradación de I κ B- α y - β no se ve afectada de manera significativa por el pre-tratamiento del sTWEAK. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que el pre-tratamiento con el sTWEAK podría mejorar la resistencia a la insulina actuando a nivel de JNK1/2, más que compitiendo por los factores limitantes que comparten, como estaba descrito en otros modelos celulares (Maecker *et al.* 2005; Wicovsky *et al.* 2009).

La gran mayoría de vías de transducción de señales requieren una correcta regulación de su activación, no sólo por proteínas con actividad quinasa, sino también por fosfatasas. Concretamente, la ruta de las MAPKs está regulada de manera negativa por múltiples fosfatasas. La subfamilia de las serina/treonina fosfatasas de tipo PP2 podría catalizar la

desactivación inicial, mientras que en tiempos más tardíos este papel lo podrían estar desarrollando las fosfatasa duales (Janssens and Goris 2001; Wadgaonkar *et al.* 2004). De hecho, parece razonable plantear la hipótesis de que PP2A, que regula la activación de JNK1/2 en las células pancreáticas (Li *et al.* 2011), pueda hacer lo mismo en nuestro modelo celular en respuesta al sTWEAK. Por ello, analizamos la actividad intracelular de PP2A en los adipocitos viscerales LiSa-2 en respuesta a los tratamientos con el sTWEAK y el TNF- α .

Como se observa en la Figura 23, el sTWEAK, pero no el TNF- α , incrementa de manera significativa la actividad de PP2A tras un tratamiento de 6 horas. Además, en las células pre-tratadas con sTWEAK la actividad PP2A aumenta, incluso en presencia de TNF- α (Figura 24).

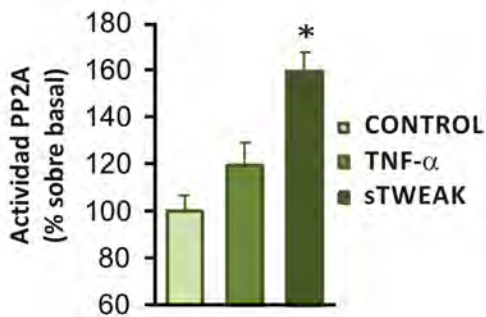


Figura 23: Efecto del TNF- α y del sTWEAK sobre la actividad de PP2A. La actividad PP2A de los lisados de los adipocitos diferenciados cultivados con TNF- α (20ng/ml) durante 24h y con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h fue analizada usando un kit de Ser/Thr fosfatasa, tal y como se describe en materiales y métodos.

*, $P < 0,01$.

A pesar de que en otros modelos celulares, como los adipocitos marrones murinos, se ha descrito que el TNF- α activa PP2A a través de la producción de ceramidas, induciendo resistencia a la insulina a través de la inhibición de la fosforilación de AKT (Teruel *et al.* 2001), en nuestro caso la PP2A podría estar actuando sobre otros sustratos diferentes, como podría ser JNK1/2.

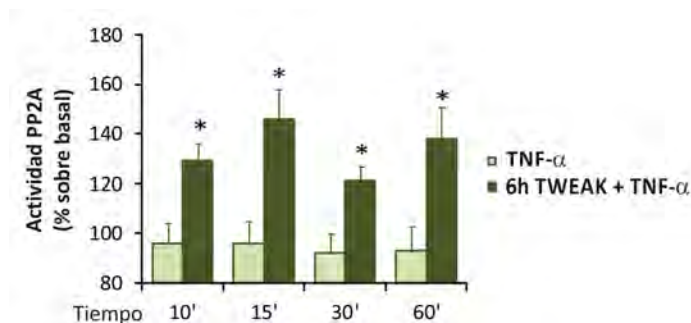


Figura 24: Efecto del pretratamiento con sTWEAK sobre la actividad de PP2A en respuesta a tratamientos cortos de TNF- α . La actividad PP2A se midió al igual que la figura 23, en células control y células pre-tratadas con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h y con TNF- α (20ng/ml) durante los tiempos indicados. Los resultados se expresan como media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Los datos se expresan como porcentaje de estimulación de la actividad fosfatasa sobre las células control. *, P<0,01.

Para determinar si la activación de PP2A dependiente del sTWEAK está directamente implicada en la regulación de JNK1/2 y, en consecuencia, del efecto protector de esta citoquina sobre la resistencia a la insulina inducida por TNF- α ,

se realizaron transfecciones transitorias con una mezcla de siRNAs específicos para la subunidad catalítica α de PP2A (PP2A-C α).

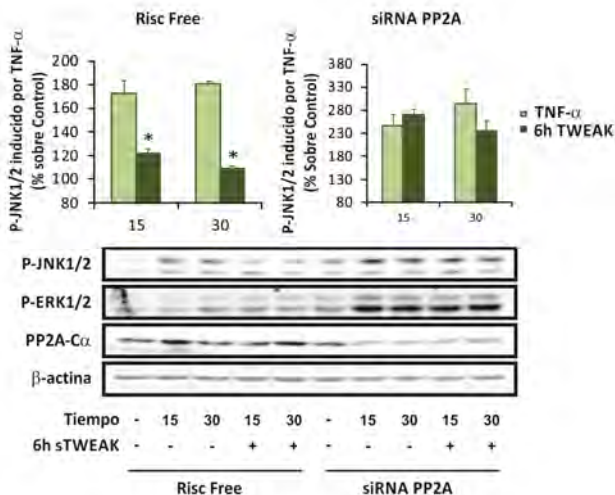


Figura 25: El silenciamiento de la subunidad catalítica de PP2A revierte el efecto protector del sTWEAK sobre la activación de JNK1/2. Los adipocitos diferenciados fueron transfectados con un siRNA específico para la subunidad catalítica α de PP2A (PP2A-C α) o con los RNAs aleatorios (RISC-FREE) como control y fueron tratados con TNF- α (20ng/ml) y/o sTWEAK (100ng/ml). Los lisados celulares fueron analizados mediante western-blot. Se muestran inmunoblots representativos de P-JNK1/2 (Thr183/Tyr185), P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y PP2A-C α (la subunidad catalítica de PP2A). Se usó β -actina para normalizar. Se muestran las medias \pm S.E.M. de las densitometrías de 2 experimentos diferentes. *, $p < 0,01$.

Como se observa en la Figura 25, el silenciamiento de PP2A-C α impide el efecto inhibitorio que tiene el sTWEAK sobre la fosforilación de JNK1/2 inducida por el TNF- α , manteniéndose elevados los niveles de P-JNKs. Sin embargo, en las células transfectadas con unos RNAs aleatorios control (*Risc Free*), la activación de JNK1/2 está inhibida por el pre-tratamiento con el sTWEAK, tal y como se observa en la Figura X.

Teniendo en cuenta que el silenciamiento de PP2A con siRNA también incrementa la fosforilación de ERK1/2 inducida por el TNF- α , no podemos descartar un potencial papel de esta fosfatasa en la regulación de ERK1/2. La eficiencia de la transfección con el siRNA de PP2A-C α se valoró mediante análisis por western-blot (Figura 25), observándose que los niveles proteicos de la subunidad catalítica de PP2A disminuyen en torno a un 50%.

Además, se midió la actividad de PP2A en respuesta al sTWEAK, tanto en las células control (RNAs aleatorios control) como en aquellas con silenciamiento de PP2A-C α (Figura 26). Cabe destacar que la activación de PP2A en las células control es algo menor que en las células sin transfectar, por lo que no podemos descartar interferencias debido al proceso de transfección en cuanto a actividad fosfatasa. No obstante, no se detectó actividad PP2A en aquellas células tratadas con el sTWEAK y transfectadas con el siRNA de PP2A-C α , resultados que demostraban la eficiencia del silenciamiento.

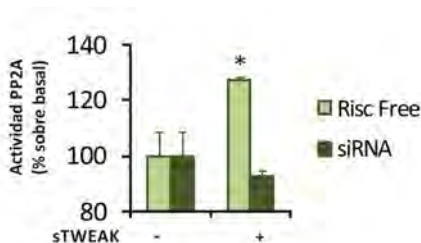


Figura 26: Análisis de la actividad de PP2A inducida por sTWEAK tras el silenciamiento de la subunidad catalítica. La actividad de PP2A se midió en células transfectadas al igual que en la Figura 25 y tratadas con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h. Los resultados se expresan como media \pm S.E.M. de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos se expresan como porcentaje de estimulación de la actividad fosfatasa sobre las células control.

6. El sTWEAK previene el desarrollo de la resistencia a la insulina en los adipocitos primarios humanos

Ya que la presencia del sTWEAK prevenía el desarrollo de la resistencia a la insulina en la línea celular de adipocitos viscerales, quisimos confirmar que el papel protector del sTWEAK no es exclusivo de esta línea celular. Para ello, realizamos los mismos estudios en adipocitos primarios humanos diferenciados, obtenidos de preadipocitos de grasa visceral. Inicialmente, estudiamos los efectos del sTWEAK sobre la cascada de señalización del TNF- α . Como se muestra en la Figura 27, el pre-tratamiento con el sTWEAK en los adipocitos viscerales humanos impide la fosforilación de JNK1/2 por el TNF- α , de manera similar a lo que ocurría en la línea celular estudiada (Figura 22). Además, observamos que

los patrones de activación de p38MAPK y ERK1/2 son similares a los observados en la línea celular LiSa-2.

Por otro lado, confirmamos que en estas células la PP2A también está implicada en la inhibición de JNK1/2 inducida por el sTWEAK, ya que el silenciamiento de PP2A-C α previene la disminución de los niveles de P-JNK1/2 inducido por el pre-tratamiento de las células con el sTWEAK (Figura 28), al igual que ocurría en la línea celular de adipocitos (Figura 25).

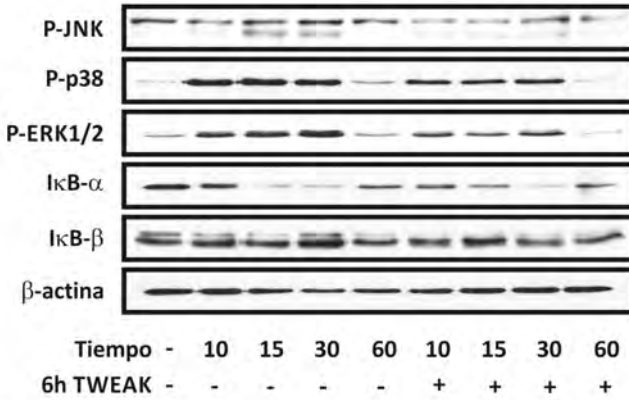


Figura 27: Análisis de la ruta de señalización del TNF- α en los adipocitos primarios humanos tratados con sTWEAK. Los adipocitos primarios humanos fueron cultivados con TNF- α (20ng/ml) y sTWEAK (100ng/ml). La activación de MAPK y NF- κ B se analizó mediante western-blot con anticuerpos frente a P-JNK1/2 (Thr183/Tyr185), P-p38MAPK (Thr180/Tyr182), P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), I κ B- α e I κ B- β . La β -actina se usó para normalizar. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

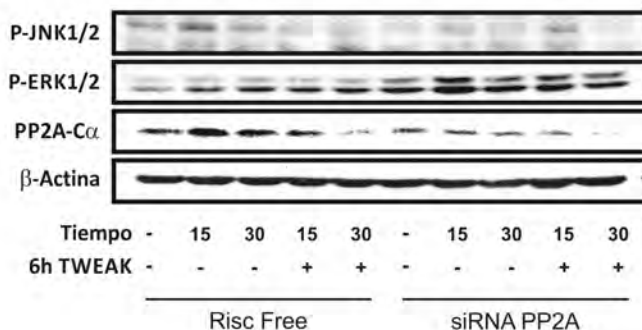


Figura 28: El silenciamiento de la subunidad catalítica de PP2A impide que el sTWEAK ejerza su papel protector sobre la activación de JNK1/2 en los adipocitos primarios. Los adipocitos primarios diferenciados fueron transfectados con el siRNA de PP2A-Cα o con RNAs aleatorias control (RISC-FREE) y tratados o no con sTWEAK (100ng/ml) 6h antes de tratarlas con TNF-α (20ng/ml). Los lisados celulares fueron analizados mediante western-blot con anticuerpos frente a P-JNK1/2 (Thr183/Tyr185), P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y PP2A-Cα (la subunidad catalítica de PP2A). Se usó β-actina como control de carga. Se muestran blots representativos de 2 experimentos independientes.

Finalmente, para demostrar que PP2A está directamente asociada con el papel protector que presenta el sTWEAK sobre la sensibilidad a la insulina respecto al transporte de glucosa, se analizó dicho transporte tras silenciar PP2A-Cα de manera transitoria. Para ello, transfectamos los adipocitos viscerales con el siRNA correspondiente y se determinó la captación de glucosa estimulada por insulina en adipocitos tratados con el TNFα y/o el sTWEAK. Como esperábamos, el pre-tratamiento con el sTWEAK restaura la captación de glucosa inducida por insulina cuando

transfectamos los adipocitos viscerales humanos con RNAs aleatorios control, mientras que cuando los transfectamos con el siRNA de PP2A-C α , el sTWEAK no es capaz de prevenir la resistencia a la insulina dependiente de TNF- α (Figura 29).

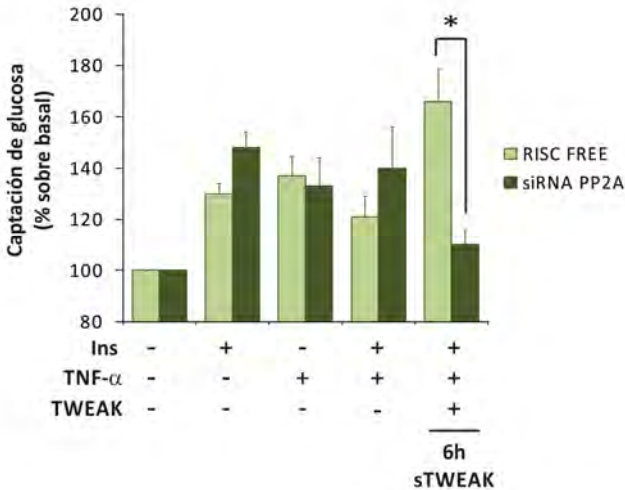


Figura 29: Análisis de la captación de glucosa en los adipocitos primarios humanos transfectados con el siRNA de PP2A-C α . Los adipocitos primarios diferenciados se transfectaron con RNAs aleatorios control (RISC FREE) o el siRNA de PP2A-C α y se incubaron o no con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h, tras lo que se incubaron con TNF- α (20ng/ml). Después de 24h de tratamiento, las células se incubaron con insulina 50nM durante 30 minutos. El transporte de glucosa se analizó durante los últimos 10 minutos de tratamiento con insulina, mediante la cuantificación de la incorporación de 2-deoxiglucosa en las células. Se muestran las medias \pm S.E.M. de las densitometrías de 2 experimentos diferentes, cada uno por triplicado, expresados como porcentaje de estimulación sobre el basal (control = 54,5 \pm 10 pmol glucosa/mg proteína/10 min). *, P<0,01.

Al igual que en los experimentos con la línea celular, valoramos la eficiencia del silenciamiento de PP2A-C α mediante análisis por western-blot. Como se observa en la figura 30, el silenciamiento de la subunidad catalítica disminuye a un 50% sus niveles.

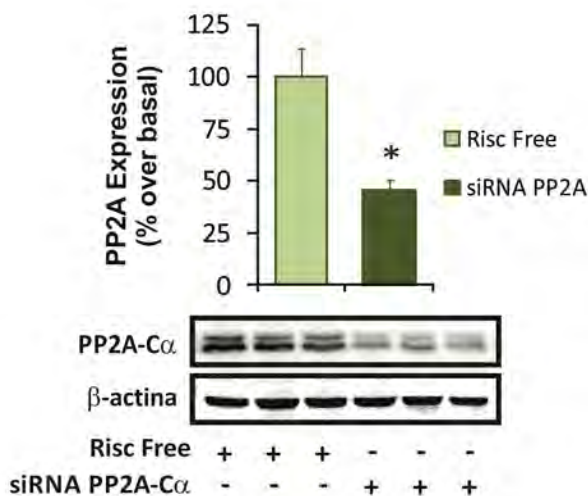


Figura 30: Análisis del grado de silenciamiento de PP2A-C α .

Los adipocitos primarios diferenciados fueron transfectados con el siRNA de PP2A-C α o con RNAs aleatorios control (RISC-FREE). Los lisados celulares fueron analizados mediante western-blot utilizando un anticuerpo frente PP2A-C α (la subunidad catalítica de PP2A). Se usó β -actina para normalizar. Se muestran blots representativos de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,01$.

Además, como en el caso de la línea celular se midió la actividad de PP2A tras el silenciamiento. En este caso, tras la transfección con RNAs aleatorios control, el sTWEAK aumenta la actividad de PP2A en torno al 40%, mientras que cuando se silencia la subunidad catalítica de PP2A el sTWEAK es incapaz de aumentar su actividad (Figura 31).

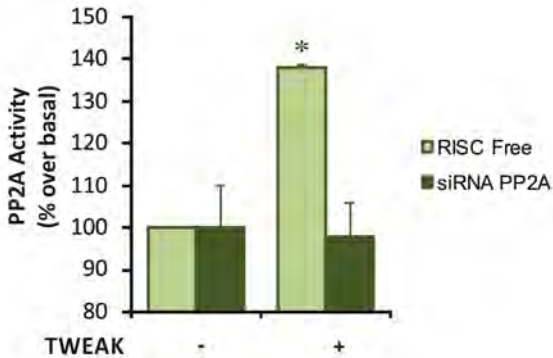


Figura 31: Análisis de la actividad de PP2A en respuesta a sTWEAK tras el silenciamiento de la subunidad catalítica. La actividad fosfatasa de PP2A se midió en células transfectadas al igual que en la figura X y tratadas con sTWEAK (100ng/ml) durante 6h. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de estimulación \pm S.E.M. de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. *, $P < 0,01$.

Por tanto, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, el sTWEAK ejerce su efecto beneficioso sobre la sensibilidad a la insulina tanto en la línea celular LiSa-2 como

en los preadipocitos viscerales humanos. Hemos comprobado que la acción del sTWEAK no depende de la competencia que los receptores de ambas citoquinas presentan por la unión a adaptadores como TRAF2, ya que el sTWEAK no altera la lipólisis y la apoptosis que el TNF- α desencadena cuando se une a TNFR1 (al igual que la resistencia a la insulina). También hemos verificado que esta protección no la realiza a través de TAK1, un regulador de las rutas de NF- κ B y MAPKs, ya que no impide su activación en respuesta al TNF- α en los adipocitos blancos. Por el contrario, en este trabajo demostramos, por primera vez, que el sTWEAK activa PP2A en los adipocitos viscerales humanos, evitando el aumento de los niveles de P-JNK1/2 que el TNF- α desencadena, impidiendo así el desarrollo de resistencia a la insulina respecto al transporte de glucosa. Este efecto protector se produce sin alterar el resto de actividades metabólicas del TNF- α que podrían estar controlando la masa adiposa.

Por tanto, el balance entre los niveles de estas dos citoquinas podría estar determinando el grado de resistencia a la insulina y ser clave en el desarrollo de la diabetes de tipo 2. Todo ello nos hace pensar que los niveles existentes de las citoquinas pro-inflamatorias podría ser un factor clave en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

B. EFECTOS DEL sTWEAK SOBRE LA MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS MURINOS

1. Rutas de señalización activadas por el sTWEAK en los fibroblastos embrionarios de ratón

Una de las complicaciones más frecuentes que presentan los pacientes diabéticos es la mala cicatrización de las heridas. En este contexto, se ha descrito que existe una menor migración y proliferación y una mayor apoptosis de fibroblastos (Desta *et al.* 2010; Lamers *et al.* 2011; Siqueira *et al.* 2010), los principales responsables de la secreción del material para la formación de nueva matriz extracelular en la herida. Dado que el TNF- α se ha relacionado con una disminución de la migración (Corredor *et al.* 2003) y que el TWEAK es capaz de regular la migración en distintos tipos de células (Dai *et al.* 2009) (Fortin Ensign *et al.* 2013; Tran *et al.* 2006) (Whitsett *et al.* 2012), decidimos analizar los posibles efectos del sTWEAK sobre este proceso.

Datos no publicados de nuestro grupo, así como de la bibliografía, indican que p38 α MAPK es un mediador de los procesos de migración e invasión en diversos tipos celulares, entre ellos los MEFs (Cristina Gamell, 2011; Junttila MR, 2007). Por ello, analizamos la cascada de señalización del TWEAK en líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) wt y p38 α -/-, caracterizadas en nuestro laboratorio.

Se había descrito que el TWEAK activaba la ruta de las ERKs (Ucero AC, 2013; Chen T, 2013), JNKs (Chen T, 2013) y p38 MAPKs (Zhi-Chun L, 2012; Chen T, 2013) en distintos tipos celulares. Nosotros, en la primera parte de esta Tesis, también hemos visto que estas rutas son activadas por TWEAK en

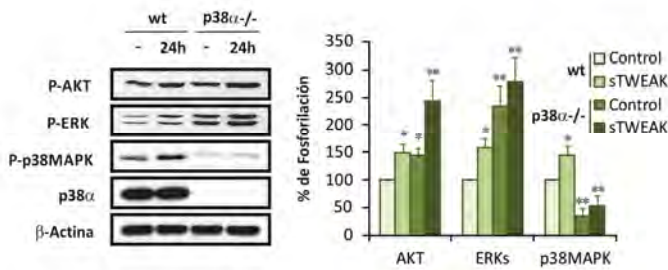


Figura 32: El sTWEAK activa la ruta de las ERKs, p38MAPKs y PI3K/AKT en los MEFs.

Los MEFs fueron deprivados de suero e incubados durante 24 horas con o sin sTWEAK (100ng/ml). Se analizaron los niveles de P-Ser473Akt, P-ERKs, P-p38MAPKs y p38α total mediante western-blot normalizando con β-actina. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes y la cuantificación correspondiente a la media ±S.E.M. de las densitometrías de los blots de los 3 experimentos como porcentaje respecto al control wt. *p<0.05, ** p<0.01 comparando con el control.

adipocitos. Por ello, decidimos analizar la activación de diferentes miembros de la superfamilia de las MAPKs por el sTWEAK en los MEFs.

Como podemos observar en la Figura 32, el sTWEAK activa a las ERKs y a las p38 MAPKs, tanto en las células wt como en

las p38 α -/-, pero en estas últimas, la isoforma de p38 activada no es la misma que en las wt. En las células wt se activa la isoforma p38 α , mientras que en las p38 α -/- se activa muy débilmente otra isoforma que presenta menor movilidad electroforética. También podemos observar que esta citoquina activa la ruta de PI3K/AKT en ambas líneas celulares (wt y p38 α -/-).

2. EL sTWEAK AUMENTA LA MIGRACIÓN CELULAR EN LOS MEFs wt Y p38 α -/-

Existen datos en la bibliografía que indican que el sTWEAK aumenta la capacidad invasiva y migratoria de distintos tipos de células, como por ejemplo la de las células de cáncer de ovario (Dai *et al.* 2009). Por tanto, estudiamos los efectos que podría tener el TWEAK sobre la migración de los MEFs y si la presencia de p38 α era relevante, dado que el TWEAK es capaz de activar esta ruta. Para ello, se realizaron ensayos de cierre de herida.

Como podemos observar en la Figura 33, los MEFs wt llegan a cubrir entre el 80-90% de la herida abierta en la placa de cultivo en tan sólo 24 horas. Dicha capacidad se incrementa cuando tratamos estas células con TWEAK, observándose un aumento en la velocidad de migración. Como consecuencia, el cierre de herida es más rápido. A las 8h se observa mejor la diferencia en la velocidad de migración, ya que en las células control hay en torno a un 30% de cierre de la herida, mientras que en las tratadas con TWEAK este cierre es de un 60%, lo que supone un aumento del 100% en la velocidad. Como ya

habíamos comentado, el TNF- α disminuye la velocidad de migración de los fibroblastos de pacientes diabéticos (Desta *et al.* 2010; Lamers *et al.* 2011; Siqueira *et al.* 2010), así que estos datos demuestran que el TWEAK juega un papel diferente en la migración de los MEFs, al igual que ocurría en el transporte de glucosa y resistencia a la insulina en los adipocitos.

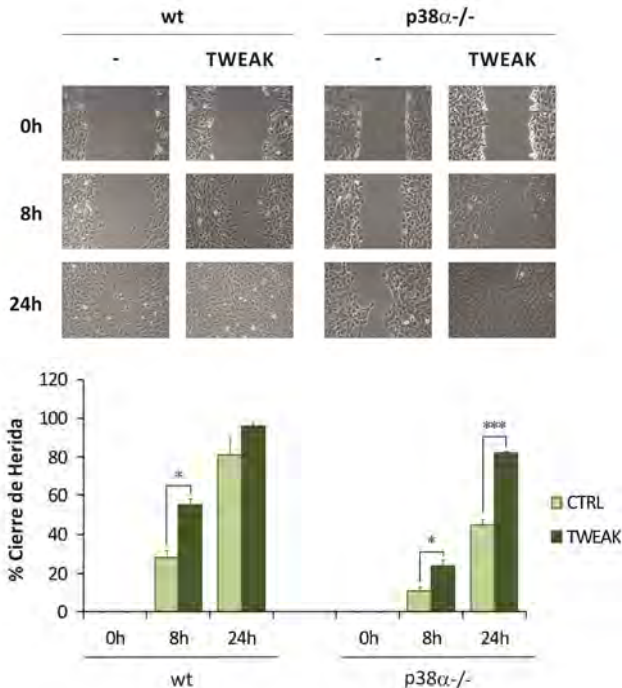


Figura 33: El sTWEAK aumenta la velocidad de migración de los MEFs independientemente de la presencia de p38 α . Los MEFs fueron privados de suero y tratados durante 30 minutos con Mitomicina C. Se les realizó una herida y se incubaron con o sin sTWEAK (100ng/ml). La migración se monitoriza a lo largo de 24h. Se muestran imágenes representativas de 5 experimentos independientes (panel superior) y la media \pm S.E.M. de las cuantificaciones de dichos experimentos (panel inferior). *p<0.05; ***p<0.001 comparado con su control.

Además comprobamos que, en condiciones basales, la velocidad de migración de las células p38 α -/- respecto a las wt es menor, y por consiguiente, el cierre de la herida se produce más lentamente en estas células. Como observamos en la Figura 33, al igual que se detecta en las células wt, el sTWEAK aumenta la velocidad de migración también en las células p38 α -/. En este caso, el incremento de la velocidad de migración a las 8h es de algo más de un 100% (similar a lo que ocurría con las células wt), pasando de un 10% de cierre a un 25%. Sin embargo, las diferencias observadas a las 24h son mucho mayores cuando las células no expresan p38 α MAPK, existiendo en este caso un incremento de la velocidad de migración del 80%, mientras que en las wt dicho incremento es del 20%. Esto sugiere que el mecanismo que utiliza esta citoquina para aumentar la velocidad de migración no está mediado por p38 α .

Dado que el sTWEAK activa las rutas de PI3K y de las ERKs evaluamos su posible implicación en los efectos del sTWEAK sobre la migración celular mediante ensayos de cierre de herida utilizando inhibidores de PI3K (LY294002) o de las ERKs (PD98059). Como se observa en la Figura 34, el inhibidor de PI3K no altera el aumento de la velocidad de migración inducido por el TWEAK, ni en los MEFs wt ni en los p38 α -/. Sin embargo, podemos observar que el inhibidor de PI3K sí disminuye la migración basal de las células p38 α -/ a las 24h de tratamiento, pasando de un 90% a un 70% de cierre cuando son tratadas con LY294002. Probablemente esto se deba a que

los MEFs $p38\alpha^{-/-}$ presentan una mayor activación de la ruta de PI3K/AKT que las células wt (Zuluaga *et al.* 2007). Sin embargo, el efecto del TWEAK no parece estar mediado por la ruta de PI3K.

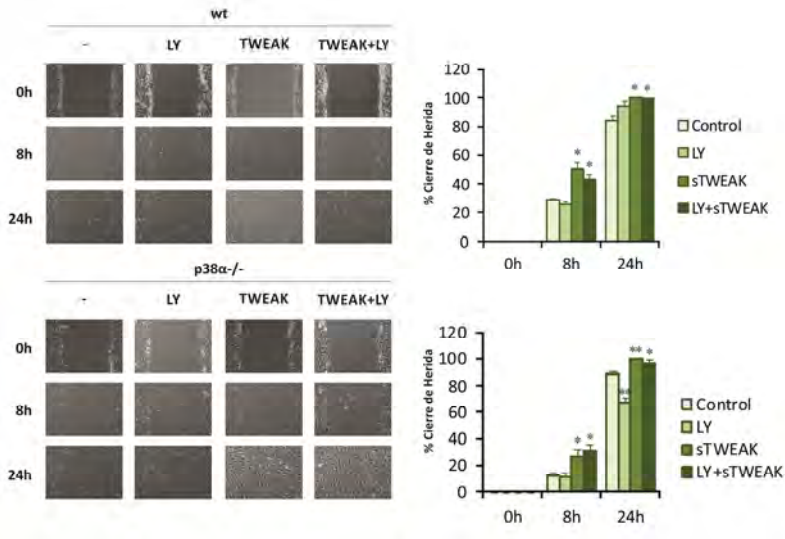


Figura 34: El inhibidor de PI3K no bloquea el aumento de migración inducido por sTWEAK en los MEFs $p38\alpha^{+/+}$ y $p38\alpha^{-/-}$. Los MEFs fueron privados de suero y tratados durante 30 minutos con Mitomicina C. Se les realizó una herida y se incubaron con o sin TWEAK (100ng/ml) y con o sin LY294002 (5 μ M). La migración se monitoriza a lo largo de 24h. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes (paneles de la izquierda) y la media \pm S.E.M. de las cuantificaciones de dichos experimentos (paneles de la derecha). * $p<0.05$; ** $p<0.01$ comparado con su control.

Sin embargo, cuando tratamos las células con el inhibidor de las ERKs, podemos observar un bloqueo parcial de la migración inducida por el TWEAK (Figura 35). En el caso de las células wt, tanto a las 8h como a las 24h de tratamiento, el PD98059 produce una caída de la migración inducida por el TWEAK, disminuyendo su capacidad migratoria en un 30%.

Por otro lado, hay que destacar que si bien el PD98059 no ejerce ningún efecto sobre la migración basal (sin TWEAK) a las 8h, a las 24h, el efecto de dicho inhibidor sobre la migración basal y la inducida por el TWEAK es el mismo (disminución de la migración del 30%). Esto indica que no habría un efecto específico del PD98059 sobre la acción del TWEAK a 24h. En el caso de las células p38 α -/-, el inhibidor de ERKs no ejerce ningún efecto sobre la migración inducida por el TWEAK a las 8h, mientras que a las 24h disminuye un 30% la velocidad de migración, no afectando a la basal (en ausencia de TWEAK).

Curiosamente, a las 8h este inhibidor aumenta la velocidad de migración de las células en estado basal, lo cual podría ser debido a diferencias en la activación de la ruta de las ERKs en las células p38 α -/- respecto a las wt. Estos datos sugieren que la ruta de las ERKs podría ser uno de los mediadores del efecto del TWEAK promoviendo la migración celular.

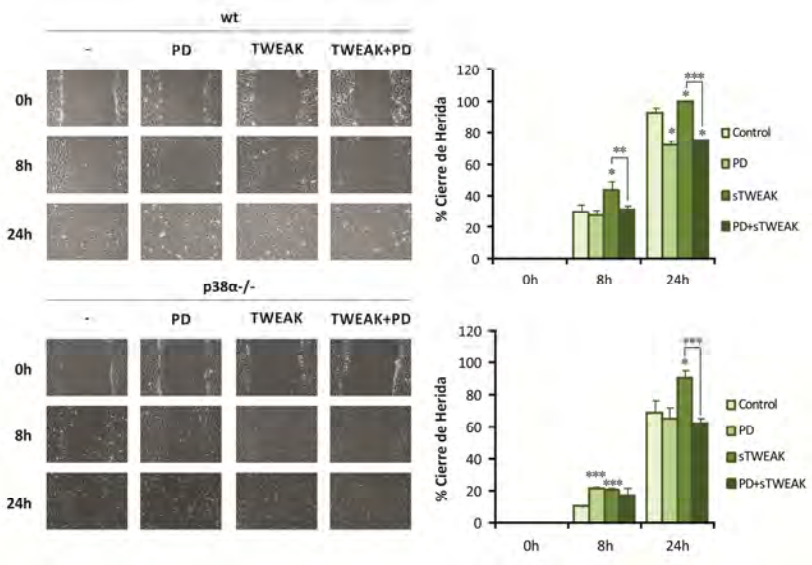


Figura 35: Efecto de la inhibición de la ruta de las ERKs sobre el aumento de migración inducido por el sTWEAK en los MEFs p38α^{+/+} y p38α^{-/-}. Los MEFs fueron deprivados de suero y tratados durante 30 minutos con Mitomicina C. Se les realizó una herida y se incubaron con o sin TWEAK (100ng/ml) y con o sin PD98059 (10μM). La migración se monitoriza a lo largo de 24h. Se muestran imágenes representativas de 4 experimentos independientes (paneles de la izquierda) y la media±S.E.M. de las cuantificaciones de dichos experimentos (paneles de la derecha). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 comparado con su control.

3. El TWEAK aumenta la actividad de la metaloproteasa MMP-9

La MMP-9 es una proteasa que participa en la degradación de las moléculas de la matriz extracelular, favoreciendo la migración e invasión de algunos tipos de células. Se había descrito que en las células musculares el TWEAK generaba un aumento de la expresión de MMP-9, participando así en la pérdida muscular asociada a estados cancerígenos (Johns *et al.* 2013). Por todo ello, y dado que el TWEAK era capaz de inducir migración en los MEFs, nos pareció interesante estudiar una posible modulación de la expresión y/o actividad de esta proteasa y de otras por parte del TWEAK.

Inicialmente, se analizaron posibles cambios en los niveles de los mRNA de distintas MMPs mediante RT-PCR cuantitativa. Como observamos en la Figura 36, el TWEAK aumenta significativamente los niveles del mRNA de MMP-9 en las células wt, pero no en las p38 α -/- cuando la comparamos con sus niveles basales. Analizamos también la expresión de otros miembros de la familia MMP y comprobamos que el TWEAK no es capaz de alterar los niveles del mRNA de MMP-10 ni de MMP-13. Curiosamente, en este último caso, se observa un aumento de los niveles basales del mRNA de MMP-13 en las células deficientes en p38 α .

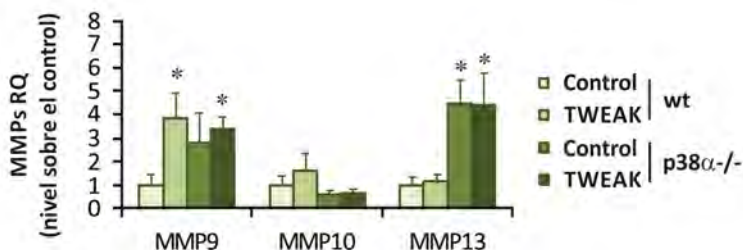


Figura 36: Efecto del sTWEAK sobre los niveles de los RNAm de MMP9, MMP10 y MMP13 en los MEFs p38α+/+, y p38α-/-.

