



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

**NOVES APORTACIONS AL CONEIXEMENT I LA
PREVENCIÓ DE LA INFLAMACIÓ I LA RESISTÈNCIA A
LA INSULINA INDUÏDES PER ÀCIDS GRASSOS EN
CÈL·LULES MUSCULARS ESQUELÈTIQUES**

Teresa Coll i Iglesias

2009



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

PROGRAMA DE DOCTORAT: Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

(Bienni 2005-2007)

**NOVES APORTACIONS AL CONEIXEMENT I LA PREVENCIÓ DE
LA INFLAMACIÓ I LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA INDUÏDES
PER ÀCIDS GRASSOS EN CÈL·LULES MUSCULARS
ESQUELÈTIQUES**

Memòria presentada per

Teresa Coll i Iglesias

per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

Els directors,

Dr. Manuel Vázquez Carrera

Dr. Juan Carlos Laguna Egea

La doctoranda,

Teresa Coll i Iglesias

Barcelona, 8 d'octubre de 2009

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

Ministerio de Ciencia e Innovación
(Projecte SAF 2004-03045 i SAF 2006-01475)

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



A la meva àvia

I en acabat, que cadascú es vesteixi
com bonament li plagui, i via fora!,
que tot està per fer i tot és possible.

Miquel Martí i Pol

AGRAÏMENTS

Qui m'havia de dir, ara fa cinc anys, que començaria un màster experimental al Departament de Farmacologia que m'engrescaria a continuar amb una Tesi Doctoral. Tot allò que vaig aprendre durant aquell primer any, juntament amb la gent que formava el grup van fer que em decidís a continuar en el món de la recerca. Evidentment, els següents quatre anys no van resultar ser tan "idíllics" com el primer (és el que té treballar amb cèl·lules...) però malgrat els imprevistos i problemes que han sorgit durant la tesi no es pot dir que no hagi disfrutat -sinó no m'explico com ha passat tan ràpidament aquest temps!-. I ara que sembla que aquesta etapa ja arriba a la seva fi, m'agradaria agrair a tothom que, d'una manera o altra, ha contribuït a fer possible aquest treball.

En primer lloc, vull donar les gràcies al Dr. Manel Vázquez, per la confiança dipositada en mi i l'ajuda que m'ha brindat en tot moment, així com també al Dr. Joan Carles Laguna. A tots dos per donar-me l'oportunitat de treballar en el seu grup d'investigació.

Al Dr. Palomer, per ensenyar-me una altra manera de veure la ciència i per ajudar-me en tot allò que he necessitat. Moltes gràcies per tots els cafès/camamilles i per saber convertir "l'acidesa" de determinats moments en bon rotllo.

A la Dra. Mireia Jové, que tant em va ensenyar quan començava a fer els primers passos en el món de la ciència. Vaig aprendre molt de la teva rigurositat i organització a l'hora de treballar.

De fet, aquesta rigurositat fa que no m'atreveixi a escriure el nom de tothom a qui voldria agrair tot el que ha fet per mi al llarg d'aquests anys al "depar" (les meves nenes, tots els treballs dirigits, màsters, doctorands, *post-docs*... buf!, realment són molts els qui en formen, o n'han format part... segur que m'oblidaria algú sense voler). Per tant, el més prudent és que faci un agraïment general a tota la gent dels grups de la cinta blava, groga i verda, és a dir, a tota la gent del grup d'hipolipemians, d'apoptosi i de neuro, així com també als farmacognostes i a la Mar. Entre tots heu aconseguit crear un molt bon ambient al *lab*!

I ja fora de la facultat de Farmàcia, però just a l'edifici del costat, gràcies a l'Anna Orozco i la Maria Guitart per la seva ajuda amb els cultius primaris.

A part de la gent del laboratori, són molts els que han "patit" els meus nervis, desesperacions i estrès durant aquests anys (i sobretot aquests últims mesos), però també els bons moments. Gràcies per animar-me a seguir endavant i proporcionar-me altes dosis d'optimisme, serenitat i alegria.

Moltes gràcies als Wekes (per ordre alfabètic): Albert, Ari, Aura, Borja, Carla, Carme, Coll, Dj Kram, Exumi, Golet, Isaac, Jaume, Jesús, Jordi, Judith, Kuru, Lau, Lluís (o Sixtu), Marga, Maritza, Miquel B., Miquel S., Page, Sílvia Ll., Sílvia P. i Villa (ara ja flamant Associació Penya Weke Weke). Al final ens hem decidit a oficialitzar-nos, i amb acte inclòs! això sí que és saber organitzar-se, treballar en equip i passar-s'ho bé! Lau, quantes aventures, "confesiones", "entrenus", hores senceres rient, nits de festa... que

bé saber que puc comptar amb tu pel que sigui! Ari i Carla... (les 3 maries, vaja) gràcies per ensenyar-me que realment tot el que un es proposa és possible (només cal tenir unes *barritas* energètiques de xocolata). Em va encantar compartir aquell viatge amb vosaltres (i tantes altres coses!). Xílvia, estupenda, la teva capacitat d'escoltar és infinita, tot i que últimament ho hàgim de concentrar en un cafè no tan sovint com ens agradaria. I a tota la resta de la colla, sou un veritable antídoto contra l'avorriment!

A qui s'ha convertit en la meva família a Barcelona durant els anys d'universitat i tesi. A na Maritza, que des que ens vam conèixer al pis de la Vila hem passat tantes hores juntes (i tan bones) que és com si ens coneguéssim de tota la vida. He après molt de tu. Encara hem de fer molts més *corolarios*! I la Moni, per ensenyar-me que el més important és tenir les idees clares. A la Thais, encomanes motivació i ganes de fer coses a qui t'envolta. Molta sort amb la tesi! A l'Ana, una bona troballa a la uni, tot i que ens coneguéssim millor posteriorment. I com no, a l'Adrià, en Fali i la Míriam.

A l'Eva, per estar al meu costat des que érem unes nenes de 4 anys... i continuar compartint, encara ara, les nostres penes i alegries.

A qui m'ha acollit tan bé, el clan Planagumà-Valls: Jordi pare, Carme, Jordi, Jesús (o Dr. Planagumà; el "xapista" dark metal responsable de la portada i de tants bons consells relacionats amb la ciència, el disseny gràfic i la música), Sarah, Marc (o Dj Kram), Marga i també l'àvia Paquita. Gràcies per fer-me sentir una més de la família!

I a la meva família d'Olot: la del Pla de Dalt, Sta. Pau i els tiets del Pla del Coll. I per descomptat als meus pares, per creure en mi i apoiar-me en totes les decisions que he pres. Per recordar-me que l'esforç diari és bàsic per arribar allà on es vol. Sense vosaltres no ho hauria aconseguit mai! I als meus avis, que els hi hagués agradat molt veure aquest treball.

Finalment, necessitaria moltes pàgines per agrair a en Jordi tota la paciència (infinita), que ha tingut amb mi durant la realització d'aquesta tesi. Milions de gràcies per les paraules d'ànim i suport que em dones sempre, però molt en especial les d'aquests últims mesos. Saps que són fonamentals per mi. Gràcies per tots els moments compartits i, sens dubte m'atreveixo a dir, per tots els que compartirem. Fem un gran equip!

I no podria pas acabar aquests agraïments sense recordar la meva terra, la Garrotxa. No sé si és el paisatge més bonic de Catalunya, però els seus racons han contribuït a donar-me, setmana rere setmana, la pau, tranquil·litat i energia necessàries per dur a terme aquesta tesi.

<i>Abreviatures</i>	1
PRESENTACIÓ	5
INTRODUCCIÓ	13
1. METABOLISME DE LA GLUCOSA	15
1.1 Via de senyalització de la insulina	16
1.2 Implicació de diferents proteïnes en la via de senyalització de la insulina	18
1.2.1 <i>IRS</i>	18
1.2.2 <i>Fosfatidilinositol-3 cinasa</i>	21
1.2.3 <i>Akt/PKB</i>	23
1.2.4 <i>PKCs</i>	24
1.2.5 <i>Transportadors de la glucosa</i>	25
2. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS	28
2.1 Transport dels àcids grassos a través de la membrana	29
2.1.1 <i>FATP</i>	30
2.1.2 <i>FAT/CD36</i>	31
2.1.3 <i>FABPpm</i>	31
2.2 El mitocondri i l'oxidació dels àcids grassos	32
2.2.1 <i>β-oxidació dels àcids grassos</i>	32
2.3 Regulació enzimàtica del metabolisme dels àcids grassos	33
2.3.1 <i>Carnitina palmitoiltransferasa (CPT)</i>	33
2.3.2 <i>Acetil Co-A carboxilasa (ACC) i Malonil-CoA</i>	34
2.3.3 <i>AMPK</i>	36
2.4 Control transcripcional del metabolisme dels àcids grassos	37
2.4.1 <i>PPARs</i>	37
2.4.2 <i>PGC-1</i>	42
3. INTEGRACIÓ DEL CICLE DE LA GLUCOSA I DELS ÀCIDS GRASSOS	45
3.1 Lípids intracel·lulars	47
3.1.1 <i>Diacilglicerol i Triacilglicerol</i>	47
3.1.2 <i>Ceramides</i>	49
4. ÀCIDS GRASSOS I RESISTÈNCIA A LA INSULINA	52
4.1 Alteracions de la captació d'àcids grassos	52
4.2 Alteracions del mitocondri	53
4.2.1 <i>Transport mitocondrial d'àcids grassos</i>	53
4.2.2 <i>Contingut i funcionament mitocondrial</i>	55
4.3 Alteracions de la via de senyalització de la insulina	58
5. INFLAMACIÓ I RESISTÈNCIA A LA INSULINA INDUÏDES PER ÀCIDS GRASSOS	62
5.1 Inflamació, resistència a la insulina i àcids grassos insaturats	63
5.2 Vies inflamatòries implicades en la resistència a la insulina induïda per àcids grassos	65

5.2.1 Via independent de receptor	65
5.2.2 Via dependent de receptor: TLRs	66
5.3 NF- κ B	69
5.3.1 Interleucina-6	72
5.3.2 MAPK	73
5.3.3 Ciclooxygenasa-2	76
OBJECTIUS	81
RESULTATS	85
- PUBLICACIÓ 1. <i>Palmitate-Mediated Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1α in Skeletal Muscle Cells Involves MEK1/2 and Nuclear Factor-κB Activation</i> <i>Diabetes</i> 2006, 55:2779-2787	87
- PUBLICACIÓ 2. <i>Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance and Inflammation in Skeletal Muscle Cells</i> <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2008, 283:11107-11116	101
- PUBLICACIÓ 3. <i>COX-2 inhibition enhances palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cell</i>	115
- PUBLICACIÓ 4. <i>Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ (PPARδ) by GW501516 Prevents Fatty Acid-induced NF-κB Activation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells</i>	151
DISCUSSIÓ GLOBAL	189
CONCLUSIONS	213
BIBLIOGRAFIA	215

ABREVIATURES

AA	Àcid araquidònic
ACC	Acetil Co-A carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AF-1 i 2	<i>Activation Function-1 i 2</i>
AG	Àcid gras
AGcL	Àcid gras de cadena llarga
AGL	Àcid gras lliure
Akt	Proteïna cinasa B
AMP	Adenosina monofosfat
AMPK	Cinasa activada per AMP
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AS160	Substrat de l'Akt de 160 kDa
ATP	Adenosina trifosfat
Bis	Bisindolilmaleimida
CACT	Acil carnitina translocasa
CaMK	Cinasa dependent de calci/calmodulina
CoA	Coenzim-A
COX	Ciclooxigenasa
cPLA₂	Fosfolipasa citoplasmàtica A ₂
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CTE	Tioesterasa citosòlica
DAG	Diacilglicerol
DBD	DNA <i>binding domain</i>
DGAT	Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa
DM2	Diabetis Mellitus tipus 2
ERK	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars
ERR	<i>Estrogen-Related Receptor</i>
FABP	Proteïna d'unió a àcids grassos
FAT/CD36	Translocasa d'àcids grassos
FATP	Proteïna transportadora d'àcids grassos
FOXO	<i>Forkhead box</i>
FXR	<i>Farnesyl X Receptor</i>
G-6P	Glucosa-6 fosfat
GLUT	Transportador de la glucosa
GPRs	Receptors acoblats a proteïnes G
GSV	Vesícules d'emmagatzematge de GLUT4
GTP	<i>Guanosina 5'-trifosfat</i>
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat

IKK	Cinasa de IκB
IL	Interleucina
Interferó-γ	INF-γ
IRAK1	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRS	Substrat del Receptor de la Insulina
IκBα	Proteïna inhibidora κBα
JNK	Cinasa c-jun NH ₂ -terminal
KDa	Quilodalton
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
L-CPT-1	Carnitina palmitoiltransferasa-1 de fetge
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LPS	Lipopolisacàrids
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens
MAPKK	Cinasa de MAPK
MAPKKK	Cinasa de la cinasa de MAPK
mAspAT	Aspartat aminotransferasa mitocondrial
MCD	Malonil-CoA decarboxilasa
M-CPT-1	Carnitina palmitoiltransferasa-1 de múscul
MEF-2	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
MLK-3	<i>Mixed-lineage kinase 3</i>
MMI	Membrana mitocondrial interna
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary-response protein 88</i>
NEMO	NF-κB <i>essential modifier</i>
NF-κB	Factor nuclear-κB
NRF-1 i 2	<i>Nuclear Respiratory Factor-1 i 2</i>
pb	Parell de bases
PDC	Piruvat deshidrogenasa
PDK	Proteïna cinasa depenent de fosfatidilinositol
PDK4	Piruvat deshidrogenasa cinasa 4
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamat
PGC-1	PPAR _γ <i>Coactivator-1</i>
PGs	Prostaglandines
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI	Fosfatidilinositol
PI(4)P	Fosfatidilinositol 4-fosfat
PI(4,5)P₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PKA	Proteïna cinasa A
PKB	Proteïna cinasa B
PKC	Proteïna cinasa C
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>

PP2A	Proteïna fosfatasa 2A
PP2C	Proteïna fosfatasa 2C
PPAR	Receptor activat per proliferadors peroxisòmics
PPARα	Receptor activat per proliferadors peroxisòmics α
PPARβ/δ	Receptor activat per proliferadors peroxisòmics β/δ
PPARγ	Receptor activat per proliferadors peroxisòmics γ
PPRE	Element de Resposta a Proliferadors Peroxisòmics
PRC	Coactivador relacionat amb PGC-1
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding</i>
RI	Resistència a la insulina
RTK	Receptor amb activitat intrínseca tirosina cinasa
RXR	Receptors Retinoid X
SAPKs	Proteïnes cinases activades per estrès
Ser	Serina
SLGT	Transportador de glucosa depenent de sodi
SREBP1c	Proteïna d'unió a elements regulats per esterols 1c
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAK1	<i>transforming-growth-factor-b-activated kinase</i>
TG	Triglicèrids
Thr	Treonina
TIR	Toll/IL-1
TLR	Receptors <i>Toll-like</i>
TNF-α	Factor de Necrosi Tumoral- α
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor(TNF)-associated factor 6</i>
TX	Tromboxà
ZDF	<i>Zucker diabetic fatty</i>

PRESENTACIÓ



La Diabetis Mellitus tipus 2 (DM2) és una malaltia metabòlica complexa que afecta entre un 4 i un 5 % de la població en les societats industrialitzades. Aquesta patologia es caracteritza per la presència, en la seva fase inicial, de resistència a la insulina (RI), definida com un defecte de la capacitat de la insulina per aconseguir que la glucosa sigui utilitzada pel seu teixit diana més important, el múscul esquelètic (Saltiel i Kahn, 2001). S'ha establert de manera clara que en la DM2, la RI precedeix i prediu el desenvolupament d'aquesta malaltia. Freqüentment, una de les primeres alteracions que s'observen en els individus amb predisposició a patir RI/DM2 és l'acumulació de grassa intraabdominal. De fet, la relació epidemiològica entre l'obesitat i la RI és molt sòlida (Grundy, 2008). El fet que l'obesitat augmenti any rere any fa que s'esperï un increment significatiu del nombre de pacients amb DM2, que pot assolir els 330 milions de persones afectades per aquesta patologia l'any 2025.

En l'última dècada, nombroses evidències han posat de manifest l'existència d'una estreta relació entre un estat d'inflamació crònic de baixa intensitat i la presència d'obesitat-RI-DM2. De fet, diferents molècules de senyalització alliberades pels adipòcits poden activar diverses vies inflamatòries en una gran varietat de teixits, incloent especialment el múscul esquelètic: les citocines inflamatòries i els AG lliures (AGL). La primera relació entre inflamació i obesitat es descobrí l'any 1993, quan es va identificar que la citocina proinflamatòria TNF- α (Factor de Necrosi Tumoral- α) es sobreexpressava en el teixit adipós de models animals d'obesitat (Hotamisligil i col., 1995). De la mateixa manera que en aquests models d'obesitat, el TNF- α també es sobreexpressa en el teixit adipós i en el múscul esquelètic de persones obeses (Kern i col., 1995; Saghizadeh i col., 1996; Uysal i col., 1997). Posteriorment es va demostrar que l'obesitat es caracteritza per la presència d'una resposta inflamatòria molt àmplia i que molts mediadors inflamatoris presenten patrons d'expressió o afecten a l'acció de

la insulina de manera similar a com ho fa TNF- α quan hi ha obesitat, tant en models animals d'obesitat com en humans (Bastard i col., 2002; Esposito i col., 2002). Entre aquests mediadors inflamatoris, la interleucina 6 (IL-6) (Bastard i col., 2002; Esposito i col., 2002), IL-1, IL-8 i IL-18 han estat citades per ser les citocines més importants implicades en l'aparició de RI/DM2. De totes elles, la IL-6 és la que presenta una major correlació amb la RI i la DM2 (Kern i col., 2001; Pradhan i col., 2001; Kosmidou i col., 2002) i els seus nivells plasmàtics són de 2 a 3 vegades superiors en pacients amb obesitat i DM2 respecte a pacients no obesos (Rotter i col., 2003). Fins fa poc, els macròfags i les cèl·lules mononuclears perifèriques eren considerades les principals fonts de producció de IL-6. No obstant, dades recents suggereixen que els adipòcits i les cèl·lules musculars esquelètiques també produeixen IL-6 (Kristiansen i Mandrup-Poulsen, 2005). A més de les citocines inflamatòries, les adipocines (leptina i adiponectina) són mediadors bioactius alliberats pels adipòcits que també poden regular el procés inflamatori (Rabe i col., 2008).

Actualment els mecanismes a través dels quals els nivells elevats d'AGL associats a l'obesitat causen RI/DM2 no es coneixen bé, però nombroses evidències suggereixen una relació entre els nivells elevats d'AGL i l'activació del procés inflamatori. L'augment dels nivells d'AGL pot provocar respostes proinflamatòries directes o indirectes. La resposta directa es produeix gràcies a la seva capacitat d'unió als TLR (*Toll-like receptors*). Aquests receptors pertanyen a una família essencial en el sistema immune que produeix l'activació de la via de senyalització proinflamatòria dependent de NF(*Nuclear Factor*)- κ B en resposta als lipopolisacàrids (LPS) dels bacteris Gram negatius, però també dels AGL (Lee i col., 2001). L'activació indirecta de les vies proinflamatòries a causa de nivells elevats d'AGL té lloc quan s'acumulen molècules intermediàries lipídiques dins les cèl·lules. Aquest procés s'inicia amb el transport dels AG (AG) a l'interior de les cèl·lules musculars, on una vegada són activats (acil-CoAs) poden ser β -oxidats al mitocondri o bé emmagatzemats com a

intermediaris del metabolisme dels AG: triglicèrids (TG), diacilglicerol (DAG) o ceramides. L'acumulació d'aquests compostos dona lloc a l'activació de diferents serina cinases (entre elles la cinasa de la proteïna inhibidora $\text{kB-}\beta$ (IKK- β) i la proteïna cinasa C- θ) (Wymann i Schneiter, 2008), que regulen negativament l'acció de la insulina. D'entre totes les isoformes de la PKC, només la PKC- θ té l'habilitat d'activar NF- κ B (Griffin i col., 1999), fet que s'ha relacionat amb l'empitjorament de la sensibilitat a la insulina induïda per AG en el múscul esquelètic de rosegadors (Hirosumi i col., 2002; Kim i col., 2001) i l'augment de l'expressió de múltiples mediadors inflamatoris, incloent-hi TNF- α i IL-6 (Shoelson i col., 2003).

D'altra banda, els AG poden regular el seu propi metabolisme gràcies a que actuen com a lligands dels Receptors Activats per Proliferadors Peroxisòmics (PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*). Els PPARs són membres de la superfamília dels factors de transcripció activats per lligand. Formen heterodímers amb els RXR α (*retinoid X receptors*) i s'uneixen a elements de resposta consens de seqüències hexamèriques d'ADN separades per 1 bp (Barish i col., 2006). L'unió del lligand indueix un canvi conformacional en els complexos PPAR-RXR, fent que s'intercanviïn els corepressors pels coactivadors, cosa que fa que es recluti la maquinària de transcripció basal i s'augmenti l'expressió gènica. A més, és interessant destacar que aquests receptors nuclears implicats en el metabolisme dels AGL també poden suprimir la inflamació a través de diferents mecanismes mitjançant la reducció de l'alliberament de factors inflamatoris o l'estabilització de complexos repressors en els promotors dels gens inflamatoris (Barish i col., 2006). Dels tres subtipus de PPAR, PPAR α (NR1C1) i PPAR γ (NR1C3) són les dianes dels fàrmacs hipolipemians (fibrats) i antidiabètics (tiazolidindiones), respectivament. L'activació del tercer subtipus, PPAR β/δ (NR1C2), per lligands d'alta afinitat (L-165041 i GW501516) s'ha proposat com una estratègia terapèutica pel tractament de la RI. Un dels gens regulats

per PPAR β/δ és la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1), la qual regula el transport d'AG de cadena llarga (AGcL) al mitocondri i per tant, limita el procés de la β -oxidació mitocondrial. L'augment d'aquest procés sembla ser clau per evitar l'acumulació de mediadors lipídics i, com a conseqüència, la RI. De fet, s'ha demostrat que l'activació de l'oxidació dels AG mitjançant la sobreexpressió de CPT-1 *in vitro* (Sebastian i col., 2007) o *in vivo* (Bruce i col., 2009) millora la RI induïda pels lípids en cèl·lules musculars esquelètiques. Malgrat això, actualment es desconeix si els activadors de PPAR β/δ són capaços d'evitar la inflamació i la RI induïda per AG a través d'un possible increment de l'expressió i l'activitat de CPT-1.

És important destacar que no tots els AG es comporten de forma similar. Així, els AG saturats i els monoinsaturats difereixen en la seva contribució a la RI (Schmitz-Peiffer i col., 1999; Vessby i col., 2001). Vessby i col. (2001) van observar que dietes riques en AG monoinsaturats milloraven la sensibilitat a la insulina en comparació a dietes riques en AG saturats amb la mateixa quantitat de calories. Estudis previs del nostre grup també assenyalen que l'àcid gras monoinsaturat oleat, a diferència de l'àcid gras saturat palmitat, impedeix l'augment de l'expressió i la secreció de la IL-6 en cèl·lules musculars esquelètiques C2C12 (Jové i col., 2005a), però es desconeix si l'oleat pot prevenir la inflamació i la RI induïda per palmitat en aquestes cèl·lules i a través de quins mecanismes es porta a terme.

D'altra banda, les alteracions del metabolisme mitocondrial semblen jugar un paper clau en la patogènesi de la RI/DM2 (Boden i Shulman, 2002). De fet, el nostre grup (Jové i col., 2004) i d'altres (Mootha i col., 2003; Patti i col., 2003) han obtingut resultats que suggereixen que la RI es caracteritza per una reducció dels nivells de PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) en el múscul esquelètic. Aquest coactivador transcripcional dels PPARs regula l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes mitocondrials i gens implicats en el metabolisme dels AG (Finck i Kelly, 2006). De tota

manera, es desconeix si el procés inflamatori causat pels AGL en cèl·lules musculars esquelètiques afecta l'expressió de PGC-1 α i els mecanismes que hi estan implicats.

Com ja s'ha descrit, la inflamació causada per l'exposició de cèl·lules musculars als AGL es caracteritza per un augment de l'expressió de gens diana regulats per NF- κ B. Entre aquests gens cal destacar la ciclooxigenasa-2 (COX-2), també coneguda com a prostaglandina-endoperòxid sintetasa-2, la qual sintetitza prostaglandines (PGs) proinflamatòries i antiinflamatòries que poden modular els estats d'inflamació i, consegüentment, la RI. De fet, la inflamació crònica mediada per la COX-2 sembla estar involucrada en el desenvolupament de la RI, ja que la DM2 observada en Indis Pima ha estat associada a una variant del promotor del gen induïble COX-2 (Konheim i Wolford, 2003). A més, també s'ha relacionat la inflamació mediada per COX-2 i l'estrès oxidatiu amb la DM2 en homes ancians (Helmersson i col., 2004). En la mateixa línia, estudis recents mostren que aquesta inflamació crònica en el teixit adipós és crucial en l'aparició de RI lligada a l'obesitat (Hsieh i col., 2009). No obstant, un nombre creixent d'estudis assenyalen que les PGs poden dur a terme un rol protector durant la inflamació (Sandig i col., 2007). Concretament, algunes PGs augmenten durant la fase resolutive de la inflamació en models animals, tot alleujant aquest procés (Gilroy i Peretti, 2005; Trivedi i col., 2006; Shibata i col., 2002). Fins i tot s'ha constatat que una reducció de la producció de PGs a causa de deficiències genètiques o mitjançant l'administració d'inhibidors de la COX-2 poden empitjorar la inflamació (Gavett i col., 1999; Peebles i col., 2002; Hammad i col., 2003). Tanmateix, la inhibició de la COX-2 pot incrementar la disponibilitat de l'àcid araquidònic per ser transformat per la lipooxigenasa i la citocrom P450, i per modificacions enzimàtiques oxidatives (Inserte i col., 2009), fent que es sintetitzin un major nombre de compostos actius que poden modular el procés inflamatori. Així doncs, la COX-2 pot modular de forma diferent el procés inflamatori, tot i que actualment es desconeix quin paper juga en la inflamació i la RI induïda per lípids en cèl·lules musculars esquelètiques.

Totes aquestes dades mostren la presència d'una estreta relació entre la inducció del procés inflamatori per nivells elevats d'AGL i el desenvolupament de RI en cèl·lules musculars esquelètiques. En conseqüència, aprofundir en els mecanismes implicats en aquesta associació entre inflamació i RI induïda per AGL podria ser útil per a establir noves estratègies en la prevenció i el tractament d'aquest procés.

INTRODUCCIÓ



1. METABOLISME DE LA GLUCOSA

La insulina és una hormona sintetitzada per les cèl·lules β pancreàtiques que s'allibera en resposta a un increment dels nivells circulants de glucosa i amino àcids després d'una ingesta. La seva funció principal és mantenir les concentracions sanguínies de glucosa dins uns límits bastants estrets (90-110 mg/dl) per tal d'assegurar un equilibri precís entre l'entrada de glucosa al torrent sanguini i la captura d'aquesta per part d'òrgans com el cervell, el fetge, el múscul i el teixit adipós. El manteniment de la homeòstasi glucídica per part de la insulina es realitza a diferents nivells: a) al fetge, reduint la producció hepàtica de glucosa (tot disminuint la gluconeogènesi i la glicogenòlisi) i b) incrementant la captació de glucosa, principalment al múscul esquelètic i al teixit adipós (Shulman, 2000).

El transport de glucosa a l'interior de les cèl·lules musculars és estimulat per la insulina, la qual afavoreix la translocació del transportador de la glucosa 4 (GLUT4) des de les vesícules intracel·lulars, on s'emmagatzema, a la membrana plasmàtica (Gumà i col., 1995). El pas que limita la utilització i emmagatzematge de la glucosa és doncs, la seva captació. Un cop a l'interior de la cèl·lula, la glucosa és fosforilada per l'enzim hexocinasa i posteriorment pot ser oxidada per generar energia o bé emmagatzemada en forma de glicogen (glicogènesi).

La síntesi de glicogen al múscul és la via principal del metabolisme de la glucosa, de manera que un defecte en aquesta activitat pot ser la responsable de l'aparició de RI (Roden i col., 2001; Bokhari i col., 2009). En els adipòcits, la insulina

inhibeix la lipòlisi i afavoreix l'emmagatzematge de la glucosa en forma de TG (lipogènesi) (Sesti i col., 2006).

1.1. VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA INSULINA

El **receptor de la insulina** és una glicoproteïna amb una estructura tetramèrica $\alpha_2\beta_2$ estabilitzada mitjançant enllaços disulfur que pertany a la família dels receptors amb activitat intrínseca tirosina cinasa (RTK) (Hubbard i Till, 2000). Des de que a principis dels 70 es va demostrar que la insulina actuava mitjançant la unió a un receptor situat a la membrana plasmàtica, ja es va suggerir que les alteracions de la sensibilitat a la insulina observades en l'obesitat, la RI i la DM2 podien ser conseqüència d'una disminució de la concentració o de l'afinitat d'aquesta hormona per al seu receptor.

L'acció de la insulina s'inicia quan aquesta s'uneix a la subunitat α extracel·lular del seu receptor i estimula l'autofosforilació de múltiples residus tirosina que es troben a la porció citoplasmàtica de la subunitat β transmembrana (De Meyts i Whittaker, 2002) (Figura 1). Una vegada activat, el receptor recluta i fosforila diversos substrats intracel·lulars entre els quals cal destacar el **Substrat del Receptor de la Insulina 1 i 2** (IRS-1 i IRS-2). Posteriorment IRS-1 i IRS-2 s'uneixen a proteïnes amb dominis SH2 com les subunitats reguladores de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K): p85, p55, p50 i p55^{PIK}, les tirosina cinases Fyn i Csk, la tirosina fosfatasa SH-PTP2 i les proteïnes d'unió a factors de creixement Crk, Nck i Grb-2, la darrera de les quals pot activar la via de les proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Sesti i col., 2001).

La via d'interès en aquest treball, de la qual es parlarà a continuació, és la que involucra la **PI3-K**. L'activació de la PI3-K dóna lloc a la formació del lípid fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) que activa una cascada de proteïnes cinases, la primera de les quals és la proteïna cinasa dependent de fosfatidilinositol (PDK). A continuació, aquesta pot fosforilar dos tipus de serina/treonina cinases, l'**Akt** (també coneguda com a proteïna cinasa B (PKB)) i les isoformes ζ i λ de la **proteïna cinasa C** (PKC- ζ/λ). L'Akt regula la translocació del **transportador GLUT4** a la membrana plasmàtica fent que augmenti la captació de glucosa en resposta a la insulina (Welsh i col., 2005). Paral·lelament a l'Akt, les PKCs ζ/λ també poden controlar la translocació de GLUT4 (Beeson i col., 2004).