Los MEFs fueron deprivados de suero e incubados con o sin sTWEAK (100ng/ml) durante 24h. Se muestran las medias de los RQs ±S.E.M. de 3 experimentos independientes. *p<0.05 comparado con el control de células wt.

Teniendo en cuenta los datos de expresión de los mRNA de MMP9, MMP10 y MMP13, y dado que la regulación de las MMPs en muchos casos no es transcripcional, analizamos posibles cambios en la actividad de MMP2 y MMP9. Hemos visto mediante zimografía que el tratamiento con TWEAK aumenta la actividad de MMP9 en los MEFs (Figura 37). En el caso de las células wt, el aumento de la actividad de MMP-9 inducida por TWEAK es de un 75%, mientras que en las células p38α-/- es del 300%. Esto se debe a que las células p38α-/- presentan una menor actividad basal de MMP-9 (un 40% respecto a las células wt), y por tanto, el incremento es mayor en respuesta al TWEAK. De hecho, cuando comparamos los niveles de actividad de las p38α-/- tratadas con TWEAK con los

niveles de actividad que presentan las células wt, también tratadas con TWEAK, ambos valores son semejantes. Sin embargo, la actividad de MMP-2 no se regula por el TWEAK, al igual que ocurre en células de neuroblastoma (Pettersen *et al.* 2013). Nuestros resultados sugieren que el TWEAK podría favorecer la migración/invasión celular a través del aumento de actividad de MMP-9.

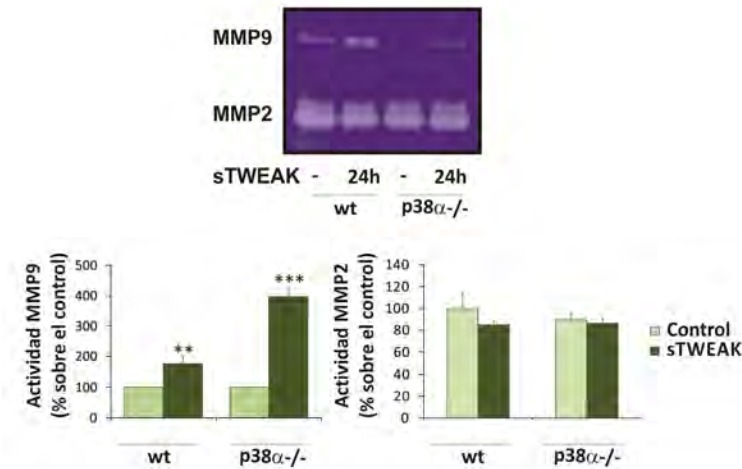


Figura 37: El sTWEAK aumenta la actividad de MMP9 en los MEFs p38 α ^{+/+} y p38 α ^{-/-}. Los MEFs fueron deprivados de suero e incubados con o sin TWEAK (100ng/ml) durante 24h. La actividad de MMP9 y 2 se analizó mediante zimografía. El nivel basal de actividad MMP-9 de las células p38 α ^{-/-} corresponde a un 40% de la de las células wt. Se muestra una imagen representativa de 4 experimentos independientes y la media \pm S.E.M. de las cuantificaciones correspondientes referidas al control de los MEFs wt (100%). **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control de MEFs wt.

4. El TWEAK es un regulador negativo de la secreción de Fibulina-3, una proteína de matriz extracelular implicada en migración.

En base a datos recientes de la bibliografía, se ha propuesto que la fibulina-3 puede ser tanto un promotor como un inhibidor de los procesos de migración/invasión en células tumorales (Luo *et al.* 2013; Pass *et al.* 2012). Así, por ejemplo, promueve los procesos de invasión en glioma (Hu *et al.* 2009), mientras que en otros tipos de tumores como en carcinoma de pulmón ejerce un efecto opuesto (Yue *et al.* 2007). Además, datos no publicados de nuestro grupo indican que p38 α regula negativamente la expresión de fibulina-3, lo que afecta a su vez a los procesos de migración/invasión. En base a todo esto, y al efecto del TWEAK sobre la migración y la actividad de MMP9, hemos analizado si el TWEAK podía ser capaz de

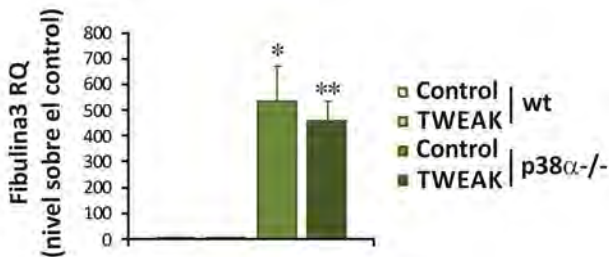


Figura 38: El sTWEAK no modula la expresión del RNAm de Fibulina 3 en los MEFs p38 α +/+ o p38 α -/-. Los MEFs fueron deprivados de suero e incubados con o sin sTWEAK (100ng/ml) durante 24h. Se muestran las medias de los RQs \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. *p<0.05 **p<0.01 comparado con el control de células wt.

regular la expresión y secreción de fibulina-3, la cual, podría actuar como mediadora de los efectos del TWEAK. También hemos analizado si el efecto del TWEAK sobre la expresión de fibulina-3 puede ser dependiente de p38 α .

Como ya habíamos comentado, datos no publicados de nuestro grupo indican que p38 α regula negativamente la expresión de fibulina-3 (Figura 38), por lo que las células p38 α -/- presentan niveles más altos del mRNA de fibulina-3 que las wt (aproximadamente un 400%). Sin embargo, el TWEAK no es capaz de modular la expresión del mRNA de fibulina-3 ni en los MEFs wt ni en los deficientes en p38 α .

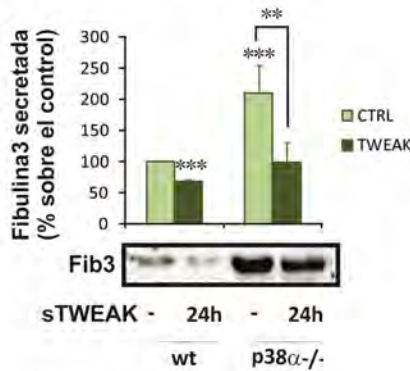


Figura 39: El sTWEAK disminuye la secreción de Fibulina 3 al medio por los MEFs p38 α +/+ y p38 α -/-. Los MEFs fueron deprivados de suero e incubados con o sin sTWEAK (100ng/ml) durante 24h. Se recogieron los medios de cultivo y se analizaron mediante western-blot. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes y la media \pm S.E.M. de las cuantificaciones correspondientes. **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control de MEFs wt.

Cuando analizamos la secreción de la fibulina-3 al medio de cultivo comprobamos, como se muestra en la Figura 39, que el sTWEAK disminuye su secreción, provocando una caída del 40% en el caso de las células wt y del 100% en el caso de las células p38 α -/-.

Dado que parece haber una correlación entre la bajada en secreción de fibulina-3 al medio y el efecto pro-migratorio del TWEAK, y que datos no publicados del grupo indicaban que el silenciamiento de fibulina-3 promovía la migración quisimos analizar el efecto del silenciamiento de fibulina-3 sobre la migración inducida por el TWEAK para ver si su efecto era dependiente de fibulina-3 o no. Para ello, utilizamos MEFs con silenciamiento estable de fibulina-3 generadas en el laboratorio (wt y p38 α -/-). Como observamos en la Figura 40, no hay cambios significativos en la velocidad de migración basal de las células wt como consecuencia del silenciamiento de fibulina-3. Esto se debe, probablemente, a los bajos niveles de fibulina-3 presentes en estas células wt, tanto sin silenciar como silenciadas. Sin embargo, en el caso de las células p38 α -/- observamos que el silenciamiento de fibulina-3, aumenta su velocidad basal de migración de forma significativa, siendo un 130% más a las 8h y un 45% más a las 24h. Así, si comparamos los tiempos de cierre de herida de las células p38 α -/- con silenciamiento de fibulina-3 con los de las células wt, ambas en condiciones basales, comprobamos que la velocidad de migración es la misma. Sin embargo, observamos que el sTWEAK no aumenta la velocidad de migración en los MEFs

con silenciamiento de fibulina-3, a diferencia de lo que ocurre en las células sin silenciamiento de fibulina-3. Por tanto, parece que el efecto que ejerce el TWEAK sobre la migración de los fibroblastos es dependiente de fibulina-3. Este efecto es más evidente en las células $p38\alpha^{-/-}$ que en las células wt, dado que el silenciamiento de fibulina-3 aumenta mucho su velocidad de migración basal.

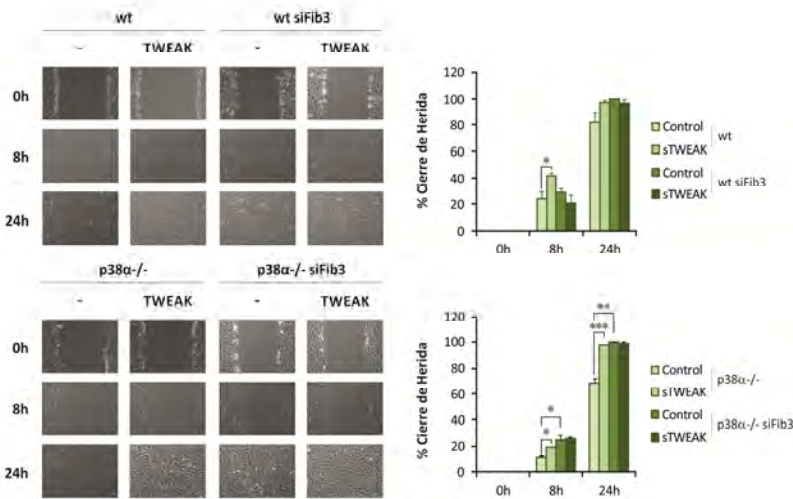


Figura 40: El silenciamiento de fibulina 3 bloquea el efecto pro-migratorio del TWEAK en los MEFs wt y $p38\alpha^{-/-}$. Los MEFs fueron deprivados de suero y tratados durante 30 minutos con Mitomicina C. Se les realizó una herida y se incubaron con o sin sTWEAK (100ng/ml). La migración se monitoriza a lo largo de 24h. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes y la media \pm S.E.M. de las cuantificaciones de dichos experimentos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con su control.

Por tanto, y teniendo en cuenta todos los datos obtenidos, podríamos pensar que el sTWEAK está implicado en la promoción de la migración de los fibroblastos murinos por un mecanismo dependiente de la disminución de la secreción de Fibulina-3 y del aumento de la actividad de MMP-9. Además, la ruta de las ERKs también parece estar implicada en estos efectos pro-migratorios del TWEAK. Por ello, cabe la posibilidad de que esta ruta pudiera estar implicada, al menos parcialmente, en la regulación de la secreción de la Fibulina-3 y/o de la actividad de MMP9 observada en respuesta al TWEAK. Estos efectos podrían ser importantes en un contexto de obesidad, en el que la migración de los fibroblastos hacia la herida se ve disminuida. El sTWEAK podría mejorar la cicatrización por lo que sería interesante estudiar el efecto conjunto entre el sTWEAK y el TNF- α en este modelo para comprobar si, al igual que en el caso de la resistencia a la insulina, el sTWEAK es capaz de modular los efectos negativos del TNF- α sobre la migración.

DISCUSIÓN GENERAL

La obesidad es la enfermedad metabólica más frecuente en los países industrializados y está directamente relacionada con el desarrollo de numerosas comorbilidades como la resistencia a la insulina y la Diabetes Tipo 2. El hecho de que tanto la ausencia como el exceso de tejido adiposo estén asociados a estados de resistencia a la insulina pone de manifiesto el papel esencial que juega este tejido en el desarrollo de estas patologías. El conocimiento de los circuitos metabólicos propios de los adipocitos y los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de estas enfermedades puede ofrecer nuevas estrategias para su tratamiento.

En un contexto de obesidad, se genera un desequilibrio en las respuestas homeostáticas caracterizado por un incremento en la presencia de citoquinas con actividad pro-inflamatoria, y una disminución de las anti-inflamatorias, que afecta negativamente a los procesos fisiológicos que mantienen la sensibilidad a la insulina. Así, se ha propuesto que los mediadores liberados por los adipocitos y/o los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo, como son los miembros de la familia del TNF- α , sean los responsables de la respuesta defectiva a la insulina en los tejidos periféricos. De hecho, los altos niveles de TNF- α que presentan los individuos obesos podrían explicarse como un intento de control del peso corporal, siendo la resistencia a la insulina un efecto secundario (Hube and Hauner 1999).

En la presente tesis describimos, por primera vez, un papel positivo para el eje TWEAK/Fn14 en los adipocitos viscerales humanos. Nuestros resultados demuestran que el sTWEAK atenúa la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α sobre el metabolismo de los carbohidratos sin afectar a los

demás efectos metabólicos de esta citoquina, dirigidos a limitar la acumulación de grasa. Aunque los estudios *in vitro* muestran que el sTWEAK induce resistencia a la insulina en el hígado (Feng *et al.* 2008), los estudios clínicos apuntan hacia la clasificación del sTWEAK como un potencial nuevo biomarcador del síndrome metabólico.

El sTWEAK se ha definido como un factor clave en enfermedades con perfil inflamatorio. No obstante, aunque en enfermedades de tipo autoinmune los niveles de esta citoquina encontrados son elevados (lupus eritematoso sistémico, lupus nefrítico y esclerosis sistémica) (Park *et al.* 2008; Schwartz *et al.* 2006; Yanaba *et al.* 2009), en otras enfermedades como en la Diabetes Mellitus, la aterosclerosis, el fallo renal crónico, la hipertensión arterial pulmonar, el fallo cardíaco o la aneurisma aórtica abdominal sus niveles circulantes son bajos, (Blanco-Colio *et al.* 2007; Chorianopoulos *et al.* 2009; Filusch *et al.* 2011; Kralisch *et al.* 2008; Martin-Ventura *et al.* 2011; Sanz *et al.* 2011; Yilmaz *et al.* 2009; Yilmaz *et al.* 2011). Más concretamente, estudios recientes han descrito que los niveles circulantes de sTWEAK son significativamente más bajos en los pacientes con diabetes tipo 2 y obesidad severa y que estos bajos niveles se correlacionan de forma negativa con los niveles de glucosa en ayunas, el porcentaje de hemoglobina glicosilada, la obesidad y la resistencia a la insulina (evaluado por el índice HOMA-IR: *Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance*) (Kralisch *et al.* 2008; Vendrell and Chacon 2013). De hecho, durante el desarrollo de esta tesis se ha visto también que el sTWEAK aumenta, en el 69% de los casos estudiados, en paralelo con la pérdida de peso que el paciente obeso sufre tras una cirugía bariátrica. Además, los niveles de sTWEAK

también se correlacionan negativamente con los de colesterol y triglicéridos y positivamente con los de colesterol asociado a HDL, por lo que parece que esta citoquina podría estar jugando un papel clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas con un componente cardiovascular. Por otro lado, es interesante destacar que los niveles de ácidos grasos libres podrían estar modulando la expresión del sTWEAK, por lo que la lipotoxicidad podría ser un factor importante en la regulación de sus niveles (Maymo-Masip *et al.* 2013). A su vez, los niveles de sTWEAK también son menores en los pacientes con diabetes tipo 1 y están inversamente correlacionados con los factores de riesgo cardiovascular (Llaurado *et al.* 2012).

Actualmente se desconoce el papel que el tejido adiposo podría estar ejerciendo en la secreción de sTWEAK. Bajo condiciones fisiológicas se han encontrado altos niveles del RNAm del TWEAK en una gran variedad de tejidos humanos, como los nódulos linfáticos, el páncreas, el intestino, el corazón, el cerebro, el pulmón, el ovario y el músculo vascular y esquelético. Sin embargo, la contribución real de cada tejido al sTWEAK circulante no se conoce. Los bajos niveles del mRNA del TWEAK detectados en el tejido adiposo humano (Vendrell *et al.* 2010) sugieren que la contribución de este tejido al TWEAK circulante es menor. No obstante, se ha descrito que los niveles de sTWEAK circulantes en los individuos obesos se correlacionan negativamente con la masa de adipocitos (Vendrell and Chacon 2013), al contrario de lo que ocurre con los niveles del TNF- α (Hotamisligil *et al.* 1993). Hasta la fecha, no se conocen ni el significado ni el mecanismo mediante el cual los niveles de sTWEAK están reducidos en las patologías asociadas con un perfil pro-aterosclerótico. Se puede plantear la hipótesis de que los niveles más bajos de

sTWEAK en las enfermedades de alto riesgo cardiovascular podrían ser consecuencia de la alteración metabólica en otros tejidos, en los que TWEAK se expresa generalmente en niveles más altos, tales como el músculo vascular y el esquelético, ambos por otro lado, implicados en el desarrollo de estos trastornos metabólicos.

Diversos miembros de la familia del TNF- α se han relacionado estrechamente con la regulación de numerosos procesos inflamatorios. En un contexto de obesidad, el TNF- α y el TWEAK coexisten en el tejido adiposo y aunque, en principio, ambas citoquinas tendrían potencial inflamatorio (Vendrell and Chacon 2013; Wieser *et al.* 2013), el TNF- α parece ser una citoquina pro-inflamatoria con un efecto más rápido y potente que el TWEAK (Fick *et al.* 2012). No obstante, se había descrito en otros modelos celulares que el sTWEAK inhibía los efectos pro-inflamatorios del TNF- α (Echeverry *et al.* 2012; Wicovsky *et al.* 2009; Yamana *et al.* 2012) y se ha comprobado que en el tejido adiposo también ocurre así, ya que inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por el TNF- α como la IL-6 y la IL-8 (Maymo-Masip *et al.* 2013). El análisis de las distintas isoformas del TWEAK en el tejido adiposo ha demostrado que el mTWEAK se expresa sólo en la fracción del estroma vascular, siendo los macrófagos anti-inflamatorios M2a aquellos que mayoritariamente expresan esta isoforma. Por el contrario, los adipocitos, a pesar de presentar niveles elevados de Fn14, expresan mínimamente tanto el mTWEAK como el sTWEAK. Teniendo en cuenta que los macrófagos son uno de los componentes principales de la fracción del estroma vascular y que en un contexto de obesidad su infiltración en el tejido adiposo es mayor (Sethi and Vidal-Puig 2007), estos datos apuntan también hacia un posible papel del TWEAK en la

prevención de la inflamación de bajo grado que ocurre en la obesidad.

Nuestro estudio sugiere además que el sTWEAK podría tener un papel beneficioso en las alteraciones metabólicas asociadas con la DT2 y proporciona evidencias sobre el mecanismo molecular a través del cual esta citoquina podría estar previniendo la resistencia a la insulina asociada al componente inflamatorio característico de la obesidad. No se han observado efectos metabólicos del sTWEAK ni sobre la lipólisis ni sobre el transporte de glucosa basal, lo que concuerda con un estudio anterior en adipocitos subcutáneos humanos (Tiller *et al.* 2009). Sin embargo, nuestros estudios demuestran, por primera vez, que el sTWEAK impide la resistencia a la insulina dependiente del TNF- α en términos de captación de glucosa regulando la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática y preservando la ruta de señalización de la insulina. Esto sugiere que podría actuar como un factor protector en la homeostasis de la glucosa mediada por la insulina.

Estudios previos han identificado al sTWEAK como un regulador, tanto positivo como negativo, de la ruta de señalización del TNF- α , ya que ambas citoquinas, a través de la unión a sus receptores, desencadenan vías de señalización utilizando factores similares asociados a los TNFRs, incluyendo TRAF2. Así, la ruta TWEAK-Fn14 puede sensibilizar a las células tumorales frente al TNF- α (Vince *et al.* 2008), mientras que en las células epiteliales no tumorales se ha descrito que el sTWEAK inhibe la señalización mediada por el TNFR1 y tiene potencial para alterar la calidad de las respuestas celulares al

TNF- α , tanto en inflamación como en muerte celular (Wicovsky *et al.* 2009).

Nuestro estudio indica que en los adipocitos viscerales humanos, tanto el Fn14 como el TNFR1, compiten por su unión al TRAF2 endógeno. Sin embargo, cuando se analizan las dianas posteriores de la ruta, se demuestra que la acción del sTWEAK modulando los efectos del TNF- α sobre la sensibilidad a la insulina es consecuencia, al menos en parte, de la regulación de las MAPKs, especialmente de las JNKs, más que de la competencia por los factores limitantes que comparten, como se ha descrito en otros modelos celulares (Maecker *et al.* 2005; Wicovsky *et al.* 2009). De manera más específica, demostramos que el sTWEAK previene la resistencia a la insulina inducida por TNF- α a través de la regulación de la fosforilación de JNK1/2. Es más, nuestro estudio proporciona evidencias experimentales que indican que la Serina/Treonina Fosfatasa PP2A es un efector de la cascada de señalización del TWEAK, y su activación está ligada al papel protector de éste durante el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de la regulación negativa de JNK1/2. Hasta ahora, se había descrito principalmente a PP2A como un regulador negativo de la ruta de señalización de la insulina ya que disminuye la activación de AKT (Blouin *et al.* 2010). De hecho, en los adipocitos marrones el TNF- α , actuando a través de un mecanismo dependiente de ceramidas, mediaría la activación de PP2A induciendo resistencia a la acción de la insulina disminuyendo la fosforilación de Akt (Teruel *et al.* 2001). Sin embargo, en este trabajo demostramos que el TNF- α no activa PP2A en los adipocitos blancos humanos, sugiriendo que el efecto de PP2A en la ruta de señalización de la insulina es dependiente del tipo celular. De hecho, nuestros resultados

demuestran que en nuestros modelos celulares la activación de PP2A a través de sTWEAK tendría un efecto positivo sobre la cascada de señalización de la insulina al inhibir la fosforilación de JNK1/2 inducida por TNF- α , la cual, está directamente relacionada con la resistencia a insulina producida por esta citoquina (Fernandez-Veledo *et al.* 2009b). Se sabe que PP2A está formada por 3 tipos de subunidades diferentes: estructurales, catalíticas y reguladoras. Las subunidades reguladoras juegan un papel clave en la localización y actividad de la enzima, por lo que puede llevar a cabo diferentes funciones dependiendo de la subunidad reguladora que forme parte de ella. De hecho, la especificidad de PP2A depende sobre todo de las subunidades reguladoras que se expresen, lo cual, es dependiente del tipo celular, momento del desarrollo y otros factores (Hahn *et al.* 2010).

En este contexto, los estudios en los adipocitos murinos demostraban que la inhibición de PP2A provoca resistencia a la insulina como consecuencia de la activación continuada de mTOR y la fosforilación de IRS1 en serina (Carlson *et al.* 2004). Además, la activación de determinadas rutas de transducción de señales por la adiponectina, una adipoquina bien conocida por sensibilizar a las células a la acción de la insulina, es dependiente de la activación de PP2A (Deepa *et al.* 2011). De acuerdo con esto, nuestro estudio en adipocitos viscerales humanos revela que la PP2A controla la fosforilación de JNK1/2, lo que está en concordancia con estudios previos hechos en células pancreáticas (Li *et al.* 2011) y de esta forma sensibilizaría a las células frente a la acción de la insulina. Aparte de la PP2A, se ha descrito que hay otras serina/treonina fosfatasas como la PP4, que están implicadas en la regulación de la activación de JNK1/2 inducida por el TNF-

α (Zhou *et al.* 2002). Aunque demostramos claramente que sTWEAK juega un papel positivo en la activación de PP2A en los adipocitos viscerales humanos en el contexto de la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α , no hay que descartar la posible participación de otras fosfatasa como la PP2C que también está implicada en la inhibición de la sensibilidad a la insulina provocada por el TNF- α (Steinberg *et al.* 2006).

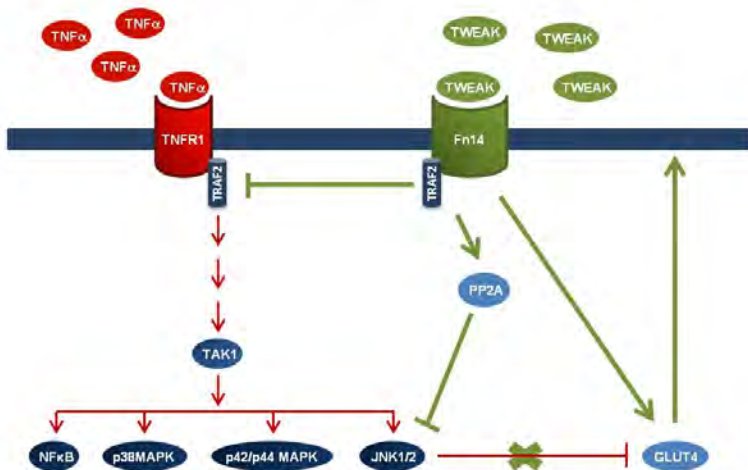
En resumen, en la primera parte de este trabajo hemos mostrado que el sTWEAK puede prevenir la resistencia a la insulina asociada a la obesidad provocada por el TNF- α a través de un mecanismo dependiente de PP2A. No obstante, es necesario seguir investigando en el futuro para poder entender en profundidad el mecanismo molecular mediante el cual el sTWEAK ejerce sus efectos positivos sobre la actividad de PP2A y lo que es más importante, establecer el papel específico de las subunidades reguladoras de PP2A en los estados de sensibilidad o resistencia a la insulina. En este escenario, proponemos que los niveles elevados de sTWEAK podrían tener un papel protector en el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de una sobre-activación de PP2A, apoyando la hipótesis previa que identificaba al sTWEAK como un potencial biomarcador de enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2. Nuestros resultados refuerzan la idea de que un desequilibrio entre los miembros de la familia del TNF- α en el tejido adiposo podría ser un factor clave en la patogénesis de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (Figura 41).

Al contrario de lo que se había observado que ocurría con el TNF- α en pacientes con obesidad y diabetes tipo 2, los niveles circulantes de sTWEAK aparecen como un elemento

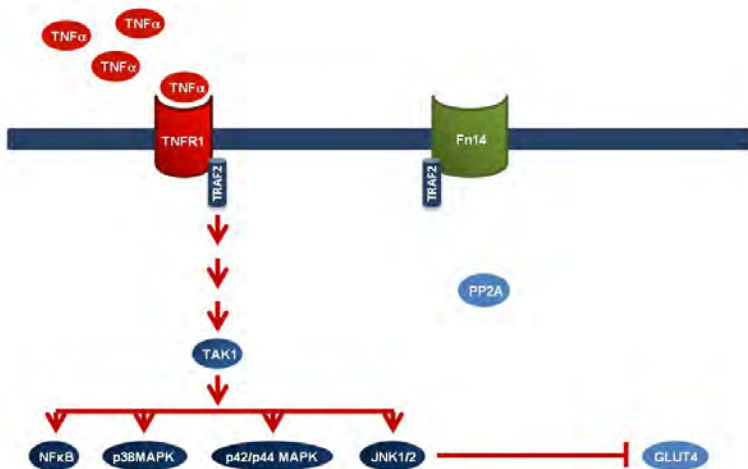
protector bajo estas condiciones. Es interesante destacar que el mTWEAK y el sTWEAK activan diferentes rutas de transducción de señales (Roos *et al.* 2010). Dado que el mTWEAK se expresa principalmente en los monocitos/macrófagos activados, los efectos metabólicos del TWEAK pueden, por lo tanto, diferir en las células que tienen contacto con los monocitos (por ejemplo, los adipocitos en un contexto de obesidad) y en las células más distantes que viven en un ambiente libre de monocitos. Por tanto, es posible que la disminución de los niveles de sTWEAK, junto con el aumento de mTWEAK, pueda contribuir a mantener el efecto pro-inflamatorio local promovido por el TNF- α . Por consiguiente, sería muy interesante estudiar el posible uso, tanto del TWEAK recombinante como de los agonistas de Fn14 para manipular la vía TWEAK/Fn14 y así tratar la resistencia a la acción de la insulina generada por el TNF- α .

Figura 41: El balance entre los miembros de la familia del TNF- α en el tejido adiposo es un factor clave en la patogénesis de los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad. (A) Estados tempranos de la obesidad/inflamación. Los niveles elevados de sTWEAK podrían indicar que ejerce un papel protector frente a la resistencia a la insulina generada por el TNF- α a nivel del transporte de glucosa. Aunque el TNFR1 y el Fn14 compiten por su unión a TRAF2, el pre-tratamiento con sTWEAK no modula todas las rutas de señalización que el TNF- α activa a través de TRAF2 (como por ejemplo TAK1). Específicamente, la activación de PP2A por sTWEAK inhibe la activación de JNK1/2 inducida por el TNF- α , permitiendo que los adipocitos respondan de manera adecuada a la insulina aumentando el transporte de glucosa dependiente de insulina. (B) Progresión de la obesidad/inflamación: una disminución en los niveles de sTWEAK (como ocurre en los pacientes con DT2 u obesidad) podría inducir una disminución de la respuesta a la insulina a nivel del transporte de glucosa como consecuencia de la activación de JNK1/2.

A. Estados tempranos de la obesidad



B. Progresión de la obesidad



Por otro lado, y en línea con el papel protector que parece presentar el sTWEAK sobre la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, decidimos analizar el efecto de esta citoquina sobre otras funciones celulares. Es sabido que una de las complicaciones más habituales de la diabetes es la dificultad que presentan sus pacientes para cicatrizar las heridas. Muchas de las etapas clave del proceso de cicatrización están alteradas en los enfermos diabéticos, lo que se ha relacionado con un reclutamiento temprano defectivo de las células inflamatorias, asociado a su vez con una alteración de la expresión de quimioquinas y factores de crecimiento, como el EGF, el TGF- β o el FGF (Barrientos *et al.* 2008; Ochoa *et al.* 2007). Por otro lado, en la diabetes existe además una disminución de la migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos y de los fibroblastos, lo que se ha relacionado con un aumento de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , en las heridas de estos pacientes (Corredor *et al.* 2003).

Como ya comentamos anteriormente, en los pacientes con diabetes tipo 2 y obesidad severa existe una disminución en los niveles de sTWEAK circulantes, lo que podría dar lugar a un peor pronóstico de la enfermedad. En base a esto, hemos estudiado por primera vez, el papel que esta citoquina juega en la cicatrización de las heridas, basándonos en un modelo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Los fibroblastos son importantes en el proceso de cicatrización ya que son las células que se encargan principalmente de la secreción de la nueva matriz extracelular necesaria para la re-epitelización de las heridas. Además, existen datos en la bibliografía que demuestran que el TWEAK aumenta la migración e invasión celular de distintos tipos de

células tumorales, como las de cáncer de ovario (Dai *et al.* 2009).

Mediante los ensayos de cierre de herida, demostramos, por primera vez, que el TWEAK aumenta la migración de los MEFs a través de un mecanismo no mediado por la p38 α MAPK, a pesar de que esta quinasa promueve la migración e invasión celular en distintos modelos celulares (Gamell *et al.* 2011; Junttila *et al.* 2007). Como el sTWEAK, además de activar a la p38 α MAPK, también activa las rutas de ERKs y PI3K/AKT, analizamos si el aumento de la velocidad de migración en los fibroblastos ocurría a través de alguna de estas vías. Sin embargo, nuestros datos indican que la activación de PI3K no sería responsable de dicha acción, ya que al inhibir PI3K, la velocidad de migración inducida por el sTWEAK no se veía alterada. Por el contrario, la ruta de las ERKs parece contribuir al efecto pro-migratorio del sTWEAK, dado que el inhibidor de las ERKs disminuía la velocidad de migración inducida por el sTWEAK.

Numerosos estudios han demostrado que las MMPs están implicadas en los procesos de migración/invasión celular, ya que participan en la degradación de las moléculas de la matriz extracelular (Jiang *et al.* 2013). Al analizar si el sTWEAK es capaz de modular la expresión de los RNAm de algunas MMPs (MMP-9, MMP-10 y MMP-13), únicamente vimos un aumento significativo de los niveles del mRNA de MMP-9 en respuesta a sTWEAK en los MEFs wt. No obstante, los cambios en los niveles de los mRNA de MMP-9, MMP-10 y MMP-13 en MEFs wt y p38 α -/- no explican las diferencias observadas en migración. Por ello y teniendo en cuenta que la regulación de

la actividad de las MMPs en muchos casos no es transcripcional, se analizó la actividad de MMP-2 y MMP-9.

Mediante zimografía comprobamos que el sTWEAK aumenta la actividad de MMP-9 tanto en las células wt como en las p38 α -/. Esto podría explicar el papel pro-migratorio del sTWEAK en MEFs wt y p38 α -/ y concuerda con un estudio previo en el que se había visto que el sTWEAK es capaz de incrementar la actividad de MMP-9 en los fibroblastos cardíacos, promoviendo así la inducción de fibrosis en el miocardio (Chen *et al.* 2012).

También hemos visto que el sTWEAK disminuye la secreción al medio extracelular de la proteína de matriz extracelular, fibulina-3, sin alterar los niveles de su mRNA. Esta proteína promueve la migración e invasión en algunos tipos de tumores como los de glioblastoma (Hu *et al.* 2009), mientras que en otros como el cáncer de pulmón (Yue *et al.* 2007) o colorrectal (Tong *et al.* 2011) inhibe dichos procesos. Por otro lado, datos no publicados de nuestro grupo indicaban que la fibulina-3 era capaz de regular de forma negativa la migración e invasión de los MEFs y que su expresión se regula negativamente por p38 α . Así, las células p38 α -/ presentan una mayor expresión de fibulina-3 y una menor migración celular basal. De acuerdo con todo eso y en concordancia también con el efecto que hemos visto que tiene el sTWEAK incrementando la velocidad de migración las células p38 α -/ hasta llegar a una velocidad similar a la de las células wt, la disminución de los niveles de fibulina-3 secretada al medio podría ser responsable del efecto del TWEAK sobre la migración. De hecho, los datos de migración celular obtenidos con los MEFs (wt y p38 α -/) con silenciamiento estable de

fibulina-3 parecen corroborar esta hipótesis. Así, el silenciamiento de fibulina-3 impide la acción pro-migratoria del TWEAK, dado que induce un incremento de la velocidad de migración basal, que es especialmente significativo en el caso de los MEFs p38 α -/. Por tanto, todos estos datos indican que hay una correlación inversa entre los niveles de fibulina-3 y la migración celular. A su vez, el efecto que ejerce el TWEAK sobre la migración de los fibroblastos parece ser dependiente de fibulina-3.

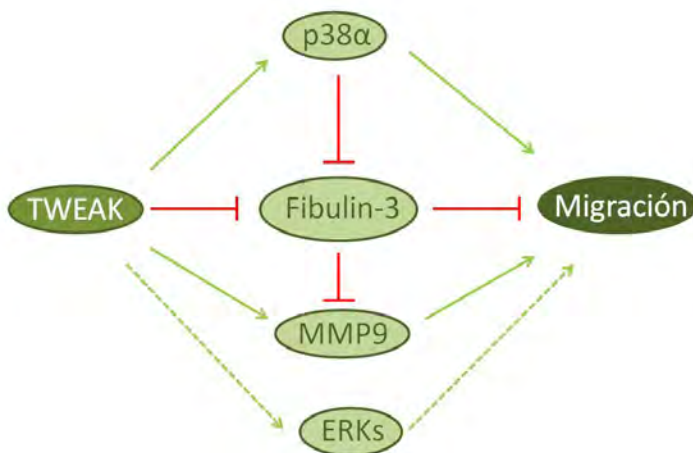


Figura 42: El TWEAK presenta efectos positivos en los mecanismos de cierre de herida implicados en la cicatrización. El TWEAK, a través de las ERKs, MMP-9 y de la regulación negativa de fibulina 3 aumenta la velocidad de migración de los MEFs pudiendo mejorar el proceso de cicatrización defectivo de los pacientes diabéticos. p38 α , a pesar de ser activada por TWEAK, no media su efecto pro-migratorio.

En resumen, los resultados correspondientes a esta segunda parte de la tesis indican que el sTWEAK promueve la migración de los fibroblastos embrionarios de ratón a través de mecanismos dependientes de activación de las ERKs y MMP-9 y de la disminución de la secreción de fibulina-3, según el modelo que proponemos en la Figura 42. Sería interesante esclarecer mediante futuros estudios el mecanismo exacto por el que el sTWEAK aumenta la actividad de MMP-9 y disminuye la secreción de fibulina-3. En base a datos publicados en otros modelos celulares, cabe pensar que la fibulina-3 pueda estar implicada en la regulación de la actividad de MMP-9, como ocurre en el caso del glioblastoma (Hu *et al.* 2009). En dicho modelo, la fibulina-3 aumenta la actividad y expresión de MMP-2 y -9, mientras que en el caso del cáncer de pulmón, la fibulina-3 disminuye la expresión de MMP-2 y -7 (Kim *et al.* 2012).

En conjunto, todos estos resultados indican que el sTWEAK podría inducir efectos beneficiosos en los pacientes diabéticos, tanto previniendo la resistencia a la insulina como mejorando la cicatrización de las heridas. Sería interesante estudiar los efectos que esta citoquina podría ejercer in vivo y en células humanas y comprobar si es posible revertir el fenotipo diabético restaurando los niveles de sTWEAK. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene el mantenimiento de los niveles de citoquinas para el correcto funcionamiento metabólico.

CONCLUSIONES

1. El sTWEAK induce apoptosis en los adipocitos viscerales humanos en menor medida que el TNF- α y no es capaz de sensibilizar a estas células frente a la muerte inducida por TNF- α .
2. El sTWEAK no regula la lipólisis basal ni la inducida por el TNF- α en los adipocitos viscerales humanos.
3. El sTWEAK previene la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α a nivel del transporte de glucosa recuperando la activación de la ruta de señalización de la insulina.
4. El pre-tratamiento con sTWEAK inhibe la asociación de TRAF2 con el receptor de tipo 1 del TNF- α , así como la activación de la ruta de JNK1/2.
5. El TNF- α induce resistencia a la insulina a través de la activación del receptor de tipo 1 del TNF- α .
6. La ruta sTWEAK-Fn14 previene la resistencia a la insulina a través de la regulación negativa de la ruta de JNK1/2 por un mecanismo dependiente de PP2A.
7. El sTWEAK promueve la migración de los MEFs wt y p38 α -/- por un mecanismo que no está mediado por las rutas de p38 α MAPK o PI3K, pero es parcialmente dependiente de la activación de las ERKs.
8. El sTWEAK aumenta la actividad de la metaloproteasa MMP-9 en los MEFs a través de un mecanismo independiente de p38 α .
9. El sTWEAK es un regulador negativo de la secreción de la fibulina-3 en los MEFs.
10. El silenciamiento de fibulina-3 bloquea el efecto pro-migratorio del sTWEAK en los MEFs.

Conclusión final: El sTWEAK ejerce un papel protector frente a la resistencia a la insulina y promueve la migración celular de los fibroblastos durante el cierre de herida, por lo que podría ser una diana terapéutica en la lucha contra la resistencia a la insulina y los problemas de cicatrización que presentan los pacientes con diabetes tipo 2.

Bibliografía

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729-733.

Alexaki VI, Notas G, Pelekanou V, Kampa M, Valkanou M, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E (2009) Adipocytes as immune cells: differential expression of TWEAK, BAFF, and APRIL and their receptors (Fn14, BAFF-R, TACI, and BCMA) at different stages of normal and pathological adipose tissue development. *J.Immunol.* **183**, 5948-5956.

Argaves WS, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E (1989) Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* **58**, 623-629.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound.Repair Regen.* **16**, 585-601.

Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, Pasparakis M, Watson CJ (2006) IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development* **133**, 3485-3494.

Biddinger SB, Kahn CR (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu.Rev.Physiol* **68**, 123-158.

Blakytyn R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet.Med.* **23**, 594-608.

Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Munoz-Garcia B, Moreno JA, Meilhac O, Ortiz A, Egido J (2007) TWEAK and Fn14. New players in the pathogenesis of atherosclerosis. *Front Biosci.* **12**, 3648-3655.

Blobel CP (2002) Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm.Res.* **51**, 83-84.

Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, Ferre P, Dugail I, Hajduch E (2010) Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* **59**, 600-610.

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 19-26.

Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P (2006) Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J.Biol.Chem.* **281**, 13964-13971.

Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R (2005) Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* **8**, 347-354.

Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, Aggarwal BB, Arap W, Pasqualini R (2007) A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J.Immunol.* **178**, 8183-8194.

Brown SA, Hanscom HN, Vu H, Brew SA, Winkles JA (2006) TWEAK binding to the Fn14 cysteine-rich domain depends on

charged residues located in both the A1 and D2 modules. *Biochem.J.* **397**, 297-304.

Cabal-Hierro L, Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* **24**, 1297-1305.

Campbell S, Michaelson J, Burkly L, Putterman C (2004) The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity. *Front Biosci.* **9**, 2273-2284.

Canale MP, Manca d, V, Martino G, Rovella V, Noce A, De LA, Di DN (2013) Obesity-related metabolic syndrome: mechanisms of sympathetic overactivity. *Int.J.Endocrinol.* **2013**, 865965.

Canello R, Clement K (2006) Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG.* **113**, 1141-1147.

Carbo N, Busquets S, van RM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2002) TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br.J.Cancer* **86**, 1012-1016.

Carlson CJ, White MF, Rondinone CM (2004) Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **316**, 533-539.

Cawthorn WP, Sethi JK (2008) TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* **582**, 117-131.

Chacon MR, Richart C, Gomez JM, Megia A, Vilarrasa N, Fernandez-Real JM, Garcia-Espana A, Miranda M, Masdevall C, Ricard W, Caubet E, Soler J, Vendrell J (2006) Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose

tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* **33**, 129-137.

Chatzantoni K, Mouzaki A (2006) Anti-TNF-alpha antibody therapies in autoimmune diseases. *Curr.Top.Med.Chem.* **6**, 1707-1714.

Chatzigeorgiou A, Harokopos V, Mylona-Karagianni C, Tsouvalas E, Aidinis V, Kamper EF (2010) The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann.Med.* **42**, 426-438.

Chaves VE, Frasson D, Kawashita NH (2011) Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie* **93**, 1631-1640.

Chen HN, Wang DJ, Ren MY, Wang QL, Sui SJ (2012) TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF-small ka, CyrillicB pathway. *Mol.Biol.Rep.* **39**, 8231-8241.

Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 32401-32410.

Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S (2000) Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279**, 162-165.

Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N (2009) Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur.J.Heart Fail.* **11**, 1050-1056.

Corredor J, Yan F, Shen CC, Tong W, John SK, Wilson G, Whitehead R, Polk DB (2003) Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **284**, C953-C961.

Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W (2009) TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett.* **283**, 159-167.

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, bdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T (1998) Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 2907-2910.

De A, Park JI, Kawamura K, Chen R, Klein C, Rauch R, Mulders SM, Sollewijn G, Hsueh AJ (2006) Intraovarian tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis/fibroblast growth factor-inducible-14 ligand-receptor system limits ovarian preovulatory follicles from excessive luteinization. *Mol.Endocrinol.* **20**, 2528-2538.

De KA, Vermeulen L, Vialard J, Van DW, I, Van WJ, Haegeman G, Moelans I (2004) Involvement of GSK-3beta in TWEAK-mediated NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **566**, 60-64.

de VS, Iwamoto T, Yamada Y (2009) Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cell Mol.Life Sci.* **66**, 1890-1902.

Deepa SS, Zhou L, Ryu J, Wang C, Mao X, Li C, Zhang N, Musi N, DeFronzo RA, Liu F, Dong LQ (2011) APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKCzeta signaling pathway. *Mol.Endocrinol.* **25**, 1773-1785.

Despres JP (2006) Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J.Endocrinol.Invest* **29**, 77-82.

Desta T, Li J, Chino T, Graves DT (2010) Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J.Dent.Res.* **89**, 609-614.

Dhruv HD, Whitsett TG, Jameson NM, Patel F, Winkles JA, Berens ME, Tran NL (2013) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes glioblastoma cell chemotaxis via Lyn activation. *Carcinogenesis*.

Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A (2007) TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* **21**, 1857-1869.

Dohi T, Burkly LC (2012) The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases: focus on inflammatory bowel diseases. *J.Leukoc.Biol.* **92**, 265-279.

Drysdale BE, Zacharchuk CM, Shin HS (1983) Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J.Immunol.* **131**, 2362-2367.

Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M (2012) The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J.Neuroinflammation.* **9**, 45.

En-lin S, Sheng-guo C, Hua-qiao W (2010) The expression of EFEMP1 in cervical carcinoma and its relationship with prognosis. *Gynecol.Oncol.* **117**, 417-422.

Feng F, Wang L, Albanese N, Holmes A, Xia P (2008) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis attenuates the action of insulin in hepatocytes. *Endocrinology* **149**, 1505-1513.

Feng SL, Guo Y, Factor VM, Thorgeirsson SS, Bell DW, Testa JR, Peifley KA, Winkles JA (2000) The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *Am.J.Pathol.* **156**, 1253-1261.

Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de CJ, Ramos MP, Bruderlein S, Moller P, Lorenzo M (2008) Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocytic cell line: paracrine interaction with myocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 2866-2876.

Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L,onso-Chamorro M, Lorenzo M (2009a) Molecular mechanisms involved in obesity-associated insulin resistance: therapeutical approach. *Arch.Physiol Biochem.* **115**, 227-239.

Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M (2009b) c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **94**, 3583-3593.

Ferrante AW, Jr. (2007) Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J.Intern.Med.* **262**, 408-414.

Fick A, Lang I, Schafer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, Wajant H (2012) Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J.Biol.Chem.* **287**, 484-495.

Filusch A, Zelniker T, Baumgartner C, Eschricht S, Frey N, Katus HA, Chorianopoulos E (2011) Soluble TWEAK predicts hemodynamic impairment and functional capacity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin.Res.Cardiol.* **100**, 879-885.

Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987) Severely impaired adipin expression in genetic and acquired obesity. *Science* **237**, 405-408.

Fortin Ensign SP, Mathews IT, Eschbacher JM, Loftus JC, Symons MH, Tran NL (2013) The Src homology 3 domain-containing guanine nucleotide exchange factor is overexpressed in high-grade gliomas and promotes tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-fibroblast growth factor-inducible 14-induced cell migration and invasion via tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J.Biol.Chem.* **288**, 21887-21897.

Fu X, Li H (2009) Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. *Cell Tissue Res.* **335**, 317-321.

Gamell C, Susperregui AG, Bernard O, Rosa JL, Ventura F (2011) The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration. *PLoS.One.* **6**, e16477.

Gaudineau B, Fougere M, Guaddachi F, Lemoine F, de la GP, Jauliac S (2012) Lipocalin 2, the TNF-like receptor TWEAKR and

its ligand TWEAK act downstream of NFAT1 to regulate breast cancer cell invasion. *J.Cell Sci.* **125**, 4475-4486.

Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, Brown SA, Winkles JA, Michaelson JS, Allaire N, Schneider P, Scott ML, Hsu YM, Yagita H, Flavell RA, Miller JB, Burkly LC, Zheng TS (2006) TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* **25**, 5826-5839.

Glenney GW, Wiens GD (2007) Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis. *J.Immunol.* **178**, 7955-7973.

Gloire G, Dejardin E, Piette J (2006) Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem.Pharmacol.* **72**, 1081-1089.

Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu.Rev.Immunol.* **29**, 415-445.

Gu L, Dai L, Cao C, Zhu J, Ding C, Xu HB, Qiu L, Di W (2013) Functional expression of TWEAK and the receptor Fn14 in human malignant ovarian tumors: possible implication for ovarian tumor intervention. *PLoS.One.* **8**, e57436.

Hahn K, Miranda M, Francis VA, Vendrell J, Zorzano A, Teleman AA (2010) PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab* **11**, 438-444.

Haile WB, Echeverry R, Wu F, Guzman J, An J, Wu J, Yepes M (2010) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and fibroblast growth factor-inducible 14 mediate cerebral

ischemia-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation and neuronal death. *Neuroscience* **171**, 1256-1264.

Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL (2001) TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J.Cell Sci.* **114**, 131-139.

Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K (2002) Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **299**, 488-493.

Havel PJ (2004) Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S143-S151.

Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* **25**, 6758-6780.

Ho DH, Vu H, Brown SA, Donohue PJ, Hanscom HN, Winkles JA (2004) Soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis overexpression in HEK293 cells promotes tumor growth and angiogenesis in athymic nude mice. *Cancer Res.* **64**, 8968-8972.

Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu.Rev.Nutr.* **20**, 365-393.

Hotamisligil GS (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **27 Suppl 3**, S53-S55.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91.

Hotta K, Sho M, Yamato I, Shimada K, Harada H, Akahori T, Nakamura S, Konishi N, Yagita H, Nonomura K, Nakajima Y (2011) Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int.* **79**, 179-188.

Hu B, Thirtamara-Rajamani KK, Sim H, Viapiano MS (2009) Fibulin-3 is uniquely upregulated in malignant gliomas and promotes tumor cell motility and invasion. *Mol.Cancer Res.* **7**, 1756-1770.

Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH (2006) Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol.Cell Biol.* **26**, 3071-3084.

Huang S, Czech MP (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* **5**, 237-252.

Hube F, Hauner H (1999) The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm.Metab Res.* **31**, 626-631.

Hube F, Hauner H (2000) The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture. *Endocrinology* **141**, 2582-2588.

Hwang CF, Chien CY, Huang SC, Yin YF, Huang CC, Fang FM, Tsai HT, Su LJ, Chen CH (2010) Fibulin-3 is associated with tumour progression and a poor prognosis in nasopharyngeal carcinomas and inhibits cell migration and invasion via suppressed AKT activity. *J.Pathol.* **222**, 367-379.

Hwang LC, Bai CH, Sun CA, Chen CJ (2012) Prevalence of metabolically healthy obesity and its impacts on incidences of

hypertension, diabetes and the metabolic syndrome in Taiwan. *Asia Pac.J.Clin.Nutr.* **21**, 227-233.

Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, Blanco J, Carrasco S, Sanchez-Nino MD, Ito-Martin A, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2012) TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int.* **81**, 1098-1107.

Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, Lincecum JM, Wang MZ, Zheng TS, Browning B, Michaelson JS, Baetscher M, Wang B, Bissell DM, Burkly LC (2005) TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J.Clin.Invest* **115**, 2330-2340.

Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem.J.* **353**, 417-439.

Jiang XP, Zhang DX, Teng M, Zhang Q, Zhang JP, Huang YS (2013) Downregulation of CD9 in Keratinocyte Contributes to Cell Migration via Upregulation of Matrix Metalloproteinase-9. *PLoS.One.* **8**, e77806.

Johns N, Stephens NA, Fearon KC (2013) Muscle wasting in cancer. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **45**, 2215-2229.

Junttila MR, Ia-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, Jaakkola P, Westermarck J, Kahari VM (2007) p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* **26**, 5267-5279.

Jupp OJ, McFarlane SM, Anderson HM, Littlejohn AF, Mohamed AA, MacKay RH, Vandenabeele P, MacEwan DJ (2001) Type II tumour necrosis factor- α receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem.J.* **359**, 525-535.

Justo P, Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J, Ortiz A (2006) Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int.* **70**, 1750-1758.

Kamata K, Kamijo S, Nakajima A, Koyanagi A, Kurosawa H, Yagita H, Okumura K (2006) Involvement of TNF-like weak inducer of apoptosis in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* **177**, 6433-6439.

Kaplan MJ, Ray D, Mo RR, Yung RL, Richardson BC (2000) TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4+ T cell killing of antigen-presenting macrophages. *J.Immunol.* **164**, 2897-2904.

Kaptein A, Jansen M, Dilaver G, Kitson J, Dash L, Wang E, Owen MJ, Bodmer JL, Tschopp J, Farrow SN (2000) Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3). *FEBS Lett.* **485**, 135-141.

Karin M (2006) Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431-436.

Kawakita T, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Enokimura N, Yamamoto N, Okano H, Sugimoto K, Murata K, Nakano T (2004) Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: possible implication in cell

proliferation and tumor angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **318**, 726-733.

Kawakita T, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Enokimura N, Yamamoto N, Okano H, Sugimoto K, Murata K, Nakano T (2005) Functional expression of TWEAK in human colonic adenocarcinoma cells. *Int.J.Oncol.* **26**, 87-93.

Kim EJ, Lee SY, Woo MK, Choi SI, Kim TR, Kim MJ, Kim KC, Cho EW, Kim IG (2012) Fibulin-3 promoter methylation alters the invasive behavior of non-small cell lung cancer cell lines via MMP-7 and MMP-2 regulation. *Int.J.Oncol.* **40**, 402-408.

Kim YJ, Yoon HY, Kim SK, Kim YW, Kim EJ, Kim IY, Kim WJ (2011) EFEMP1 as a novel DNA methylation marker for prostate cancer: array-based DNA methylation and expression profiling. *Clin.Cancer Res.* **17**, 4523-4530.

Kim YS, Joh TH (2012) Matrix Metalloproteinases, New Insights into the Understanding of Neurodegenerative Disorders. *Biomol.Ther.(Seoul.)* **20**, 133-143.

Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2008) Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* **199**, 440-444.

Kumar M, Makonchuk DY, Li H, Mittal A, Kumar A (2009) TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) activates proinflammatory signaling pathways and gene expression through the activation of TGF-beta-activated kinase 1. *J.Immunol.* **182**, 2439-2448.

Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE (2009) Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* **14**, 1484-1495.

Lafontan M, Langin D (2009) Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog.Lipid Res.* **48**, 275-297.

Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF (2011) High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS.One.* **6**, e22865.

Langin D (2006) Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol.Res.* **53**, 482-491.

Lansley MN, Walker NN, Hargett SR, Stevens JR, Keller SR (2012) Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **303**, E1273-E1286.

Lecka-Czernik B, Lumpkin CK, Jr., Goldstein S (1995) An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Mol.Cell Biol.* **15**, 120-128.

Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, Kumar A (2009) Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role of MMP-9 in myopathy. *J.Biol.Chem.* **284**, 4439-4450.

Li W, Chen Z, Gong FR, Zong Y, Chen K, Li DM, Yin H, Duan WM, Miao Y, Tao M, Han X, Xu ZK (2011) Growth of the pancreatic cancer cell line PANC-1 is inhibited by protein phosphatase 2A inhibitors through overactivation of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur.J.Cancer* **47**, 2654-2664.

Lippitz BE (2013) Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* **14**, e218-e228.

Llaurado G, Gonzalez-Clemente JM, Maymo-Masip E, Subias D, Vendrell J, Chacon MR (2012) Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. a case-control study. *PLoS.One.* **7**, e43919.

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

Lu J, Kwan BC, Lai FM, Choi PC, Tam LS, Li EK, Chow KM, Wang G, Li PK, Szeto CC (2011) Gene expression of TWEAK/Fn14 and IP-10/CXCR3 in glomerulus and tubulointerstitium of patients with lupus nephritis. *Nephrology.(Carlton.)* **16**, 426-432.

Luo R, Zhang M, Liu L, Lu S, Zhang CZ, Yun J (2013) Decrease of fibulin-3 in hepatocellular carcinoma indicates poor prognosis. *PLoS.One.* **8**, e70511.

Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR (1999) TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 8455-8459.

Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, Hurst S, Danilenko D, Li J, Filvaroff E, Yang B, Daniel D, Ashkenazi A (2005) TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* **123**, 931-944.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr.Biol.* **8**, 525-528.

Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.

Martin-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno JA, Vega de CM, Meilhac O, Michel JB, Egido J, Blanco-Colio LM (2011) Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **214**, 486-489.

Maymo-Masip E, Fernandez-Veledo S, Garcia EA, Vazquez-Carballo A, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E, Garrifo-Sanchez L, Rodriguez MM, Vendrell J, Chacon MR (2013) The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery may affect adipocyte-cytokine production induced by TNFalpha. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **98**, E1323-E1333.

Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, Boiani R, Campbell M, Christodoulides C, Perrin C, Jimenez-Linan M, Blount M, Dixon J, Zahn D, Thresher RR, Aparicio S, Carlton M, Colledge WH, Kettunen MI, Seppanen-Laakso T, Sethi JK, O'Rahilly S, Brindle K, Cinti S, Oresic M, Burcelin R, Vidal-Puig A (2005) The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes* **54**, 1706-1716.

Meighan-Mantha RL, Hsu DK, Guo Y, Brown SA, Feng SL, Peifley KA, Alberts GF, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Richards CM, Winkles JA (1999) The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J.Biol.Chem.* **274**, 33166-33176.

Merritt EK, Thalacker-Mercer A, Cross JM, Windham ST, Thomas SJ, Bamman MM (2013) Increased expression of atrogenes and TWEAK family members after severe burn injury in nonburned human skeletal muscle. *J.Burn Care Res.* **34**, e297-e304.

Michaelson JS, Burkly LC (2009) Therapeutic targeting of TWEAK/Fn14 in cancer: exploiting the intrinsic tumor cell killing capacity of the pathway. *Results Probl.Cell Differ.* **49**, 145-160.

Michaelson JS, Wisniacki N, Burkly LC, Putterman C (2012) Role of TWEAK in lupus nephritis: a bench-to-bedside review. *J.Autoimmun.* **39**, 130-142.

Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, Makonchuk DY, Glass DJ, Kumar A (2010) The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J.Cell Biol.* **188**, 833-849.

Molina JM, Ciaraldi TP, Brady D, Olefsky JM (1989) Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* **38**, 991-995.

Moller DE (2000) Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol.Metab* **11**, 212-217.

Montague CT, O'Rahilly S (2000) The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* **49**, 883-888.

Moore RM, Redline RW, Kumar D, Mercer BM, Mansour JM, Yohannes E, Novak JB, Chance MR, Moore JJ (2009) Differential expression of fibulin family proteins in the para-cervical weak zone and other areas of human fetal membranes. *Placenta* **30**, 335-341.

Nakayama M, Harada N, Okumura K, Yagita H (2003) Characterization of murine TWEAK and its receptor (Fn14) by monoclonal antibodies. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **306**, 819-825.

Nakayama M, Ishidoh K, Kayagaki N, Kojima Y, Yamaguchi N, Nakano H, Kominami E, Okumura K, Yagita H (2002) Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J.Immunol.* **168**, 734-743.

Nakayama M, Kayagaki N, Yamaguchi N, Okumura K, Yagita H (2000) Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J.Exp.Med.* **192**, 1373-1380.

Neels JG, Olefsky JM (2006) Inflamed fat: what starts the fire? *J.Clin.Invest* **116**, 33-35.

Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M (2008) Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch.Physiol Biochem.* **114**, 183-194.

Nishimura M, Shin MS, Singhirunnusorn P, Suzuki S, Kawanishi M, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H (2009) TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF- κ B-independent survival pathways in tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol.Cell Biol.* **29**, 5529-5539.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat.Protoc.* **1**, 1559-1582.

Ochoa O, Torres FM, Shireman PK (2007) Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular.* **15**, 350-355.

Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A (2004) Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in

women with overweight and obesity. *Metabolism* **53**, 1268-1273.

Park MC, Chung SJ, Park YB, Lee SK (2008) Relationship of serum TWEAK level to cytokine level, disease activity, and response to anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Scand.J.Rheumatol.* **37**, 173-178.

Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, Huflejt M, Carbone M, Chia D, Goodglick L, Goodman GE, Thornquist MD, Liu G, de PM, Tsao MS, Goparaju C (2012) Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N.Engl.J.Med.* **367**, 1417-1427.

Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM (1996) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **271**, 13018-13022.

Perper SJ, Browning B, Burkly LC, Weng S, Gao C, Giza K, Su L, Tarilonte L, Crowell T, Rajman L, Runkel L, Scott M, Atkins GJ, Findlay DM, Zheng TS, Hess H (2006) TWEAK is a novel arthritogenic mediator. *J.Immunol.* **177**, 2610-2620.

Pettersen I, Baryawno N, Abel F, Bakkelund WH, Zykova SN, Winberg JO, Moens U, Rasmuson A, Kogner P, Johnsen JI, Sveinbjornsson B (2013) Expression of TWEAK/Fn14 in neuroblastoma: implications in tumorigenesis. *Int.J.Oncol.* **42**, 1239-1248.

Polek TC, Talpaz M, Darnay BG, Spivak-Kroizman T (2003) TWEAK mediates signal transduction and differentiation of

RAW264.7 cells in the absence of Fn14/TweakR. Evidence for a second TWEAK receptor. *J.Biol.Chem.* **278**, 32317-32323.

Petrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, Maurer MH, Rossner M, Schneider A, Schwaninger M (2004) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *J.Neurosci.* **24**, 8237-8244.

Radisky ES, Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **15**, 201-212.

Ramirez Alvarado MM, Sanchez RC (2012) [Tumor necrosis factor-alpha, insulin resistance, the lipoprotein metabolism and obesity in humans]. *Nutr.Hosp.* **27**, 1751-1757.

Reid TR, Torti FM, Ringold GM (1989) Evidence for two mechanisms by which tumor necrosis factor kills cells. *J.Biol.Chem.* **264**, 4583-4589.

Roos C, Wicovsky A, Muller N, Salzmann S, Rosenthal T, Kalthoff H, Trauzold A, Seher A, Henkler F, Kneitz C, Wajant H (2010) Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J.Immunol.* **185**, 1593-1605.

Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van PL, Lodish HF (2002) Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* **51**, 1319-1336.

Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P (2004) Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **318**, 168-175.

Ryden M, Dicker A, van H, V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P (2002) Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha -mediated lipolysis in human fat cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 1085-1091.

Sadr-Nabavi A, Ramser J, Volkmann J, Naehrig J, Wiesmann F, Betz B, Hellebrand H, Engert S, Seitz S, Kreutzfeld R, Sasaki T, Arnold N, Schmutzler R, Kiechle M, Niederacher D, Harbeck N, Dahl E, Meindl A (2009) Decreased expression of angiogenesis antagonist EFEMP1 in sporadic breast cancer is caused by aberrant promoter methylation and points to an impact of EFEMP1 as molecular biomarker. *Int.J.Cancer* **124**, 1727-1735.

Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S (2003) TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J.Biol.Chem.* **278**, 36005-36012.

Salans LB, Cushman SW, Weismann RE (1973) Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J.Clin.Invest* **52**, 929-941.

Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A (2010) TWEAK activates the non-canonical NFkappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS.One.* **5**, e8955.

Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ortiz A (2011) TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int.* **80**, 708-718.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J.Immunol.* **180**, 2581-2587.

Schneider P, Schwenzer R, Haas E, Muhlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H (1999) TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur.J.Immunol.* **29**, 1785-1792.

Schwartz N, Su L, Burkly LC, Mackay M, Aranow C, Kollaros M, Michaelson JS, Rovin B, Putterman C (2006) Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *J.Autoimmun.* **27**, 242-250.

Seeliger H, Camaj P, Ischenko I, Kleespies A, De Toni EN, Thieme SE, Blum H, Assmann G, Jauch KW, Bruns CJ (2009) EFEMP1 expression promotes in vivo tumor growth in human pancreatic adenocarcinoma. *Mol.Cancer Res.* **7**, 189-198.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J.Lipid Res.* **48**, 1253-1262.

Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB (2005) Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid.Redox.Signal.* **7**, 482-496.

Shimada K, Fujii T, Tsujikawa K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N (2012) ALKBH3 contributes to survival and angiogenesis of human urothelial carcinoma cells through NADPH oxidase and tweak/Fn14/VEGF signals. *Clin.Cancer Res.* **18**, 5247-5255.

Sidoti-de FC, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, Vayssiere JL (1998) TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* **17**, 1639-1651.

Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, Behl Y, Alikhani M, Yang J, Braasch C, Graves DT (2010) Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* **53**, 378-388.

Slawik M, Vidal-Puig AJ (2007) Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr.* **2**, 41-45.

Smith JD, Borel AL, Nazare JA, Haffner SM, Balkau B, Ross R, Massien C, Almeras N, Despres JP (2012) Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes: results from the INSPIRE ME IAA study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **97**, 1517-1525.

Souza SC, Palmer HJ, Kang YH, Yamamoto MT, Muliro KV, Paulson KE, Greenberg AS (2003) TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J.Cell Biochem.* **89**, 1077-1086.

splat-Jego S, Varriale S, Creidy R, Terra R, Bernard D, Khrestchatsky M, Izui S, Chicheportiche Y, Boucraut J (2002) TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *J.Neuroimmunol.* **133**, 116-123.

Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE (2006) Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance

involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* **4**, 465-474.

Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**, 463-516.

Tallant C, Marrero A, Gomis-Ruth FX (2010) Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim.Biophys.Acta* **1803**, 20-28.

Tchernof A, Despres JP (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* **93**, 359-404.

Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M (2001) Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* **50**, 2563-2571.

Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M, Brinkmann U, Wabitsch M, Link D, Hauner H (2009) Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology* **150**, 5373-5383.

Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML (2003) Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 479-489.

Tong JD, Jiao NL, Wang YX, Zhang YW, Han F (2011) Downregulation of fibulin-3 gene by promoter methylation in colorectal cancer predicts adverse prognosis. *Neoplasma* **58**, 441-448.

Tontonoz P, Spiegelman BM (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu.Rev.Biochem.* **77**, 289-312.

Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G (2012) The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol.* **22**, 557-566.

Tran NL, McDonough WS, Donohue PJ, Winkles JA, Berens TJ, Ross KR, Hoelzinger DB, Beaudry C, Coons SW, Berens ME (2003) The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma cells in vitro and overexpressed in advanced glial tumors. *Am.J.Pathol.* **162**, 1313-1321.

Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC, Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME (2006) Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* **66**, 9535-9542.

Trayhurn P, Wood IS (2005) Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem.Soc.Trans.* **33**, 1078-1081.

Upchurch KS, Kay J (2012) Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology.(Oxford)* **51 Suppl 6**, vi28-vi36.

Van Beek EA, Bakker AH, Kruyt PM, Vink C, Saris WH, Franssen-van Hal NL, Keijer J (2008) Comparative expression analysis of isolated human adipocytes and the human adipose cell lines LiSa-2 and PAZ6. *Int.J.Obes.(Lond)* **32**, 912-921.

van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD (2013) Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth.J.Med.* **71**, 174-187.

van Kuijk AW, Wijbrandts CA, Vinkenoog M, Zheng TS, Reedquist KA, Tak PP (2010) TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade. *Ann.Rheum.Dis.* **69**, 301-304.

Varfolomeev EE, Ashkenazi A (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**, 491-497.

Vendrell J, Chacon MR (2013) TWEAK: A New Player in Obesity and Diabetes. *Front Immunol.* **4**, 488.

Vendrell J, Maymo-Masip E, Tinahones F, Garcia-Espana A, Megia A, Caubet E, Garcia-Fuentes E, Chacon MR (2010) Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **95**, 2983-2992.

Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetatos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL, Silke J (2008) TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J.Cell Biol.* **182**, 171-184.

Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Moller P (2000) LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int.J.Cancer* **88**, 889-894.

Wadgaonkar R, Pierce JW, Somnay K, Damico RL, Crow MT, Collins T, Garcia JG (2004) Regulation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase pathways in endothelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **31**, 423-431.

Wen Y, Gu J, Li SL, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL (2006) Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology* **147**, 2518-2525.

Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* **83**, 835-870.

Werner S, Krieg T, Smola H (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J.Invest Dermatol.* **127**, 998-1008.

White MF (2003) Insulin signaling in health and disease. *Science* **302**, 1710-1711.

Whitsett TG, Cheng E, Inge L, Asrani K, Jameson NM, Hostetter G, Weiss GJ, Kingsley CB, Loftus JC, Bremner R, Tran NL, Winkles JA (2012) Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion. *Am.J.Pathol.* **181**, 111-120.

Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C, Wajant H (2009) TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death.Differ.* **16**, 1445-1459.

Wieser V, Moschen AR, Tilg H (2013) Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **61**, 119-125.

Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, vis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, Liu H, Daniel TO, Smith CA, Fanslow WC (2001) A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity*. **15**, 837-846.

Wiley SR, Winkles JA (2003) TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 241-249.

Williams LM, Lali F, Willetts K, Balague C, Godessart N, Brennan F, Feldmann M, Foxwell BM (2008) Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF-kappaB. *Mol.Immunol.* **45**, 2446-2454.

Winkles JA (2008) The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat.Rev.Drug Discov.* **7**, 411-425.

Winkles JA, Tran NL, Berens ME (2006) TWEAK and Fn14: new molecular targets for cancer therapy? *Cancer Lett.* **235**, 11-17.

Winkles JA, Tran NL, Brown SA, Stains N, Cunliffe HE, Berens ME (2007) Role of TWEAK and Fn14 in tumor biology. *Front Biosci.* **12**, 2761-2771.

Wood IS, Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br.J.Nutr.* **89**, 3-9.

Wood IS, Wang B, Lorente-Cebrian S, Trayhurn P (2007) Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose

transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **361**, 468-473.

Xu F, Zhang C, Graves DT (2013) Abnormal cell responses and role of TNF-alpha in impaired diabetic wound healing. *Biomed.Res.Int.* **2013**, 754802.

Yamana J, Morand EF, Manabu T, Sunahori K, Takasugi K, Makino H, Yamamura M (2012) Inhibition of TNF-induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Cell Immunol.* **272**, 293-298.

Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Usui A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S (2009) Elevated circulating TWEAK levels in systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. *J.Rheumatol.* **36**, 1657-1662.

Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA (2009) Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J.Cell Commun.Signal.* **3**, 337-347.

Yang X, Zhang X, Heckmann BL, Lu X, Liu J (2011) Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced lipolysis in adipocytes. *J.Biol.Chem.* **286**, 40477-40485.

Yepes M, Brown SA, Moore EG, Smith EP, Lawrence DA, Winkles JA (2005) A soluble Fn14-Fc decoy receptor reduces infarct volume in a murine model of cerebral ischemia. *Am.J.Pathol.* **166**, 511-520.

Yilmaz MI, Carrero JJ, Ortiz A, Martin-Ventura JL, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Yenicesu M, Egido J, Blanco-Colio LM (2009) Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* **4**, 1716-1723.

Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, Saglam M, Kilic S, Eyileten T, Caglar K, Oguz Y, Vural A, Cakar M, Egido J, Altun B, Yenicesu M, Blanco-Colio LM, Carrero JJ (2011) Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* **6**, 785-792.