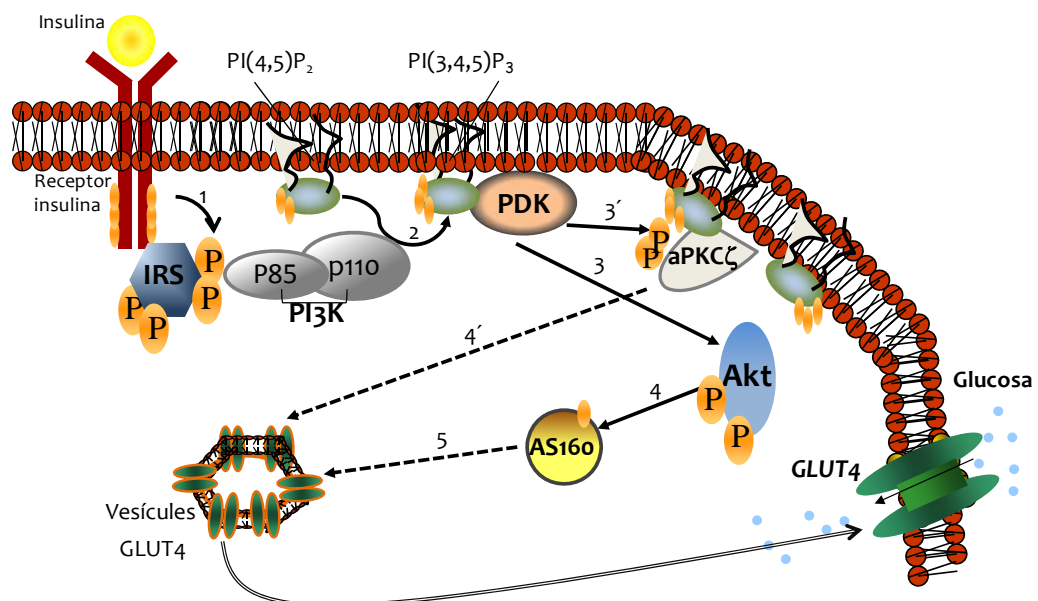


Figura 1. Esquema de la via de senyalització de la insulina. La insulina s'uneix al seu receptor i l'activa, iniciant una sèrie de fosforilacions que permetran que les vesícules del transportador de la glucosa (GLUT4) transloquin a la membrana i permetin l'entrada de glucosa a la cèl·lula.

S'ha proposat també una via independent de PI3-K que estimularia el transport de glucosa mitjançant la unió de proteïnes relacionades amb el protooncogen Cbl i el

receptor de la insulina, tot i que estudis recents han posat en dubte la seva importància, ja que experiments realitzats amb animals *knockout* per diferents components de la via no aconseguen afectar la translocació de GLUT4 (Molero i col., 2004).

1.2. IMPLICACIÓ DE DIFERENTS PROTEÏNES EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA INSULINA

A continuació es descriuen amb més detall algunes de les proteïnes que conformen la via de senyalització de la insulina que es poden veure afectades en estats de RI.

1.2.1. IRS

Les proteïnes IRS regulen nombrosos processos biològics com ara el control del metabolisme de la glucosa, la síntesi de proteïnes i la diferenciació, creixement i supervivència cel·lular.

Malgrat no tenir activitat catalítica intrínseca posseeixen nombrosos dominis d'interacció i motius de fosforilació. S'han identificat fins a sis membres d'aquesta família: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5 i IRS-6. IRS-1 i IRS-2 s'expressen àmpliament, mentre que l'expressió de IRS-4 es limita al timus, cervell, ronyó i a les cèl·lules β (Uchida i col., 2000). Per la seva banda, IRS-3 no ha estat identificat en el genoma humà, però en rosegadors s'expressa en teixit adipós i realitza una funció similar a IRS-1 (White, 2002).

Totes aquestes proteïnes tenen un domini d'unió PH (*pleckstrin homology*) i un domini PTB (*phosphotyrosine-binding*) a l'extrem amino-terminal que els permet unir-se específicament als receptors de la insulina i dominis de fosforilació a l'extrem

carboxi-terminal (White, 2002). La fosforilació en els múltiples residus tirosina de l'extrem carboxi terminal permeten l'activació de la transmissió de senyals intracel·lulars originats per la insulina (Thirone i col., 2006). IRS-1 i IRS-2 contenen fins a 20 residus tirosina que poden ser fosforilats. Molts dels residus de tirosina formen grups que fan possible la unió i possiblement l'activació de proteïnes efectores específiques com l'enzim PI3-K o molècules adaptadores com Grb2 entre d'altres (White i col., 2002). La localització cel·lular de les IRSs també varia en funció del subtipus, així mentre que IRS-1 i IRS-2 es troben unides a estructures intracel·lulars, IRS-3 i IRS-4 es troben unides a la membrana plasmàtica (Thirone i col., 2006).

De totes les proteïnes IRS, IRS-1 i IRS-2 són les més directament implicades en la regulació de l'homeòstasi glucídica (Cai i col., 2003) i, per tant, són les que es descriuran a continuació. El primer membre de la família que es va identificar fou **IRS-1** en cèl·lules d'hepatoma, encara que posteriorment s'ha vist que a més del fetge també s'expressa en múscul, teixit adipós i illots pancreàtics. Té un pes molecular de 132 kDa, malgrat que en gels d'electroforesi migra al voltant de 185 kDa a causa de les nombroses fosforilacions que pot patir (Araki i col., 1994a).

Els processos més importants que regulen l'activació de la IRS-1 són: l'acció de les serina/treonina cinases, la degradació de la mateixa IRS-1, que quan té lloc sembla promoure la RI a llarg termini i la defosforilació per acció de les fosfatases. S'han identificat nombrosos residus serina/treonina susceptibles de fosforilació, però només s'han caracteritzat les funcions d'alguns (Figura 2). Així, la posició Ser 1223 presenta una modulació positiva de IRS-1 (Luo i col., 2005), la posició Ser 323 (Ser 318 en rosegadors) pot tenir una funció positiva o negativa (Weigert i col., 2005b) i en canvi la fosforilació en posició Ser 312 (Ser 307 en ratolí) impedeix l'associació del receptor de la insulina a aquesta proteïna inhibint-ne la fosforilació en tirosina i, per tant, l'activació (Aguirre i col., 2002). A més, els nivells elevats de TNF- α també

incrementen la fosforilació en Ser 312 de IRS-1 (Hotamisligil i col., 1996), fet que ha portat a establir una relació entre la inflamació i la RI (Yu i col., 2002).

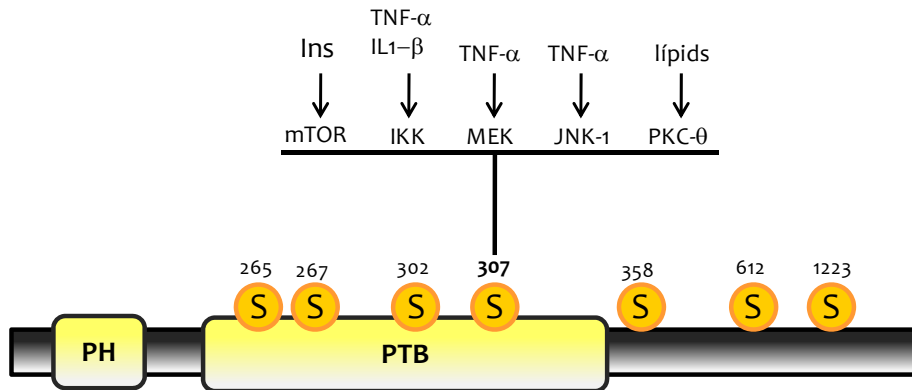


Figura 2. Esquema on es mostren alguns dels residus serina de la proteïna IRS-1 implicats en la regulació de la via de senyalització de la insulina, especificant els factors que poden induir la fosforilació en la posició serina 307 (Ser 312 en humans).

D'altra banda, la **IRS-2** fou identificada com el substrat del receptor de la insulina alternatiu en fetge i múscul de ratolins *knockout* de IRS-1 (Araki i col., 1994b). La IRS-2 s'expressa als mateixos teixits que la IRS-1, tot i que la IRS-1 sembla jugar un paper més important en el metabolisme de carbohidrats i lípids mediat per la insulina en múscul esquelètic. La proteïna IRS-2, en canvi, tindria més transcendència en fetge i teixit adipós (Previs i col., 2000). A l'extrem amino-terminal, el 75% d'amino àcids que conformen la IRS-2 són idèntics a la IRS-1, mentre que a l'extrem carboxi-terminal només comparteixen un 35% d'homologia. De tota manera, els aproximadament 20 llocs de fosforilació en tirosina presents en la IRS-1 també s'observen en IRS-2 amb característiques molt similars (Cai i col., 2003). Aquesta similitud suggeriria que possiblement realitzen funcions redundants, però en realitat s'han observat diferències en la localització subcel·lular (Inoue i col., 1998), cinètica

d'activació/desactivació i tant en la interacció amb el receptor de la insulina (Sawka-Verhelle i col., 1996) com amb d'altres proteïnes (Inoue i col., 1998).

Estudis realitzats amb ratolins *knockout* IRS-1 i IRS-2 han ajudat a discernir el paper que desenvolupa cadascun dels dos subtipus. Així, s'ha observat una disminució del transport de glucosa en resposta a la insulina en múscul esquelètic (Yamauchi i col., 1996) i teixit adipós (Tamemoto i col., 1994) de ratolins deficientes en IRS-1. En canvi en ratolins IRS-2^{-/-} s'ha observat que l'expressió d'aquesta proteïna no és necessària per a l'estimulació del transport de la glucosa en el múscul esquelètic. L'aparició de RI en el múscul de ratolins IRS-2^{-/-} no és conseqüència d'un defecte en el transport de la glucosa, sinó d'un estat de RI hepàtica que provoca hiperglucèmia en ratolins d'entre 8 i 10 setmanes de vida (Higaki i col., 1999). Resultats semblants s'han obtingut en miotubs L6, on s'ha suggerit que mentre que IRS-1 regula la remodelació de l'actina, la fosforilació d'Akt-1 i Akt-2, la translocació de GLUT4 i la captació de glucosa, IRS-2 regula l'activació d'Akt-2 i la via ERK (*Extracellular Regulated Kinase*), però gairebé no juga cap paper en la captació de glucosa (Thirone i col., 2006).

1.2.2. FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASA

La PI3-K és una proteïna heterodimèrica composta per una subunitat reguladora de 85 kDa (p85) i una subunitat catalítica de 110 kDa (p110) que es pot activar per acció de la insulina (Cross i col., 1997). Un cop activa, la PI3-K converteix el fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-fosfat (PI(4)P) i el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PI(4,5)P₂) de la membrana plasmàtica a PI(3)P, PI(3,4)P₂ i PI(3,4,5)P₃, respectivament (Cantley, 2002). La senyalització induïda pel PI(3,4,5)P₃ finalitza quan es defosforila per diferents tipus de fosfatases (Cantley i col., 2002).

La subunitat p85 de la PI3-K conté dominis SH2 que s'uneixen a IRS-1 fosforilada en tirosina i n'indueixen l'activació (Sun i col., 1993). Una vegada activada, la subunitat p110 és qui fosforila al seu substrat fisiològic, el PI(4,5)P₂, produint PI(3,4,5)P₃, que pot mediar accions com l'estimulació del creixement cel·lular, la regulació de la supervivència cel·lular i el metabolisme de la glucosa (Cengel i col., 1998). De fet, la PI3-K és considerada una peça clau en l'estimulació del transport de la glucosa en resposta a la insulina en el múscul esquelètic (Lee i col., 1995).

Existeixen tres classes diferents de la subunitat catalítica de l'enzim PI3-K (classe I, classe II i classe III) que es classifiquen en funció de l'especificitat del substrat, l'estructura i la regulació *in vitro* (Vanhaesebroeck i col., 1997). Dins la classe I, les subunitats catalítiques es poden subdividir en dues subclasses (IA i IB) en funció del tipus de subunitat adaptadora a la qual s'uneixin. En cèl·lules de mamífer només la classe IA regula el metabolisme i el creixement cel·lular a través de l'acció de la insulina (Saltiel i Kahn, 2001). Les subunitats catalítiques d'aquesta subclasse es designen com a p110 α , p110 β i p110 δ . Les dues primeres s'expressen de manera ubiqua i juguen un paper important en la senyalització de la insulina, mentre que la subunitat δ només s'expressa en cèl·lules hematopoietiques (Shepherd i col., 1998). Pel que fa a les subunitats reguladores, provenen de tres gens diferents: p85 α , p85 β i p85 γ .

Per estudiar millor els efectes de la PI3-K, Luo i col. (2006) generaren ratolins *knockout* per la subunitat reguladora p85 α/β en el múscul esquelètic i observaren una reducció significativa del pes del múscul, la mida de les fibres musculars i l'aparició de RI. L'eliminació de la subunitat p85 també s'associa amb una reducció de la fosforilació de la proteïna Akt (Frost i Lang, 2007), la qual constitueix el següent pas de la via de senyalització de la insulina.

1.2.3. AKT/PKB

La família de proteïnes serina-treonina cinasa Akt se la coneix per ser un mediador molt important de les funcions biològiques de la insulina (Zdychova i Komers, 2005). El genoma de mamífer conté tres gens de l'Akt: Akt-1 (PKB- α), Akt-2 (PKB- β) i Akt-3 (PKB- γ). De les tres isoformes, l'Akt-2 és la que s'expressa majoritàriament al múscul esquelètic (Altomare i col., 1998), tot i que igual que l'Akt-1 també es troba al timus, cervell, cor i pulmó. Pel que fa a la isoforma Akt-3 predomina al cervell i testicles i, de manera més moderada, al múscul esquelètic. S'ha descrit que l'**Akt-1** està involucrada en la regulació del metabolisme de lípids (Bouzakri i col., 2006), l'activació de la síntesi de glicogen al múscul esquelètic i la mediació de l'acció de la insulina al teixit adipós (Jiang i col., 2003). L'**Akt-2** en el múscul esquelètic, en canvi, es creu que està més involucrada en el transport de la glucosa mediat per la insulina (Cleasby i col., 2007). De fet, estudis anteriors realitzats per Cho i col. (2001) mostren que ratolins Akt-2^{-/-} desenvolupen un fenotip similar a l'observat en la DM2 i d'altres estudis realitzats en humans insulino-resistents confirmen que és l'Akt-2, i no l'Akt-1, la isoforma implicada en l'alteració de la via de la insulina en el múscul esquelètic d'aquests individus (Brozinick i col., 2003). De tota manera hi ha controvèrsia en relació a aquest fet, ja que d'altres treballs realitzats en cèl·lules musculars de rata L6 mostren que la isoforma responsable de la captació de glucosa i la síntesi de glicogen és l'Akt-1, i no pas l'Akt-2 (Palanivel i col., 2006).

Les proteïnes Akt tenen un domini PH amb una alta afinitat d'unió al PI(3,4,5)P₃ que promou la translocació de la proteïna a la membrana (Bellacosa i col., 1998). Unides a la membrana plasmàtica s'hi troben les proteïnes cinases depents de PI 1 i 2 (PDK-1 i PDK-2), les quals fosforilen l'Akt en la posició treonina 308 i serina 473

respectivament (Welsh i col., 2005) (Figura 3). La fosforilació en Thr 308 és necessària per a l'activació de la proteïna, mentre que la fosforilació en Ser 473 li proporciona la màxima activació (Downward, 1998). Un cop activada, l'Akt pot promoure la captació de glucosa en el múscul esquelètic en resposta a la insulina, regular la supervivència i la diferenciació cel·lular, la síntesi de glicogen, la síntesi de lípids i proteïnes i la transcripció de gens (Zdychova i col., 2005).

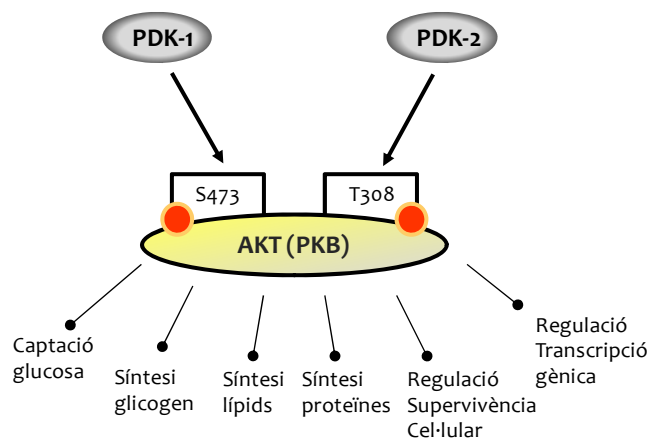


Figura 3. Activació de la proteïna Akt mediada per PDK-1 i PDK-2.

D'altra banda, la inactivació de l'Akt té lloc per defosforilació mitjançant la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) o bé pel bloqueig de l'activació mitjançant productes com ara les ceramides (Teruel i col., 2001).

1.2.4. PKCs

La família de les PKCs està implicada en moltes vies de senyalització, creixement i diferenciació cel·lular (Buchner, 1995). Existeixen 12 serina/treonina

cinases d'aquesta família que es divideixen en tres subgrups en funció de la seva sensibilitat al calci i als lípids. Les PKCs clàssiques (PKC- α , β I, β II i γ) són activades per la fosfatidilserina, Ca^{2+} , DAG o l'anàleg sintètic del DAG (PMA, *phorbol 12-myristate 13-acetate*). Les PKCs noves (PKC- δ , ϵ , η , θ i μ) són independents de Ca^{2+} però requereixen DAG per ser activades. Finalment, les PKCs atípiques (PKC- ζ , ι , λ) no requereixen Ca^{2+} ni DAG per ser activades, tot i que se sap que la PKC ζ , per exemple, és activada per altres lípids com els fosfatidilinositols, l'àcid fosfatídic, l'àcid araquidònic i les ceramides. En estat quiescent, les PKCs es troben al citoplasma i un cop activades migren a la membrana plasmàtica, nucli o a altres orgànuls on portaran a terme la seva acció (Sampson i Cooper, 2006). D'altra banda, l'activitat i la localització intracel·lular d'aquestes cinases també és controlada per la fosforilació de tres llocs altament conservats en el domini catalític (Cenni i col., 2002). La proteïna PDK-1 ha estat descrita com la cinasa responsable de fosforilar alguns d'aquests residus de les PKCs clàssiques, noves i atípiques (Toker i Newton, 2000). La fosforilació de les PKCs clàssiques i noves, juntament amb la disponibilitat de missatgers secundaris com el DAG, permeten la seva translocació a la membrana i la seva màxima activació (Gao i col., 2001).

Els principals teixits diana per a l'acció de la insulina (múscul esquelètic, fetge i teixit adipós) expressen les isoformes α , β I i β II de les PKCs clàssiques, les δ i θ de les PKCs noves i les ζ i λ de les atípiques, fet que ha portat a relacionar-les amb els efectes metabòlics de la insulina (Sampson i Cooper, 2006).

1.2.5. TRANSPORTADORS DE LA GLUCOSA

Els nivells de glucosa en sang cal que es mantinguin dins uns marges estrets, és per això que una de les funcions de la insulina és mantenir aquesta homeòstasi

glucídica. Hi ha tres processos involucrats en la regulació dels nivells plasmàtics de glucosa: la utilització de glucosa per part dels teixits perifèrics, la producció d'aquesta per part del fetge i la secreció d'insulina que realitzen les cèl·lules β pancreàtiques. Però per tal que la glucosa pugui ser captada pels teixits calen proteïnes transportadores que facilitin el pas d'aquestes molècules cap a l'interior de les cèl·lules. Existeixen dos tipus de transportadors: els transportadors dependents de sodi (SLGT) que es localitzen a l'intestí i ronyó i permeten l'entrada conjunta de sodi i glucosa en contra de gradient de concentració, i els transportadors de la família GLUT, els quals transporten glucosa a favor de gradient de concentració (Shepherd i Kahn, 1999).

Actualment es coneixen 13 membres de la família GLUT, dividits en tres classes: Classe I (GLUTs 1-4) que són transportadors de glucosa, Classe II (GLUTs 5,7,9 i 11) que són transportadors de fructosa i Classe III (GLUTs 6,8,10,12 i HMIT1) poc coneguda fins el moment (Bryant i col., 2002). D'aquests, el **GLUT4** és el transportador de glucosa dependent d'insulina més important i es localitza principalment al múscul esquelètic i teixit adipós (Mueckler, 2001).

A diferència de teixits com el cervell, on la demanda de glucosa és constant, el múscul esquelètic necessita una regulació acurada del transport de carbohidrats que li permeti incrementar la captació de glucosa ràpidament enfront determinats estímuls (exercici, ingesta d'aliments) (Bryant i col., 2002). És per això que, en absència d'estímuls, el GLUT4 es troba emmagatzemat a l'interior cel·lular en diversos compartiments però interrelacionats entre si, com a la xarxa trans-Golgi, vesícules recobertes de clatrina i endosomes (Rea i James, 1997), tot i que on s'emmagatzema una major quantitat de GLUT4 és en vesícules d'emmagatzematge de GLUT4 (*GLUT4 Storage Vesicles*, GSV) situades al citoplasma i molt properes a la membrana plasmàtica.

La quantitat de GLUT4 exposat a la membrana de les cèl·lules musculars esquelètiques en condicions basals és només d'un 5-10% del total, però en pocs minuts pot passar a ser del 20-50% per acció de la insulina (Antonescu i col., 2009).

Existeixen almenys dues vies de senyalització induïdes per la insulina implicades en la translocació de les vesícules de GLUT4 cap a la membrana: la via dependent de PI3-K i la via independent de PI3-K, tot i que altres reguladors poden induir la translocació de GLUT4 a la membrana, com la hipòxia, l'exercici i/o la contracció del múscul esquelètic (Goodyear i Kahn, 1998). Nombrosos estudis han observat que la contracció i altres agents activadors de la cinasa activada per AMP (AMPK) indueixen la fosforilació d'una proteïna, l'AS160, que podria regular la translocació de les vesícules de GLUT4 a la membrana (Deshmukh i col., 2006). D'altres autors també indiquen que l'AS160 és un substrat de l'Akt i constituiria el pas intermedi entre l'activació de l'Akt i la translocació de les vesícules de GLUT4 (Sano i col., 2003).

El transportador GLUT4 juga un paper molt important en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa de tot el cos. De fet, la translocació de GLUT4 a la membrana és el primer pas limitant per a la utilització de la glucosa al múscul esquelètic i al teixit adipós (Fink i col., 1992) i alteracions en el transport d'aquest carbohidrat són clau per al desenvolupament de la DM2 (Shepherd i Kahn, 1999).

2. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

De la mateixa manera que alteracions de la via de la insulina poden afectar l'homeòstasi glucídica i promoure l'aparició de RI i DM2, les alteracions del metabolisme dels AG també contribueixen a l'aparició d'aquestes patologies. Des de fa anys es coneix que increments de la concentració d'AGL al plasma estan estretament relacionats amb estats d'obesitat i DM2 (Reaven i col., 1988; Boden i col., 1994). En individus obesos o diabètics, la lipòlisi al teixit adipós està augmentada a causa de la resistència a l'acció de la insulina en aquest teixit (Blaak, 2005). Aquesta disponibilitat tan alta d'AGL a teixits com el fetge i el múscul esquelètic podrien induir o agravar la RI (Hegarty i col., 2003; Dobbins i col., 2001).

En individus sans, la lipòlisi és imprescindible per proporcionar AGL als teixits no dependents de glucosa perquè obtinguin l'energia necessària en estats de dejuni i exercici de moderada o baixa intensitat (Cahill, 2006; Horowitz, 2003). Al mateix temps, els AGL són importants nutrients que representen el principal combustible pel cor i el múscul en repòs. De fet, el múscul esquelètic és el teixit on hi ha una major oxidació d'AG i una correcta regulació d'aquest metabolisme és clau per evitar el desenvolupament de malalties cardiovasculars, RI, obesitat i DM2 (Frayn i col., 1996). El teixit muscular esquelètic està compost per dos tipus de fibres que tenen un perfil contràctil i metabòlic diferent. Les fibres tipus I o lentes (també anomenades vermelles) són les que oxiden AG de manera preferent, mentre que les de tipus II són més contràctils i oxiden preferentment glucosa (Fluck i Hoppeler, 2003). L'entrada dels AGL a l'interior cel·lular, bé per difusió passiva o per transportadors, és un pas clau en el metabolisme dels AG. Un cop a l'interior de la cèl·lula, els AG poden ser oxidats al mitocondri o bé poden acumular-se en forma de TG o de metabolits intermediaris com DAG o ceramides. Els AG també poden regular el seu propi metabolisme a través de l'activació de receptors nuclears com els PPARs, ja que són lligands naturals

d'aquests factors de transcripció que estan relacionats amb el control de gens del metabolisme lipídic (Moller i Berger, 2003). Diversos estudis suggereixen que el desequilibri en algun d'aquests processos, com una elevada captació d'AGcL o alteracions en la seva oxidació, provoquen l'acumulació intramiocel·lular dels AG en forma de metabolits lipídics que poden afectar la via de senyalització de la insulina i provocar el desenvolupament de RI i inflamació (Adams i col., 2004; Yu i col., 2002).

A més del seu paper en la generació d'energia, els AG contribueixen a la síntesi de fosfolípids, són precursors de les prostaglandines, són importants mediadors implicats en la inflamació, així com també tenen un paper destacat en el funcionament del sistema nerviós i la transmissió sinàptica.

2.1. TRANSPORT DELS ÀCIDS GRASSOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

Els AG circulen pel plasma units a l'albumina i poden entrar a l'interior de les cèl·lules per difusió passiva a través de la bicapa lipídica o mitjançant un transport facilitat per proteïnes.

Per la seva naturalesa lipofílica, tots els AG poden travessar la membrana plasmàtica independentment de la llargada de la cadena, fet que dona suport a la teoria que el transport d'aquestes molècules es fa per difusió passiva o *flip-flop* (Hamilton i col., 2001). No obstant, diferents estudis han observat diferències en les taxes de transferència d'AG de cadena llarga ($C > 14$) a través de la membrana (Hamilton i col., 1999), fet que evidencia un sistema alternatiu al *flip-flop* per a l'entrada d'aquestes molècules a l'interior cel·lular (Kleinfeld, 2000). A més, en determinats teixits i tipus cel·lulars els AGcL poden mediar els seus efectes a través

dels receptors acoplats a proteïnes G (GPRs) o els receptors TLR sense necessitat d'entrar dins la cèl·lula (Li i col., 2004; Steneberg i col., 2005).

Existeixen tres tipus de proteïnes transportadores: les proteïnes transportadores d'AG (*Fatty Acid Transport Protein*, FATP), les translocadores d'AG (*Fatty Acid Translocase*, FAT/CD36) i les proteïnes d'unió als AG (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP).

2.1.1. FATP

La família FATP consta de sis proteïnes integrals de membrana d'entre 70 i 80 kDa anomenades FATP1, FATP2, FATP3, FATP4, FATP5 i FATP6 (Hirsch i col., 1998). Totes elles s'expressen en teixits on hi ha una gran captació d'AG i un metabolisme lipídic molt actiu i poden ser regulades per hormones (p.ex. insulina), nutrients, endotoxines, el TNF- α i per agonistes de PPAR α i PPAR γ (Doege i Stahl, 2006; Stahl, 2004; Martin i col., 1997).

La isoforma FATP1 s'expressa majoritàriament en teixit adipós i en les fibres musculars oxidatives (*soleus*), on s'expressa dues vegades més que en les fibres glicolítiques (*gastrocnemius*) (Marotta i col., 2004). La seva localització és intracel·lular, però pot translocar-se a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina per dur a terme la captació d'AG (Wu i col., 2006). Al mateix temps FATP1 té activitat intrínseca acil-CoA sintetasa amb una gran especificitat tant pels AG de cadena molt llarga com pels AGcL (Hall i col., 2003; Coe i col., 1999). La isoforma FATP4 s'expressa en teixit adipós, cor i múscul esquelètic. Pel que fa a la resta d'isoformes, FATP2 s'expressa en fetge i ronyó (Mihalik i col., 2002), FATP3 en pulmó, còrtex adrenal, ovari i testicles (Pei i col., 2004), FATP5 s'expressa exclusivament al fetge i FATP6 ho fa majoritàriament al cor (Gimeno i col., 2003).

2.1.2. FAT/CD36

La proteïna FAT/CD36 és una glicoproteïna integral de membrana de 88 kDa clau pel transport d'AGcL i el metabolisme cel·lular (Febbraio i col., 2001). És per aquest motiu que s'expressa al múscul (més en les fibres oxidatives que en les glicolítiques) (Bonen i col., 1999), teixit adipós i intestins. De la mateixa manera que FATP1, l'expressió d'aquest transportador és regulat per factors implicats en el desenvolupament, metabolisme i nutrició (Hajri i Abumrad, 2002). Concretament, en múscul, la seva expressió està regulada per agonistes PPAR α i PPAR γ (Cha i col., 2001; Motojima i col., 1998). Estudis realitzats en cor i múscul esquelètic mostren que, de manera puntual, es pot regular l'entrada d'AG a la cèl·lula permetent la translocació de FAT/CD36 des dels reservoris intracel·lulars, on es troba emmagatzemat, fins a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina i a la contracció muscular (Luiken i col., 2003; Luiken i col., 2002). D'altres estudis realitzats amb ratolins *knockout* FAT/CD36 corroboren la implicació d'aquest transportador en el metabolisme lipídic, doncs aquests animals mostren una reducció significativa de la captació d'AGcL (Febbraio i col., 1999).

2.1.3. FABPpm

A diferència dels transportadors comentats anteriorment, aquesta no és una proteïna transmembrana, sinó una proteïna de 40 kDa associada a la membrana plasmàtica de molts teixits, inclosos el fetge, teixit adipós, cor, intestí i múscul esquelètic (preferentment a les fibres oxidatives) (Turcotte i col., 1997). No obstant això, en alguns teixits com el múscul esquelètic, també es localitza al mitocondri. La translocació de FABPpm és induïda per contraccions musculars, però no per la insulina (van Oort i col., 2009; Chabowski i col., 2004). D'altra banda, l'expressió

gènica és regulada pels AG provinents de la dieta i les contraccions musculars, possiblement a través d'un mecanisme mediat per PPARs (Benton i col., 2006a).

2.2. EL MITOCONDRI I L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

Una vegada els AG han travessat la membrana plasmàtica han de ser activats a acil-CoAs a través de l'acil-CoA sintetasa (ACS) per posteriorment poder ser: a) oxidats pel mitocondri, b) emmagatzemats en forma de TG o c) hidrolitzats altra vegada per la tioesterasa citosòlica (CTE).

En cas que els AG siguin oxidats, cal que el transportador carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1) permeti el seu pas a l'interior del mitocondri. Els mitocondris són orgànuls que es troben al citoplasma de les cèl·lules eucariotes en major o menor nombre segons el teixit. Estan formats per compartiments que duen a terme funcions especialitzades amb la finalitat de generar energia per a la cèl·lula en forma de trifosfat d'adenosina (ATP). Concretament al múscul, els mitocondris desenvolupen un paper clau en el metabolisme energètic.

2.2.1. β -OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

La β -oxidació mitocondrial és la responsable de la degradació d'AG de cadena curta ($<C_8$), intermitja (C_8-C_{12}) o llarga ($C_{12}-C_{20}$) i contribueix a la producció d'ATP via fosforilació oxidativa. En cada cicle d'oxidació s'escurça la cadena de l'AG i s'allibera una molècula d'acetil-CoA i cofactors reduïts (NADH i $FADH_2$) (Reddy i Hashimoto, 2001).

2.3. REGULACIÓ ENZIMÀTICA DEL METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

La regulació del metabolisme dels AG la realitzen diferents mecanismes en funció de la situació davant la qual es trobi el múscul esquelètic. En aquest apartat es descriurà la regulació enzimàtica que porten a terme la carnitina palmitoiltransferasa (CPT), l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) i la proteïna cinasa activada per l'AMP (AMPK) per aconseguir un bon control del metabolisme lipídic.

2.3.1. CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA (CPT)

El mitocondri consta de dues membranes, la membrana externa i la membrana interna. La membrana externa és permeable als acil-CoA però la membrana interna no, de manera que cal un sistema de transport per permetre l'entrada dels AGcL al seu interior. Aquest sistema de transport és dependent de carnitina i consta de tres proteïnes: 1) la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), 2) l'acil carnitina translocasa (CACT) i 3) la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT-2) (Figura 4).