Yue W, Dacic S, Sun Q, Landreneau R, Guo M, Zhou W, Siegfried JM, Yu J, Zhang L (2007) Frequent inactivation of RAMP2, EFEMP1 and Dutt1 in lung cancer by promoter hypermethylation. *Clin.Cancer Res.* **13**, 4336-4344.

Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A (2008) Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem.J.* **413**, 201-215.

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS (2002) Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* **51**, 2929-2935.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.

Zhou G, Mihindikulasuriya KA, Corkle-Chosnek RA, Van HA, Hu MC, Brinkley BR, Tan TH (2002) Protein phosphatase 4 is

Bibliografía

involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J.Biol.Chem.* **277**, 6391-6398.

Zuluaga S, varez-Barrientos A, Gutierrez-Uzquiza A, Benito M, Nebreda AR, Porras A (2007) Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal.* **19**, 62-74.

ABSTRACT

INTRODUCTION:

Tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a recently identified member of the TNF superfamily. A few years ago, sTWEAK was revealed as a potential new player in the development of insulin resistance in hepatocytes (Feng *et al.* 2008). Several lines of evidence also show that sTWEAK may modulate the cellular responses to TNF- α by competition at a molecular level for shared limiting factors (Maecker *et al.* 2005; Wicovsky *et al.* 2009), which might control insulin resistance. Although TWEAK and its receptor Fn14 are expressed in a variety of organs, including adipose tissue (Chacon *et al.* 2006), the physiological and patho-physiological roles of this cytokine in an obesity-associated insulin-resistant state remains largely unknown.

Insulin signaling is co-ordinately regulated through a balance between both protein kinases and phosphatases. This balance is altered in obesity and type 2 diabetes leading to insulin resistance. Impaired wound healing constitutes a major health problem in patients with diabetes. Wound healing is a complex process involving different steps, including inflammation, proliferation, vascularization, production of matrix and remodeling (Xu *et al.* 2013). Fibroblasts are the main producers of the new extracellular matrix. The delayed wound healing in diabetes could be caused by diminished fibroblast migration, linked to higher TNF- α production (Blakytyn and Jude 2006). The potential involvement of TWEAK in the migration of fibroblasts during the wound healing process has not been explored, although it can induce

migration in some cell types (Dai *et al.* 2009; Fortin Ensign *et al.* 2013; Tran *et al.* 2006) (Shimada *et al.* 2012). Hence, it would be important to characterize the function of TWEAK in fibroblast migration and the mediators of its effects.

OBJECTIVES

1. Comparative analysis of TWEAK and TNF- α effects on human visceral adipocytes: Characterization of TWEAK function preventing TNF- α -induced insulin resistance.
2. Analysis of the role played by TWEAK in migration processes during wound healing using mouse embryonic fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS:

Cells used in this study:

To perform the first objective to characterize the function of TWEAK preventing TNF- α -induced insulin resistance, LiSa-2 cells were used as a cellular model of visceral human adipocytes (Fernandez-Veledo *et al.* 2008). In addition, some results were confirmed in human visceral primary adipocytes obtained after differentiating human preadipocytes isolated from visceral fat depots (Lonza Iberica, Barcelona, Spain). sTWEAK-primed cells were obtained after incubation with sTWEAK (100ng/ml) for 6h, prior to TNF- α treatment (20ng/ml).

To analyze the role played by TWEAK in migration processes during wound healing wt and p38 α -deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), with or without fibulin 3 knock-down, have been used.

Metabolic assays:

Insulin-induced glucose transport was determined in adipocytes stimulated with insulin for 20 min using 2-deoxy-169 D[1-3H]-glucose (0.25 μ Ci ml⁻¹) in 100 μ M of unlabelled 2-deoxyglucose (Fernandez-Veledo *et al.* 2008).

The rate of lipolysis in adipocytes was determined through quantification of glycerol release using a free-glycerol determination kit (Sigma- Aldrich) as previously described (Fernandez-Veledo *et al.* 2008).

Analysis of cell viability and apoptosis:

Cell viability was determined by crystal violet staining (Gutierrez-Uzquiza *et al.* 2012). Apoptosis was measured through quantification of the rate of mono- and oligonucleosomes using a Cell Death Detection ELISA kit as described by the manufacturer (Roche).

Cell signaling studies:

Analysis of the active forms of signaling molecules was performed by western-blot using antibodies against the phosphorylated proteins. Equal amounts of protein were submitted to SDS-PAGE, then transferred to Immobilon membranes, and blocked (Fernandez-Veledo *et al.* 2009). Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL-Plus) western blot protocol (GE Healthcare).

PP2A activity was determined in human adipocytes using a Ser/Thr Phosphatase (PPase) assay Kit (Promega V22460) and following the manufacturer's protocol.

To determine the role played by PP2C α in human adipocytes, Knock-down of human PP2A catalytic subunit (PP2A-C α) was performed through transfection of these cells (Fernandez-Veledo *et al.* 2009) with a specific siRNA and scrambled siRNAs as a control (Dharmacon ,Lafayette, CO).

Cell fractionation of human adipocytes:

Nuclear extracts were prepared using the Nuclear and Cytoplasmic Kit following the manufacturer's specifications (Thermo Scientific, 78835).

Plasma membrane fraction was obtained as previously described (Gutierrez-Uzquiza *et al.* 2012).

Protein concentration was determined by the Bradford method.

Analysis of mRNA expression by qPCR:

Total RNA was isolated using RNeasy Mini kit (Qiagen; 74104). 1–3 μ g of RNA was reverse transcribed with SuperScrip III RT kit (Invitrogen 18080-040) to generate cDNA. Then, qPCR analysis was performed using specific primers for mouse fibulin-3, MMP-9, MMP-10, MMP-13 and GAPDH, which was used as an internal control.

Statistical analysis:

Results are presented as mean \pm SEM from two-five independent experiments performed in duplicates-quadruplicates (technical replicates). Statistical significance was tested using the unpaired Student's t test followed by the

protected least-significant different test. $P < 0.01$ was considered significant.

RESULTS:

sTWEAK exhibits beneficial properties in human visceral adipose cells.

sTWEAK induced cell death in differentiated LiSa-2 cells only when protein synthesis was inhibited, but to a lesser extent than TNF- α . TWEAK pretreatment did not sensitize cells to the death induced by TNF- α . Quantification of nucleosomal release indicated that the type of cell death observed in LiSa-2 cells was apoptosis.

On the other hand, sTWEAK did not increase either basal lypolysis or that induced by TNF- α in sTWEAK-primed cells.

Although TNF- α increased basal glucose uptake and induced insulin resistance in differentiated LiSa-2 cells (Fernandez-Veledo *et al.* 2009), sTWEAK did not modulate glucose uptake either under basal conditions or upon insulin stimulation. Surprisingly however, sTWEAK pre-treatment decreased the TNF- α -induced glucose uptake and impaired TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake, restoring insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane in the presence of TNF- α . Moreover, sTWEAK pretreatment enhanced insulin-induced activation of IRS1, AKT and AS160 in the presence of TNF- α . In this context, TNF- α but not sTWEAK induced JNK1/2 activation, which is directly involved in serine phosphorylation of IRS1 and the insulin resistant state developed by TNF- α .

sTWEAK pre-treatment inhibits TRAF2 association with TNFR1 that signal to insulin resistance

Co-immunoprecipitation experiments showed that both endogenous TRAF2 and Fn14 proteins form a complex under basal conditions that is partly disrupted after TNF- α treatment. In contrast, the treatment with sTWEAK increased significantly the amount of Fn14 associated to TRAF2. Interestingly, sTWEAK pre-treatment prevented the partial disruption of the complex induced by TNF- α , suggesting that Fn14 may compete with TNFRs for binding to endogenous TRAF2.

TWEAK pre-treatment hampered complex formation between TRAF2 and TNFR1 after TNF- α treatment, and the activation of TNFR1, but not that of TNFR2. In addition, TWEAK pre-treatment specifically modulates the effect of TNF- α on insulin-induced glucose uptake mediated by TNFR1.

TWEAK-Fn14 signaling specifically abrogates TNF- α -induced insulin resistance by preventing JNK1/2 activation through a mechanism dependent on PP2A activity.

sTWEAK pre-treatment abolished the stimulatory effect of TNF- α on JNK1/2 activation. In this regard, it is known that a regulated balance between kinases and phosphatases is crucial for normal cell function. According to published data, PP2 Ser/ThrPPase family could catalyze the initial deactivation. In fact, our results indicated that sTWEAK, but not TNF- α , significantly increased PP2A activity. Moreover, phosphatase activity remained significantly raised in sTWEAK-primed adipocytes even in the presence of TNF- α . This suggested that PP2A might be down-regulating JNK1/2 activity in response to sTWEAK.

Transient PP2A knock-down using a specific siRNA against PP2A α catalytic subunit (PP2A-C α) abolished the inhibitory effect of sTWEAK on TNF- α -induced JNK1/2 phosphorylation

This strongly indicates that sTWEAK exerts its beneficial role on insulin sensitivity by preventing TNF- α -induced activation of JNK1/2 through PP2A activation.

sTWEAK enhances cell migration in wt and p38 α -/- MEFs.

TWEAK can promote cell migration and invasion in some tumors such as in ovarian carcinoma (Dai *et al.* 2009). p38 α MAPK mediates cell migration and invasion in different cell models. So, we analyzed the effect of TWEAK on migration of fibroblasts and whether p38 α is relevant using wt and p38 α -/- MEFs.

We found that sTWEAK activated p38 α MAPKs, ERKs and PI3K/AKT in MEFs.

TWEAK also increased MEFs migration (around 100%) in both, wt and p38 α -/-MEFs. Moreover, inhibition of PI3K did not have any effect on TWEAK-induced MEFs migration, while ERKs partially blocked it. All these data indicate that neither p38 α MAPK nor PI3K pathway mediate sTWEAK pro-migratory effects. In contrast, ERKs cascade might contribute to TWEAK-induced fibroblasts migration.

MMP-9 metalloprotease is activated by sTWEAK.

MMP-9 is a protease involved in degradation of extracellular matrix molecules, which promotes cell migration and invasion of some cell types. In muscle cells, sTWEAK increases MMP9 expression (Johns *et al.* 2013).

We have seen by zymography that sTWEAK treatment increased MMP9 activity in wt and p38 α -/- MEFs, while having no specific effect on the expression of MMP-9, MMP-10 or MMP-13 mRNA. These data suggest that MMP-9 could play a role in sTWEAK-induced migration in MEFs.

sTWEAK is a negative regulator of the secretion of Fibulin-3, an extracellular matrix protein controlling cell migration.

Fibulin-3 can either promote or inhibit cell migration/invasion in tumor cells (Luo *et al.* 2013; Pass *et al.* 2012).

In MEFs, sTWEAK decreased fibulin-3 secretion, causing a drop of around 40% in wt cells and 100% in p38 α -/- MEFs. Furthermore, fibulin-3 knock-down prevented sTWEAK-induced cell migration in wt and p38 α -/- MEFs, while increasing basal migration, mainly in p38 α -/- MEFs. Therefore, the decrease in fibulin-3 secretion appears to be necessary for sTWEAK-dependent migration.

DISCUSSION:

In the present study, we describe for the first time a positive role for the TWEAK/Fn14 axis in human visceral adipocytes, where it specifically functions to attenuate insulin resistance induced by TNF- α on carbohydrate metabolism without affecting the other metabolic effects of TNF- α directed at limiting fat accretion. Clinical studies pointed to sTWEAK as a potential novel biomarker of metabolic syndrome with a putative protective effect. In this respect, serum levels of sTWEAK are significantly decreased in T2D patients and are negatively correlated with fasting glucose and insulin

resistance assessed by HOMA-IR (Maymo-Masip *et al.* 2013). Our study provides strong evidences about the molecular mechanisms through which the insulin-signaling cascade may be improved, suggesting that sTWEAK acts as a protective factor in insulin-mediated glucose homeostasis.

The second part of our study describe for the first time that sTWEAK promotes MEFs migration during wound healing. This pro-migratory effect of TWEAK is not mediated through p38 α or PI3K pathways, while ERKs cascade might play a role, as well as MMP-9. Furthermore, the decrease in fibulin-3 secretion produced upon TWEAK treatment appears to be necessary for sTWEAK-dependent migration.

It would be interesting to determine in future studies the precise mechanism involved in the regulation of MMP-9 activity and fibulin 3 secretion in response to sTWEAK in MEFs. Based on published data in other cell models, it is likely that fibulin 3 might be involved in the regulation of the MMP-9 activity as it occurs in glioblastoma, where fibulin-3 increases the activity and expression of MMP-2 and -9 (Hu *et al.* 2009). In contrast, in lung cancer, fibulin-3 leads to MMP-2 and -7 down-regulation (Kim *et al.* 2012).

MAIN CONCLUSION

sTWEAK protects human visceral adipocytes from TNF- α -induced insulin resistance through regulation of JNKs by PP2A. In addition, sTWEAK promotes MEFs migration during wound healing. Hence, sTWEAK could be used in therapy to reverse insulin resistance and to treat problems derived from the impaired wound healing in patients with diabetes.

Reference List

Blakytny R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet.Med.* **23**, 594-608.

Chacon MR, Richart C, Gomez JM, Megia A, Vilarrasa N, Fernandez-Real JM, Garcia-Espana A, Miranda M, Masdevall C, Ricard W, Caubet E, Soler J, Vendrell J (2006) Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* **33**, 129-137.

Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W (2009) TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett.* **283**, 159-167.

Feng F, Wang L, Albanese N, Holmes A, Xia P (2008) Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis attenuates the action of insulin in hepatocytes. *Endocrinology* **149**, 1505-1513.

Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de CJ, Ramos MP, Bruderlein S, Moller P, Lorenzo M (2008) Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocytic cell line: paracrine interaction with myocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93**, 2866-2876.

Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M (2009) c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **94**, 3583-3593.

Fortin Ensign SP, Mathews IT, Eschbacher JM, Loftus JC, Symons MH, Tran NL (2013) The Src homology 3 domain-containing guanine nucleotide exchange factor is overexpressed in high-grade gliomas and promotes tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-fibroblast growth factor-inducible 14-induced cell migration and invasion via tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J.Biol.Chem.* **288**, 21887-21897.

Gutierrez-Uzquiza A, Arechederra M, Bragado P, Guirre-Ghiso JA, Porras A (2012) p38 α mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. *J.Biol.Chem.* **287**, 2632-2642.

Hu B, Thirtamara-Rajamani KK, Sim H, Viapiano MS (2009) Fibulin-3 is uniquely upregulated in malignant gliomas and promotes tumor cell motility and invasion. *Mol.Cancer Res.* **7**, 1756-1770.

Johns N, Stephens NA, Fearon KC (2013) Muscle wasting in cancer. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **45**, 2215-2229.

Kim EJ, Lee SY, Woo MK, Choi SI, Kim TR, Kim MJ, Kim KC, Cho EW, Kim IG (2012) Fibulin-3 promoter methylation alters the invasive behavior of non-small cell lung cancer cell lines via MMP-7 and MMP-2 regulation. *Int.J.Oncol.* **40**, 402-408.

Luo R, Zhang M, Liu L, Lu S, Zhang CZ, Yun J (2013) Decrease of fibulin-3 in hepatocellular carcinoma indicates poor prognosis. *PLoS.One.* **8**, e70511.

Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, Hurst S, Danilenko D, Li J, Filvaroff E, Yang B, Daniel D, Ashkenazi A (2005) TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* **123**, 931-944.

Maymo-Masip E, Fernandez-Veledo S, Garcia EA, Vazquez-Carballo A, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E, Garrifo-Sanchez L, Rodriguez MM, Vendrell J, Chacon MR (2013) The rise of soluble TWEAK levels in severely obese subjects after bariatric surgery may affect adipocyte-cytokine production induced by TNFalpha. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **98**, E1323-E1333.

Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, Huflejt M, Carbone M, Chia D, Goodglick L, Goodman GE, Thornquist MD, Liu G, de PM, Tsao MS, Goparaju C (2012) Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N.Engl.J.Med.* **367**, 1417-1427.

Shimada K, Fujii T, Tsujikawa K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N (2012) ALKBH3 contributes to survival and angiogenesis of human urothelial carcinoma cells through NADPH oxidase and tweak/Fn14/VEGF signals. *Clin.Cancer Res.* **18**, 5247-5255.

Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC, Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME (2006) Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* **66**, 9535-9542.

Wicovsky A, Salzman S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C, Wajant H (2009) TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death.Differ.* **16**, 1445-1459.

Xu F, Zhang C, Graves DT (2013) Abnormal cell responses and role of TNF-alpha in impaired diabetic wound healing. *Biomed.Res.Int.* **2013**, 754802.

ANEXO

TWEAK prevents TNF- α -induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes

Ana Vázquez-Carballo, Victòria Ceperuelo-Mallafre, Matilde R. Chacón, Elsa Maymó-Masip, Margarita Lorenzo, Almudena Porras, Joan Vendrell and Sonia Fernández-Veledo

Am J Physiol Endocrinol Metab 305:E101-E112, 2013. First published 7 May 2013;
doi: 10.1152/ajpendo.00589.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 49 articles, 23 of which you can access for free at:
<http://ajpendo.physiology.org/content/305/1/E101.full#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
<http://ajpendo.physiology.org/content/305/1/E101.full>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

This information is current as of July 9, 2013.

TWEAK prevents TNF- α -induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes

Ana Vázquez-Carballo,¹ Victòria Ceperuelo-Mallafre,^{2,3} Matilde R. Chacón,^{4,5} Elsa Maymó-Masip,⁴ Margarita Lorenzo,^{1†} Almudena Porras,^{1*} Joan Vendrell,^{4,5*} and Sonia Fernández-Veledo^{4,5}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, Complutense University, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; ²Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; ³CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn-Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain; ⁴CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM-Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain; and ⁵Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Submitted 26 November 2012; accepted in final form 5 May 2013

Vázquez-Carballo A, Ceperuelo-Mallafre V, Chacón MR, Maymó-Masip E, Lorenzo M, Porras A, Vendrell J, Fernández-Veledo S. TWEAK prevents TNF- α -induced insulin resistance through PP2A activation in human adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E101–E112, 2013. First published May 7, 2013; doi:10.1152/ajpendo.00589.2012.—Visceral fat is strongly associated with insulin resistance. Obesity-associated adipose tissue inflammation and inflammatory cytokine production are considered key mediators of insulin signaling inhibition. TWEAK is a relatively new member of the TNF cytokine superfamily, which can exist as full length membrane-associated (mTWEAK) and soluble (sTWEAK) isoforms. Although TWEAK has been shown to have important functions in chronic inflammatory diseases its physiological role in adipose tissue remains unresolved. In this study, we explore the molecular mechanisms involved in the modulation of TNF- α -induced effects on insulin sensitivity by sTWEAK in a human visceral adipose cell line and also in primary human adipocytes obtained from visceral fat depots. Our data reveal that sTWEAK ameliorates TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake, GLUT4 translocation and insulin signaling without affecting other metabolic effects of TNF- α such as lipolysis or apoptosis. Co-immunoprecipitation experiments in adipose cells revealed that pretreatment with sTWEAK specifically inhibits TRAF2 association with TNFR1, but not with TNFR2, which mediates insulin resistance. However, sTWEAK does not affect other downstream molecules activated by TNF- α , such as TAK1. Rather, sTWEAK abolishes the stimulatory effect of TNF- α on JNK1/2, which is directly involved in the development of insulin resistance. This is associated with an increase in PP2A activity upon sTWEAK treatment. Silencing of the PP2A catalytic subunit gene overcomes the dephosphorylation effect of sTWEAK on JNK1/2, pointing to PP2A as a relevant mediator of sTWEAK-induced JNK inactivation. Overall, our data reveal a protective role of TWEAK in glucose homeostasis and identify PP2A as a new driver in the modulation of TNF- α signaling by sTWEAK.

insulin signaling; glucose uptake; TNF; obesity; phosphatases; adipose tissue

INSULIN SIGNALING IS AN IMPORTANT cellular regulator of metabolic pathways involved in maintaining the correct balance between the organism's energy expenditure and storage capac-

ity. Visceral obesity is considered a key contributor to the dysregulation of insulin transduction pathways and is also a major risk factor for the development of insulin resistance and type 2 diabetes (T2D). Adipose tissue, a central player in the mild inflammatory state that is characteristic of obese patients, is one of the first tissues affected by insulin resistance. Several mediators released from adipocytes and infiltrating macrophages have been described to alter glucose homeostasis through inhibiting insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane by tissue-specific mechanisms (14). These include the activation of proinflammatory and stress kinases as well as protein tyrosine phosphatases such as PTP1B that reduce tyrosine phosphorylation of the insulin receptor (IR) and insulin receptor substrates (IRSs) (12). In this context, our previous studies with human adipocytes demonstrated that TNF- α inhibits insulin-induced glucose uptake in human visceral but not in subcutaneous adipocytes by impairing insulin signaling at the level of IRS-1 in a JNK1/2-dependent manner (13).

Tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a recently identified member of the TNF superfamily, whose biological activities in the immune system continue to be unraveled. Although TWEAK can be expressed as a membrane-bound form (mTWEAK), it is mainly processed as a soluble variant (sTWEAK), resulting from proteolytic cleavage of mTWEAK (47). Both isoforms can bind to fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), which signals via the recruitment of several TNFR-associated factors (2, 17, 33). Recently, sTWEAK has been revealed as a potential new player in the development of insulin resistance in hepatocytes (10). TWEAK/Fn14 signaling mediates unique and context-dependent pleiotropic effects. In a manner similar to TNF- α , sTWEAK activates proinflammatory signaling pathways, including both canonical and non canonical NF- κ B pathways (35), as well as Akt, ERK1/2, and JNK1/2 (9, 25). However, several lines of evidence also show that sTWEAK may modulate the cellular responses to TNF- α by competition at a molecular level for shared limiting factors (29, 46). Although TWEAK and its receptor Fn14 are expressed in a variety of organs, including adipose tissue (7), the physiological and patho-physiological roles of this cytokine in an obesity-associated insulin-resistant state remains largely unknown. TWEAK has been described to inhibit adipogenesis (40) and we have recently shown that TWEAK may have a proinflammatory function in human subcutaneous adipocytes (42). However, clinical studies have shown a negative association between

† Deceased 7 April 2010.

* J. Vendrell and A. Porras contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: S. Fernández-Veledo, Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr. M. Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain (e-mail: sonia.fernandezveledo@gmail.com; sonia.fernandez@isipv.cat).

fasting glucose and soluble circulating sTWEAK levels, as well as a decrease of sTWEAK in patients with T2D (24). Thus, the effects of TWEAK on insulin sensitivity in human adipose tissue are far from clear.

Insulin signaling is coordinately regulated through a balance between both protein kinases and phosphatases. It is known that some Ser/Thr phosphatases (PPs) participate in cytokine signaling pathways, mainly as negative regulators. In particular, PP2A is a Ser/Thr phosphatase with broad substrate specificity and diverse cellular functions. Here, we have investigated the role and molecular mechanisms by which TWEAK regulates insulin sensitivity in human adipocytes of visceral origin. We demonstrate that TWEAK specifically reverses TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake through the activation of PP2A. Our data reveal, for the first time, that PP2A may be a signaling component of the JNK1/2 cascade involved in relaying the TNF- α signal to promote insulin resistance. Thus, modulation of TWEAK/Fn14 axis could be a bona fide pharmacological approach to treat insulin resistance.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Insulin, BSA, crystal violet, free glycerol determination kit, cycloheximide, and anti-Lamin and anti- β -actin antibodies were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cell Death Detection ELISA was from Roche (Foster City, CA). Soluble human recombinant TWEAK (sTWEAK) and TNF- α were from PeproTech, (Rocky Hills, NY). Culture media and sera were from Invitrogen (Paisley, UK). Autoradiographic films were from GE Healthcare (Rainham, UK). 2-Deoxy-D-[1-³H]glucose (11.0 Ci/mmol) was from PerkinElmer. Antibodies against phosphorylated (p)-IRS-1 (Tyr⁶¹²), total IRS-1, GLUT1, and GLUT4 were from Millipore (Bedford, MA). Antibodies against p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), p-Akt (Ser⁴⁷³), total Akt, p-AMPK (Thr⁶⁴²), p-c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), and Fn14 were from Cell Signaling (Beverly, MA). Antibodies against I κ B α (sc-371), I κ B β (sc-945), TRAF2 (sc-876), caveolin-1 (sc-894), NF- κ B p52 (sc-298), GLUT3 (sc-74399), and TNF-R1 (sc-73195) were from Santa Cruz (Palo Alto, CA). Antibodies against p-TAK1 (Thr¹⁸⁷) and TAK1 were from Abcam (Cambridge, UK). NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents were from Thermo Scientific (Rockford, IL). A monoclonal antibody to human TNF-RII (p75/p80) was bought from Hycult Biotech (Plymouth Meeting, PA). An anti-human TNFR1/TNFRSF1A antibody was purchased from R&D Systems (Abingdon, UK).

Cell culture and lysis. LiSa-2 cells, kindly provided by Dr. Möller (University of Ulm, Germany), were used as a cellular model of visceral human adipocytes. This is a stable cell line derived from a poorly differentiated liposarcoma with a pronounced capacity for terminal adipose differentiation (11, 44). Moreover, comparative expression analysis with isolated human adipocytes revealed this cell line to be a robust model for differentiated human adipocytes (41). LiSa-2 cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in DMEM-F12 (1:1) supplemented with 10% (vol/vol) fetal serum and antibiotics and were induced to differentiate over 10 days in serum-free DMEM-F12 (1:1) supplemented with 10 μ g/ml transferrin, 15 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES, 33 μ M biotin, 17 μ M pantothenate, 1 nM insulin, 20 pM triiodothyronine, 1 μ M cortisol, and antibiotics (11). As previously reported, differentiated human adipose cells show an insulin-sensitive phenotype in terms of both glucose and lipid metabolism (11, 13). Human visceral primary adipocytes were obtained after differentiation of human preadipocytes isolated from visceral fat deposits (Lonza Iberica, Barcelona, Spain) for 12 days, as recommended by the supplier. Cells were cultured overnight in serum-free, low-glucose (1,000 mg/l) DMEM supplemented with 1% (wt/vol) BSA before initiation of different treatments. sTWEAK-primed cells were ob-

tained after incubation with sTWEAK (100 ng/ml) for 6 h prior to TNF- α treatment. Cells were lysed in a buffered solution containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 100 μ M sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 30 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% (vol/vol) Triton X-100, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin. Cell lysates were centrifuged (13,000 rpm, 10 min, 4°C), and the supernatant fractions were stored at -80°C. Protein concentration was determined by the Bradford method using a kit supplied by Bio-Rad Laboratories.

Cell death quantification. Cell viability was determined by crystal violet assay as previously described (15). Apoptosis was measured by determining the rate of cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono- and oligonucleosomes). Cell death was assessed by a photometric enzyme immunoassay, using a Cell Death Detection ELISA kit as described by the manufacturer (Roche).

Measurement of lipolytic rate. The rate of lipolysis in adipocytes was determined through quantification of glycerol release into the medium with an enzymatic method using a free-glycerol determination kit (Sigma-Aldrich) as previously described (11). Results are expressed as the percentage of stimulation over basal (control = 100).

Glucose transport and GLUT4 translocation assays. After treatments, cells were washed with KRP buffer (12.5 mM HEPES, pH 7.4, 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, and 0.6 mM Na₂HPO₄) and stimulated with insulin in KRP buffer for 20 min. Then, 2-deoxy-D-[1-³H]glucose (0.25 μ Ci/ml in 100 μ M of unlabeled 2-deoxyglucose) was added, and cells were incubated for 10 min. Next, cells were washed in ice-cold KRP buffer three times and solubilized in 0.05 N NaOH. Samples were removed for protein determination and radioactivity measurements as described (11). Glucose uptake rates were calculated as picomoles of glucose taken up per 10 minutes per milligram of protein, and results were expressed as the percentage of stimulation over basal (control = 100). Cells were fractionated to obtain the plasma membrane fraction, followed by SDS-PAGE separation and immunoblotting with GLUT4, GLUT3, GLUT1, and caveolin-1 antibodies, as previously described (15).

Immunoprecipitation assays. For immunoprecipitation experiments, cell lysates containing equal amounts of proteins (200–400 μ g) were immunoprecipitated with anti-TRAF2, anti-TNFR1, or anti-TNFR2 antibodies overnight at 4°C. The immune complexes were precipitated by incubation with protein A-agarose beads or protein G-agarose beads (Sigma-Aldrich) for 4 h at 4°C. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE. Subsequent immunoblot assays were performed using antibodies to Fn14 or TRAF2.

Immunoblot analysis. Equal amounts of protein were submitted to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon membranes and blocked (13). Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL-Plus) Western blot protocol (GE Healthcare).

Extraction of nuclear proteins. Nuclear extracts from differentiated adipocytes treated with sTWEAK were prepared using the Nuclear and Cytoplasmic Kit following the manufacturer's specifications (Thermo Scientific, 78835). Lamin A and GAPDH were used as nuclear and cytosolic markers, respectively.

Transient transfection with small interfering RNA. Human PP2A catalytic subunit (PP2A-C α) and control (scrambled) small interfering (si)RNAs were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Human differentiated adipocytes were transfected with 100 nM of siRNA using Dharmafect 1 reagent as previously described (13). At 48 h posttransfection, adipocytes were treated with TNF- α and/or sTWEAK as shown in respective figures. Cell lysates were collected, and insulin sensitivity on glucose uptake and MAPK phosphorylation status were measured. PP2A-C α protein expression and PP2A phosphatase activity were analyzed to evaluate the effectiveness of siRNA knockdown.

PP2A phosphatase activity. PP2A activity was determined in human adipocytes using a Ser/Thr phosphatase (PPase) assay kit (Promega V22460). Cell lysates were obtained with a phosphatase lysis buffer [20 mM HEPES, pH 7.4, 10% (vol/vol) glycerol, 0.1% (vol/vol) NP-40, 30 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EGTA], and activity

was measured following the manufacturer's protocol using a PP2A-specific reaction buffer (50 mM imidazole, pH 7.2, 0.2 mM EGTA, 0.03% β -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml BSA). Free phosphate generated from a phospho-peptide was quantified by measuring the absorbance (600 nm) of a molybdate-malachite green-phosphate complex.

Data analysis. Results are presented as means \pm SE from two to five independent experiments performed in duplicates-quadruplicates (technical replicates), as indicated in the corresponding figure legends. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t*-test followed by the protected least significant different test. $P < 0.01$ was considered significant.

RESULTS

sTWEAK exhibits beneficial properties in human visceral adipose cells. It has been postulated that TNF- α may act as an important auto/paracrine regulator to limit adipose tissue ex-

pansion at the expense of insulin resistance development (20). We explored the potential modulation of TNF- α -mediated responses by sTWEAK during lipolysis, apoptosis, and insulin-dependent glucose uptake in a human visceral adipose cell line with a high capacity to differentiate and an efficient insulin-sensitive phenotype (11, 13). As expected, TNF- α exposure significantly decreased the viability of LiSa-2 cells in the presence of cycloheximide (Fig. 1A). Similarly, sTWEAK induced cell death in differentiated LiSa-2 cells only when protein synthesis was inhibited, but to a lesser extent than TNF- α (Fig. 1A). However, sTWEAK pretreatment did not sensitize cells to the death induced by TNF- α , as described in other cellular models (43). Quantification of nucleosomal release indicated that the type of cell death observed in LiSa-2 cells was apoptosis (Fig. 1B), supporting the previous results of

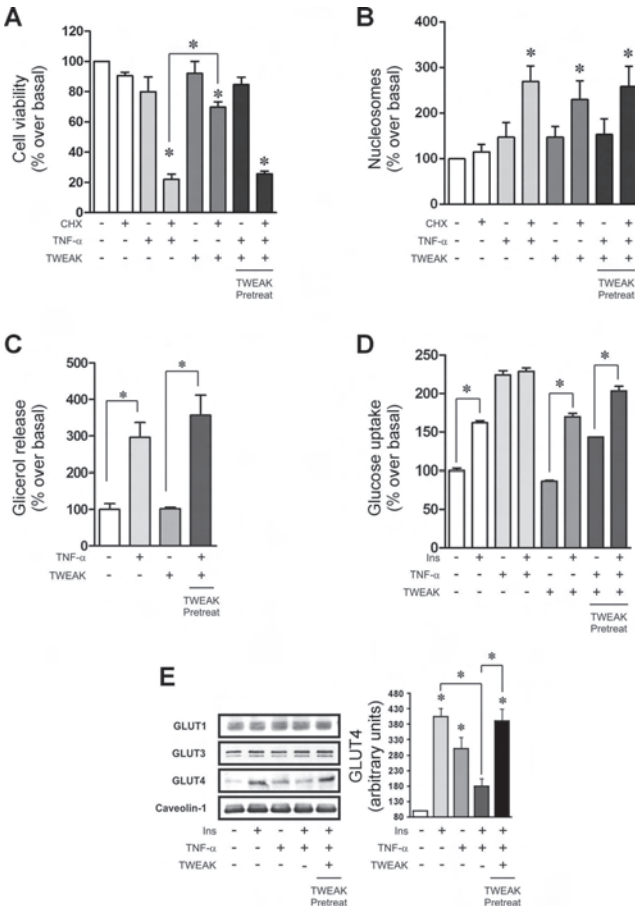


Fig. 1. sTWEAK [soluble tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis] pretreatment prevents TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake in the human visceral adipocyte cell line LiSa-2 without altering its effects on lipolysis and apoptosis. **A:** Differentiated adipose cells were cultured for 24 h in the absence or presence of 10 mg/ml cycloheximide (CHX), 20 ng/ml TNF- α , and/or 100 ng/ml sTWEAK. sTWEAK-primed cells were obtained after sTWEAK incubation for 6 h prior to TNF- α treatment. Cell viability was measured by crystal violet staining. Results represent means \pm SE of 4 independent experiments performed in quadruplicates and are expressed as percent stained cells over basal (control = 100). **B:** Adipocytes were cultured as in **A** and the rate of nucleosomes was measured. Results are means \pm SE of 3 independent experiments performed in triplicates and are expressed as percent stimulation over basal (control = 100). **C:** Differentiated adipocytes were cultured for 24 h in the absence or presence of 20 ng/ml TNF- α and/or 100 ng/ml sTWEAK. Lipolysis was determined by measuring glycerol release. Results are expressed as percent stimulation over basal from 3 independent experiments performed in triplicates (control = 10.69 \pm 0.75 nmol glycerol/mg protein/3 h). **D:** Adipocytes were cultured as in **C** before stimulation with 50 nM insulin (Ins) for 30 min, and glucose uptake was measured during the last 10 min by incorporation of 2-deoxyglucose into the cells. Results from 5 independent experiments performed in triplicates are expressed as percent stimulation over basal (control = 7.26 \pm 0.53 pmol glucose/mg protein/10 min). **E:** Adipocytes were cultured as in **A** before stimulation with 50 nM insulin for 20 min and submitted to subcellular fractionation. Plasma membrane proteins were analyzed by Western blot using anti-GLUT1, -GLUT3, -GLUT4, and -caveolin-1 (Cav-1) antibodies. Representative immunoblots and densitometric analysis of 3 independent experiments are shown. * $P < 0.01$.

reduced cell viability. We also evaluated lipolysis by measuring glycerol release. As shown in Fig. 1C, treatment of differentiated human adipose cells with sTWEAK did not increase glycerol release to the medium, and TNF- α -induced lipolysis was not changed in sTWEAK-primed cells (Fig. 1C). Since it has been described that sTWEAK induces insulin resistance in human hepatocytes (4), insulin sensitivity of carbohydrate metabolism was also analyzed. As shown in Fig. 1D and following from our previous results, TNF- α increased basal glucose uptake and induced insulin resistance in differentiated LiSa-2 cells (13). In contrast, sTWEAK did not modulate glucose uptake either under basal conditions or upon insulin stimulation, in agreement with the effects described for adipocytes of subcutaneous origin (40). Surprisingly, however, sTWEAK pretreatment decreased the TNF- α -induced glucose uptake and impaired TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake (Fig. 1D). Similar results were obtained when we analyzed the modulation of TNF- α metabolic responses upon cotreatment with sTWEAK (data not shown).

TNF- α produces paradoxical effects on glucose uptake in human visceral adipocytes. It increases GLUT4 translocation and glucose uptake but also activates JNK1/2, inducing phosphorylation of IRS-1 at the Ser⁶¹² residue. This, in turn, leads to an impairment of insulin-induced glucose uptake (13). Localization of GLUT1, GLUT3, and GLUT4 protein at the plasma membrane was examined by subcellular fractionation. As shown in Fig. 1E, addition of insulin, TNF- α , or TWEAK failed to promote GLUT1 or GLUT3 protein association with plasma membrane. In contrast, TNF- α induced the translocation of GLUT4 to the plasma membrane, which correlates with the increase in basal glucose uptake (Fig. 1D) but impaired insulin-induced GLUT4 translocation, as we previously described (13). Consistent with the improved glucose uptake effect (Fig. 1D) sTWEAK pretreatment restored insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane in the presence of TNF- α (Fig. 1E). It should be noted that the total cellular levels of GLUT4 were not modified by either TNF- α (13) or sTWEAK treatment (data not shown). Similar to other stress conditions related to insulin resistance (11, 18, 38), TNF- α increases basal glucose uptake but induces detrimental effects on insulin sensitivity by impairing the insulin signaling

cascade at the level of IRS-1/Akt phosphorylation through a mechanism dependent on JNK1/2 activation (13). In this respect, we observed that pretreatment of human adipose cells with sTWEAK enhanced insulin-induced activation of both IRS-1 and Akt (Fig. 2). More importantly, insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160, which controls GLUT4 intracellular retention and release to the cell surface (26), was impaired in cells treated with TNF- α but restored in sTWEAK-primed adipocytes (Fig. 2). The individual metabolic effects of both TNF- α and sTWEAK in differentiated adipose cells correlate with distinguishing intracellular signaling pathways (Fig. 3). TNF- α but not TWEAK induced I κ B α and - β degradation, established hallmarks of classical NF- κ B pathway activation (Fig. 3A). Proteolytic processing of the NF- κ B2 (p100) subunit into p52, which translocates to the nucleus, was also analyzed as a central step for noncanonical NF- κ B signaling (37). As shown in Fig. 3B, sTWEAK treatment of LiSa-2 adipocytes induced a significant increase of p52 levels in nuclear fractions. It is known that TWEAK can activate both canonical and noncanonical NF- κ B pathways depending on the cellular context (3, 35) and the TWEAK variant (33). Our results reveal that in human visceral adipose cells sTWEAK might exclusively activate a noncanonical NF- κ B pathway. In addition, TNF- α but not sTWEAK induced JNK1/2 activation, which is directly involved in serine phosphorylation of IRS-1 and the insulin-resistant state developed by TNF- α , as was previously demonstrated (13).

Overall, these results demonstrate that sTWEAK may provide beneficial effects in human visceral adipose cells, in the setting of obesity, as it restores insulin sensitivity on glucose uptake without affecting the metabolic effects of TNF- α that are directed to limit fat mass, such as lipolysis and apoptosis.

sTWEAK pretreatment inhibits TRAF2 association with TNFR1 that signal to insulin resistance. TWEAK triggers multiple cellular responses through the Fn14-TRAF2 axis (35). In our cellular model, coimmunoprecipitation experiments performed with anti-TRAF2 or anti-Fn14 antibodies, followed by immunoblotting with the corresponding antibodies against Fn14 or TRAF2, respectively, showed that both endogenous TRAF2 and Fn14 proteins form a complex under basal conditions that is partly disrupted after TNF- α treatment (Fig. 4A).

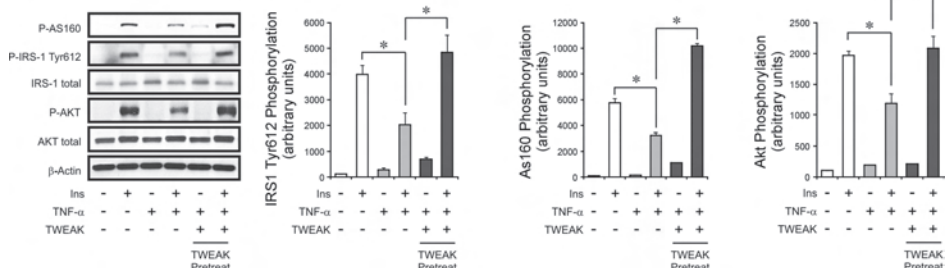


Fig. 2. sTWEAK pretreatment ameliorates TNF- α -induced insulin resistance at IRS-1/Akt/AS160 level. Lysates from differentiated LiSa-2 cells cultured for 24 h in the absence or presence of TNF- α , sTWEAK, or sTWEAK pretreatment (6 h) before stimulation with 50 nM insulin for 10 min were analyzed by Western blot using antibodies against phosphorylated and total IRS-1 (Tyr⁶¹²), Akt (Ser⁴⁷³), and AS160 (Thr⁶⁴²). A representative experiment is shown together with densitometric analysis of phosphorylated vs. total proteins (3 independent experiments). **P* < 0.01.

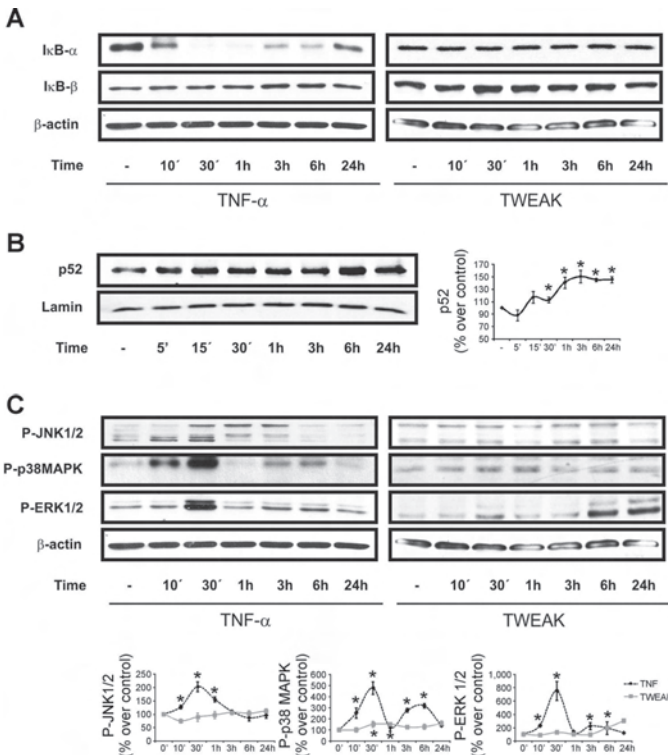


Fig. 3. TNF- α and sTWEAK signal via different transduction pathways. Lysates from differentiated LiSa-2 cells cultured for up to 24 h in the presence of 20 ng/ml TNF- α or 100 ng/ml sTWEAK were analyzed by Western blot. *A*: NF- κ B activity was indirectly measured by analysis of I κ B α and - β degradation. *B*: nuclear fractions were prepared at indicated time points after TWEAK treatment and analyzed by Western blot using an anti-p52 antibody. Lamin A was used as a nuclear marker. *C*: MAPK activation was analyzed in corresponding protein extracts by Western blot using antibodies against phosphorylated JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), and ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴); β -actin was used as a loading control. A representative experiment is shown together with densitometric analyses from 3 independent experiments. * $P < 0.01$.

In contrast, treatment of LiSa-2 adipocytes with sTWEAK increased significantly (nearly 20%) the amount of Fn14 associated with TRAF2. Interestingly, sTWEAK pretreatment prevented the partial disruption of the complex induced by TNF- α , suggesting that Fn14 may compete with TNFRs for binding to endogenous TRAF2. It should be noted that TNF- α , but not sTWEAK, downregulates TRAF2 protein levels, in line with previous reports (19, 46). Remarkably, the Fn14-TRAF2 complex found in nonstimulated human cells would be in agreement with a TRAF2 constitutively active state under basal conditions, which has been described in noncanonical NF- κ B signaling (33). In line with the TNF- α -induced disassociation of Fn14-TRAF2 complex (Fig. 4A), treatment of human adipose cells with TNF- α significantly increased TRAF2 association to TNFR1, but not to TNFR2, which in fact was reduced (Fig. 4A). Under basal conditions, sTWEAK did not modulate TRAF2 association with either TNFR1 or TNFR2. However, TWEAK pretreatment hampered complex formation between TRAF2 and TNFR1 after TNF- α treatment. Overall, our data indicate that in human differentiated adipose cells both Fn14 and TNFR1 compete to bind to endogenous TRAF2, as reported in other cellular models (35). Although several studies

have described that the majority of the effects of TNF- α are mediated by TNFR1, the relative contribution of each TNFR to the role of TNF- α in adipocyte physiology in the context of insulin sensitivity is far from clear. In murine adipocytes, it has been suggested that TNF- α exerts its inhibitory effect on insulin signaling through stimulation of TNFR1 (32), whereas studies in human subcutaneous adipocytes have proposed the participation of both TNFR1 and TNFR2 (21). Since sTWEAK pretreatment inhibits TNF- α -induced association of TRAF2 with TNFR1 (Fig. 4A), we explored insulin sensitivity on glucose uptake in the presence of anti-human TNFR1 and TNFR2 agonist antibodies (23, 32). As shown in Fig. 4B, activation of TNFR1, but not TNFR2, increased basal glucose uptake and induced an insulin-resistant state similar to that induced by TNF- α treatment (13). Our previous studies demonstrated that TNF- α inhibited insulin-induced glucose uptake through a mechanism dependent on JNK1/2 activation (13). Accordingly, p-JNK1/2 was detected only in human adipose cells incubated with the TNFR1 agonist (Fig. 4C). A similar behavior was observed for p38 MAPK activation, whereas ERK1/2 activation, as well as I κ B α degradation, was induced by both TNFR1 and TNFR2 agonist treatments (Fig. 4C).

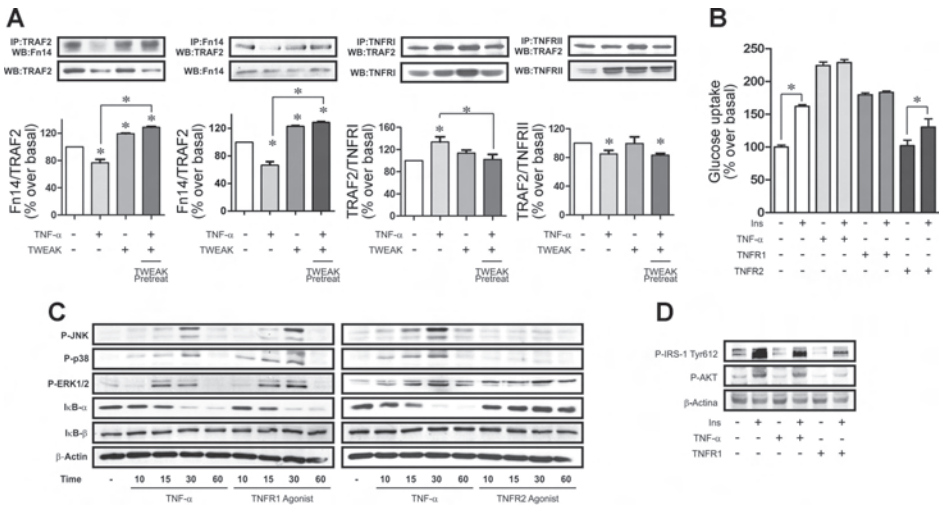


Fig. 4. TNF- α induces insulin resistance through TNF receptor (TNFR)1, which competes with fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) for binding to TRAF2. **A:** total cell lysates from differentiated adipose cells cultured for 24 h in the absence or presence of 20 ng/ml TNF- α , 100 ng/ml sTWEAK, or sTWEAK pretreatment (6 h) were immunoprecipitated with anti-TRAF2, -Fn14, -TNFR1, or -TNFR2 antibodies, and resulting immune complexes were analyzed by Western blot using antibodies against Fn14 and TRAF2. A representative experiment of 3 and densitometric analysis of phosphorylated vs. total protein levels are shown. * $P < 0.01$. **B:** differentiated LiSa-2 cells were incubated with specific TNFR1 and TNFR2 agonists (2 μ g/ml) and 20 ng/ml TNF- α . After 24 h of treatment, cells were incubated with 50 nM insulin for 30 min, and glucose uptake was measured during the last 10 min by quantification of 2-deoxyglucose incorporation into the cells. Results from 3 independent experiments, each in triplicate, are expressed as percent stimulation over basal (control = 100). **C:** cell lysates from adipocytes treated with 20 ng/ml TNF- α and 2 μ g/ml TNFR1 or TNFR2 agonist for up to 60 min were analyzed with corresponding antibodies against p-JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and p-I κ B- α and - β ; β -actin was used as a loading control. **D:** lysates from differentiated LiSa-2 cells cultured for 24 h in the absence or presence of TNF- α or 2 μ g/ml TNFR1 agonist before stimulation with 50 nM insulin for 10 min were analyzed by Western blot using antibodies against phosphorylated and total IRS-1 (Tyr⁶¹²) and Akt (Ser⁴⁷³). A representative experiment of 3 is shown. * $P < 0.01$.

Activation of IRS-1 and Akt was also analyzed to confirm TNFR1-induced insulin resistance. Similar to TNF- α treatment, an anti-human TNFR1 agonist antibody inhibited both insulin-induced IRS-1 tyrosine and Akt serine phosphorylation (Fig. 4D). These data demonstrate for the first time that, in differentiated human adipose cells from a visceral origin, the specific activation of TNFR1 inhibits insulin sensitivity in terms of glucose uptake. The fact that Fn14 competes with TNFR1 for TRAF2 association may explain the inhibitory effect of sTWEAK on TNF- α -induced insulin resistance. However, TWEAK pretreatment specifically modulates the effect of TNF- α on insulin-induced glucose uptake, but not on other TNF- α effects such as lipolysis and apoptosis, also mediated via TNFR1 (4, 34), suggesting that TRAF2 association with TNFR1 in TWEAK-primed cells is sufficient to signal. Therefore, the molecular mechanism involved in the protective mechanism proposed here should occur downstream of TRAF2.

TWEAK-Fn14 signaling specifically abrogates TNF- α -induced insulin resistance by preventing JNK1/2 activation through a mechanism dependent on PP2A activity. We next explored the potential modulation of TNF- α signaling by sTWEAK, focusing on the NF- κ B and MAPK transduction pathways, since they are involved in TNF- α -mediated insulin resistance (6, 30, 48). Although both Fn14 and TNFR1 com-

pete for the binding to endogenous TRAF2, sTWEAK pretreatment did not impair the activation of TAK1 (Fig. 5), a known TNF- α -induced TRAF2 effector that regulates both MAPK and NF- κ B signaling pathways (25, 31). However, sTWEAK pretreatment abolished the stimulatory effect of TNF- α on JNK1/2 activation that is directly involved in the development of insulin resistance (13). A decrease in both p38 MAPK and ERK1/2 activation was also detected (Fig. 6), whereas I κ B α and - β degradation were not significantly modulated by sTWEAK. Therefore, our data suggest that sTWEAK pretreatment would ameliorate insulin resistance by acting at the level of JNK1/2 rather than competing for shared limiting factors, as has been previously described in other cellular models (29, 46). In this regard, it is known that a regulated balance between kinases and phosphatases is crucial for normal cell function. MAPK pathways are negatively regulated by dephosphorylation by multiple phosphatases. Primarily, the PP2 Ser/ThrPPase family can catalyze initial deactivation, whereas at later time points dual-specificity phosphatases would contribute to the downregulation of MAPK signals (22, 45). It seemed reasonable to hypothesize that PP2A, which has been described to modulate JNK1/2 activation in pancreatic cells (27), could be regulated by sTWEAK in our cellular context. Thus, we next analyzed intracellular PP2A activity

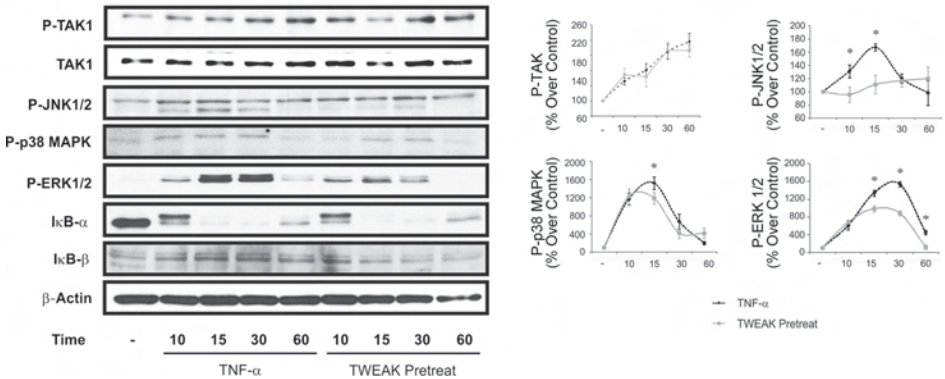


Fig. 5. sTWEAK pretreatment prevents JNK1/2 activation induced by TNF- α . Differentiated LiSa-2 cells were treated with 100 ng/ml sTWEAK for 6 h prior to TNF- α treatment. Modulation of TNF- α -induced signaling cascades were analyzed by Western blot using antibodies against p-TAK1 (Tyr¹⁸⁵), p-JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸³), p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and I κ B- α and - β ; β -actin was used as a loading control. Representative immunoblots and densitometric analysis of 3 independent experiments are shown. * $P < 0.001$

of LiSa-2 adipocytes in response to sTWEAK and TNF- α treatment. As shown in Fig. 6A, sTWEAK but not TNF- α significantly increased PP2A activity after 6 h of treatment. Indeed, PP2A activity decreased upon TNF- α treatment for 24 h (data not shown). Moreover, phosphatase activity remained significantly raised in sTWEAK-primed adipocytes even in the presence of TNF- α (Fig. 6B). To determine whether this PP2A activation by sTWEAK was directly involved in the regulation of JNK1/2, PP2A gene expression was transiently knocked down by a specific siRNA against PP2A α catalytic subunit (PP2A-C α). As shown in Fig. 6C, PP2A-C α knockdown abolished the inhibitory effect of sTWEAK on TNF- α -induced JNK1/2 phosphorylation. JNK1/2 activation by TNF- α was impaired by TWEAK pretreatment in control cells (RISC-free siRNA transfection), but not in PP2A-C α siRNA-transfected human cells, where TNF- α -induced JNK1/2 activation remained high regardless of the presence of sTWEAK. The effectiveness of PP2A-C α siRNA transfection was validated by Western blot analysis (Fig. 6C) together with measurement of PP2A activity (Fig. 6D). Since PP2A-C α knockdown also increased TNF- α -induced ERK1/2 phosphorylation, we cannot formally exclude a potential role of this phosphatase in the regulation of ERK1/2 activation.

We next confirmed the protective role of sTWEAK on TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake through PP2A activation in differentiated human primary adipocytes obtained from visceral fat-derived preadipocytes. As shown in Fig. 7A, sTWEAK pretreatment of human visceral adipocytes abolished TNF- α -induced JNK1/2 phosphorylation in a similar manner to that found in the human cell line (Fig. 5). Moreover, we also confirmed in these cells that PP2A was involved in the inhibition of JNK1/2 induced by sTWEAK, as PP2A-C α knockdown prevented the downregulation of TNF- α -induced JNK1/2 activation by sTWEAK pretreatment (Fig. 7B). Finally, to demonstrate that PP2A was directly associated with the protective role of sTWEAK on insulin sensitivity in primary human

cells, glucose uptake was analyzed after PP2A-C α siRNA transfection in visceral adipocytes. As anticipated, TWEAK-pretreatment restored insulin-induced glucose uptake in RISC-free transfected human visceral adipocytes treated with TNF- α but not in those cells where PP2A-C α had been silenced by specific siRNA transfection (Fig. 7C). Again, measurement of PP2A-C α protein expression (Fig. 7E) and PP2A phosphatase activity (Fig. 7F) was performed in both control (RISC free siRNA) and PP2A-C α siRNA-transfected human visceral adipocytes to validate the effectiveness of PP2A-C α knockdown. Taken together, our results strongly indicate that sTWEAK exerts its beneficial role on insulin sensitivity by preventing TNF- α -induced activation of JNK1/2 through PP2A activation.

DISCUSSION

The multisystem effects of obesity are linked to an imbalance in homeostatic and proinflammatory responses. Obesity triggers inflammatory pathways in adipose tissue, which dysregulate physiological processes that maintain insulin sensitivity. In fact, insulin resistance in adipose tissue is one of the seminal events in the progression toward metabolic dysregulation in obesity. Mediators released by adipocytes and macrophages from this tissue, such as TNF- α family members, have been proposed to impair insulin action in peripheral tissues. In particular, increased levels of TNF- α in the obese state may prevent weight gain through induction of insulin resistance (20).

In the present study, we describe for the first time a positive role for the TWEAK-Fn14 axis in human visceral adipocytes, where it specifically functions to attenuate insulin resistance induced by TNF- α on carbohydrate metabolism without affecting the other metabolic effects of TNF- α directed at limiting fat accretion. Although in vitro studies showed that sTWEAK induced cellular insulin resistance in the liver (10), clinical studies pointed to sTWEAK as a potential novel biomarker of metabolic syndrome with a putative protective effect. In this respect, serum levels of sTWEAK are significantly decreased

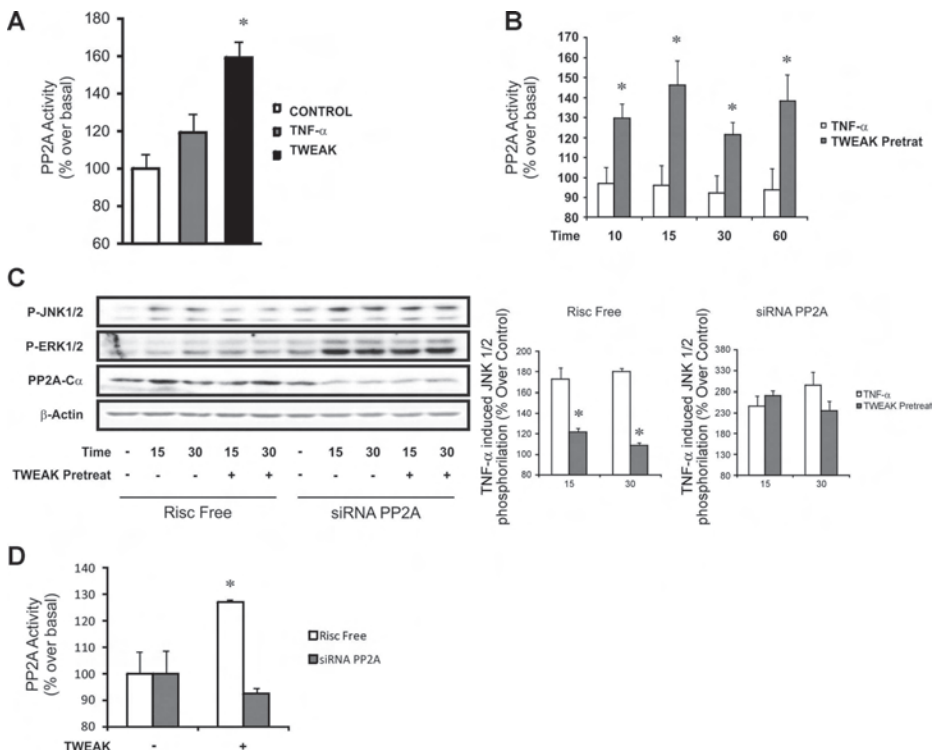


Fig. 6. sTWEAK activation of the Ser/Thr phosphatase PP2A impairs TNF- α -induced JNK1/2 phosphorylation in LiSa-2 adipocytes. **A**: differentiated human adipose cells were incubated with 100 ng/ml sTWEAK for 6 h, and PP2A activity was measured as described in MATERIALS AND METHODS. **B**: PP2A activity was also measured in control and sTWEAK-pretreated cells (6 h) after TNF- α incubation for indicated times. Results are means \pm SE from 3 independent experiments performed in duplicates. Data are expressed as percent stimulation of phosphatase activity compared with control cells. **C**: adipose cells were transfected with 100 nM siRNA against the α -catalytic subunit of PP2A (PP2A-C α) or RISC-free (control cells) and stimulated or not with 100 ng/ml sTWEAK for 6 h prior to TNF- α treatment. Cell lysates were analyzed by Western blot, and representative immunoblots of p-JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and PP2A catalytic subunit are shown; β -actin was used as a loading control. Densitometric analysis of 2 independent experiments is shown. **D**: adipose cells transfected as in **C** were stimulated with 100 ng/ml sTWEAK for 6 h, and PP2A activity was measured. Results are means \pm SE from 2 independent experiments performed in triplicates. Data are expressed as percent stimulation of phosphatase activity compared with control cells.

in T2D patients and are negatively correlated with fasting glucose and insulin resistance assessed by HOMA-IR (24). A recent study from our laboratory also revealed that sTWEAK levels are decreased in T1D and are inversely correlated with cardiovascular risk factors (28). In addition, a decrease in sTWEAK might be associated with insulin resistance in pregnancy and could be a predictor of T2D in high cardiovascular risk populations (unpublished results). Under physiological conditions, high levels of TWEAK mRNA have been found in many human tissues such as lymph nodes, pancreas, intestine, heart, brain, lung, ovary, vasculature, and skeletal muscle. However, the real contribution of each tissue to circulating sTWEAK is unknown. The low level of TWEAK mRNA detected in human adipose tissue (42) suggests that adipose tissue contribution to circulating sTWEAK circulation is mi-

nor. Interestingly, our unpublished findings suggest that circulating sTWEAK is negatively correlated with fat mass (under review). This situation is the opposite of that found regarding circulating TNF- α in obese individuals. To date, the significance and the mechanisms leading to reduce levels of sTWEAK in pathology associated with a proatherosclerotic profile are not known. One may hypothesize that lower circulating sTWEAK levels in high cardiovascular risk diseases might be a consequence of metabolic derangement in other tissues where TWEAK is usually expressed at higher levels, such as the vasculature and skeletal muscle, which are both involved in the development of these metabolic disturbances.

Our study suggests a potential beneficial role for sTWEAK in the metabolic disturbances associated with T2D and provides strong evidence about the molecular mechanisms through

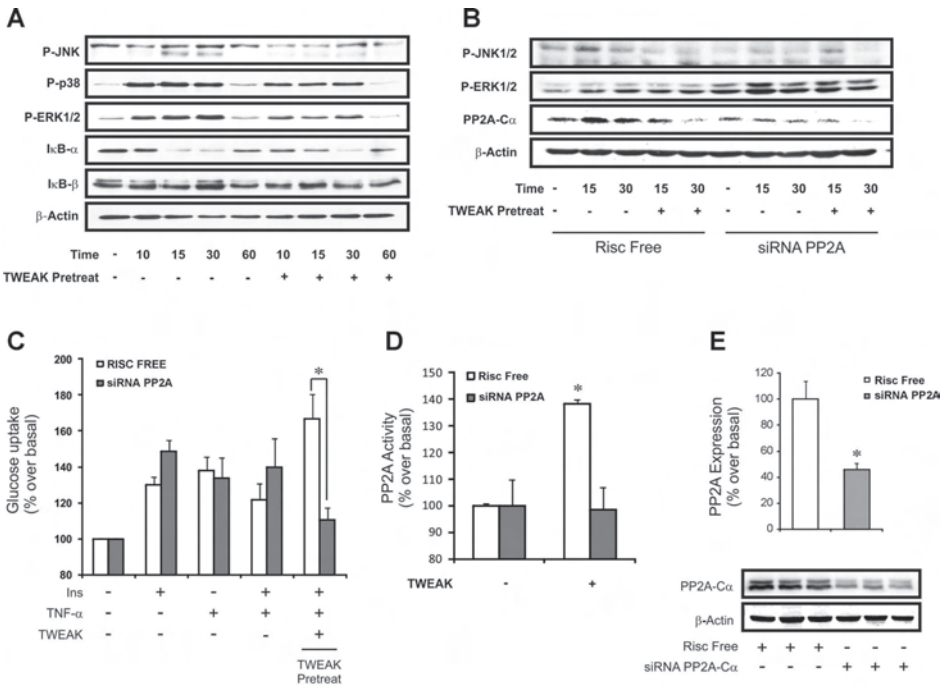


Fig. 7. Activation of PP2A by sTWEAK restores insulin sensitivity on glucose uptake in human primary adipocytes by preventing JNK1/2 phosphorylation. *A*: human primary adipocytes were obtained by differentiation of preadipocytes isolated from visceral fat depots and cultured for up to 24 h in the presence of 20 ng/ml TNF- α or 100 ng/ml sTWEAK. NF- κ B and MAPK activation was analyzed by Western blot using antibodies against p-JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and p-I κ B- α and - β ; β -actin was used as a loading control. Representative immunoblots of 2 independent experiments are shown. *B*: differentiated human primary adipocytes were transiently transfected with 100 nM siRNA against PP2A-C α or RISC-free (control cells) and stimulated or not with 100 ng/ml sTWEAK for 6 h prior to TNF- α (20 ng/ml) treatment. Cell lysates were analyzed by Western blot with antibodies against p-JNK1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), and the PP2A catalytic subunit. Representative immunoblots of 2 independent experiments are shown. *C*: human primary adipocytes transfected with RISC-free (control cells) or PP2A-C α siRNA were stimulated or not with 100 ng/ml TWEAK for 6 h (TWEAK pretreatment) before incubation with 20 ng/ml TNF- α for 24 h. Glucose uptake was measured after 50 nM insulin incubation for 30 min by incorporation of 2-deoxyglucose into the cells during the last 10 min of culture. Results from 2 independent experiments performed in triplicates are expressed as percent stimulation over basal (control = 54.5 \pm 10 pmol glucose/mg protein/10 min). **P* < 0.01.

which the insulin signaling cascade may be improved. No metabolic effects of sTWEAK under basal conditions were observed on either lipolysis or glucose uptake, in agreement with a previous study in human subcutaneous adipocytes (40). However, our results demonstrate for the first time that sTWEAK ameliorates TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake, GLUT4 translocation, and insulin signaling, suggesting that sTWEAK acts as a protective factor in insulin-mediated glucose homeostasis.

sTWEAK has been identified both as a positive and negative regulator of TNF- α signaling, since both TNF- α and TWEAK, through binding to their receptors, signal via similar TNFR-associated factors, including TRAF2. Thus, TWEAK-Fn14 signaling can sensitize tumor cells to TNF- α (43), whereas in nontumoral epithelial cells sTWEAK has been described to inhibit TNFR1 signaling and has the potential to shift the

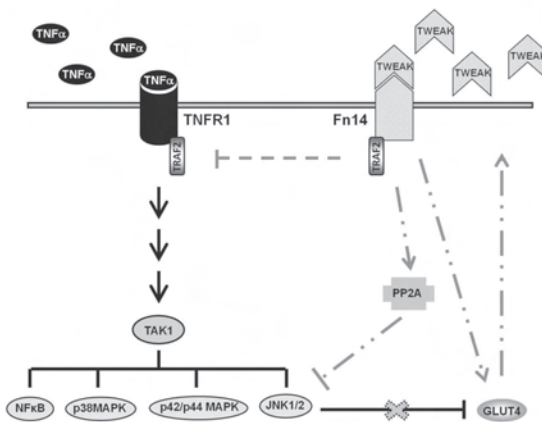
quality of cellular TNF- α responses from inflammation to cell death (46). Similarly, our study indicates that in human visceral adipocytes both Fn14 and TNFR1 compete for binding to endogenous TRAF2. Nevertheless, the analysis of downstream effectors demonstrates that modulation of TNF- α -induced effects on insulin sensitivity by sTWEAK is a consequence, at least in part, of MAPK modulation rather than by competition for shared limiting factors, as has been described in other cellular models (29, 46). More specifically, we demonstrate that sTWEAK prevents TNF- α -induced insulin resistance through the direct regulation of JNK1/2 phosphorylation. Furthermore, our study provides compelling evidence that the Ser/Thr phosphatase PP2A is an effector molecule in the TWEAK signaling cascade and that its activation is linked to the protective role of TWEAK during the development of insulin resistance. Until now, PP2A has been mainly described as a negative regulator

of the insulin signaling pathway as it impairs Akt activation (1). Indeed, in brown adipocytes, TNF- α , acting through a ceramide-dependent mechanism, mediated PP2A activation (39). However, as we show here, TNF- α does not activate PP2A in human white adipocytes and does not induce changes in the protein levels of either the catalytic or the regulatory PP2A subunits, suggesting cell type-specific differences in the effect of PP2A on insulin signaling. Actually, PP2A specificity depends on its regulatory subunits, which may be cell type dependent (16). In this context, studies in murine adipocytes demonstrate that PP2A inhibition triggers insulin resistance as a consequence of mTOR activation and IRS-1 Ser phosphorylation (5). Moreover, particular transduction pathways acti-

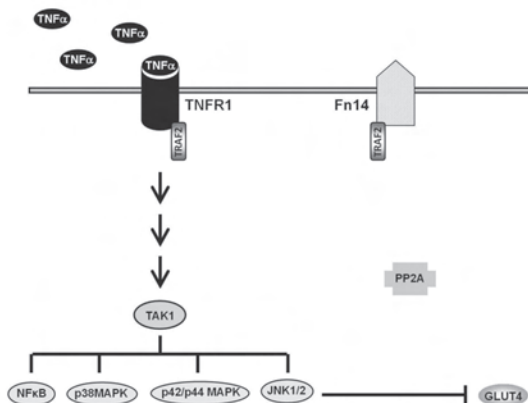
vated by adiponectin, a well-known insulin-sensitizing adipokine, are elicited by PP2A activation (8). Our study in human adipocytes reveals that PP2A controls JNK1/2 phosphorylation and is in agreement with previous studies performed in pancreatic cells (27). In addition to PP2A, other PP2A-related Ser/Thr phosphatases such as PP4 have also been described to be involved in the regulation of TNF- α -induced activation of JNK1/2 (49). Although we clearly demonstrate here the positive role of sTWEAK on PP2A activation in human visceral adipocytes in the context of TNF- α -induced insulin resistance, additional effects of alternative phosphatases such as PP2C, which are also involved in the inhibition of insulin sensitivity by TNF- α , should not be rule out (36).