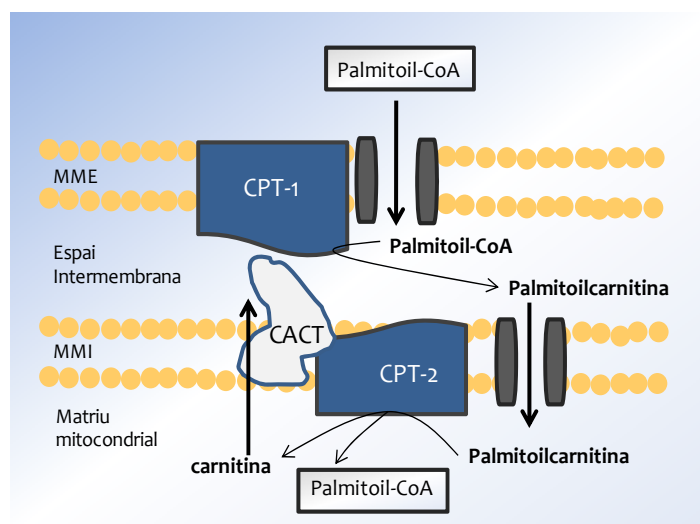


Figura 4. Sistema de transport dels AGcL a l'interior del mitocondri mitjançant la CPT-1, CACT i CPT-2. MME:membrana mitocondrial externa. MMI:membrana mitocondrial interna.

La **CPT-1** és un enzim transmembrana situat a la membrana mitocondrial externa que és limitant en la β -oxidació dels AGcL (Ruderman i Saha, 2006). S'encarrega de formar acilcarnitina a partir dels acil-CoA i carnitina, fent que els AG puguin travessar la membrana mitocondrial interna (MMI) (McGarry i Brown, 1997).

Una vegada a l'interior, l'acilcarnitina és reconvertida a acil-CoA per la CPT-2, situada a la MMI. Existeixen dues isoformes de la CPT-1, la isoforma del fetge (L-CPT-1 o CPT-1 α) i la del múscul (M-CPT-1 o CPT-1 β), les quals tenen diferents propietats cinètiques i reguladores. S'ha descrit que la M-CPT-1 és més sensible a la inhibició per part del malonil-CoA que no pas la isoforma del fetge (McGarry i Brown, 1997). A diferència de la CPT-1, la CPT-2 no té un paper regulador en la captació d'AG per part del mitocondri (Kerner i Hoppel., 2000). Hi ha estudis que confirmen la importància de CPT-1 en múscul esquelètic de rata, on es mostra que la sobreexpressió d'aquest enzim incrementa l'oxidació dels AG impedit que s'acumulin a l'interior de la cèl·lula (Bruce i col., 2009). Un dels reguladors més importants de l'activitat de la CPT-1 és la concentració de malonil-CoA.

2.3.2. ACETIL-CoA CARBOXILASA i MALONIL-CoA

El malonil-CoA està estretament lligat a la regulació del metabolisme lipídic per ser un potent inhibidor de la CPT-1. El fet que s'impedeixi l'entrada d'acil-CoAs a l'interior del mitocondri fa que es redueixi la taxa d'oxidació d'AG i s'incrementi la síntesi de TG i DAG (Wakil i Abu-Elheiga, 2009). L'enzim responsable de la formació de malonil-CoA a partir d'acetil-CoA és l'acetil Co-A carboxilasa (ACC). L'acetil-CoA és producte de la β -oxidació dels AG, fet que el posiciona com un intermediari clau en el metabolisme dels carbohidrats, lípids i aminoàcids.

En mamífers existeixen dues isoformes de la ACC, la ACC-1 o ACC- α i la ACC-2 o ACC- β . La **ACC-1**, tot i que s'expressa de manera ubiqua, es troba en major

quantitat al citosol de teixits lipogènics com el fetge i l'adipós, mentre que la ACC-2 s'expressa majoritàriament en fetge i múscul i s'associa al mitocondri (Abu-Elheiga i col., 1997; Abu-Elheiga i col., 2000). La isoforma **ACC-2** és qui genera el malonil-CoA encarregat de regular l'activitat CPT-1 i, per tant, la β -oxidació mitocondrial, mentre que la ACC-1 genera el malonil-CoA que s'utilitza per a la síntesi d'AG (Abu-Elheiga i col., 2000). De fet, la taxa d'oxidació d'AG en ratolins ACC-2^{-/-} és major que en ratolins control, fet que indica que només el malonil-CoA generat per la isoforma ACC-2 controla la β -oxidació (Oh i col., 2005; Choi i col., 2007).

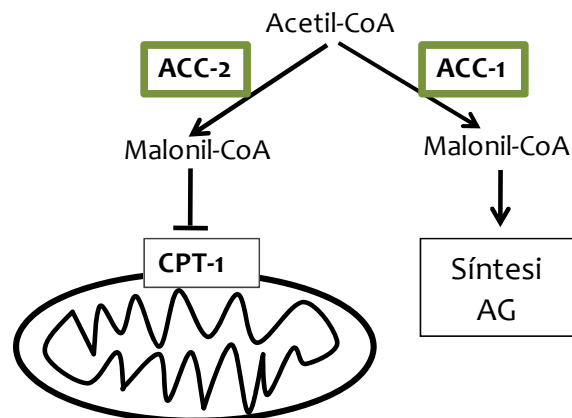


Figura 5. Els enzims ACC-1 i ACC-2 són els responsables de la síntesi de malonil-CoA a partir d'acetil-CoA. El malonil-CoA sintetitzat per l'ACC-1 està relacionat amb la síntesi d'AG, mentre que el sintetitzat per la ACC-2 inhibeix l'activitat CPT-1.

Totes dues isoformes estan sota el control de nombrosos promotors, els quals estan regulats per la dieta i hormones. Així, una dieta lliure de greixos indueix la síntesi i l'activitat de l'enzim ACC, mentre que el dejuni o la diabetis en redueixen l'expressió i l'activitat (Kim, 1997). D'entre els factors de transcripció clau en el control d'ACC destaquen els PPARs i el seu coactivador PGC-1, FOXO (*forkhead box*) i SREBP1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) (Barber i col., 2005). Altres factors que poden regular l'activitat de l'ACC són el citrat i els AGcL (de manera al·lostèrica) i la

proteïna cinasa A (PKA) i AMPK mitjançant fosforilacions. Es coneix que el citrat activa l'enzim ACC afavorint la formació de malonil-CoA mentre que els AGcL, com ara el palmitoil-CoA, l'inhibeixen (Brownsey i col., 2006; Munday, 2002; Fediuc i col., 2006). Pel que fa a les modificacions covalents per fosforilació i defosforilació, se sap que la PKA fosforila ACC-1 en Ser 1200 i que l'AMPK ho fa en Ser 80 i 81 en ACC-1 i en Ser 219 i 220 de la isoforma ACC-2, tot reduint-ne l'activitat (Towler i Hardie, 2007, Hardie i Pan, 2002). D'entre totes les cinases que actuen sobre l'ACC, l'AMPK és la que presenta un paper més destacat.

D'altra banda, l'enzim que catalitza el pas de malonil-CoA a acetil-CoA és la malonil-CoA decarboxilasa (MCD), que de manera oposada a l'ACC, contribueix a augmentar l'oxidació dels AG al múscul (Saha i col., 2000).

2.3.3. AMPK

La proteïna cinasa activada per AMP (AMPK) és un enzim heterotrimèric amb activitat serina/treonina cinasa clau per a la regulació del metabolisme en el múscul esquelètic. Actua promovent l'oxidació d'AG i la captació de glucosa al múscul i reduint la gluconeogènesi al fetge.

L'AMPK és activada de manera al·lostèrica per l'AMP i per fosforilació en la posició treonina 172 (Hardie i col., 1999), tot disminuint-ne la V_{max} un 80-90% (Munday, 2002). L'activació té lloc quan augmenta la ràtio AMP:ATP intracel·lular a causa de l'estrés metabòlic provocat per la hipòxia, el dejuni o l'exercici (Ruderman i Saha, 2006), tot i que no es coneix el mecanisme exacte. El nivell d'activació màxim s'assoleix quan la proteïna cinasa supressora de tumors LKB1 fosforila el residu Thr 172 (Xiao i col., 2007; Shaw i col., 2004). Altres estudis han demostrat que factors com ara la citocina IL-6, la relació fosfocreatina-creatina i el contingut de glicogen també poden regular l'activitat de l'AMPK (Ceddia i Sweeney, 2004; Hudson i col., 2003). En

el cas de les citocines, s'ha observat que la IL-6 pot incrementar la fosforilació d'AMPK al múscul *in vivo* i *in vitro*, i en la mateixa línia, treballs realitzats en ratolins IL-6^{-/-} mostren una disminució de l'activitat AMPK (Kola i col., 2006; Kelly i col., 2004). Aquesta fosforilació és reversible, de manera que la regulació de l'AMPK podria estar relacionada amb l'activitat de la fosfatasa PP2C (Sanders i col., 2007). Un cop activada, l'AMPK pot reduir els nivells de malonil-CoA mitjançant la fosforilació de la proteïna ACC o de la MCD, fent que s'estimuli la β -oxidació (Saha i col., 2000).

Quan l'activació és crònica al múscul esquelètic, l'AMPK estimula la biogènesi mitocondrial i el contingut d'enzims mitocondrials a través del coactivador PGC-1 α (Zong i col., 2002).

2.4. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

La regulació transcripcional dels gens involucrats en el metabolisme dels AG és considerat el mecanisme més important per a la regulació de l'homeòstasi lipídica a llarg termini i tant els PPARs com PGC-1 α juguen un paper important en aquesta regulació.

2.4.1. PPARs

Els PPARs pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears. S'identificaren a principis dels anys 90 i s'anomenaren receptors activats per proliferadors peroxisòmics pel fet que eren activats per compostos que indueixen la proliferació peroxisòmica. Es tracta de factors de transcripció susceptibles de ser activats per

l·ligands endògens, com els AGcL, o l·ligands sintètics, que controlen una gran quantitat de gens involucrats en el metabolisme dels AG.

Tots els PPARs comparteixen la mateixa estructura molecular (Blanquart i col., 2003): 1) domini A/B localitzat a la regió amino-terminal, que conté el domini AF-1 (*Activation Function-1*), que és la regió responsable de l'activitat de transactivació independent de l·ligand del receptor; 2) Domini C o DNA *binding domain* (DBD), que permet la unió del PPAR a seqüències específiques anomenades Elements de Resposta a Proliferadors Peroxisòmics (PPRE) situades a la regió promotora dels seus gens diana; 3) Domini D, implicat en la interacció del receptor amb cofactors que controlen l'activitat transcripcional; 4) Domini E/F o *ligand binding domain* (LBD) localitzat a la regió carboxi-terminal que conté la funció d'activació-2 (AF-2) i requereix la unió del l·ligand per induir l'activació transcripcional. Per dur a terme la seva funció és indispensable que els PPARs s'uneixin al receptor de l'àcid 9-cis-retinoic (RXR) formant un heterodímer (Figura 6).

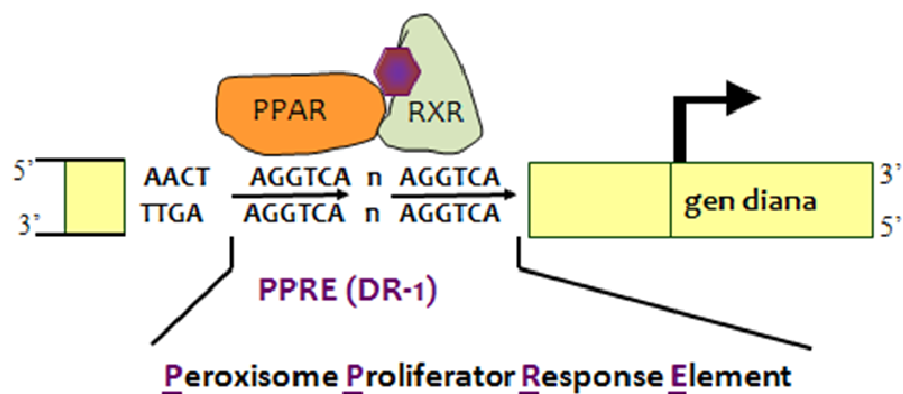


Figura 6. Mecanisme de regulació de l'expressió de gens mitjançant la formació de l'heterodímer PPAR-RXR i la posterior unió al seu element de resposta (PPRE).

S'han identificat tres subtipus de PPARs: PPAR α (NR1C1, segons el sistema unificat de nomenclatura per la superfamília de receptors nuclears), PPAR δ (NR1C2) i PPAR γ (NR1C3). Estan codificats per gens independents i presenten un patró de distribució tissular i funcionalitat diferents (per més detalls veure la taula 1).

Existeixen una gran varietat de lligands, naturals i sintètics, de les tres isoformes de PPARs. Tots ells comparteixen la característica de tenir un domini d'unió a lligand molt gran que fa que molts compostos puguin unir-s'hi (Xu i col., 1999a). Com es mostra a la taula 1, els AG són importants activadors naturals d'aquests receptors nuclears, essent els AG poliinsaturats de cadena llarga els millors lligands (Wu i col., 1999). Pel que fa als lligands sintètics, els fibrats són lligands específics de **PPAR α** i s'utilitzen pel tractament de la dislipèmia, a més s'ha vist que disminueixen els factors de risc de malalties cardiovasculars, tot i que els seus efectes sobre la RI no estan ben establerts (van Heyningen, 2007). Altres lligands sintètics de PPAR α com el Wy-14643, actuen com a potents activadors murins de PPAR α i com a agonistes dèbils de PPAR γ . Pel que fa a **PPAR γ** , es coneixen uns lligands altament selectius per a aquest subtipus de PPAR que s'anomenen tiazolidindiones (TZD) o glitazones, les quals actuen com a agents antidiabètics com a resultat del seu efecte sensibilitzant a l'acció de la insulina. De les tres isoformes existents, **PPAR δ** és la menys coneguda tot i que en els darrers anys ha emergit com un important regulador metabòlic. S'han desenvolupat lligands sintètics específics per PPAR δ com el GW501516 i L-165041, essent el primer més potent (Oliver i col., 2001). Al múscul esquelètic, PPAR δ s'expressa entre 10 i 50 vegades més que PPAR α i PPAR γ respectivament (Braissant i col., 1996), i tractaments amb agonistes sintètics d'aquesta isoforma provoquen un augment de l'expressió de gens musculars relacionats amb l'oxidació d'AG, la respiració mitocondrial i el metabolisme oxidatiu (Tanaka i col., 2003). L'estudi de les funcions de PPAR δ al múscul esquelètic d'animals *knockout* o que sobreexpressen

aquest subtipus de PPAR mostren que confereix resistència a l'obesitat i millora el perfil metabòlic (Wang i col., 2004). De fet, estudis realitzats en primats obesos amb l'agonista GW501516 mostren una disminució dels nivells de TG i un increment dels nivells d'HDL en el sèrum d'aquests animals (Oliver i col., 2001). D'altres estudis realitzats en humans també observen una disminució dels nivells de TG i colesterol LDL, tot i que no detecten canvis en els nivells del colesterol HDL (Riserus i col., 2008; Sprecher i col., 2007). Els resultats obtinguts fins el moment suggereixen que PPAR δ podria ser una nova diana terapèutica per combatre l'obesitat i la DM2 (Gilde i col., 2007) i és per aquest motiu que actualment molts estudis es centren en la investigació d'aquesta isoforma. Malgrat aquest fet, no es coneix si l'activació de PPAR δ és capaç de reduir la inflamació i la RI induïda per AG en cèl·lules musculars esquelètiques.