Fig. 8. Balance between TNF family members on adipose tissue as a key factor in the pathogenesis of obesity-associated metabolic disorders. **A:** early stages of obesity/inflammation: elevated levels of sTWEAK may show a protective role against TNF- α -induced insulin resistance on glucose uptake. Although both TNFR1 and Fn14 compete for TRAF2, TWEAK pretreatment does not modulate all TNF- α signaling pathways downstream of TRAF2 (e.g., TAK1). Specifically, PP2A activation by sTWEAK inhibits TNF- α -induced JNK1/2 activation, allowing an adequate response of adipocytes to insulin-induced glucose uptake. **B:** steady-state obesity/inflammation: decrease in sTWEAK levels (i.e., patients with T2D or obesity) might induce a decrease in insulin responsiveness on glucose uptake as consequence of JNK1/2 activation.

A Obesity early states



B Obesity progression



In summary, we have shown that sTWEAK can prevent obesity-associated insulin resistance brought about by TNF- α signaling through a PP2A-dependent fine tuning of JNK1/2 activation. Further investigation will be required to understand the molecular mechanisms mediating the positive effect of sTWEAK on PP2A activity and, perhaps more importantly, to establish the specific role of the regulatory PP2A subunits in the insulin sensitivity/resistance states. In this scenario, we postulate that elevated sTWEAK levels may have a protective role on insulin resistance development through the induction of PP2A overactivation, supporting the previous hypothesis that identified sTWEAK as a potential novel biomarker of metabolic disturbances such as obesity and T2D. Our results reinforce the idea that an imbalance between the TNF family members on adipose tissue is a key factor in the pathogenesis of the insulin-resistance-associated metabolic disorders (Fig. 8). Contrary to what is observed with TNF- α in obese and T2D patients, circulating sTWEAK appears as a protective element under these conditions. Interestingly, mTWEAK and sTWEAK have been shown to have different effects on signal transduction pathways (33). Since mTWEAK is mainly expressed in activated monocytes, the metabolic effects of TWEAK may therefore differ in cells having contact with monocytes (e.g., adipocytes in an obesity context) and in more distant cells living in a monocyte-free environment. Thus, it is tempting to speculate that the decrease in sTWEAK levels, together with an increase of mTWEAK, may help to maintain the local proinflammatory effect of the TNF- α -driven response. Consequently, the potential use of recombinant TWEAK or Fn14 agonists to manipulate the TWEAK/Fn14 pathway for the treatment of insulin resistance is an exciting prospect that should be explored further.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kelly Roche from our lab for technical assistance.

GRANTS

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2008-04043 and SAF2012-36186 to S. Fernández-Veledo, PI08/0733 and PI11/00049 to M. R. Chacón, SAF2010-20918-C02-01 to A. Porras, and PI11/00085 to J. Vendrell), S. Fernández-Veledo acknowledges support from the "Miguel Servet" tenure track program (CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria and cofinanced by the European Regional Development Fund. M. R. Chacón is supported by the Research Stabilization Program of the Instituto de Salud Carlos III cofinanced by Institut Català de Salut in Catalonia. A. Vázquez-Carballo and V. Ceperuelo-Mallfré are supported by FPI and "Juan de la Cierva" fellowships, respectively, from the Spanish Ministry.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: A.V.-C., V.C.-M., and E.M.-M. performed experiments; A.V.-C., V.C.-M., and S.F.-V. analyzed data; A.V.-C., A.P., and S.F.-V. interpreted results of experiments; A.V.-C. and V.C.-M. prepared figures; A.V.-C., M.R.C., A.P., J.V., and S.F.-V. edited and revised manuscript; M.R.C., M.L., J.V., and S.F.-V. conception and design of research; A.P., J.V., and S.F.-V. approved final version of manuscript; S.F.-V. drafted manuscript.

REFERENCES

- Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, Ferre P, Dugail I, Hajduch E. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59: 600–610, 2010.
- Brown SA, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 285: 17432–17441, 2010.
- Brown SA, Richards CM, Hanscom HN, Feng SL, Winkles JA. The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor- κ B activation. *Biochem J* 371: 395–403, 2003.
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24: 1297–1305, 2012.
- Carlson CJ, White MF, Rondinone CM. Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 533–539, 2004.
- Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett* 582: 117–131, 2008.
- Chacon MR, Richard C, Gomez JM, Megia A, Vilarrasa N, Fernandez-Real JM, Garcia-Espana A, Miranda M, Masdevall C, Ricard W, Caubet E, Soler J, Vendrell J. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine* 33: 129–137, 2006.
- Deepa SS, Zhou L, Ryu J, Wang C, Mao X, Li C, Zhang N, Musi N, DeFronzo RA, Liu F, Dong LQ. APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKCzeta signaling pathway. *Mol Endocrinol* 25: 1773–1785, 2011.
- Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J* 21: 1857–1869, 2007.
- Feng F, Wang L, Albanese N, Holmes A, Xia P. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis attenuates the action of insulin in hepatocytes. *Endocrinology* 149: 1505–1513, 2008.
- Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de CJ, Ramos MP, Bruderlein S, Moller P, Lorenzo M. Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocyte cell line: paracrine interaction with myocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2866–2876, 2008.
- Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, onso-Chamorro M, Lorenzo M. Molecular mechanisms involved in obesity-associated insulin resistance: therapeutic approach. *Arch Physiol Biochem* 115: 227–239, 2009.
- Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3583–3593, 2009.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29: 415–445, 2011.
- Gutierrez-Uzquiza A, Arechederra M, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA, Porras A. p38 α mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. *J Biol Chem* 287: 2632–2642, 2012.
- Hahn K, Miranda M, Francis VA, Vendrell J, Zorzano A, Telemann AA. PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab* 11: 438–444, 2010.
- Han S, Yoon K, Lee K, Kim K, Jang H, Lee NK, Hwang K, Young Lee S. TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF- κ B through TNF receptor-associated factors. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 789–796, 2003.
- Houdail B, Nguyen V, Ammon HF, Haap M, Schechinger W, Machicao F, Rett K, Haring HU, Schleicher ED. Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signalling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle. *Diabetologia* 45: 356–368, 2002.
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26: 3071–3084, 2006.
- Hube F, Hauner H. The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res* 31: 626–631, 1999.
- Hube F, Hauner H. The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture. *Endocrinology* 141: 2582–2588, 2000.

22. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353: 417–439, 2001.
23. Jupp OJ, McFarlane SM, Anderson HM, Littlejohn AF, Mohamed AA, MacKay RH, Vandenaebelle P, MacEwan DJ. Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J* 359: 525–535, 2001.
24. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 199: 440–444, 2008.
25. Kumar M, Makonchuk DY, Li H, Mittal A, Kumar A. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) activates proinflammatory signaling pathways and gene expression through the activation of TGF-beta-activated kinase 1. *J Immunol* 182: 2439–2448, 2009.
26. Lansley MN, Walker NN, Hargett SR, Stevens JR, Keller SR. Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E1273–E1286, 2012.
27. Li W, Chen Z, Gong FR, Zong Y, Chen K, Li DM, Yin H, Duan WM, Miao Y, Tao M, Han X, Xu ZK. Growth of the pancreatic cancer cell line PANC-1 is inhibited by protein phosphatase 2A inhibitors through over-activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur J Cancer* 47: 2654–2664, 2011.
28. Laurado G, Gonzalez-Clemente JM, Maymo-Masip E, Subias D, Vendrell J, Chacon MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One* 7: e43919, 2012.
29. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, Hurst S, Danilenko D, Li J, Filvaroff E, Yang B, Daniel D, Ashkenazi A. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* 123: 931–944, 2005.
30. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 114: 183–194, 2008.
31. Nishimura M, Shin MS, Singhirunusorn P, Suzuki S, Kawanishi M, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF-(kappa)B-independent survival pathways in tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol Cell Biol* 29: 5529–5539, 2009.
32. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271: 13018–13022, 1996.
33. Roos C, Wicovsky A, Muller N, Salzmann S, Rosenthal T, Kalthoff H, Trauzold A, Seher A, Henkler F, Kneitz C, Wajant H. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol* 185: 1593–1605, 2010.
34. Ryden M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunberg M, Perbeck L, Lonqvist F, Arner P. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 277: 1085–1091, 2002.
35. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 278: 36005–36012, 2003.
36. Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4: 465–474, 2006.
37. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 21: 71–85, 2011.
38. Talior I, Yarkoni M, Bashan N, Eldar-Finkelman H. Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC δ activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E295–E302, 2003.
39. Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50: 2563–2571, 2001.
40. Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M, Brinkmann U, Wabitsch M, Link D, Hauner H. Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology* 150: 5373–5383, 2009.
41. van Beek EA, Bakker AH, Kruyt PM, Vink C, Saris WH, Franssen-van Hal NL, Keijer J. Comparative expression analysis of isolated human adipocytes and the human adipose cell lines LiSa-2 and PAZ6. *Int J Obes (Lond)* 32: 912–921, 2008.
42. Vendrell J, Maymo-Masip E, Tinahones F, Garcia-Espana A, Megia A, Caubet E, Garcia-Fuentes E, Chacon MR. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2983–2992, 2010.
43. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL, Silke J. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol* 182: 171–184, 2008.
44. Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Moller P. LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* 88: 889–894, 2000.
45. Wadgaonkar R, Pierce JW, Somnay K, Damico RL, Crow MT, Collins T, Garcia JG. Regulation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase pathways in endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 423–431, 2004.
46. Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, Ehrenschrwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C, Wajant H. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16: 1445–1459, 2009.
47. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 241–249, 2003.
48. Williams LM, Lali F, Willetts K, Balague C, Godessart N, Brennan F, Feldmann M, Foxwell BM. Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF-kappaB. *Mol Immunol* 45: 2446–2454, 2008.
49. Zhou G, Mihindukulasuriya KA, Corkle-Chosnek RA, Van HA, Hu MC, Brinkley BR, Tan TH. Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 277: 6391–6398, 2002.

The Rise of Soluble TWEAK Levels in Severely Obese Subjects After Bariatric Surgery May Affect Adipocyte-Cytokine Production Induced by $TNF\alpha$

Elsa Maymó-Masip, Sonia Fernández-Veledo, Antonio García-España, Ana Vázquez-Carballo, Francisco J. Tinahones, Eduardo García-Fuentes, Lourdes Garrido-Sanchez, M. Mar Rodríguez, Joan Vendrell,* and Matilde R. Chacón*

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (E.M.-M., D.F.-V., A.V.-C., L.G.-S., J.V., M.R.C.); Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (E.M.-M., D.F.-V., A.G.-E., L.G.-S., J.V., M.R.C.), IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 28027 Madrid, Spain; Department of Biochemistry and Molecular Biology II (A.V.-C.), Faculty of Pharmacy, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (F.J.T., E.G.-F., M.M.R.); Department of Obesity and Nutrition (F.J.T.), Hospital Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain; Servicio de Endocrinología y Nutrición (E.G.-F.), Hospital Regional Universitario Carlos Haya, 29004 Málaga, Spain; Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga (E.G.-F.), 29009 Málaga, Spain; and Department of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition (M.M.R.), Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, 17007 Girona, Spain

Context: Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) is generated by the intracellular proteolytic cleavage of full-length membrane-bound TNF-like weak inducer of apoptosis (mTWEAK). sTWEAK levels are reduced in diseases with an inflammatory component. Additionally, sTWEAK hampers $TNF\alpha$ activity in human cells.

Objectives: The objectives of the study were as follows: 1) to determine circulating sTWEAK in severe obesity and after bariatric surgery; 2) to study m/sTWEAK and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) protein expression in sc adipose tissue (SAT) of severely obese subjects, in SAT stromal vascular fraction (SVF), and isolated adipocytes and in human monocyte-derived macrophages; and 3) to explore, on human adipocytes, the sTWEAK effect on $TNF\alpha$ proinflammatory activity.

Design: sTWEAK levels were measured in cohort 1: severely obese subjects ($n = 23$) and a control group ($n = 35$); and in cohort 2: ($n = 23$) severely obese subjects before and after surgery. The m/sTWEAK and Fn14 expressions were determined in SAT biopsies, SVF, and isolated adipocytes from severely obese and control subjects and in human monocyte-derived macrophages. In human primary cultured adipocytes, sTWEAK pretreated and $TNF\alpha$ challenged, IL-6, IL-8, and adiponectin protein and gene expressions were determined and nuclear factor- κ B and MAPK signaling analyzed.

Results: sTWEAK levels were reduced in severely obese subjects. After surgery, sTWEAK levels rose in 69% of patients. mTWEAK protein expression was increased in SAT and SVF of severely obese subjects, whereas Fn14 was up-regulated in isolated adipocytes. M2 human monocyte-derived macrophages overexpress mTWEAK. In human adipocytes, sTWEAK down-regulates $TNF\alpha$ cytokine production by hampering $TNF\alpha$ intracellular signaling events.

Conclusion: The decrease of sTWEAK in severely obese patients may favor the proinflammatory activity elicited by $TNF\alpha$.

TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), a member of the TNF superfamily of cytokines, is a multifunctional cytokine that controls many cellular activities including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, angiogenesis, and inflammation (1). High levels of TWEAK mRNA have been found in many tissues such as lymph nodes, pancreas, intestine, heart, brain, lung, ovary, vasculature, and skeletal muscle and at low levels in the liver, lung, thymus, kidney, and adipose tissue (2–5).

TWEAK is initially expressed as a full-length transmembrane protein of 27 kDa (mTWEAK) from which a soluble variant of 18 kDa (sTWEAK) can be generated intracellularly by proteolytic processing (6). Both isoforms, mTWEAK and sTWEAK, are biologically active and can bind to fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), its only bona fide signal transducing receptor (6).

Reduced circulating TWEAK (sTWEAK) levels have been found in diseases with increased cardiovascular risk and low-degree chronic inflammation, such as type 2 diabetes, atherosclerosis, or chronic renal failure (3, 7, 8).

Obesity is a highly prevalent chronic disease in which inflammatory events (systemic and local in the adipose tissue) play a key role in its associated comorbidities (9). In obesity, more adipose tissue infiltrating macrophages with an altered polarizing state have been reported (10, 11). An imbalance between M1 (proinflammatory) and M2 (antiinflammatory) macrophage types has been claimed to be an important determinant of the inflammatory component of the adipose tissue in obesity (12–17).

To date, TNF α has focused the attention as a preponderant inflammatory cytokine, with important implications both at local and systemic levels in obesity and related diseases (18). TWEAK and TNF α are cytokines that coexist within the context of obesity, and sTWEAK has been described to interfere with TNF α signaling in cellular systems such as human epithelial cancer cell lines, human synoviocytes, and mouse cerebral cortical neurons (19–21).

The physiological role of sTWEAK within the context of obesity or insulin resistance has been scarcely studied. In this sense, *in vitro* studies have shown that sTWEAK stimulus could regulate preadipocyte differentiation and can exert a weak proinflammatory activity over subcutaneous mature adipocytes without affecting lipolysis or glu-

cose uptake (22–25). On the other hand, studies on the function of sTWEAK in human macrophages have suggested that sTWEAK balances TNF α activity by repressing the production of proinflammatory cytokines and attenuating the transition from innate to adaptive immunity (23).

Taking the above data into consideration and because, to our knowledge, no information exists on circulating sTWEAK in severe obesity, in this study we explored whether sTWEAK may participate in the inflammatory/antiinflammatory imbalance observed in severe obesity. We show that sTWEAK levels were decreased in severely obese patients and rose after weight loss. We found that in severely obese subjects, the mTWEAK protein expression in sc adipose tissue (SAT) is mainly due to the cells contained in the stromal vascular fraction (SVF) compartment. We also reveal that M2 class macrophages express mTWEAK at higher levels than M1 type. Finally, we report that in human primary cultured adipocytes, sTWEAK down-regulates inflammatory cytokines induced by TNF α , by hampering intracellular signaling events.

Materials and Methods

Subjects

Two different cohorts were studied.

Cohort 1

Cohort 1 included 23 severely obese subjects and an age- and gender-matched population of 35 overweight subjects who were recruited at the Hospital Clínico de Málaga and Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII (Spain), respectively (Table 1). None of the severely obese subjects were receiving insulin therapy or oral hypoglycemic or hypolipidemic agents. Subjects were of Caucasian origin and had no systemic or infectious disease other than obesity.

Cohort 2

A different cohort from the Hospital Clínico de Málaga was included in the study. Twenty-three severely obese patients, who underwent bariatric surgery, were prospectively recruited. Patients were studied before and 6 months after bariatric surgery (Table 2).

Abdominal SAT was obtained from 4 severely obese patients (undergoing bariatric surgery procedures) and from 4 control subjects (undergoing laparoscopic surgery procedures such as

Table 1. Clinical and Anthropometrical Characteristics of Cohort 1

	Control (n = 35)	Severely Obese (n = 23)	P Value
Age, y	44.5 ± 8.3	40 ± 10	ns
Gender, n, male/female	23/12	9/14	ns
BMI, kg/m ²	26.2 ± 3.6	57.4 ± 7.3	<.001
Waist circumference, cm	90.8 ± 13	146.2 ± 23.5	<.001
SBP, mm Hg	122 ± 13	140 ± 23.6	ns
DBP, mm Hg	70.6 ± 9.4	84.5 ± 10.2	.004
Cholesterol, mM	4.8 ± 0.3	5.2 ± 1.1	ns
HDL-cholesterol, mM	1.3 ± 0.3	1 ± 0.6	ns
Triglycerides, mM	1.2 ± 0.7	1.4 ± 0.8	ns
LDL-cholesterol, mM	2.9 ± 0.9	3.5 ± 1.1	ns
Glucose, mM	5.3 ± 0.7	5.6 ± 1	ns
Insulin, μU/mL	5.9 ± 4.5	31.5 ± 18	<.001
HOMA-IR	1.4 ± 1.1	8.1 ± 5.9	<.001
IL-6, pg/mL	1.9 ± 1.4	6.1 ± 4.5	<.001
TNFα, pg/mL	2.4 ± 1.3	4.1 ± 2.4	.033
sTWEAK, pg/mL	587.8 ± 264.3	252.8 ± 386.5	<.003

Abbreviations: DBP, diastolic blood pressure; ns, not significant; SBP, systolic blood pressure.

Table 2. Clinical and Anthropometrical Characteristics of Cohort 2

	Before Surgery	6 Months After Surgery	P Value ^a	Change, % ^b	Pearson Correlation, % TWEAK ^c
BMI, kg/m ²	56 ± 6.6	43 ± 6.5	<.001	-24.5 ± 7.1	R = -0.008; P = 0.976
Waist circumference, cm	143 ± 14.6	117.5 ± 13.7	<.001	-18.1 ± 7.4	R = 0.208; P = .342
Cholesterol, mM	4.9 ± 1	3.4 ± 0.69	<.001	-30.8 ± 11.6	R = -0.055; P = 0.802
HDL-cholesterol, mM	1.10 ± 0.3	0.92 ± 0.2	<.001	-13.4 ± 15.3	R = -0.001; P = .998
Triglycerides, mM	1.6 ± 1	1.3 ± 0.5	.010	-7.9 ± 33.1	R = 0.065; P = .770
Glucose, mM	5.6 ± 1	4.8 ± 0.4	<.001	-12.3 ± 15.3	R = 0.029; P = .897
FFAs, mM	0.56 ± 0.24	0.48 ± 0.17	.386	5.4 ± 56.4	R = -0.535; P = .018
Insulin, μU/mL	28.1 ± 16.4	11.3 ± 4.3	<.001	-51.3 ± 23.9	R = -0.079; P = .734
HOMA-IR	7.2 ± 5	2.5 ± 1	<.001	-58.3 ± 21.8	R = -0.103; P = .665
Leptin, ng/mL	82.8 ± 32.5	34.4 ± 37	<.001	-61.8 ± 25.9	R = -0.075; P = .768
CRP, mg/mL	7 ± 6.2	1.6 ± 4.7	.001	-62.6 ± 32.3	R = -0.015; P = .954
IL-6, pg/mL	3.1 ± 3	1.1 ± 1.7	.012	105.6 ± 767	R = -0.071; P = .786
TNFα, pg/mL ^d	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	.033	-17.8 ± 14	R = 0.067; P = .820
sTWEAK, pg/mL	253 ± 110.4	319 ± 157	.029	34.8 ± 53.7	R = 1

Clinical and analytical characteristics (units provided) of the severely obese patients (n = 23) before and 6 months after surgery (cohort 2). Patients were 7 men and 16 women aged 40.2 ± 10 years.

^a P value for paired Student's *t* test between T = 0 and T = 6.

^b Percentage change (T = 6-T0/T = 0100).

^c Correlation analysis with percentage sTWEAK and clinical and anthropometrical variables R (Pearson correlation coefficient and P value).

^d Plasma levels.

hiatus hernia repair or cholecystectomies). Adipocytes and SVF were isolated as described elsewhere (4) from the biopsies of 4 severely obese patients and 4 control patients. Biological samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analysis.

The corresponding hospital ethics committees responsible for research approved the study, and informed consent was obtained from all participants.

Analytical methods

Glucose, cholesterol, and triglyceride plasma levels were determined by a Hitachi 737 autoanalyzer (Roche Molecular Biochemicals, Marburg, Germany) using the standard enzyme methods. High-density lipoprotein cholesterol was quantified

after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (PEG-6000; Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany). Plasma insulin, levels of soluble IL-6, and plasma free fatty acids (FFAs) were measured as described elsewhere (5). TNFα in serum (cohort 1) and in plasma (cohort 2) was measured with the human TNFα ultrasensitive kit (BLK Diagnostics International, Barcelona, Spain). Serum sTWEAK was measured using the human TWEAK instant ELISA kit (Bender Medsystems, Vienna, Austria). Leptin was analyzed using the enzyme immunoassay ELISA kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas). Adiponectin was analyzed using the enzyme immunoassay ELISA kit (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Plasma high-sensitive C-reactive protein (CRP) was measured

using a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany).

Reagents

TWEAK, TNF α , IL-4, IL-10, and interferon (INF)- γ were purchased from PeppoTech Inc (Rocky Hill, New Jersey). Lipopolysaccharide was purchased from Calbiochem (BioNova, Barcelona, Spain). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). The following antibodies were used: antihuman TWEAK/TNFS12 was purchased from R&D Systems (Barcelona, Spain); Fn14; p44/42 (ERK); stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK); p38 MAPK; phosphorylated (P)-p44/42 (ERK) (Thr202/Tyr204); P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185); P-p38 MAPK (Thr180/Tyr182); inhibitory- κ B (I κ B)- α ; P-I κ B α (Ser32) were obtained from Cell Signaling (Invitrogen, Spain); and anti- β -actin antibody was obtained from Sigma-Aldrich.

Cell culture and treatments

Primary culture of human adipocytes

Human preadipocytes were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). Cells were differentiated into adipocytes as recommended by the European Collection of Cell Cultures. At day 14 of differentiation, cells were treated with 100 ng/mL TWEAK or left untreated. After 17 hours, the medium was replaced with a fresh medium. Cells were then either left unstimulated or stimulated for 8 hours with 50 ng/mL TNF α or with 50 ng/mL TNF α plus 100 ng/mL sTWEAK. Cells and cell culture supernatant were collected for further processing.

Human monocyte-derived macrophages

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Bioscience, Barcelona, Spain). Monocytes were purified from PBMCs by magnetic cell sorting using CD14-microbeads (Milteny Biotec, S.L. Madrid, Spain). M1, M2a(IL-4), and M2c(IL-10) macrophages were generated in vitro according to the literature (11) by incubation of PBMCs in 1000 U/mL IFN γ , 10 ng/mL IL-4, and 10 ng/mL IL-10, respectively, for 5–6 days in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum.

In addition, THP-1 cells were polarized to M1, M2a, and M2c as described by Lepur et al (24). After treatments, all cells were collected for further processing.

Immunoblot analysis

Cellular proteins were submitted to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked. Blots were developed and quantified as described elsewhere (5).

Gene expression and relative quantification

RNA was extracted and quantified as described (4, 5). The TaqMan gene expression assays used were as follows: *IL-6* (Hs00985641_m1); *IL-8* (Hs00174103_m1); (Hs00605917_m1), *IL-1 β* (Hs01555410_m1), *IL-10* (Hs00961622_m1), *TNF α* (Hs00174128_m1), *TWEAK* (Hs00611242_m1), *MCP-1* (Hs00234140_m1), *CD206* (Hs00267207_m1), *ADIPOQ* (Hs00605917_m1), *PPAR γ* (Hs00234592_m1), and *PP1A* (Hs99999904_m1).

Statistical analysis

For clinical and anthropometrical variables, data are expressed as mean \pm SD and for in vitro experimental results as mean \pm SE. Differences in variables before and 6 months after surgery were analyzed by a paired Student's *t* test. Cohen's kappa agreement was calculated to detect positive or negative variations in circulating level changes before and after surgery between sTWEAK and adiponectin.

Differences among control and severely obese subjects were tested with the Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed data or Student's *t* test for normally distributed data. Spearman's correlation coefficient was used to analyze the association between sTWEAK levels and clinical or metabolic parameters. The mixed linear model was used to determine whether any variable was affecting sTWEAK change between 0 and 6 months, considering the measures of each subject as a random effect and the time and the influence of variables as fixed. Gender, age, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were considered to adjust the model. Finally, stepwise linear regression analysis was performed grouping patients at T = 0 from cohort 1 and cohort 2 to determine the independence of the association between metabolic and clinically associated variables and sTWEAK levels. *P* < .05 was considered significant. Statistical analysis was performed using version 15 of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, Illinois).

Results

sTWEAK serum levels are reduced in severely obese patients and rise after bariatric surgery

When we compared circulating serum sTWEAK levels in the cohort 1 of severely obese subjects vs a comparable control group (Table 1), we observed significantly lower levels of sTWEAK in severely obese patients compared with the control group (*P* < .003) (Figure 1A). No significant differences according to gender were found with respect to sTWEAK levels within the group of severely obese subjects or within the control group (*P* = .297 and *P* = .063, respectively) or after grouping all subjects from cohort 1 (*P* = .414). As expected, severely obese subjects showed a circulating proinflammatory profile with significantly higher levels of IL-6 and TNF α (Table 1).

We also measured sTWEAK in a different cohort before and after bariatric surgery (cohort 2, Table 2). At 6 months after surgery, sTWEAK levels were significantly elevated in 69% of the patients (*P* = .029) when compared with basal levels before weight loss (Table 2 and Figure 1B). No differences were found according to gender with respect to sTWEAK before (*P* = .698) or after surgery (*P* = .878). A mimetic effect of sTWEAK and adiponectin changes after weight loss were observed in some subjects (*n* = 17), with a tendency to be significant (κ = 0.415; *P* = .087) (25). Other clinical parameters, biochemical (glucose and lipid profile) and inflammatory, were found significantly decreased after surgery (Table 2). Correlation analysis with

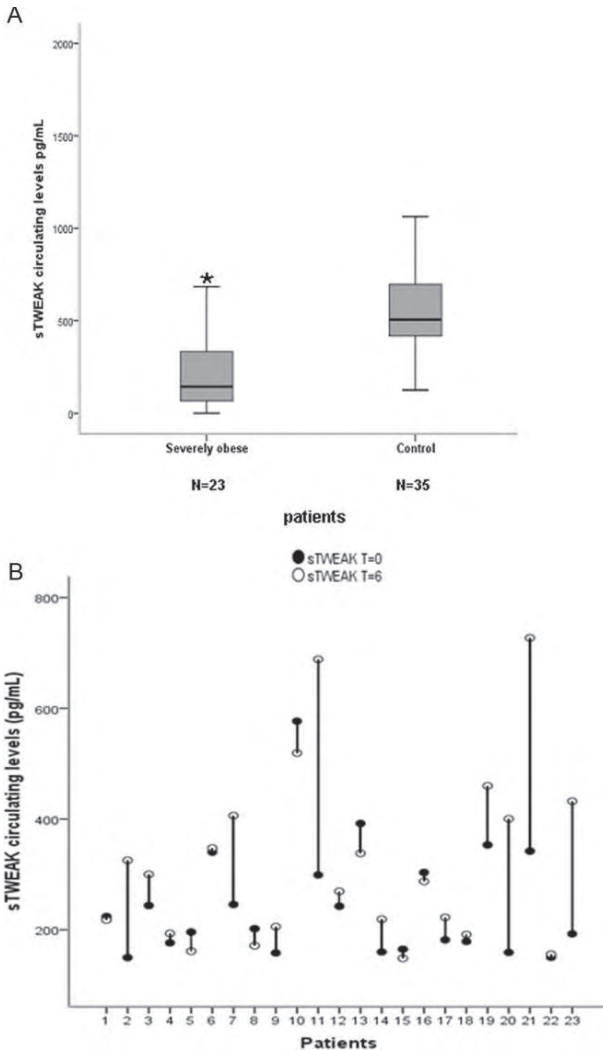


Figure 1. sTWEAK serum concentrations are decreased in severely obese subjects and rise after bariatric surgery. A, sTWEAK circulating serum levels are reduced in severely obese compared with control subjects (cohort 1). Each box shows the median, quartiles, and extreme. *, $P < .003$. B, Individual sTWEAK levels of cohort 2 patients before and 6 months after surgery.

all studied variables at T = 0 and T = 6 showed that sTWEAK at T = 0 was negatively related to CRP at T = 6 ($r = -0.537$, $P = .026$), and sTWEAK at T = 6 significantly correlated with FFAs at T = 6 ($r = -0.499$, $P = .025$). In a bivariate correlation analysis, the percentage of change of sTWEAK was the only variable that signifi-

cantly related with the percentage of change of FFA ($r = -0.535$, $P = .018$). Then we performed a paired t test to check whether FFA levels change significantly after surgery. Despite a clear trend to be lower, the differences were not statistically significant ($P = .386$). Finally, to test whether changes in FFAs were influencing sTWEAK changes, we used the mixed linear model, and we found that FFAs modulate the expression of sTWEAK ($P = .021$), meaning that an increase of 1 unit (1 mM) of FFAs decreases sTWEAK by -202.994 pg/mL [95% confidence interval (CI) $(-373.167; -32.820)$].

Bivariate correlation analysis grouping subjects from cohorts 1 and 2 at T = 0 ($n = 81$) showed that circulating sTWEAK correlates negatively with HOMA-IR ($r = -0.286$, $P = .025$), glucose ($r = -0.306$, $P = .013$), body mass index (BMI) ($r = -0.399$; $P = .001$), cholesterol ($r = -0.282$, $P = .025$), and triglycerides ($r = -0.255$, $P = .046$) and positively with high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol ($r = 0.299$, $P = .018$). To evaluate the contribution of each variable in determining the sTWEAK circulating levels, we constructed a multiple regression model with sTWEAK as the dependent variable, including all the above-correlated variables as independent ones, including gender and age as confounding factors. The final model indicated that the increase of 1 unit of BMI (kilograms per square meter) decreases sTWEAK by -7.73 pg/mL (95% CI $-12.2; -3.26$).

Finally, to test the influence of sTWEAK, HOMA-IR, cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol on BMI index we performed a regression analysis with BMI as the dependent variable. The result showed that BMI was predicted by HOMA-IR [B = 1.85 (CI 1.21; 2.5)] and HDL-cholesterol [B = -11.51 (95% CI $-19.6; -3.3$)]. The model had an adjusted R^2 coefficient of 0.478.

mTWEAK is predominantly expressed in the SVF and Fn14 in the isolated adipocytes obtained from SAT of severely obese patients

When we determined the protein expression of TWEAK isoforms and Fn14 in the SAT depot of control and severely obese patients, we observed that the expression of mTWEAK and Fn14 was higher in severely obese than in controls, whereas the expression of sTWEAK was undetectable in both groups (Figure 2A). Additionally, as already described, TNF α mRNA levels were up-regulated in the SAT samples of severely obese subjects, confirming the existing local inflammatory background in these patients (Supplemental Figure 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>) (26).

When we analyzed isolated adipocytes and SVF from SAT of severely obese and control subjects, we observed that mTWEAK and Fn14 protein were slightly overexpressed in SVF from severely obese subjects, and, in the adipocyte fraction of these subjects, the Fn14 receptor protein expression was also significantly elevated (Figure 2, B and C).

mTWEAK is overexpressed in M2a but not in M2c, M1, or unpolarized M0 monocyte-derived macrophages

We addressed the question of whether M1, M2a, or M2c macrophage types express TWEAK because there was no information regarding this issue, and these macrophage types have been described in the obese setting (16). We first determined TWEAK expression at the mRNA and protein level in THP-1 polarized macrophages to M1, M2a, and M2c. We observed that the M1 type had significantly up-regulated expression of *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-6*, *MCP-1*, and *TNF α* when compared with the unpolarized M0 type; in the M2a macrophage, *IL-10* and *CD206* were significantly up-regulated, whereas M2c showed a similar profile to M0, with a slightly significant up-regulation of TNF α . Interestingly, TWEAK mRNA was markedly up-regulated only in the M2a type (Figure 3A). To rule out that this finding is not cell type restricted, we also obtained M1, M2a and M2c type human monocyte-derived macrophages, and we observed that *IL-6* mRNA was overexpressed in the M1 type, whereas *CD206* was overexpressed in the M2a type (Figure 3C). Both M1 and M2a expressed similar mRNA levels of TWEAK (Figure 3C).

At the protein level, we showed an overexpression of mTWEAK only in the M2a type, in both THP-1 polarized macrophages, and human monocyte-derived macrophages (Figure, 3B and D). Very low intracellular levels of sTWEAK were detected in each macrophage subtype (Figure 3, B and D).

It is well known that some cytokines may help to polarize macrophages toward M1 and M2 types (12); we then checked whether sTWEAK treatment could have an effect on macrophage polarization. When sTWEAK was added to the polarization treatments of THP-1 cells, no polarizing effect was observed because the mRNA expression profile of the selected cytokines remained the same (Supplemental Figure 2).

sTWEAK reduces TNF α induction of IL-6 and IL-8 cytokine in primary cultures of human adipocytes

A down-regulation of the TNF α inflammatory effects by sTWEAK have been described in different cell types in the setting of autoimmune and chronic inflammatory diseases (19–21). We then explored whether sTWEAK might also interfere with TNF α proinflammatory effects in adipocytes because the involvement of TNF α in the inflammatory events that take place in obesity is well established (27). For this purpose we analyzed human primary cultured adipocytes using a previously described experimental procedure, in which cells pretreated with sTWEAK or left untreated were further challenged with TNF α (19). When human primary cultured adipocyte cells were pretreated with sTWEAK, we observed a significant reduction ($P < .005$) in the TNF α -induced IL-6 and IL-8 mRNA and protein expression profile (Figure 4, A and B). No changes were observed for adiponectin gene or protein expression (Figure 4, A and B) or for *PPAR γ* gene expression (Figure 4A).