	EXPRESSIONI	FUNCI	LLIGANDS
PPARα	Teixit adipós Fetge Cor Múscul esquelètic Ronyó Intestí	-Recaptació d'AG - β -oxidació d'AG -Inflamació -Funció vascular	NATURALS -Àcid docahexanoic -Àcid araquidònic -Àcid linoleic -C6-C18 -ETYA -Eicosanoids (PGJ ₂ , 15d-PGJ ₂ , PGI ₂ , 12HETE, 8-(R)HETE, 8-(S)HETE, 8-HEPE, prostaciclins, LTB ₄) SINTÈTICS -GW7647 -Wy-14643 -Ciofibrat -Fenofibrat -Bezafibrat -Ciprofibrat -Gemfibrozil
PPARδ	Ubiqua, tot i ser més important en: Múscul esquelètic Cor Placenta Cervell	- Metabolisme d'AG -Inflamació	NATURALS -Àcid docahexanoic -Àcid araquidònic -Àcid linoleic -C6-C8 -Eicosanoids (PGJ ₂ , 15d-PGJ ₂ , PGI ₂ , PGB ₂ prostaciclins) SINTÈTICS -GW501516 -L-165041 -GW0742
PPARγ	Teixit adipós Fetge Múscul esquelètic Intestí prim	-Adipogènesi -Diferenciació adipocitària -Homeòstasi glucídica -Homeòstasi lipídica	NATURALS -Àcid docahexanoic -Àcid araquidònic -Eicosanoids (PGJ ₂ , 15d-PGJ ₂ , PGB ₂ , 15HETE, 8-(R)HETE, 8-(S)HETE) SINTÈTICS -Rosiglitazona -Ciglitazona -Troglitazona -Pioglitazona -GW1929

Taula 1. Distribució tissular, funció i lligands (naturals i sintètics) dels tres subtipus de PPAR.

2.4.2. PGC-1

Des de fa anys es coneixen proteïnes coactivadores i corepressores que poden modular l'activitat dels PPARs, com ara el coactivador PGC-1 (Xu i col., 1999b).

PGC-1 α va ser descobert per Puigserver i col. (1998) al teixit adipós marró per la seva capacitat d'unió a PPAR. Posteriorment es descobriren dues isoformes més, PGC-1 β i PRC (*PGC-1-related coactivator*) (Andersson i Scarpulla, 2001; Lin i col., 2002a). **PGC-1 α** i **PGC-1 β** s'expressen preferentment en teixits amb una alta capacitat oxidativa com ara el cor, les fibres musculars oxidatives i el teixit adipós marró, on regulen la capacitat funcional del mitocondri i el metabolisme energètic de la cèl·lula (Wu i col., 1999; St-Pierre i col., 2003). Pel que fa a PRC, encara no són massa coneguts els patrons d'expressió i el rol biològic d'aquesta isoforma.

En general, es considera que els efectes biològics dels coactivadors PGC-1 consisteixen en regular els mecanismes de la cèl·lula per incrementar la seva capacitat de produir energia (St-Pierre i col., 2003) mitjançant la regulació del metabolisme lípidic i la sensibilitat a la insulina (Benton i col., 2008).

El múscul esquelètic, per la seva importància en la homeòstasi energètica, també expressa PGC-1 α i PGC-1 β . En aquest teixit els dos coactivadors incrementen l'expressió de gens mitocondrials, el nombre de mitocondris i la capacitat oxidativa d'aquests, fet que augmenta la capacitat de resposta del múscul a l'exercici (Calvo i col., 2008). D'acord amb això, estudis realitzats en múscul esquelètic d'humans (Pilegaard i col., 2003) i ratolins (Taylor i col., 2005) demostren que l'exercici intens indueix PGC-1. Malgrat tenir paper fisiològics molt semblants, diversos estudis mostren diferències entre PGC-1 α i PGC-1 β . PGC-1 α incrementa el contingut de glicogen cel·lular i promou la formació de fibres oxidatives tipus I i IIa, mentre que PGC-1 β sembla que disminueix el contingut de glicogen (Mortensen i col., 2006) i

promou la formació de fibres IIx (Lin i col., 2002b; Arany i col., 2007). Aquestes fibres estan situades a la part més interna del múscul i, tot i ser oxidatives, tenen característiques típiques de les fibres glicolítiques tipus IIb (Larsson i col., 1991). Fins i tot hi ha estudis on observen que PGC-1 α pot convertir les fibres glicolítiques a fibres oxidatives (Lin i col., 2002a), tot i que d'altres autors parlen no tant d'una transformació de la fibra, sinó d'un canvi del fenotip metabòlic d'aquesta (Benton i col., 2008).

Estudis realitzats en ratolins *knockout* de PGC-1 α mostren que aquests animals presenten una disminució del nombre de mitocondris i de la capacitat respiratòria de les fibres oxidatives del múscul, alteracions de la termogènesi, increment de l'expressió de gens lipogènics i increment anormal de la grassa corporal, entre d'altres alteracions (Leone i col., 2005). Aquestes observacions situen PGC-1 α com una peça clau en el metabolisme energètic i l'adaptació del múscul durant l'exercici (Finck i Kelly, 2006). També s'ha relacionat el coactivador PGC-1 α amb el metabolisme de la glucosa en múscul després d'observar-se que pot activar la transcripció del transportador de la glucosa GLUT4 (Michael i col., 2001) i l'expressió de la piruvat deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4), la qual regula negativament l'oxidació de la glucosa (Wende i col., 2005). Així doncs, PGC-1 α també podria actuar com un regulador del metabolisme glucídic i lipídic, tot incrementant l'oxidació d'AG i disminuint de manera temporal l'oxidació de la glucosa (Finck i Kelly, 2006).

PGC1- α pot unir-se a una gran quantitat de receptors nuclears per a modular-ne l'activitat. Alguns dels factors de transcripció que s'han identificat com a diana de PGC-1 α són: PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , NRF-1 i NRF-2 (*Nuclear Regulatory Factor-1* i *2*), LXR (*Liver X Receptor*), FXR (*Farnesyl X Receptor*) i ERR (*Estrogen-Related Receptor*). Tot i que també pot unir-se a altres factors de transcripció que no són receptors nuclears com MEF-2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*) o FOXO1 (*Forkhead Box*

O1) (Finck i Kelly, 2006). Tots ells estan involucrats en el control de l'expressió de gens relacionats amb l'oxidació d'AG, la fosforilació oxidativa al mitocondri i el metabolisme de la glucosa.

Pel que fa a la regulació de PGC-1 α , el primer que es va descobrir en teixit adipós marró va ser que el fred n'augmentava l'expressió (Puigserver i col., 1998). Posteriorment s'ha descobert que en múscul esquelètic, la calcineurina A i la cinasa dependent de calci/calmodulina (CaMK) n'activen l'expressió (Handschin i col., 2003), i que les cinases p38 MAPK i AMPK estan implicades en el control de la seva expressió després de realitzar exercici físic (Akimoto i col., 2005; Zong i col., 2002) (Figura 7). També es pot regular l'activitat de PGC-1 α a través de modificacions postraduccionalment com ara fosforilacions, acetilacions, metilacions en arginina i interaccions amb proteïnes repressores (Fan i col., 2004a; Teyssier i col., 2005; Knutti i col., 2001).

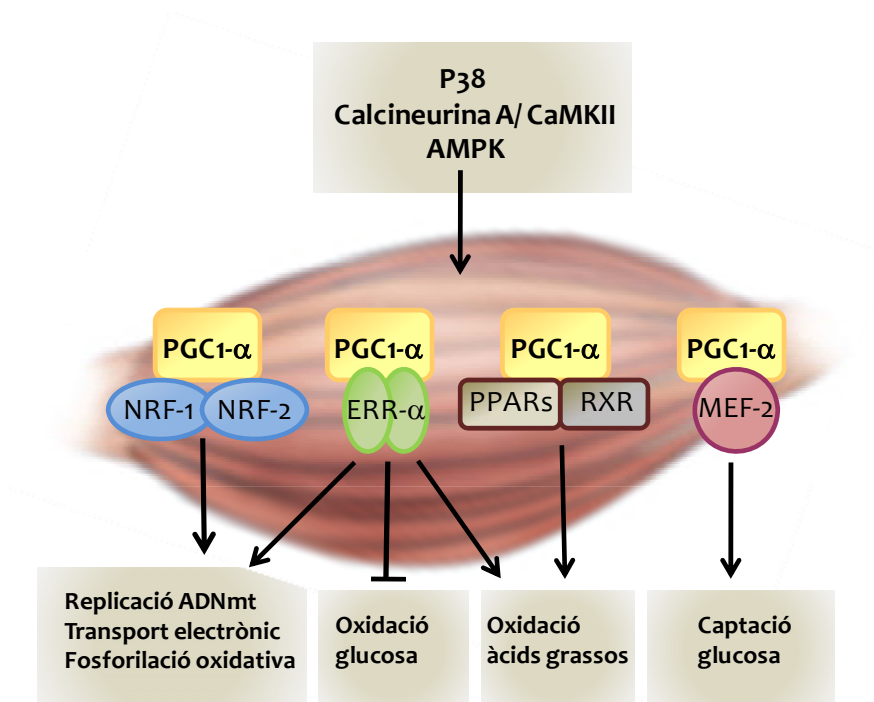


Figura 7. Esquema on es mostra la inducció de PGC-1 α per part de diferents proteïnes i els efectes produïts per la unió de PGC-1 α als seus factors de transcripció diana. (Finck i col., The Journal of Clinical Investigation, 116: 615-622, 2006)

D'altra banda, ratolins PGC-1 β ^{-/-}, de manera similar al que s'observa en ratolins PGC-1 α ^{-/-}, mostren una disminució de l'expressió de gens mitocondrials i defectes en la termogènesi i el funcionament del cor (Vianna i col., 2006), tot i que les funcions reguladores de les dues isoformes són diferents (Kressler i col., 2002; Lin i col., 2002b). La regulació d'una i altra forma també difereix, doncs s'ha descrit que PGC-1 β , a diferència de PGC-1 α , no respon a l'exercici ni a la denervació en múscul esquelètic (Koves i col., 2005a).

3. INTEGRACIÓ DEL CICLE DE LA GLUCOSA I DELS ÀCIDS GRASSOS

Durant el **dejuni**, el múscul oxida preferentment AG per a obtenir energia, però després d'una **ingesta** canvia aquest substrat per la glucosa, de manera que s'inhibeix l'oxidació lipídica i augmenta la captació i oxidació de glúcids.

Segons el cicle de la glucosa-AG proposat per Randle, l'oxidació d'AG en detriment de la glucosa juga un paper fonamental en la sensibilitat a la insulina i les alteracions metabòliques de la DM2 (Delarue i Magnan, 2007). L'any 1963, Randle i col. van demostrar que els AG competeixen amb la glucosa per ser oxidats en múscul cardíac i diafragma de rata. Segons aquest model, un increment de la concentració d'AG en plasma incrementa la captació d'aquests, de manera que al mitocondri s'hi acumula acetil-CoA provinent de la β -oxidació que provoca l'acumulació de citrat i glucosa-6 fosfat (G-6P). L'acetil-CoA inhibeix l'activitat del complex de la piruvat deshidrogenasa (PDC), mentre que el citrat, en última instància, inhibeix la captació de glucosa i la glicòlisi generant RI (Figura 8A). Malgrat que alguns estudis recolzaren aquesta teoria (Ferrannini i col., 1983; Kelley i col., 1993), d'altres no observaven acumulació d'acetil-CoA ni G-6P en múscul esquelètic tot i alterar-se el transport de

glucosa i aparèixer RI (Boden i col., 1994), fet que indicava que el mecanisme a través del qual els AG poden induir RI no s'ajustava amb el cicle proposat per Randle.

La teoria elaborada a partir d'estudis posteriors implica l'acumulació de lípids intracel·lulars, concretament DAG, ceramides i acil-CoAs de cadena llarga, en la inhibició del transport de la glucosa i la RI. És el que s'anomena "model lipotòxic" de la RI en múscul esquelètic. Segons aquests treballs, els lípids intracel·lulars activen la PKC- θ que fosforila IRS-1 en residus serina/treonina i provoca una disminució de l'activació de l'enzim PI3-K, afectant així la via de senyalització de la insulina (Shulman i col., 2000; Itani i col., 2002) (Figura 8B).

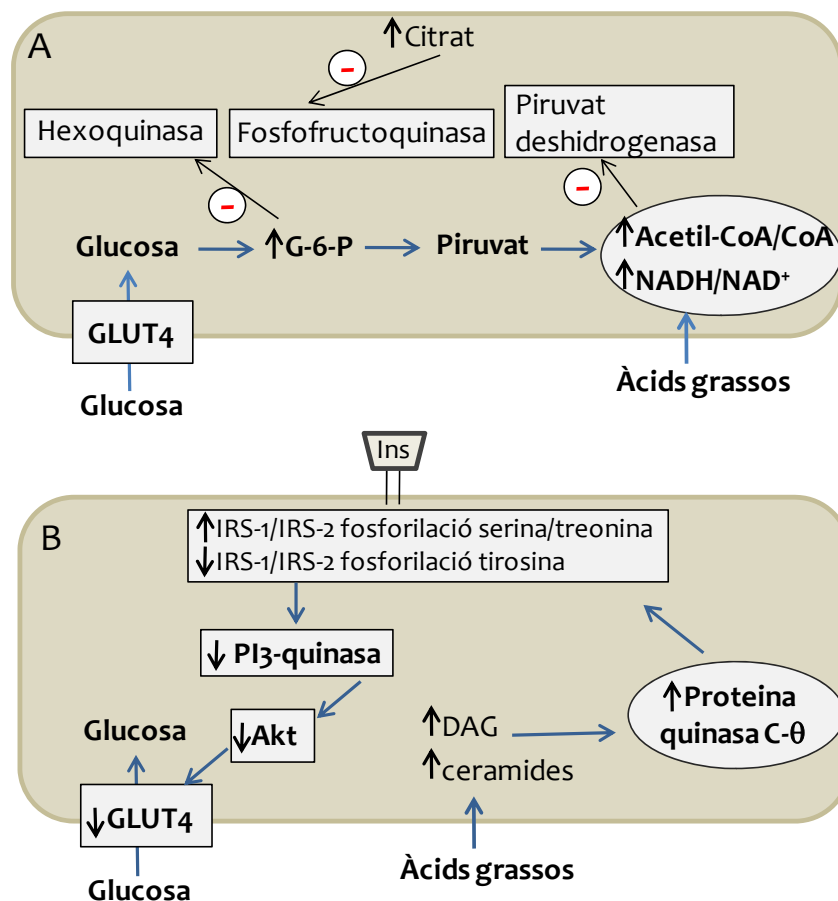


Figura 8. A. Esquema del mecanisme implicat en la RI induïda per AG segons Randle i col. **B.** Mecanisme implicat en la RI induïda per AG proposada per Shulman i col. (Kovacs i col., Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 19: 625,635, 2005)

3.1. LÍPIDS INTRACEL·LULARS

L'emmagatzematge d'energia en forma de TG és un procés essencial per a la supervivència. La majoria dels TG s'emmagatzemen al teixit adipós, tot i que també poden trobar-se en altres teixits com el múscul esquelètic. El múscul representa aproximadament un 40% de la massa corporal i contribueix de manera molt significativa a la despesa energètica. Prova d'això és que el 60% de les gotes lipídiques, les quals proporcionen energia al múscul, es troben en contacte amb els mitocondris per facilitar la seva disponibilitat per ser oxidades (Tarnopolsky i col., 2007). Malgrat la importància dels TG com a font energètica pel múscul, una acumulació excessiva de lípids intramiocel·lulars s'ha relacionat amb l'aparició de RI en diferents models animals i en humans (Schrauwen , 2007; Moro i col., 2008). Diversos treballs detecten una acumulació de metabolits derivats dels AG com acil-CoA de cadena llarga, DAG i ceramides en el múscul esquelètic d'individus obesos que, d'acord amb el "model lipotòxic", poden alterar la via de senyalització de la insulina o l'activitat d'enzims involucrats en la utilització de la glucosa i induir un estat de RI (Hegarty i col., 2003; Petersen i Shulman, 2006).

3.1.1. DIACILGLICEROL i TRIACILGLICEROL

El **DAG** actua com un segon missatger en la regulació de la senyalització intracel·lular i es pot formar per trencament de fosfolípids a través de les fosfolipases o bé per síntesi *de novo* a partir d'AGcL-CoAs i glicerol-3-fosfat (Timmers i Schrauwen, 2008).