Adipocytes remained greater than 90% viable at the end of the different treatments (data not shown).

sTWEAK inhibits TNF α cellular signaling in primary cultures of human adipocytes

To explore a possible inhibition of the TNF α inflammatory cascade by sTWEAK, we analyzed the activation status of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and MAPK signaling pathways, well-known mediators of TNF α signaling in adipocytes (27). For this purpose, sTWEAK pretreated primary cultured adipocytes were further challenged with TNF α for 5 seconds, 15 seconds, 30 seconds, 2 hours, and 8 hours. Pretreatment of adipocytes with sTWEAK lowered the activity of NF- κ B by significantly reducing I κ B α phosphorylation at 5 seconds, which was followed, as expected, by a reduction in total I κ B α . Regarding MAPK signaling cascades, we observed that sTWEAK pretreatment significantly reduced the activation of JNK at 10 seconds and 15 seconds, and ERK1/2 protein kinase at 5 and 10 seconds, whereas p38 phosphorylation was only moderately reduced but did not reach significance (Figure 5).

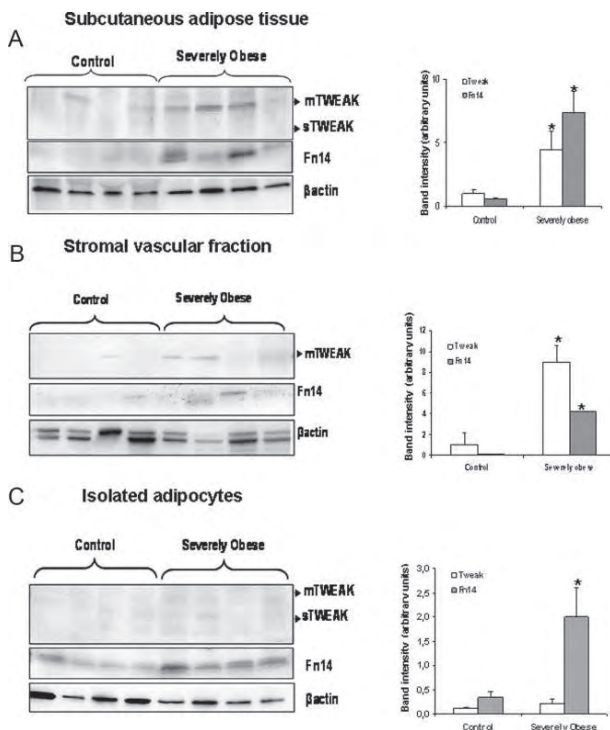


Figure 2. mTWEAK protein expression was increased in the SAT and SVF of severely obese subjects, whereas FN14 was up-regulated in isolated adipocytes. Abdominal SAT was obtained from 4 severely obese patients (4 women, aged 45.5 ± 9.7 years; BMI 59.1 ± 4.4 kg/m²) and from 4 control subjects (4 women, aged 67.7 ± 14.2 years; BMI 24 ± 0.9 kg/m²); adipocytes (ADI) and SVF were isolated. Fifty micrograms per lane of total protein extract were analyzed by Western blot for both TWEAK isoforms (m/sTWEAK) and Fn14. SAT (A) SVF (B) fractions are shown as are isolated adipocytes (C). Immunoblot and densitometric analyses normalized to β -actin levels are shown. Data are expressed as means \pm SE. *, $P < .05$.

Discussion

In the present study, we report, for the first time, that sTWEAK circulating levels are significantly decreased in severely obese patients compared with a control group. On the other hand, sTWEAK levels rise after bariatric surgery in 69% of patients. The observation of lower levels of sTWEAK in severely obese subjects is in agreement with decreased sTWEAK circulating levels found in patients with other chronic inflammatory conditions such as type 2 and type 1 diabetes, heart failure, or atherosclerosis, all of which are associated with an increased cardiovascular risk (3, 7, 28, 29).

The improvement in the metabolic and inflammatory profile after massive weight loss leads to a recovery of the circulating levels of antiinflammatory molecules; such is

the case of adiponectin. Because we observed that sTWEAK levels also rise after surgery, this may suggest that sTWEAK could play an antiinflammatory role. However, to confirm this association, we are aware that a larger sample size will be necessary. Interestingly, we also found that FFA modulates the expression of sTWEAK, which datum may indicate that lipotoxicity could be an important factor that may be regulating sTWEAK levels.

There is no clear explanation for decreased sTWEAK levels in severely obese patients. In general, the mechanisms leading to reduced levels of sTWEAK in diseases associated with cardiovascular risk are not known. In the case of severe obesity, we found that the main determinant of the sTWEAK circulating levels was BMI in an inverse-dependent manner. However, the low levels of mRNA of TWEAK expression detected in subcutaneous and visceral adipose tissue (5) suggest that the contribution of adipose tissue to sTWEAK levels should be minor. Thereafter the circulating sTWEAK levels may be decreased in severe obesity, possibly as a consequence of the metabolic derangement of other tissues such as vasculature and skeletal muscle, which are both involved in the development of obese comorbidities, and in which TWEAK expressed at higher levels has been found (2).

Many cytokines of the TNF family exist in the form of transmembrane proteins and, after proteolytic cleavage, are secreted as soluble form. Typically both forms activate their receptors efficiently, however, sometimes with a different intensity (30–32). In the case of TWEAK, mTWEAK induces a superior response than sTWEAK in vitro (33).

In this study, we have analyzed the expression of TWEAK protein isoforms in SAT in detail by isolating adipocytes from their SVF cells. Interestingly, adipocytes show negligible m/sTWEAK expression levels but a high expression of their receptor Fn14, whereas the SVF cells express mTWEAK only. Because macrophages are an important component of the SVF cells, this finding may point

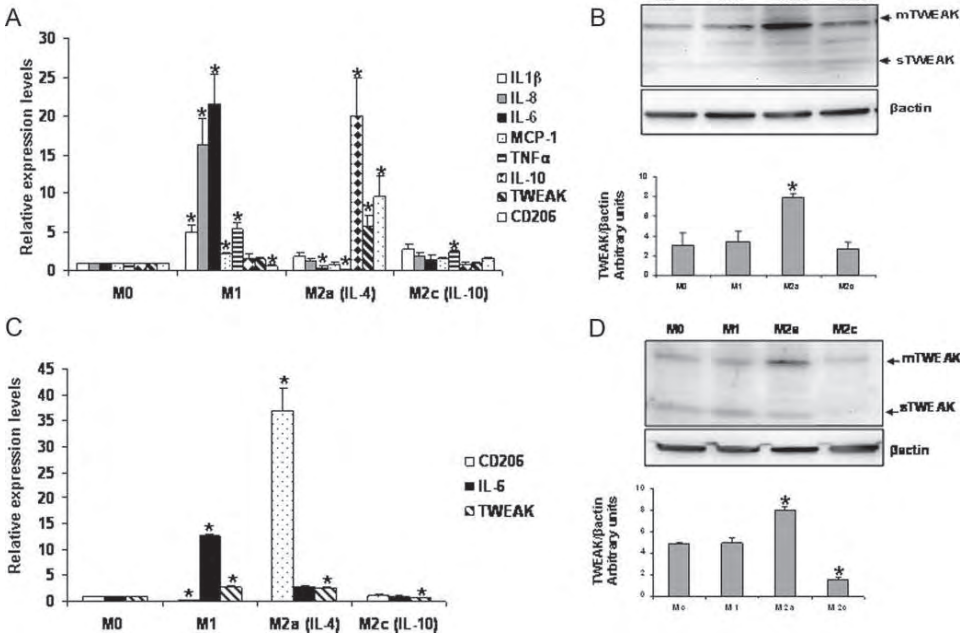


Figure 3. Overexpression of mTWEAK in M2a polarized THP-1 and human monocyte-derived macrophages. THP-1 polarized to macrophages. A, Inflammatory mRNA profile of M0, M1, and M2 (a and c) polarized cells. To obtain the M0 and M1 types, cells were treated with 100 mM PMA in complete RPMI 1640 medium for 3 days, followed by 3 days without PMA for M0 and with 100 ng/mL lipopolysaccharide for M1. To obtain M2a and M2c macrophage phenotype, cells were treated with 100 mM PMA with the addition of 10 ng/mL IL-4 for M2a or IL-10 for M2c in complete medium. Total RNA was isolated and analyzed by quantitative RT-PCR for the cytokines: *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-6*, *MCP-1*, *TNF α* , *IL-10*, and *TWEAK*. (mean \pm SE of 5 independent experiments). *, $P < .05$ with respect to M0. B, Western blot analysis of TWEAK isoforms (mTWEAK and sTWEAK) in the 4 polarized types: M0, M1, and M2 (a and c). Protein extracts (20 μ g/lane) were resolved by SDS-PAGE analyzed by Western blot. Representative immunoblot of 4 independent experiments and densitometry analysis are shown. *, $P < .05$ with respect to M0, M1, and M2c. Human monocyte-derived macrophages are shown. C, Monocytes from peripheral blood of 4 healthy donors were pooled and cultured 5–6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 1000 U/mL IFN γ , 10 ng/mL IL-4, and 10 ng/mL IL-10, respectively, for 5–6 days. Real-time PCR confirming human macrophage polarization was performed for M1 and M2 (a and c). *, $P < .05$ with respect to M0. D, Western blot analysis of TWEAK isoforms (mTWEAK and sTWEAK) in the 4 polarized types: M0, M1, and M2 (a and c). Protein extracts (20 μ g/lane) were resolved by SDS-PAGE analyzed by Western blot. Representative immunoblot of 2 independent experiments and densitometry analysis are shown. *, $P < .05$ with respect to M0 and M1.

to macrophages as one of the cells that expresses this cytokine in the adipose tissue of severely obese subjects. This observation could be of importance because in severe obesity, this tissue is highly infiltrated with the macrophages (up to 40%) (10).

In obesity, infiltrating macrophages have been described to fit within the M1 and M2 (a and c) type, and the M2 type has been described as the most abundant within the obese adipose tissue (12–17). It has been reported that macrophages can express mTWEAK on their surface (23), but to date, there has been no evidence in favor of a specific subtype. Here we report that M2a human monocyte-derived macrophages express higher levels of mTWEAK when compared with M2c, M1, and M0 type. Because the

phenotypes of macrophages that express TWEAK are not described in human adipose tissue, the impact of our findings needs to be corroborated in isolated macrophages from severely obese subjects.

It is well known that some cytokines may help to polarize macrophages toward M1 and M2 types (12). In this sense, we found that in our experimental conditions, sTWEAK has no effect over the different macrophage activation states, indicating that the presence of sTWEAK may not affect macrophage phenotype.

In addition, we have shown that treatment of human primary cultured adipocytes with sTWEAK significantly reduced the production of TNF α -induced IL-6, and IL-8 by down-regulating NF- κ B and MAPK pathways with no

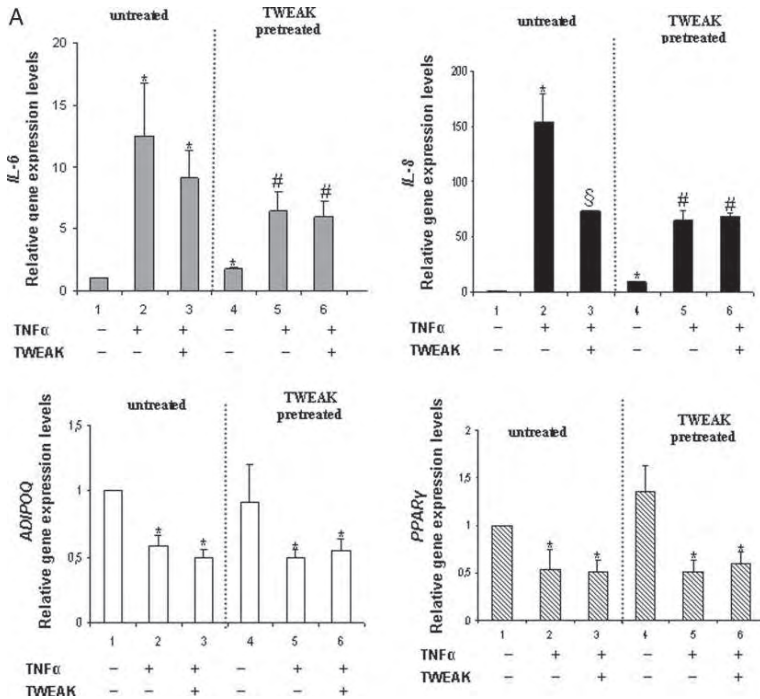


Figure 4. sTWEAK reduces TNF α -induced cytokine production in human primary cultured adipocytes. A, sTWEAK inhibits TNF α -induced IL-6 and IL-8 mRNA expression in human primary cultured adipocytes but does not alter ADIPOQ mRNA expression. Cells untreated or pretreated with sTWEAK (see *Materials and Methods*) were left unstimulated (lanes 1 and 4), treated with 50 ng/mL TNF α (lanes 2 and 5), or treated with 100 ng/mL sTWEAK plus 50 ng/mL TNF α (lanes 3 and 6). *, $P < .05$ compared with untreated control (lane 1); §, #, $P < .05$ compared with treated TNF α (lane 2) (mean \pm SE of 3 independent experiments). B, sTWEAK reduces TNF α -induced IL-6 or IL-8 protein secretion without affecting adiponectin secretion. Untreated or sTWEAK-pretreated primary cultured adipocytes were stimulated with 50 ng/mL TNF α . Culture media concentrations of IL-6, IL-8, and adiponectin were measured by ELISA. Data represent the percentage of cytokine secretion from untreated vs TWEAK pretreated (mean \pm SE of 3 independent experiments). *, $P < .05$.

apparent changes in the adiponectin gene or protein expression. Although it is known that NF- κ B regulates the expression of IL-6 and IL-8 by directly binding to their promoter regions (34, 35), it does not regulate adiponectin expression directly. Adiponectin is in part regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor- γ (36), which does not undergo any change in its expression either after sTWEAK pretreatment. This inhibitory/modulatory effect of sTWEAK on TNF α -activated cells is in line with what occurs in other pathologies such as rheumatoid arthritis (20), ischemic stroke (21), and in several tumor epithelial cells (19), suggesting a broader general competitive behavior of sTWEAK and TNF α . Both sTWEAK and TNF α cytokines coexist within the adipose tissue environment, and both have a proinflammatory potential, although at the same doses, TNF α has a much more potent and rapid inflammatory upshot than sTWEAK (37). In

this sense, the low circulating levels of sTWEAK found in obese subjects may contribute to amplify the deleterious effect of TNF α in systemic and local specific tissues.

In conclusion, our observation of lower sTWEAK circulating levels in severely obese subjects may favor the proinflammatory activity elicited by TNF α . Additionally, in human adipocytes, the modulator effect by sTWEAK over TNF α cytokine production broadens our knowledge of TNF α inflammatory response and could impinge on a better understanding of its adverse metabolic effects in obesity.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the collaboration of Dr Enric Caubert (Department of Surgery, Hospital St Pau i Sta Tecla, Tarragona,

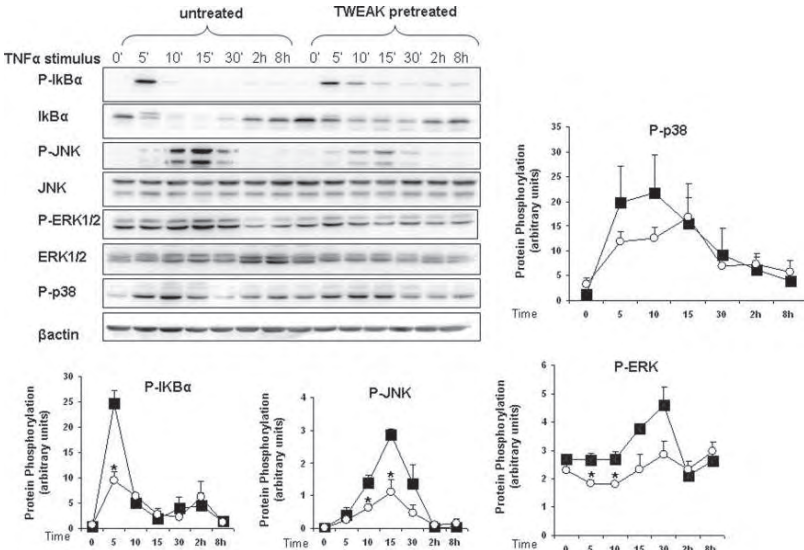


Figure 5. sTWEAK inhibits TNF α cellular signaling in human primary cultured adipocytes. Human primary cultured adipocytes pretreated with sTWEAK or left untreated were stimulated with 50 ng/mL TNF α , and cells were collected at different time points. Protein extracts (20 μ g/lane) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. The activation of the NF- κ B and MAPK pathways was analyzed using antiphospho- and antitotal I κ B α , SAPK/JNK, ERK1/2, and p38 antibodies. Representative immunoblot of 3 independent experiments and densitometric analysis are shown (■, untreated; ○, sTWEAK pretreated). *, $P < .05$ with respect to untreated.

Spain). We thank the BioBanc of HUJ23 for providing human samples and Pilar Hernández (Statistics, Epidemiology, and Bioinformatics Unit, IISPV of Tarragona, Tarragona, Spain).

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Matilde R. Chacón, Research Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, c/o Dr Mallafré Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: mrodriguez.hj23.ics@gencat.cat.

This work was supported by projects from the Fondo de Investigación Sanitaria: Grant PI 11/00049 (to M.R.CH.), Grant PI08/0733 (to M.R.C.), Grant SAF2012-36186 (to S.F.-V.) and from the Project Consolider Ingenio Grant CSD-2010-00065 (to A.G.-E.). S.F.-V. acknowledges support from the “Miguel Servet” tenure track program (Grant CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria. All support from the Fondo de Investigación Sanitaria are cofinanced by the European Regional Development Fund. A.G.-E., M.R.C., and E.G.-F. are supported by the Research Stabilization Programme of the Instituto de Salud Carlos III. M.R.C. and A.G.-E. are also cofinanced by Institut Català de Salut in Catalonia (Spain). M.M.R. and L.G.-S. are financed by a fellowship “Juan de la Cierva” from the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant JCI-2011-11488 and JCI-2009-04086, respectively). E.-M.-M. is supported by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:411–425.
- Chicheportriche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-ZeKri N, Izui S. Downregulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:162.e5.
- Blanco-Colio LM, Martí n-Ventura JL, Muñoz-García B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:916–922.
- Chacón MR, Richart C, Gómez JM, et al. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine.* 2006;33:129–137.
- Vendrell J, Maymó-Masip E, Tinahones F, et al. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a pro-inflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:2983–2992.
- Brown SA, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- κ B pathway. *J Biol Chem.* 2010;285:17432–17441.
- Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2008;199:440–444.
- Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, et al. Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:110–118.

9. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunction linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:367–377.
10. Cancellor R, Henegar C, Viguier N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemo-attractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 2005;54:2277–2286.
11. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007;112:61–67 (review).
12. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453–461 (review).
13. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23–35 (review).
14. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation.* 2008;117:806–815.
15. Spencer M, Unal R, Zhu B, et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E1990–E1998.
16. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299:E1016–E1027.
17. Fuentes L, Wouters K, Hannou SA, et al. Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia.* 2011;54:3150–3156.
18. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:5139.
19. Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits pro-inflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ.* 2009;16:1445–1459.
20. Yamana J, Morand EF, Manabu T, et al. Inhibition of TNF-induced IL-6 by the TWEAK-Fn14 interaction in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Cell Immunol.* 2012;272:293–298.
21. Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M. The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 2012;9:45.
22. Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, et al. Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology.* 2009;125:5373–5383.
23. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell.* 2005;123:931–944.
24. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:804–818.
25. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.* New York: Chapman and Hall; 1991.
26. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409–2415.
27. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008;582:117–131.
28. Llauro G, González-Clemente JM, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One.* 2012;7:e43919.
29. Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N. Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:1050–1056.
30. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995;83:793–802.
31. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with down-regulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205–1213.
32. Müller N, Wyzgol A, Münkler S, Pfizenmaier K, Wajant H. Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J.* 2008;275:2296–2304.
33. Roos C, Wicovsky A, Müller N, et al. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF- κ B pathway. *J Immunol.* 2010;185:1593–1605.
34. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990;10:2327–2334.
35. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001;50:2094–2099.
36. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72:847–855.
37. Fick A, Lang I, Schäfer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, Wajant H. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem.* 2011;287:484–495.

Critical Review

Role of Energy- and Nutrient-sensing Kinases AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in Adipocyte Differentiation

Sonia Fernández-Veledo^{1,2*}
Ana Vázquez-Carballo³
Rocio Vila-Bedmar^{4,5}
Victoria Ceperuelo-
Mallafra^{6,7}
Joan Vendrell^{1,2}

¹Research Unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Complutense University, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

⁴Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Madrid, Spain

⁵Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Madrid, Spain

⁶Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, del Hospital Virgen de la Victoria (Fundación IMABIS), Málaga, Spain

⁷CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract

Recent advances have demonstrated that the adipose tissue plays a central role in regulating overall energy balance. Obesity results from a chronic deregulation of energy balance, with energy intake exceeding energy expenditure. Recently, new mechanisms that control the obesity phenotype such as the equilibrium between white and brown adipose tissue function has been identified. In this context, it is becoming increasingly clear that in addition to cellular growth, AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) also regulate lipid metabolism and adipogenesis.

Here, we review recent advances in the understanding of the molecular mechanisms involved in white and brown differentiation programs focusing on AMPK and mTOR signaling pathways, which may play differential roles in white adipose tissue and brown adipose tissue development. In view of the worldwide epidemic of obesity and its associated metabolic disorders such as insulin resistance and type 2 diabetes, targeting these kinases may represent a potential approach for reducing adiposity and improving obesity-related diseases. © 2013 IUBMB Life, 00(00):000–000, 2013.

Keywords: AMPK; mTOR; adipogenesis; white adipose tissue; brown adipose tissue; obesity

Abbreviations: ADSC, adipose-derived stem cells; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; BAT, brown adipose tissue; CaM, calmodulin; CaMKK2, Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase kinase 2; C/EBP, CCAAT enhancer-binding proteins; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; FABP4, fatty acid binding protein; LKB1, liver kinase B1; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MSC, mesenchymal stem cells; mTOR, mammalian target of rapamycin; mTORC1, mTOR complex 1; mTORC2, mTOR complex 2; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- α coactivator 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; p70S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase; TSC, tuberous sclerosis complex; TZDs, thiazolidinediones; T2D, type 2 diabetes; UCP, uncoupling protein; WAT, white adipose tissue

© 2013 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Volume 000, Number 000, Month 2013, Pages 000–000

*Address for correspondence to: Sonia Fernández-Veledo, Research Unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, c/o Dr. Mallafra Guasch, 4, Tarragona 43007, Spain. Tel.: +34-977-29-58-00. Fax: +34-977-29-58-23. E-mail: sonia.fernandezveledo@gmail.com or sonia.fernandez@iispv.cat.

Received 15 January 2013; accepted 14 March 2013

DOI: 10.1002/iub.1170

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com)



Introduction

Adipose tissue plays an active role in energy balance because it is not only a lipid storing and mobilizing organ (white fat) but also consists of functionally specialized tissue able to produce heat (brown fat). Animals have highly integrated systems to regulate the proper balance between energy expenditure and storage capacity. However, nowadays there is excessive consumption of energy-rich foods as well as sedentary behavior, which have led to an increase in the prevalence of obesity and associated metabolic disorders such as type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases. White and brown adipocytes are organized to form a large organ with discrete anatomy, specific vascular and nerve supplies, and high physiological plasticity. Adipose tissues can thus be considered a multidepot organ that contributes to many of the crucial survival needs such as thermogenesis, immune responses, and fuel for metabolism (1). In this context, our understanding of adipose tissue biology and the role of adipocytes in obesity-related diseases such as T2D has benefited greatly from the study of the molecular mechanisms controlling the differentiation process of white and brown adipocytes. Although adipogenesis is considered an active area of research and last years have brought to light some examples of potential factors differentially regulating white *versus* brown cell differentiation, the developmental relationship between white and brown adipose tissue (BAT) is far from clear. Emerging data reveal a divergence between white and brown precursor cells in early development but also a great plasticity of adipose tissue where several conditions associated with enhanced energy expenditure correlate with the appearance of a brown phenotype dispersed within white adipose tissue (WAT). It is well known that the complex protein network that senses and precisely reacts to environmental changes is thus mainly regulated by rapid and reversible post-translational modifications such as phosphorylation. This review focuses on the mechanisms by which preadipocytes differentiate into adipocytes and provide a functional and regulatory overview of the serine/threonine protein kinases AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR), two interconnected major junctions which have been revealed to play key roles not only in growth control and cell proliferation but also in metabolism. We revise the impact of these two opposed pathways regulating catabolic *versus* anabolic routes in the control of white and brown adipogenesis processes.

The Adipose Organ

The adipose organ consists of several depots located at various anatomical sites that have different physiological functions and pathophysiological roles. Advances in the last two decades in our understanding of adipocyte biology have clari-

fied their role as a key regulator of both energy balance and intermediary metabolism. WAT has long been recognized as the main site for the storage of energy excess derived from food intake (2). Nevertheless, adipose tissue is not only an inert energy-storage depot, but an endocrine organ releasing a wide range of adipokines, which can regulate immune responses, blood pressure, angiogenesis, hemostasis, bone mass, and thyroid and reproductive function (3). Moreover, it has also been described that adipose tissue secretes lipid factors (lipokines) such as C16:1n7-palmitoleate, to communicate with distant organs and regulate systemic metabolic homeostasis (4). Thus, owing to its endocrine function and its classic role as lipid storage, the presence of functional adipose tissue in proper proportion to body size is essential to control whole-body metabolism. In contrast, BAT is specialized primarily for cold-induced nonshivering thermogenesis. The unique thermogenic capacity of BAT results from the expression of the uncoupling protein (UCP)1, which is located in the mitochondrial inner membrane. This protein allows the consumption of the energy derived from fatty acid (FA) oxidation for the generation of heat. Until quite recently, BAT was thought to be of metabolic importance only in small mammals and infant humans. However, recent studies using positron-emission tomography scanning suggest that adult humans have several discrete areas of metabolically active BAT (5,6). In this regard, BAT may be far more relevant in human metabolism than was previously appreciated, and loss of BAT function is linked to obesity and metabolic disease (7). Most fat depots can be characterized as either brown or white although some brown fat cells, which have been recently named “brite adipocytes” (“brown-in-white”) (8), can also be found dispersed through white fat depots both in rodents and in humans, forming a multidepot organ with plastic properties (reviewed in ref. (9)).

Fat tissues contain several cell types, including stromal-vascular cells such as fibroblasts, macrophages, smooth muscle cells, pericytes, endothelial cells, and adipogenic progenitor cells. However, mature adipocytes constitute the majority of cells in both WAT and BAT. As adipose tissue plays a central role in whole-body energy metabolism, defects in adipose function can lead to severe metabolic abnormalities. Obesity, which has deleterious effects on metabolic balance and is an important risk factor for the development of insulin resistance and T2D, is characterized by increased adipose tissue mass that results from both increased fat-cell number (hyperplasia) and increased fat-cell size (hypertrophy) (10,11). The number of adipocytes present in an organism is determined to a large degree by the adipocyte differentiation process, which generates mature adipocytes from fibroblast-like preadipocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) (12). The knowledge of molecular pathways involved in adipogenic commitment and terminal differentiation as well as how these two stages of adipogenesis is physiologically integrated during development and is essential for the progress of future pharmacological interventions designed to prevent obesity.

Adipogenesis

Adipocytes are derived from MSCs, which are a self-renewing population of multipotent cells present in bone marrow and many other adult tissues that can differentiate into multiple lineage-specific cells that form bone, fat, cartilage, muscle, and tendon (13). When MSCs are appropriately stimulated, they undergo a multistep process of commitment in which the progenitor cells become restricted to the adipocyte lineage. Recruitment to this lineage gives rise to preadipocytes, which, when induced, undergo multiple rounds of mitosis (mitotic clonal expansion) and then differentiate into adipocytes. Pluripotent stem cell lines such as CH310T1/2, murine preadipocyte cells (*i.e.*, 3T3-L1, 3T3-F442A) as well as MSCs have been indispensable in identifying/characterizing the steps in the commitment and differentiation programs. Whether adipogenesis occurs in the adult adipose tissue remains controversial. Although white adipocyte numbers increase through puberty but are relatively steady in the mature fat pad, within human adult WAT, adipocytes seem to undergo an annual turnover of approximately 10% (10). In addition, human studies correlating fat mass with cell number have yielded conflicting results (10,14,15). Thus, further work must be carried out to conclude whether increased adipogenesis plays a crucial role in the development of obesity in humans.

Historically, white and brown adipocytes were thought to derive from the same precursor cell. However, recent studies have revealed that BAT is more closely related to skeletal muscle than WAT, as both muscle and BAT have progenitors that express the early muscle marker myogenic factor 5 (MYF5), contrasting to WAT (16). These surprising findings indicate that there is a divergence between white and brown precursor cells in early development and it has been reported that transcription factors such as PRMD16 may control brown fat determination (16). In addition, upon prolonged cold exposure or in response to β -adrenergic signaling, WAT can display characteristics of BAT, such as expression of UCP1. The brown-like adipocytes within WAT are developmentally distinct from brown adipocytes found in BAT (16); thus, the plasticity of WAT in response to these stimuli may be owing to transdifferentiation of mature white adipocytes into brown adipocytes (17) or the result of *de novo* adipocyte formation.

Nevertheless, the process of differentiating into brown or white adipocytes appears to employ a similar canonical transcriptional pattern. Along these lines, several nuclear factors regulate some processes that are common to both cell types such as lipogenesis. Once the preadipocyte population has been defined (commitment), hormonal stimulation initiates a transcriptional regulatory cascade that results in a gene expression profile specific for adipocyte functions. Several critical transcription factors and the crosstalk among them have been well studied, including peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and CCAAT enhancer-binding proteins (C/EBPs) (18). Exogenous adipogenic stimuli induce the expression of C/EBP β and δ in preadipocytes rapidly and transiently,

which in turn mediate the induction of PPAR γ and C/EBP α expression. Once activated upon initiation of differentiation, both transcription factors form a positive feedback loop to reinforce and maintain each other's expression. This cooperative interplay activates the essential adipogenic gene expression required for adipocyte functions and maintains the terminally differentiated state (18). Although C/EBP α cannot promote adipogenesis in the absence of PPAR γ , PPAR γ is both necessary and sufficient for adipogenesis. However, PPAR γ is only one of the many key modulators of adiposity. More specifically, some coactivators such as peroxisome proliferator-activated receptor- α coactivator 1 (PGC-1 α) have been described as characteristic of BAT in opposition to WAT; and other nuclear receptors including PPAR δ , liver X receptors or estrogen-related receptors have been proposed as playing a potential role in mediating brown fat differentiation (reviewed in ref. (19)).

Adipogenesis is also influenced by a variety of extrinsic factors and intracellular signaling pathways. In this regard, upstream signals regulating the expression and activation of the transcriptional events during adipocyte differentiation are far from clear. Insulin is a potent inducer of adipogenesis, and differentiation of white and brown adipocytes requires many components of the insulin signaling pathways. The phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway appears to be required for the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and several studies have also revealed an important role for the insulin/IGF-1 system in BAT development (19). In contrast, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways differentially regulate adipogenesis. Although ERK1/2 pathways display both positive and negative effects through the process, the role of p38MAPK seems to be related to UCP1 expression in brown adipocytes (20), but is still controversial in white (reviewed in ref. (21)). In addition, adipogenesis is regulated by calcium as increases of intracellular Ca²⁺ in preadipocytes during the early phase of differentiation can inhibit adipogenesis (22). Although the mechanism by which Ca²⁺ represses adipogenesis is not fully understood, the calmodulin (CaM) kinase cascade through Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) activation seems to play an important role (see below).

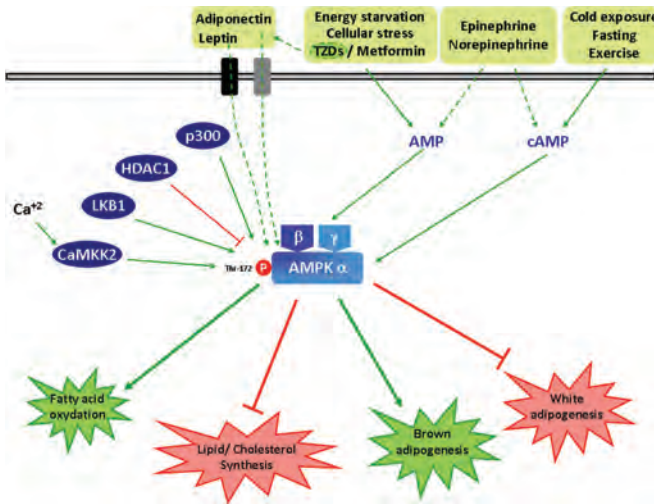
The Energy-Sensing Kinase AMPK and Adipose Tissue

AMPK is a heterotrimeric serine/threonine kinase consisting of one catalytic (α) and two regulatory (β and γ) subunits. Multiple isoforms of each mammalian subunit exist (α 1-2, β 1-2, γ 1-3) and are differentially expressed in various tissues enabling the potential formation of 12 heterotrimeric combinations that are thought to exhibit differences in subcellular localization and tissue-specific signaling functions (23). In response to energy starvation or cellular stress, AMPK is allosterically activated by AMP through its binding to AMPK γ regulatory subunit, which also promotes phosphorylation by the upstream kinases

such as liver kinase B1 (LKB1) and CaMKK2, and protects the enzyme against dephosphorylation (23). Therefore, AMPK activation stimulates pathways, leading to ATP production such as FA oxidation, and blocking anabolic processes that consume ATP such as lipid and cholesterol synthesis (Fig. 1). Regarding glucose metabolism, it has been described that 3T3-L1 adipocytes treated with AMPK activators showed enhanced GLUT4 translocation (24). Similarly, in human adipocytes TNF- α increases basal glucose uptake and GLUT4 in the plasma membrane by a mechanism dependent on AMPK activation (25). However, these AMPK activators seem to inhibit insulin-stimulated glucose uptake (26). It has been proposed that in contrast to skeletal muscle, in which AMPK stimulation might promote glucose transport to provide ATP as a fuel in response to contraction, AMPK stimulation might inhibit insulin-stimulated glucose transport in adipocytes, inhibiting triacylglycerol synthesis to conserve ATP. AKT substrate of 160 kDa (AS160) was revealed as a mediator of both insulin- and contraction-

stimulated glucose uptake. However, their paralog TBC1D1 expression is higher in skeletal muscle compared with adipose tissue and it has been suggested that AMPK may play a greater role in phosphorylation of TBC1D1 than for AS160 (27).