La unió covalent d'una molècula d'acil-CoA al DAG forma **TG** per mitjà de l'enzim **acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa** (DGAT). En mamífers existeixen dos enzims que catalitzen aquesta reacció, DGAT-1 i DGAT-2 (Lardizabal i col., 2001; Cases i col., 2001) (Figura 9). L'enzim DGAT-1 s'expressa de manera ubiqua, tot i que es troba en major quantitat a l'intestí prim, colon, testicles i múscul esquelètic. Pel que fa a DGAT-2, també s'expressa ubiquament, tot i que es troben nivells especialment elevats en fetge i teixit adipós. En ratolí, DGAT-2 també s'expressa en cor, múscul esquelètic i ronyó (Cases i col., 1998; Cases i col., 2001).

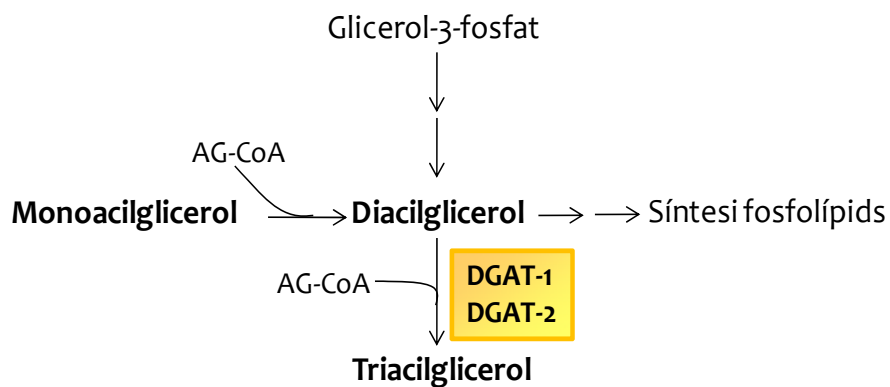


Figura 9. Elements bàsics en la síntesi de DAG i TG a partir de monoacilglicerol.

Tant DGAT-1 com DGAT-2 són importants moduladors del metabolisme energètic, però sembla que DGAT-2 és el més rellevant en el control de l'homeòstasi de TG *in vivo* (Stone i col., 2004). En ratolins, DGAT-2 és l'enzim responsable de la majoria de la síntesi de TG, i de fet, ratolins DGAT-2^{-/-} no mostren TG en plasma ni en teixit i moren poc després del naixement (Yen i col., 2008). Els ratolins DGAT-1^{-/-}, en canvi, mostren nivells normals de TG al sèrum però són resistents a l'obesitat induïda per la dieta (Chen i col., 2002). DGAT-1 no pot compensar totalment la manca de

DGAT-2 en ratolins DGAT-2^{-/-}, fet que indica que aquests dos enzims realitzen funcions diferents (Yen i col., 2008).

Hi ha autors que han descrit que l'acumulació de TG podria ser un primer pas protector per a evitar l'acumulació d'altres espècies lipídiques més implicades en el desenvolupament de la RI, com el DAG (Listenberger i col., 2003; Lessard i col., 2007), ja que l'acumulació de TG no està afectada en miotubs d'individus obesos i pacients diabètics tipus 2 quan s'exposen a palmitat i oleat (Gaster i Beck-Nielsen, 2006). Contràriament, l'acumulació de DAG s'ha relacionat amb l'aparició de RI en múscul d'individus (Itani i col., 2002) i ratolins obesos (Kraegen i col., 2006) i en cultiu primari de mioblasts humans, on s'observa que el palmitat indueix l'acumulació de DAG i ceramides (Pickersgill i col., 2007). D'acord amb aquesta hipòtesi, la sobreexpressió de DGAT-1 en múscul esquelètic de ratolins protegeix de la RI induïda per una dieta rica en greixos gràcies a una major síntesi de TG i a una disminució del contingut de DAG i ceramides (Liu i col., 2007).

El mecanisme mitjançant el qual el DAG indueix RI és la fosforilació de la IRS-1 en Ser 307 a conseqüència de l'activació de la PKC- θ (Kim i col., 2004a; Hegarty i col., 2003). En el mateix sentit, Yu i col. (2002) van observar una reducció del 30% de la fosforilació de IRS-1 en tirosina i una reducció del 50% de l'activitat PI3-K associada a IRS-1 a conseqüència de l'acumulació de DAG i posterior activació de PKC- θ . A més, diversos autors han proposat que els nivells elevats d'AGL circulants són responsables de l'acumulació de DAG intramiocel·lular i de la posterior activació de la PKC- θ , la qual és capaç d'activar el factor proinflamatori NF- κ B i, com a conseqüència, augmentar l'expressió de citocines inflamatòries com la IL-6 i el TNF- α (Boden, 1997; Griffin i col., 1999; Kern i col., 2001).

3.1.2. CERAMIDES

Les ceramides es formen a partir de la hidròlisi d'un fosfolípid de membrana anomenat esfingomielina o bé per síntesi *de novo* a partir de l'AG saturat palmitat (Merrill i col., 1990). Són molècules de senyalització que estan implicades en diferents funcions biològiques com la divisió cel·lular, l'apoptosi i que també es troben a la membrana plasmàtica formant microdominis de senyalització (Cooney i col., 2002; Goni i Alonso, 2009).

Diversos estudis han observat que l'acumulació de ceramides en múscul esquelètic d'individus obesos, insulino-resistents o en rosegadors està relacionada amb la RI (Adams i col., 2004; Strackowski i col., 2004; Holland i col., 2007). Igualment, estudis *in vitro* realitzats amb cèl·lules musculars també destaquen la importància de les ceramides en l'aparició de RI (JeBailey i col., 2007; Pickersgill i col., 2007; Sabin i col., 2007), tot i que no es coneix exactament el mecanisme implicat a través del qual ho duen a terme. S'ha especulat que les ceramides poden inhibir la via de senyalització de la insulina a nivell de l'Akt (Adams i col., 2004; Holland i col., 2007), bé per acció de la PP2A, la qual defosforila l'Akt (Schmitz-Peiffer i col., 1999; Chavez i col., 2003a), o bé mitjançant la fosforilació d'Akt en posició treonina 34 per part de la PKC- ζ (Cazzolli i col., 2001; Powell i col., 2004). Estudis en cèl·lules musculars C2C12 tractades amb l'AG saturat palmitat, però no amb l'insaturat linoleat (Holland i col., 2007), mostren una disminució de la fosforilació de l'Akt i de la síntesi de glicogen a conseqüència de l'acumulació de ceramides (Schmitz-Peiffer i col., 1999). Resultats similars s'observen en cèl·lules L6 tractades amb l'anàleg de les ceramides C2-ceramida, les quals mostren una pèrdua de l'activitat Akt i de la captació de glucosa en resposta a la insulina (Hajduch i col., 2001). D'altra banda, el tractament amb l'inhibidor de la síntesi *de novo* de ceramides miriocina evita l'efecte del palmitat sobre la via de senyalització de la insulina en miotubs C2C12 (Chavez i col., 2003a).

Contràriament, altres estudis no mostren diferències en el contingut total de ceramides en múscul d'individus amb diferent sensibilitat a la insulina (individus sans, intolerants a la glucosa, diabètics tipus 2 i atletes) (Skovbro i col., 2008). El fet que s'hagin detectat alteracions en el receptor de la insulina i la proteïna IRS-1, i no només a nivell de l'Akt, suggereix que hi ha altres lípids, com ara el DAG, involucrats en la reducció de la sensibilitat a la insulina en el múscul esquelètic a part de les ceramides.

Tot i que nombrosos estudis han relacionat estretament l'acumulació de lípids intramiocel·lulars amb la RI (Bachmann i col., 2001; Virkamaki i col., 2001; Greco i col., 2002), sorprenentment també s'han detectat nivells elevats de lípids intramiocel·lulars en atletes d'èlit, els quals tenen una gran sensibilitat a la insulina (Goodpaster i col., 2001) (Figura 10).

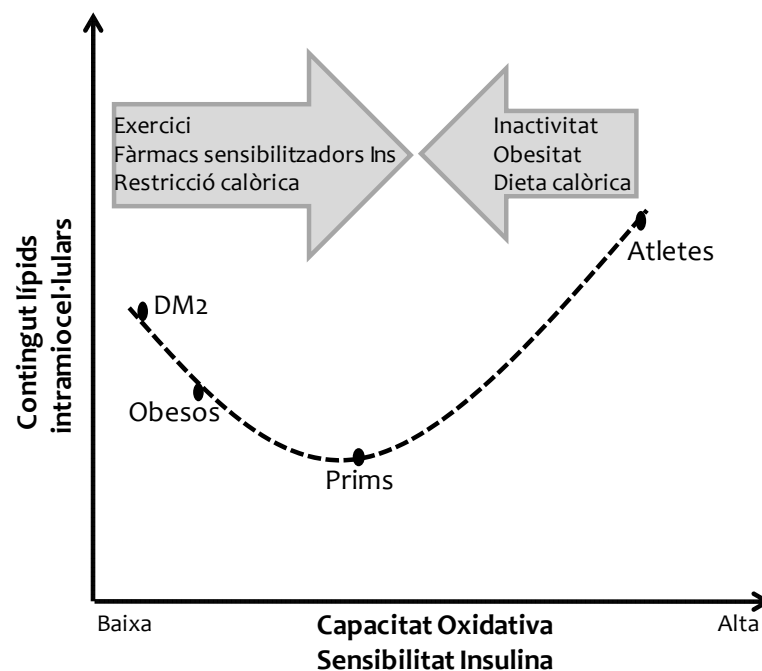


Figura 10. Gràfica de la relació entre l'acumulació de lípids intramiocel·lulars, la capacitat oxidativa i la sensibilitat a la insulina en humans. Els atletes, malgrat tenir un contingut de lípids intracel·lulars igual o superior a l'observat en individus obesos, tenen una gran capacitat oxidativa i sensibilitat a la insulina. (Moro i col., *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E203–E213, 2008)

Alguns autors expliquen aquesta paradoxa pel fet que els atletes, a diferència d'individus sedentaris, realitzen molts cicles de degradació i formació de lípids intramiocel·lulars (Moro i col., 2008). Una major capacitat d'emmagatzemar TG, juntament amb un alt contingut mitocondrial i capacitat oxidativa els hi permet oxidar els lípids de manera òptima impedit que s'acumulin intermediaris lipídics tòxics (Proctor i col., 1995; Kelley i col., 1999).

4. ÀCIDS GRASSOS I RESISTÈNCIA A LA INSULINA

L'acumulació de metabolits lipídics a l'interior de les cèl·lules musculars sembla ser un factor determinant per a l'aparició de RI (Kelley i Goodpaster, 2001; Shulman, 2000; Savage i col., 2007). Aquest fet situa les alteracions de la captació i oxidació dels AG com a possibles causes de l'acumulació lipídica intracel·lular que s'observa en individus obesos i insulino-resistents (Ritov i col., 2005; Thyfault i col., 2004; Bonen i col., 2004). Així doncs, una reducció dels nivells de lípids intracel·lulars podria prevenir la RI i la DM2.

4.1. ALTERACIONS DE LA CAPTACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS

Un dels processos metabòlics que pot estar alterat en el múscul esquelètic de pacients diabètics és el transport d'AG a través de la membrana, el qual pot contribuir a l'acumulació de lípids intramiocel·lulars. D'acord amb aquesta hipòtesi, estudis en rates obeses Zucker mostren un augment del transport d'AG al múscul esquelètic (Coort i col., 2004; Luiken i col., 2001). Les proteïnes transportadores FABPpm, FAT/CD36 i FATP1 podrien estar-hi involucrades. De fet, FABPpm es troba elevada en múscul esquelètic d'individus obesos i diabètics tipus 2 (Bruce i col., 2003; Simoneau i

col., 1999). No obstant, existeix controvèrsia pel que fa al comportament dels transportadors d'AG en diferents situacions (obesitat, DM2 durant exercici, dejuni...). D'una banda, estudis en múscul d'individus obesos mostren un increment de FAT/CD36 al sarcolema, però no de FABPpm, i tampoc observen modificacions en l'expressió de cap dels dos transportadors (Bonen i col., 2004). Contràriament, Colberg i col. (1995) van detectar una disminució de la captació d'AG en múscul d'individus en dejú amb obesitat visceral i Kelley i col. (1994) observaren una supressió de la captació d'AG després de la ingesta en individus diabètics. Això posa de manifest que, tot i que els transportadors d'AG semblen estar implicats en l'acumulació d'AG intracel·lulars i la RI, encara no es coneix exactament el paper que hi juguen.

4.2. ALTERACIONS DEL MITOCONDRI

La reducció de l'oxidació dels AG i la consegüent acumulació de lípids intracel·lulars també s'han associat amb alteracions del mitocondri, en concret amb el transport cap a l'interior d'aquests orgànuls i amb el seu funcionament, de manera que defectes en algun d'aquests processos poden provocar l'aparició de RI (Kelley i col., 1999; Kelley i col., 2002; Ritov i col., 2005).

4.2.1. TRANSPORT MITOCONDRIAL D'ÀCIDS GRASSOS

L'enzim CPT-1 és el pas que limita l'entrada dels AGcL al mitocondri, fent que un lleuger increment de l'activitat CPT-1 en múscul pugui augmentar l'oxidació i evitar l'emmagatzematge d'AG a l'interior cel·lular, com s'ha observat en ratolins (Bruce i col., 2009). L'AMPK és l'enzim que regula l'activació de l'ACC, el qual té la funció de

synthetitzar malonil-CoA. Aquest, al seu torn, inhibeix de manera al·lostèrica la CPT-1, fent que l'eix **AMPK/ACC/malonil-CoA/CPT-1** (Figura 11) contribueixi de manera important a les alteracions que provoquen acumulació lipídica i RI.

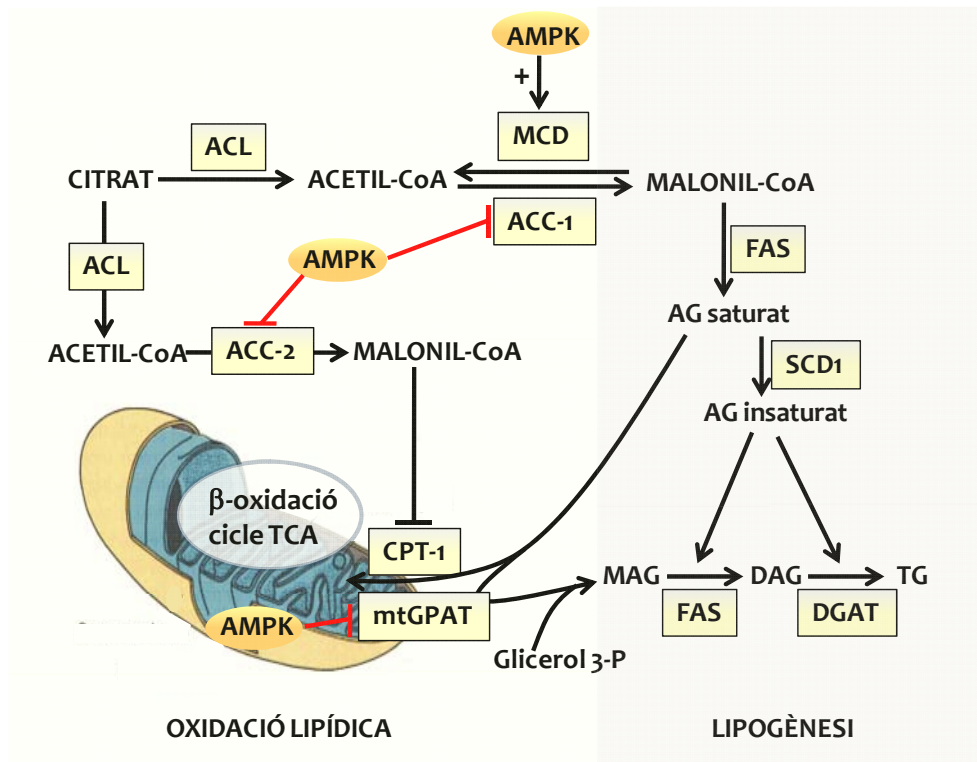


Figura 11. Esquema del metabolisme lipídic i la seva regulació per part de la proteïna AMPK. Alteracions dels enzims ACC, CPT-1, DGAT o la mateixa AMPK s'han relacionat amb l'aparició de RI. (Zhang i col. Cell Metabolism 9: 407-416, 2009)

En animals alimentats amb dieta grassa i altres models animals de RI s'han descrit alteracions de l'**AMPK** (Ruderman i Saha, 2006; Liu i col., 2006). Estudis en humans, però, han mostrat resultats contradictoris. En alguns estudis s'han descrit reduccions de l'activitat AMPK en individus obesos i diabètics tipus 2 (Bruce i col., 2005; Bandyopadhyay i col., 2006), mentre que en d'altres (Steinberg i col., 2004; Hojlund i col., 2004) no s'observen alteracions en el funcionament d'aquesta proteïna.