Overall, AMPK activation leads to energy preservation for cell survival at the expense of growth and proliferation. The AMP:ATP ratio within the cell is critical in regulating AMPK activity. Recent studies have revealed that AMPK activity is also controlled by histone-modifying proteins such as the acetyltransferases p300 and deacetylase HDAC1, which antagonize each other through modification of the side chains of lysine residues in histone proteins (Fig. 1). Emerging data reveal that deacetylation of AMPK enhances physical interaction with the upstream kinase LKB1, leading to AMPK phosphorylation and activation (28). However, further studies are necessary to address the functional significance of nuclear acetylation/deacetylation and cytoplasmic phosphorylation with regard to


FIG 1

AMPK activation leads to energy preservation for cell survival at the expense of growth and proliferation. AMPK is allosterically activated by AMP in response to energy-poor conditions such as energy starvation or cellular stress through its binding to AMPK_γ regulatory subunit, which also promotes phosphorylation by the upstream kinases LKB1 and CaMKK2. AMPK activity is also controlled by the histone-modifying proteins acetyltransferases p300 (+) and deacetylase HDAC1 (-). Fasting, exercise, and cold exposure have been shown to activate AMPK through increasing cAMP levels in a β -adrenergic-dependent mechanism. AMPK activation by catecholamines such as epinephrine in adipose tissue seems to be secondary to the effects on lipolysis. The mechanism by which the adipokines leptin and adiponectin induce AMPK activation is not known. Antidiabetic drugs such as metformin and TZDs have also shown to induce AMPK activation in adipocytes. All these AMPK activation pathways lead to ATP production by stimulating catabolic processes such as FA oxidation, as well as inhibiting anabolic pathways such as lipid/cholesterol synthesis. White and brown fat development is differentially regulated by AMPK. Thus, white adipogenesis is negatively controlled by AMPK but this kinase is required for brown adipocyte differentiation, suggesting that this kinase differentially regulate white and brown fat development. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.wileyonlinelibrary.com).]

the regulation of short- and long-term metabolic effects of AMPK activation in adipocytes.

The important role of AMPK in regulating adipocyte lipolysis, glucose uptake, and FA oxidation has been extensively reviewed (29). Nevertheless and as we discuss below, AMPK also regulates the expression of several genes involved in the control of cellular differentiation and mitochondrial function in the adipocyte. AMPK activity in BAT is higher than in liver (30), and heterotrimeric complexes containing the $\alpha 1$ catalytic subunit account for most of the activities of AMPK in adipocytes. However, some studies have revealed that both AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ could potentially play an important role in the regulation of adiposity (31,32).

Catecholamines activate AMPK both in white and in brown adipocytes. In WAT, fasting, exercise, and cold exposure have been shown to activate AMPK through increasing β -adrenergic stimulation and cAMP levels (Fig. 1) (30,32–34). Accordingly, decreasing the levels of GRK2, a kinase known to desensitize adrenergic receptors, also enhances AMPK phosphorylation, FA oxidation, and thermogenesis after acute cold exposure (35). There is a good evidence that activation of AMPK in adipocytes by cAMP-inducing agents such as epinephrine is a consequence of lipolysis and not of PKA activation (36), suggesting that AMPK activation might be caused by an increase in the AMP:ATP ratio, as consequence to the acylation of FAs. Therefore, in this context, AMPK activation appears to control the energy depletion and oxidative stress caused by lipolysis.

More recently, it has been described that the adrenergic nervous system regulates AMPK *in vivo* in an adrenergic receptor-dependent manner by modulating AMPK α but not AMPK β subunit levels (37). On the other hand, adipokines such as leptin (38) and adiponectin (39) have also been shown to induce AMPK activation in WAT. Similarly, biguanides such as metformin and thiazolidinediones (TZDs), PPAR γ agonists that have been classically used as antidiabetic drugs can also induce AMPK activity in adipocytes. Although the mechanism of AMPK activation by metformin and PPAR γ agonists seems to be dependent on the inhibition of mitochondrial respiration and the increase in intracellular AMP:ATP ratio (40), TZDs may also act on AMPK by triggering the release of adiponectin (41). However, it still remains unclear how signaling through the leptin and adiponectin receptors leads to AMPK activation (Fig. 1). Otherwise, pharmacological effects of PPAR γ agonists exerted through the modulation of AMPK activity seem to be independent of receptor activation (42).

Role of AMPK in Adipogenesis

Compatible with the role of AMPK in shutting down anabolic pathways when activated, studies from several laboratories have also revealed that AMPK negatively regulates white adipogenesis. Thus, treatment of 3T3-L1 fibroblasts with AMPK agonists such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) has been shown to inhibit cell proliferation blocking clonal expansion, an essential step for the differentiation process in murine 3T3L1 but not in human primary cells

(43,44). Similarly, hypoxic conditions biphasically activate AMPK and concomitantly block clonal expansion of preadipocytes attenuating adipocyte differentiation (45). On the other hand, AMPK activation in the early phase of differentiation inhibits PPAR γ and C/EBP α expression as well as late adipogenic markers such as fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase. Thus, it is well accepted that AMPK activity is inversely related to white adipogenesis. Recently, Lee et al. reported that inhibition of adipogenesis by AICAR-induced AMPK activation in 3T3-L1 cells is dependent on the Wnt/ β -catenin pathway. Thus, inhibition of adipogenesis by AICAR was accompanied by significantly enhanced expression and nuclear accumulation of β -catenin, and knocking down β -catenin expression by siRNA prevented the suppressive effects of AICAR on the expression of major genes involved in adipogenesis such as PPAR γ , C/EBP α , fatty acid-binding protein (FABP4), and lipoprotein lipase (46). It has been proposed that the Wnt/ β -catenin signaling pathway might maintain the undifferentiated state of preadipocytes by inhibiting adipogenic gene expression. In fact, a reciprocal relationship between β -catenin and PPAR γ has been described during adipogenesis. Thus, PPAR γ activation resulted in a decrease in β -catenin by a mechanism that involves the proteasome (47). Once adipocytes are differentiated, activation of AMPK may induce a decrease in adipocyte size through a reduced expression of proteins involved in triglyceride synthesis such as glycerol phosphate acyltransferase and acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (43). Thus, nutritional and pharmacological approaches to manipulate AMPK activity such as antiobesity therapies are of great interest and subject of recent studies. On the other hand, upstream AMPK kinases, such as CaMKK2, which have been described to regulate AMPK activity in adipocytes, are also related to white adipogenesis. In this context, CaMKK2 null mice have shown increased adiposity and larger adipocytes than wild-type mice. This effect is a consequence of AMPK inhibition as CaMKK β deletion enhances the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes, an effect that was reversed by AICAR-induced AMPK activation (48). Furthermore, it has recently been demonstrated that AMPK may also play an important role in fate cell decision of human adipose-derived stem cells (ADSCs) as a regulator between osteogenesis and adipogenesis. Thus, inhibition of AMPK reduced osteogenesis but induced adipogenesis of ADSC, even in osteogenic medium (49).

Contrary to the previous data reported on white adipocytes, a recent study carried out at our laboratory has shown that AMPK activation is required for brown adipocyte differentiation (50). Our study reveals that inhibition of AMPK induced different effects, depending on the stage of differentiation. Thus, AMPK inhibition from the beginning of the process precluded brown adipocyte differentiation, whereas in the later stages AMPK inhibition increased lipid accumulation. No significant differences in cell number were detected, suggesting that AMPK activation is necessary for brown adipogenesis but is not involved in the proliferative step of this process. In



addition, we observed that *in vivo*, AMPK activation with AICAR induced an accumulation of brown adipocytes in WAT detected by immunolocalization with anti UCP1 antibody, which partially correlated with the body weight reduction detected in response to the treatment with AICAR (50). As no differences were detected in BAT from AICAR- compared to vehicle-treated animals, we hypothesize that only brown preadipocytes or MSCs within white fat depots, and not mature cells in BAT, might be sensitive to AICAR-induced UCP1 expression. Thus, our results support the hypothesis that brown adipocyte-like cells present in WAT and the brown adipocytes constituting BAT are subjected to different control systems. Along these lines, it had been previously reported that AMPK activation induced the expression of UCP1 and mitochondrial enzymes in WAT of obese mice (51). Our studies support the hypothesis that AMPK may play a positive role in mitochondrial biogenesis and thermogenesis. The opposite effect of AMPK on brown and white adipocytes could be explained by the fact that brown adipocytes specialize in lipid catabolism rather than storage, much like oxidative skeletal muscle tissue. However, the molecular mechanisms by which AMPK is activated during brown adipocyte differentiation are currently under study. A change in energy status might be an appropriate candidate because inhibition of AMP synthesis with the adenosine kinase inhibitor iodotubercidin also precluded brown adipocyte differentiation (50). Moreover, activation of AMPK by the acquisition of thermogenic properties should not be ruled out. In this regard, the inhibition of AMPK might preclude cell energetic adaptation, and thus impairing the brown adipocyte differentiation process.

The Nutrient-Sensing Kinase mTOR and Adipose Tissue

mTOR is a conserved serine-threonine kinase that controls protein synthesis, cell size, and proliferation, according to the availability of amino acids, growth factors, nutrients, and cell energy status. Consequently, mTOR signaling pathway has been described to be involved in several cellular processes including adipogenesis and deregulated in human diseases such as obesity and T2D (reviewed in ref. (52)). mTOR is activated downstream of Akt, and in turn it promotes enhanced translation through its targets eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), and eukaryotic elongation factor 2. mTOR is the catalytic core of two distinct multiprotein complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2), that have different downstream targets and biological functions. The adaptor proteins, Raptor and Rictor, determine the substrate specificity of mTORC1 and mTORC2, respectively. mTORC1 and mTORC2 have been traditionally characterized, depending on their sensitivity to inhibition by the bacterial macrolide rapamycin: mTORC1 as the rapamycin-sensitive and mTORC2 as the insensitive complex (Fig. 2). However, this par-

adigm might not be entirely precise, as chronic rapamycin, in some cases, inhibits mTORC2 activity (53) and important mTORC1 functions seem to be resistant to inhibition by rapamycin (54). One of the most important sensors involved in the regulation of mTORC1 activity is the tuberous sclerosis complex (TSC), which is a heterodimer that comprises TSC1 (hamartin) and TSC2 (tuberin). TSC1/2 functions as a GTPase-activating protein for the small Ras-related GTPase Rheb. Although the TSC1-TSC2 complex was believed to function as a heterodimer, recently TBC1D7 has been revealed as a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1 (55). Growth factors stimulate mTORC1 through the activation of the canonical insulin and Ras signaling pathways. TSC2 phosphorylation is increased after stimulation through AKT, ERK1/2, and RSK1 (56-58), which leads to the inactivation of TSC1/2 and thus to the activation of mTORC1. Some studies, however, might suggest that the physiological requirement of Akt phosphorylation of TSC2 for mTOR activation is unclear. In this regard, PRAS40 has been revealed as a key mediator of AKT signals to mTOR but also a dominant-negative effector of mTOR over TSC-Rheb signaling. In this context, PRAS40 inhibits mTOR activity and suppresses constitutive activation of mTOR in cells lacking TSC2. Thus, AKT activation by growth factors such as insulin might activate mTORC1 in a TSC2-independent manner (59) (Fig. 2). On the other hand, mTORC2 induces basal AKT phosphorylation on Ser473 that precedes and facilitates Thr 308 phosphorylation by PDK1 (60).

Expansion of fat mass in obesity is associated with marked activation of mTOR in adipose tissue, whereas fat mass retraction owing to caloric restriction and fasting is associated with adipose tissue mTOR inhibition. Accordingly, chronic pharmacological inhibition of the mTORC1 signaling pathway is associated with a reduction in adipose tissue mass owing to both reduced adipocyte size and number (61). Downstream of mTORC1 signaling pathway, deletion of p70S6K protects against age- and diet-induced obesity, and genetic models of obesity exhibit markedly increased p70S6K activity (62). However, although there is a direct association between mTORC1 activity and adiposity, the mechanism by which mTOR modulates fat mass is far from clear. In this context, the role of mTORC1 in regulating lipid synthesis, which is required for cell growth but also adipocyte differentiation, is starting to be appreciated. In addition, the important role of mTORC1 in mitochondrial metabolism and biogenesis uncovers new signaling pathways in brown fat function and development (see below).

Role of mTor in Adipogenesis

Primarily through the use of the mTORC1-specific inhibitor rapamycin, several studies have concluded that mTORC1 activity is required for proper differentiation of preadipocyte cell lines and primary cultures. Thus, a constitutive activation of mTOR might be required for both the clonal expansion at the early stage of the process and for the execution of the adipogenic program (63,64). Rapamycin significantly reduced the expression of most adipocyte marker genes including PPAR γ ,

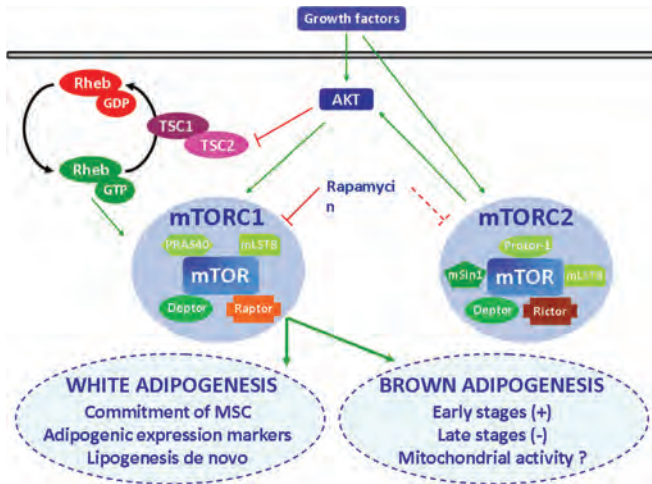


FIG 2

Schematic diagram of mTOR activation and mTORC1 functions on adipogenesis. mTOR exists in association with two distinct multiprotein complexes: mTORC1 consists of mTOR and four regulatory associated proteins (Raptor, mLST8, PRAS40, and Deptor), whereas mTORC2 complex consists of mTOR and five associated proteins (Rictor, mSin1, Protor-1, mLST8, and Deptor). The heterodimer composed of TSC1 and TSC2 (TSC) is one of the most important sensors involved in the regulation of mTORC1 activity. Growth factors inactivate the TSC1/TSC2 complex by an AKT-dependent mechanism. Inactivation of TSC2 results in activation of mTORC1 via Rheb. Additionally, AKT activation by growth factors such as insulin (and also by amino acids) can activate mTORC1 in a TSC1/2-independent manner (through negative phosphorylation of mTORC1 suppressor, PRAS40). mTORC2 is activated by growth factors in a TSC1/TSC2-independent manner and induces basal AKT phosphorylation on Ser473. The activation of mTORC1 by growth factors such as insulin has key roles controlling white and brown adipogenesis. mTORC1 positively regulates commitment of MSC to white adipogenic program as well as adipogenesis/lipogenesis. In contrast, temporal control of mTOR is required for a proper brown adipocyte differentiation. Early activation of the mTOR signaling pathway followed by a subsequent downregulation of this pathway by an AMPK-dependent mechanism is an absolute requirement to reach a fully differentiated brown phenotype. mTORC2 implication in the control of lipogenesis/adipogenesis seems to be limited in mammals. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

adipsin, FABP4, and FAS, as well as decreased intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 and 3T3-F442A cells, suggesting that rapamycin would affect both lipogenesis and adipogenesis (65) (Fig. 2). Studies performed with stem cells as cellular models also indicate that the mTOR/p70S6K pathway may act downstream of the PI3K/Akt cascade in mediating the adipogenic conversion of MSCs (66). In fact, although p70S6K might be dispensable for terminal adipocyte differentiation, it is clearly involved in the commitment of embryonic stem cells to early adipocyte progenitors (67). Mice lacking the specific and essential mTORC1 component Raptor in adipose tissue have confirmed the important role of this complex in adipocyte metabolism and full-body energy homeostasis. Thus, Raptor^{ad}−/− mice were protected against diet-induced obesity owing to elevated energy expenditure (68). Despite the well-established positive role of mTORC1 in regulating adipogenesis and adipose cell maintenance, DEPTOR, which is an endogenous inhibitor of mTORC1 signalling, has also been revealed as a new regulator of adipogenesis as it promotes adipose tissue expansion

and adipocyte differentiation by regulating the balance between mTORC1 and AKT activity (69). It should be noted, however, that DEPTOR impairs mTORC1 action to a much lower degree than rapamycin or Raptor loss. Consequently, the impact of mTORC1 inhibition on the regulation of adipogenesis and WAT accumulation may be different. On the other hand, despite p70S6K activity being markedly increased in models of obesity, the complete blockage of this kinase by rapamycin partially reduced differentiation. It has been hypothesized that adipogenic mTORC1 signaling occurs via the 4E-BP1/eIF4E pathway, rather than through p70S6K (70). Specifically, the deletion of 4E-BP1 results in a reduction in adipose tissue partially linked to the conversion of WAT into BAT, as detected by the expression of UCP1 and PGC-1 α in WAT (71). A molecular link between nutrient status and adipogenesis has been defined as PPAR γ activity has been revealed also to be dependent on amino acid sufficiency. Rapamycin has been described to specifically disrupt the positive transcriptional feedback loop between C/EBP α and PPAR γ . Thus, a



model has been proposed in which the mTOR pathway and the PI3K/Akt pathway would act in parallel to regulate PPAR γ activation during adipogenesis by mediating nutrient availability and insulin signals, respectively. Interestingly, mouse knock-outs affecting specific mTOR targets suggest that both p70S6K activation and 4E-BP1/2 inhibition might contribute to a pro-adipogenic role for mTORC1 activation (62,72). To summarize, mTORC1 promotes adipogenesis and adipocyte maintenance by several mechanisms including the control of lipogenesis through SREBP-1, PPAR γ , and lipin. By contrast and despite two recent reports suggest that mTORC2 function may also affect fat accumulation in yeast, the implication of mTORC2 in the control of lipogenesis/adipogenesis appears to be limited in mammals (reviewed in ref. (52)).

Little is known about specific role of mTOR in brown adipogenesis. Mostly, data from our lab demonstrated that early activation of the mTOR–p70S6K signaling pathway is an absolute requirement to reach a fully differentiated brown phenotype (50). However, subsequent downregulation of this pathway also seems crucial for the process (Fig. 2). mTORC1 inhibition by rapamycin and siRNA decreased cell proliferation and precluded brown adipocyte differentiation (50). These negative regulatory effects on brown adipogenesis may be exerted through a mechanism that depends on the control of cell growth, in a similar way to that described in human preadipocytes (65). Nevertheless, a potential link between mTOR and mitochondrial activities should also be taken into account. The complete inhibition of mTORC1 by loss of Raptor in adipose tissue increases mitochondrial uncoupling (68), whereas studies in an immortalized line of T lymphocytes suggest that mTORC1 activity may play an important role in determining the relative balance between mitochondrial and nonmitochondrial sources of ATP generation (73). In contrast, in skeletal muscle, mTORC1 is necessary for the maintenance of mitochondrial oxidative function through a mechanism that seems to be dependent on the transcription factor yin-yang 1 (YY1) which is a common target of mTORC1 and PGC-1 α (74). Additionally, TSC1 deletion in hematopoietic stem cells increased mitochondrial biogenesis and elevated levels of reactive oxygen species (75). Therefore, the influence of mTORC1 in mitochondrial activity seems to be tissue specific. Whether this pathway plays a role in mitochondrial activity in BAT should be clarified and deserves further studies.

AMPK–mTOR Crosstalk in Adipogenesis

As described above, while AMPK is activated under low-energy conditions, mTOR activity depends on diverse growth-positive signals such as high-energy levels, amino acids, and growth factors. In this regard, energy status of the cell is signaled to mTOR through AMPK. Several studies have revealed the convergence of AMPK and mTOR signaling pathways, pointing to mTOR as a central signal integrator that receives signals arising from growth factors, nutrients, and cellular energy metab-

olism (Fig. 3). In response to energy depletion (low ATP:ADP ratio), activated AMPK is thought to inhibit mTORC1 activity primarily in the opposite way that growth factors stimulate it, mainly by phosphorylation and activation of the negative regulator TSC2. Additionally, AMPK can reduce mTORC1 activity in response to energy depletion by directly phosphorylating Raptor, which might be crucial for the role of AMPK as a metabolic checkpoint coordinating cell growth with energy status (76). *In vitro*, cellular levels of ATP increase mTOR signaling, and mTORC1 itself is thought to serve as an ATP sensor. Thus, AMPK regulates the activities of both p70S6K and 4E-BP1, indicating a convergence of AMPK and mTOR signaling pathways (reviewed in (56)). The interplay of mTOR and AMPK provides a more exact mechanism for mammals to coordinate with the environmental conditions.

As described above, Akt is a positive regulator of mTOR that mediates the activation of mTORC1 by growth factors but it is also a key regulator of energy metabolism that inhibits AMPK (56). Historically, the activation of mTORC1 via Akt-mediated phosphorylation of TSC2 and via inhibition of AMPK was viewed as two separate pathways, leading to the activation of mTOR. However, currently it has been proved that AKT lies upstream of both pathways and induces full inhibition of TSC2 and activation of mTORC1 both through direct phosphorylation and by inhibition of AMPK-mediated phosphorylation of TSC2 (77). TSC2 has been described as a physiological substrate of GSK3 and similar to AKT, it is known that Wnt stimulates the mTORC1 signaling pathway via inhibiting GSK3 phosphorylation of TSC2. More importantly, GSK3 phosphorylates TSC2 after the AMPK-priming phosphorylation and inhibition of GSK3 compromises AMPK-induced TSC2 phosphorylation. Thus, GSK3 and AMPK depend on each other to regulate mTORC1 signaling, pointing to TSC2 as a key node, which integrates Wnt and energy signals via phosphorylation (78) (Fig. 3).

Although it is clear that AMPK and mTOR are key factors in the adipocyte differentiation process and that fat loss induced by fasting or caloric restriction correlates with mTOR inhibition as well as AMPK activation, no such data presently exist for the AMPK–mTOR interplay in this process. Only the study in brown adipocytes reported by our group has investigated the contribution of AMPK–mTOR crosstalk in brown fat adipogenesis (50). In fact, we have recently shown that the brown adipocyte differentiation program is sequentially controlled by LKB1–AMPK and TSC2–mTOR–p70S6K intracellular signaling pathways. Via pharmacological inhibition as well as genetic knockdown approaches, our study reveals that at early stages the mTOR–p70S6K signaling pathway is essential for brown adipocyte differentiation. The activation of AMPK at later stages, also necessary for brown adipogenesis, would be involved in mTOR–p70S6K shutdown. Our data confirm that inactivation of mTOR throughout the differentiation process is dependent on AMPK activation. Thus, at the beginning of the process, a transitory phosphorylation of TSC2 at the Thr1462 residue, probably induced by an AKT-dependent mechanism,

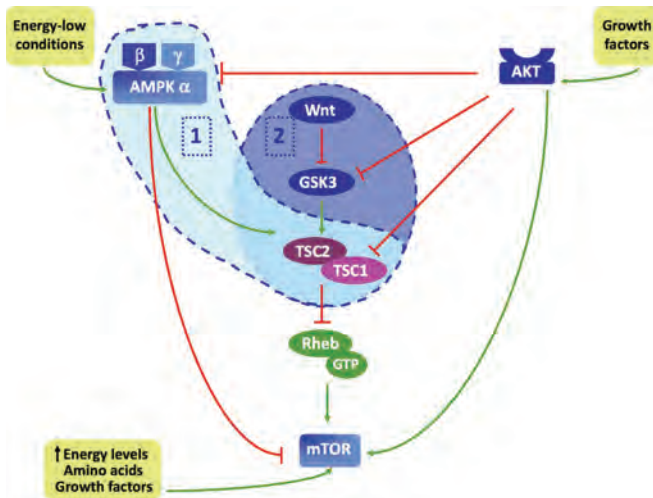


FIG 3

mTOR as a central signal integrator of the energy status of the cell. mTOR activity is highly controlled by energy levels, amino acids, or growth factors through several mechanisms. (1) In response to low-energy conditions mTORC1 is inhibited directly by AMPK (through Raptor inhibition) or indirectly by TSC2 phosphorylation, resulting in energy preservation. (2) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3. Inhibition of the serine/threonine kinase GSK-3 in response to Wnt or AKT activation leads to the inactivation of the tumor suppressor complex TSC1/2, followed by activation of the mTOR signaling pathway. GSK3 phosphorylation of TSC2 follows the AMPK-priming phosphorylation. GSK3 and AMPK depend on each other to regulate mTOR signaling pointing to TSC2 as a key node. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

is found, resulting in TSC2 inhibition and consequently in mTOR-dependent p70S6K activation. However, once the LKB1–AMPK cascade is activated through brown adipogenesis, a decrease in the inactive form of TSC2 is detected (50). Surprisingly, although it has been reported that the Wnt pathway positively regulates mTOR activity (79), our study suggests negative feedback regulation between these cascades. In this regard, the Wnt signaling pathway, known to be involved in brown adipocyte differentiation, is rapidly and transiently activated through the brown differentiation process. On the other hand, it was observed that rapamycin activated the Wnt pathway by delaying β -catenin degradation in which it may represent a novel mTOR–Wnt feedback loop (50).

Conclusions and Future Perspectives

In view of the worldwide epidemic of obesity and associated metabolic disorders, it is important to identify pathways that can be manipulated either genetically or pharmacologically to regulate weight gain. Inhibition of white adipocyte differentiation as well as the promotion of BAT development should be considered as promising strategies in the field of antiobesity

therapies. Emerging data reveal that temporal control of several signaling pathways such as AMPK and mTOR is required for a proper differentiation process of fat cells. Specifically, AMPK–mTOR crosstalk has been revealed as one of the mechanisms that differentially regulates brown and white differentiation programs. How these events are integrated in the cells to regulate both adipogenic and a thermogenic program is an exciting topic and requires future studies. On the other hand, AMPK, but also mTOR, seems to be a vital link between immune function and metabolism. In fact, emerging data might reveal a critical role of these kinases in promoting the differentiation, activation, and function of some immune cells (80). Several studies have established adipose tissue as a new important player of the immune response and recent studies point to accumulation of inflammatory T cells in adipose tissue an early event in obesity even prior to macrophage infiltration (81). In fact, cells of both innate and adaptive immune system such as macrophages, B and T cells, and dendritic-like cells massively infiltrate adipose tissue in an obese environment. Nevertheless, adipose tissue is well-spread through the body and it should not be ruled out that in physiological conditions this organ could provide immune cells which participate to immune response as has been recently proved for ADSC (82).



In this context, adipose tissue may also be considered as an extramedullary reservoir for immune cells, opening new and fascinating perspectives on a potential role of this tissue not only in obesity-associated metabolic disorders but also in host defense and inflammatory disease.

Acknowledgements

Our lab is supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2008-04043 and SAF2012-36186 to S.F.-V.; PI11/0085 and CB07/08/0012 to J.V.). S.F.-V. acknowledges support from the “Miguel Servet” tenure track program (CP10/00438) from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). A.V.-C. and V.C.-M. are supported by FPI and “Juan de la Cierva” fellowships respectively, from the Spanish Ministry.

REFERENCES

- [1] Cinti, S. (2012) The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech.* 5, 588–594.
- [2] Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853.
- [3] Trayhurn, P. and Wood, I. S. (2005) Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1078–1081.
- [4] Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., et al. (2008) Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134, 933–944.
- [5] Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E444–E452.
- [6] Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., et al. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.
- [7] Seale, P. and Lazar, M. A. (2009) Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* 58, 1482–1484.
- [8] Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., et al. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 7153–7164.
- [9] Frontini, A. and Cinti, S. (2010) Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11, 253–256.
- [10] Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., et al. (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.
- [11] Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., et al. (2009) Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000324.
- [12] Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240–249.
- [13] Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P., and Roberts, I. (2006) The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20, 161–171.
- [14] Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonja, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., et al. (2010) Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18226–18231.
- [15] van Hammerlen, V., Skurk, T., Rohrig, K., Lee, Y. M., Halbleib, M., et al. (2003) Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 889–895.
- [16] Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., et al. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- [17] Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., et al. (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1244–E1253.
- [18] Siersbaek, R., Nielsen, R., and Mandrup, S. (2012) Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 56–64.
- [19] Vila-Bedmar, R. and Fernandez-Veledo, S. (2011) A new era for brown adipose tissue: new insights into brown adipocyte function and differentiation. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 195–208.
- [20] Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., et al. (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell Biol.* 24, 3057–3067.
- [21] Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., and Binetruy, B. (2005) The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87, 51–56.
- [22] Shi, H., Halvorsen, Y. D., Ellis, P. N., Wilkison, W. O., and Zemel, M. B. (2000) Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol. Genomics* 3, 75–82.
- [23] Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.
- [24] Yamaguchi, S., Katahira, H., Ozawa, S., Nakamichi, Y., Tanaka, T. et al. (2005) Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E643–E649.
- [25] Fernandez-Veledo, S., Vila-Bedmar, R., Nieto-Vazquez, I., and Lorenzo, M. (2009) c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3583–3593.
- [26] Salt, I. P., Connell, J. M., and Gould, G. W. (2000) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49, 1649–1656.

- [27] Taylor, E. B., An, D., Kramer, H. F., Yu, H., Fujii, N. L., et al. (2008) Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 9787–9796.
- [28] Lin, Y. Y., Kihl, S., Suhail, Y., Liu, S. Y., Chou, Y. H., et al. (2012) Functional dissection of lysine deacetylases reveals that HDAC1 and p300 regulate AMPK. *Nature* 482, 251–255.
- [29] Ceddia, R. B. (2013) The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 366, 194–203.
- [30] Mulligan, J. D., Gonzalez, A. A., Stewart, A. M., Carey, H. V., and Saupé, K. W. (2007) Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. *J. Physiol.* 580, 677–684.
- [31] Villena, J. A., Viollet, B., Andreelli, F., Kahn, A., Vaulont, S., et al. (2004) Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase- α 2 subunit. *Diabetes* 53, 2242–2249.
- [32] Bauwens, J. D., Schmuck, E. G., Lindholm, C. R., Ertel, R. L., Mulligan, J. D., et al. (2011) Cold tolerance, cold-induced hyperphagia, and nonshivering thermogenesis are normal in α 1-AMPK $^{-/-}$ mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R473–R483.
- [33] Sponarova, J., Mustard, K. J., Horakova, O., Flachs, P., Rossmels, M., et al. (2005) Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depot-specific metabolic changes during starvation. *FEBS Lett.* 579, 6105–6110.
- [34] Park, H., Kaushik, V. K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., et al. (2002) Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J. Biol. Chem.* 277, 32571–32577.
- [35] Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., Nieto-Vazquez, I., Mayor, F., Jr., Lorenzo, M., et al. (2012) GRK2 contribution to the regulation of energy expenditure and brown fat function. *FASEB J.* 26, 3503–3514.
- [36] Gauthier, M. S., Miyoshi, H., Souza, S. C., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., et al. (2008) AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J. Biol. Chem.* 283, 16514–16524.
- [37] Pulinilkunnil, T., He, H., Kong, D., Asakura, K., Peroni, O. D., et al. (2011) Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in brown adipose tissue in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 8798–8809.
- [38] Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., et al. (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343.
- [39] Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T. J., Scalia, R., et al. (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52, 1355–1363.
- [40] Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., et al. (2010) Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 11, 554–565.
- [41] Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., et al. (2006) Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 8748–8755.
- [42] Lee, W. H. and Kim, S. G. (2010) AMPK-dependent metabolic regulation by PPAR agonists. *PPAR Res.* pii, 549101.
- [43] Habinowski, S. A. and Witters, L. A. (2001) The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 852–856.
- [44] Gregoire, F. M. (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* 226, 997–1002.
- [45] Kim, K. H., Song, M. J., Chung, J., Park, H., and Kim, J. B. (2005) Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1178–1184.
- [46] Lee, H., Kang, R., Bae, S., and Yoon, Y. (2011) AICAR, an activator of AMPK, inhibits adipogenesis via the WNT/ β -catenin pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Med.* 28, 65–71.
- [47] Moldes, M., Zuo, Y., Morrison, R. F., Silva, D., Park, B. H., et al. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/ β -catenin signalling during adipogenesis. *Biochem. J.* 376, 607–613.
- [48] Lin, F., Ribar, T. J., and Means, A. R. (2011) The Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase, CaMKK2, inhibits preadipocyte differentiation. *Endocrinology* 152, 3668–3679.
- [49] Kim, E. K., Lim, S., Park, J. M., Seo, J. K., Kim, J. H., et al. (2012) Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. *J. Cell. Physiol.* 227, 1680–1687.
- [50] Vila-Bedmar, R., Lorenzo, M., and Fernandez-Veledo, S. (2010) Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* 151, 980–992.
- [51] Giri, S., Rattan, R., Haq, E., Khan, M., Yasmin, R., et al. (2006) AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr. Metab.* 3, 31.
- [52] Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2009) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.* 19, R1046–R1052.
- [53] Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., et al. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168.
- [54] Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., et al. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284, 8023–8032.
- [55] Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., et al. (2012) TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol. Cell* 47, 535–546.
- [56] Inoki, K., Kim, J., and Guan, K. L. (2012) AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 381–400.
- [57] Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P. P. (2005) Phosphorylation and functional



- inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179–193.
- [58] Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13489–13494.
- [59] Vander, H. E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., and Kim, D. H. (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323.
- [60] Zhang, Z., Zhang, G., Xu, X., Su, W., and Yu, B. (2012) mTOR-riCTOR is the Ser473 kinase for AKT1 in mouse one-cell stage embryos. *Mol. Cell. Biochem.* 361, 249–257.
- [61] Houde, V. P., Brule, S., Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., Bellmann, K., et al. (2010) Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59, 1338–1348.
- [62] Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., et al. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.
- [63] Yeh, W. C., Bieber, B. E., and McKnight, S. L. (1995) Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11086–11090.
- [64] Gagnon, A., Lau, S., and Sorisky, A. (2001) Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. *J. Cell. Physiol.* 189, 14–22.
- [65] Bell, A., Grunder, L., and Sorisky, A. (2000) Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture. *Obes. Res.* 8, 249–254.
- [66] Yu, W., Chen, Z., Zhang, J., Zhang, L., Ke, H., et al. (2008) Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biochem.* 310, 11–18.
- [67] Carnevalli, L. S. and Trumpp, A. (2010) Tuning mTORC1 activity for balanced self-renewal and differentiation. *Dev. Cell* 19, 187–188.
- [68] Polak, P., Cybulski, N., Feige, J. N., Auwerx, J., Ruegg, M. A., et al. (2008) Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metab.* 8, 399–410.
- [69] Laplante, M., Horvat, S., Festuccia, W. T., Birsoy, K., Prevorsek, Z., et al. (2012) DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab.* 16, 202–212.
- [70] El-Chaar, D., Gagnon, A., and Sorisky, A. (2004) Inhibition of insulin signaling and adipogenesis by rapamycin: effect on phosphorylation of p70 S6 kinase vs eIF4E-BP1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, 191–198.
- [71] Tsukiyama-Kohara, K., Poulin, F., Kohara, M., DeMaria, C. T., Cheng, A., et al. (2001) Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat. Med.* 7, 1128–1132.
- [72] Le, B. O., Petroulakis, E., Paglialunga, S., Poulin, F., Richard, D., et al. (2007) Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.* 117, 387–396.
- [73] Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, J. P., Jr., Aponte, A. M., Shen, R. F., et al. (2006) The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* 281, 27643–27652.
- [74] Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., et al. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740.
- [75] Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K. L., et al. (2008) TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* 205, 2397–2408.
- [76] Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., et al. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- [77] Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C. C., Skeen, J. E., Sonenberg, N., et al. (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* 280, 32081–32089.
- [78] Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., et al. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955–968.
- [79] Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., et al. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955–968.
- [80] Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., and Horton, M. R. (2012) Regulation of immune responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 39–68.
- [81] Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., et al. (2008) T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310.
- [82] Peng, W., Gao, T., Yang, Z. L., Zhang, S. C., Ren, M. L., et al. (2012) Adipose-derived stem cells induced dendritic cells undergo tolerance and inhibit Th1 polarization. *Cell. Immunol.* 278, 152–157.