S'ha suggerit que aquestes diferències podrien estar associades a un augment del teixit adipós més que no pas a la DM2 *per se*.

D'altra banda, també s'han observat alteracions de la **CPT-1** en múscul esquelètic d'individus obesos (Simoneau i col., 1999). Així, ha estat descrit que una combinació d'hiperglucèmia i hiperinsulinèmia incrementa el **malonil-CoA** i provoca una disminució de l'activitat CPT-1 en el múscul esquelètic humà (Rasmussen i col., 2002). En el mateix sentit, altres estudis descriuen que l'activitat CPT-1 es veu disminuïda en humans obesos insulino-resistents (Kim i col., 2000) i la realització d'exercici en millora l'activitat i redueix la sensibilitat d'aquest enzim pel malonil-CoA (Bruce i col., 2006). El paper que juga la CPT-1 en la RI queda palès quan es tracta amb l'inhibidor de l'activitat CPT-1, etomoxir, el qual indueix l'acumulació intracel·lular lipídica i RI en rates alimentades amb dieta grassa (Dobbins i col., 2001). La sobreexpressió de CPT-1, en canvi, impedeix el desenvolupament de RI en rates alimentades amb una dieta rica en greixos (Bruce i col., 2009) i en cèl·lules musculars L6 tractades amb AGL, gràcies a un augment de l'oxidació dels AG i a la posterior reducció de l'activitat PKC- θ (Perdomo i col., 2004; Sebastian i col., 2007). Els estudis de Perdomo i col. (2004) mostren una millora de l'acció de la insulina, tot i que no observen disminució del DAG, ceramides i acil-CoAs de cadena llarga a l'interior de la cèl·lula, fet que indicaria que un augment de la capacitat oxidativa sensibilitzaria el múscul a l'acció de la insulina independentment dels canvis en el contingut de lípids citosòlics, mentre que els estudis de Sebastian i col. (2007), sí mostren una disminució de l'acumulació de DAG i ceramides que protegeix enfront l'aparició de RI. En qualsevol cas, el nombre d'AG que entren a l'interior del mitocondri per ser oxidats és menor que l'entrada d'AG a l'interior del teixit, de manera que els lípids intracel·lulars hi queden emmagatzemats desencadenant insulino-resistència.

4.2.2. CONTINGUT I FUNCIONAMENT MITOCONDRIAL

Una altra de les alteracions que possiblement provoca acumulació de lípids intramiocel·lulars és la pròpia oxidació dels AG. Molts dels estudis publicats fins el moment conclouen que els individus obesos, insulino-resistents o diabètics de tipus 2 acumulen lípids intracel·lulars a conseqüència d'un contingut i/o funcionament mitocondrial reduït (Kim i col., 2008; Lowell i Shulman, 2005). De fet, diversos estudis han observat reduccions de la β -oxidació i la conseqüent acumulació de lípids en individus obesos (Shulman, 2000; Van Loon i Goodpaster., 2006; Kelley i col., 2002; Ritov i col., 2005). La disfunció mitocondrial provocaria una oxidació incompleta dels AG fent que hi hagués un desajustament entre la β -oxidació, el cicle dels àcids tricarbòxílics i la cadena de transport electrònic que incrementaria els acil-CoA intracel·lulars (Koves i col., 2005b). Aquestes conclusions s'oposen a d'altres estudis que suggereixen un menor nombre de mitocondris en individus obesos però no alteracions en la seva funcionalitat (Boushel i col., 2007; Holloway i col., 2009). De fet, alguns estudis afirmen que només els individus amb un índex de massa corporal entre 40 i 50 presenten alteracions en l'oxidació dels AG (Thyfault i col., 2004). Altres autors com Holloway i col. (2009), en canvi, proposen que el múscul compensa la disminució del contingut mitocondrial a mesura que augmenta l'índex de massa corporal amb una major capacitat d'oxidació per part dels mitocondris restants. De fet, en el múscul esquelètic d'animals exposats a dieta grassa s'observa un augment dels metabolits provinents de la β -oxidació, indicant una sobrecàrrega de l'activitat mitocondrial a causa d'un excés d'AG (Koves i col., 2005a; Koves i col., 2008). En la mateixa direcció apunten estudis realitzats per Hancock i col., (2008) que mostren un increment de la capacitat oxidativa *in vitro* del múscul juntament amb un increment del contingut de PGC-1 α en rates alimentades amb una dieta rica en greixos. La sobreexpressió del factor de transcripció PGC-1 α , el qual regula la biogènesi mitocondrial i incrementa el

contingut de proteïnes mitocondrials i nuclears (Lehman i col., 2000) aconseguiria prevenir d'aquesta manera la RI induïda per la dieta (Kamei i col., 2003). Així mateix, Hancock i col. (2008) han demostrat que la sobreexpressió en múscul de PPAR δ , el qual és activat per AG i regula la biogènesi mitocondrial, incrementa l'expressió de la proteïna PGC-1 α sense incrementar-ne l'ARNm. Aquest fet ha suggerit que l'estabilitat i activitat de PGC-1 α pot ser regulada per modificacions postraduccionalment com ara fosforilacions i acetilacions (Puigserver i col., 2001; Kraegen i col., 2008). No obstant, alguns estudis recents no observen diferències en el contingut de la proteïna PGC-1 α i PGC-1 β en múscul esquelètic d'individus obesos (De Filippis i col., 2008; Holloway i col., 2009), i de manera oposada, reduccions dels nivells d'ARNm de PGC-1 α i PGC-1 β en el múscul esquelètic s'han relacionat amb la presència de DM2 en humans (Mootha i col., 2003; Patti i col., 2003) i en d'altres models animals de DM2 com la rata ZDF (Jové i col., 2004) (Figura 12).

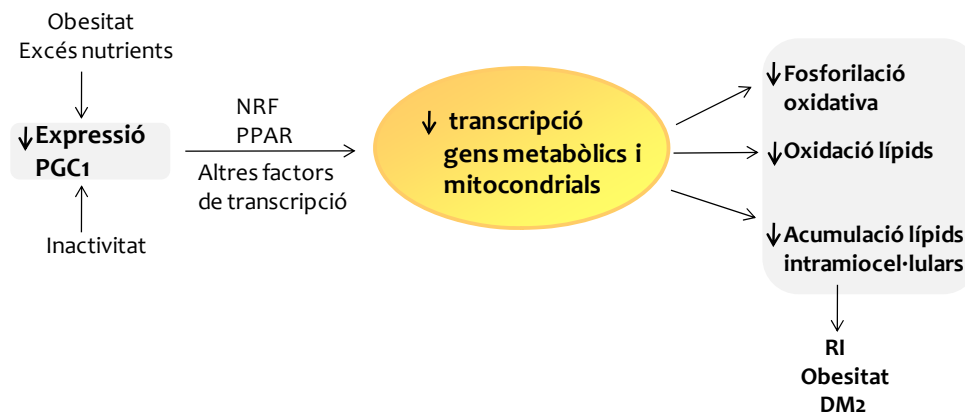


Figura 12. Hipòtesi del mecanisme mitjançant el qual l'obesitat i l'inactivitat poden disminuir l'expressió de PGC-1 i efectes que se'n deriven.

En aquest sentit, l'increment dels nivells circulants d'AGL podrien estar implicats en la reducció de PGC-1 α , ja que estudis realitzats pel nostre grup també

havien demostrat que l'exposició de les cèl·lules C2C12 a l'àcid palmític reduïa l'expressió de PGC-1 α (Jové i col., 2005a) encara que se'n desconeixia el mecanisme implicat.

Es creu que les diferències observades poden ser conseqüència de la utilització de diferents metodologies com ara diferent exposició del múscul a hiperlipidèmia o diferent tipus de fibres musculars estudiades (Bruce i col., 2009). És per això que calen més estudis per confirmar si l'obesitat provoca RI a conseqüència d'alteracions en el funcionament del mitocondri.

4.3. ALTERACIONS DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA INSULINA

El transport de la glucosa a l'interior de la cèl·lula és un pas limitant per a la síntesi de glicogen en resposta a la insulina en pacients insulino-resistents i diabètics de tipus 2 (Savage i col., 2007). Aquest fet mostra la importància de conèixer els defectes a nivell molecular de la via de senyalització de la insulina que són responsables de les alteracions de la captació de glucosa al múscul esquelètic i, en última instància, de l'aparició de RI. A continuació s'exposen algunes de les proteïnes implicades en la via de la insulina que es poden veure alterades enfront elevades concentracions d'AG.

Diversos estudis han relacionat l'augment de la fosforilació de residus Ser/Thr de les proteïnes **IRS-1** i la disminució de la fosforilació en residus tirosina com a reguladors negatius de la via de senyalització de la insulina (Werner i col., 2004; Draznin, 2006). S'ha demostrat que la infusió lipídica augmenta els nivells intracel·lulars de DAG, el qual és un activador al·lostèric de la PKC- θ , fent que aquesta s'activi i fosforili la proteïna IRS-1 en posició Ser 307 (Itani i col., 2001; Morino i col.,

2006; Petersen i col., 2003) (Figura 13). En aquest sentit, treballs realitzats en rata (Yu i col., 2002) i ratolí (Kim i col., 2004a) mostren un increment de la fosforilació de la IRS-1 en Ser 307 per acumulació intracel·lular d'acil-CoA i DAG i posterior activació de la PKC- θ quan es tracten els animals amb dietes riques en greixos. També s'han observat increments de la fosforilació en residus Ser de múscul esquelètic d'animals alimentats amb una dieta rica en greixos, que es reverteix quan es muten les posicions Ser 302, Ser 307 i Ser 612 per alanines (Morino i col., 2008) i en humans s'han observat increments de Ser 312 (Ser 307 en ratolí) fosforilada en biòpsies de múscul de pacients obesos i diabètics tipus 2 (Bandyopadhyay i col., 2005). Juntament amb la PKC- θ , la cinasa c-jun NH₂-terminal (JNK), IKK β i mTOR poden fosforilar el residu Ser 312 de IRS-1 (Gao i col., 2002).

Alteracions de l'enzim **PI3-K** en el múscul esquelètic també s'han associat a defectes en la resposta a la insulina en aquest teixit. En rates obeses Zucker s'han observat alteracions en l'expressió de la subunitat reguladora de PI3-K en el múscul i fetge, i altres estudis mostren que defectes en aquest enzim poden reduir el transport de la glucosa en el múscul esquelètic d'individus obesos insulino-resistents i pacients diabètics de tipus 2 (Anai i col., 1998). Tanmateix, en humans amb obesitat mòrbida (Goodyear i col., 1995) i rosegadors obesos (Heydrick i col., 1993; Saad i col., 1992) s'ha relacionat una reducció del nombre i la fosforilació del receptor de la insulina i de IRS-1 amb una disminució de l'activitat PI3-K.

Respecte a la proteïna **Akt**, Krook i col. (1997) ja van suggerir que podia estar implicada en el desenvolupament de la RI, tot i que a hores d'ara encara hi ha controvèrsia respecte al paper que juga en aquesta alteració i en la DM2. Estudis recents en cultiu primari de múscul esquelètic de pacients obesos mostren una disminució de la fosforilació en Ser 473 i Thr 308 que no s'observa en els individus control quan s'exposa el múscul a palmitat (Thrush i col., 2008). El mateix s'ha

observat en estudis realitzats en múscul de pacients amb DM2 (Cozzone i col., 2008), múscul soleus de rata (Thompson i col., 2000) i en cèl·lules musculars C2C12 (Chavez i col., 2003a). En les mateixes cèl·lules C2C12, Chavez i col. (2003b) detectaren un augment del contingut de ceramides intracel·lulars que podria ser responsable de la defosforilació de l'Akt i provocar la posterior inhibició de la via de senyalització de la insulina. Altres estudis també mostren un augment de la síntesi *de novo* de ceramides quan s'exposen miotubs en cultiu a altes dosis de l'AG saturat palmitat que provoquen una inhibició de la fosforilació de la proteïna Akt en posició Ser 473 i Thr 308 (Sabin i col., 2007; Chavez i col., 2003). Estudis que tracten amb miriocina (inhibidor de la síntesi *de novo* de ceramides) a ratolins insulino-resistents observen una recuperació de la fosforilació d'Akt en múscul respecte els animals control (Holland i col., 2007). Contràriament, altres grups d'investigació no han observat cap relació entre el contingut de ceramides i el desenvolupament de RI (Lee i col., 2006; Aerts i col., 2007), ni tampoc alteracions en la fosforilació i en l'activitat enzimàtica de l'Akt en pacients diabètics tipus 2 (Kim i col., 1999; Nikoulina i col., 2001). Com mostra l'estudi de Brozinick i col. (2003), l'activitat específica de cada isoforma podria explicar les diferències observades fins el moment, ja que els seus resultats mostren una disminució de l'activitat de l'Akt-2 i Akt-3, però no de l'Akt-1, en biòpsies de múscul esquelètic de pacients insulino-resistents amb obesitat mòrbida.

Les **PKCs** atípiques, juntament amb l'Akt, tenen un paper destacat en la captació de glucosa en resposta a la insulina (Schmitz-Peiffer, 2002). De fet, s'ha observat que individus obesos i/o diabètics tipus 2 presenten nivells baixos o poca activació de les PKCs atípiques al múscul esquelètic (Kim i col., 2003; Vollenweider i col., 2002; Sajan i col., 2004). En la mateixa direcció apunten estudis realitzats en múscul de ratolí amb el gen PKC- λ deletat, on s'observa RI, alteracions en la captació de glucosa en resposta a la insulina *in vivo* i *ex vivo* i una reducció de la

translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Farese i col., 2007). D'altra banda, s'han associat nivells elevats de lípids amb un augment de l'activitat de les PKC noves i posterior aparició de RI en teixits que responen a la insulina (Schmitz-Peiffer, 2002). Les isoformes δ , ϵ i θ apareixen permanentment activades en múscul esquelètic de rates alimentades amb una dieta grassa (Schmitz-Peiffer i col., 1997). De fet, l'activació de PKC- θ en múscul esquelètic s'ha relacionat amb una disminució del transport de glucosa en resposta a la insulina que podria ser conseqüència d'una acumulació de DAG intracel·lular i posterior fosforilació de la proteïna IRS-1 en posició Ser 307, com ja s'ha comentat anteriorment (Shulman, 2000; Yu i col., 2002). Estudis realitzats pel nostre grup també mostren l'activació de PKC- θ i del factor de transcripció nuclear κ B (NF- κ B) quan s'incuben miotubs C2C12 amb l'àcid gras palmitat (Jové i col., 2005b).

Dues de les causes que poden alterar el transport de glucosa en resposta a la insulina són: defectes en la translocació del **GLUT4** o defectes en les vies de senyalització. El primer cas s'ha observat en el múscul esquelètic d'individus obesos o diabètics, on hi ha alteracions del moviment de GLUT4 des de les vesícules intracel·lulars fins a la membrana plasmàtica (Zierath i col., 1996), i la segona seria conseqüència de la pèrdua de la capacitat de la insulina per activar l'enzim PI3-K i com a conseqüència disminuiria la captació de glucosa. Aquesta alteració s'ha observat en el múscul d'individus amb obesitat mòrbida i insulino-resistents (Goodyear i col., 1995) i pacients diabètics (Bjornholm i col., 1997). També s'ha descrit que alteracions de l'expressió de GLUT4 deriven en l'aparició de RI en ratolins mentre que la sobreexpressió millora la diabetis en models de ratolí *db/db* (Stenbit i col., 1997).

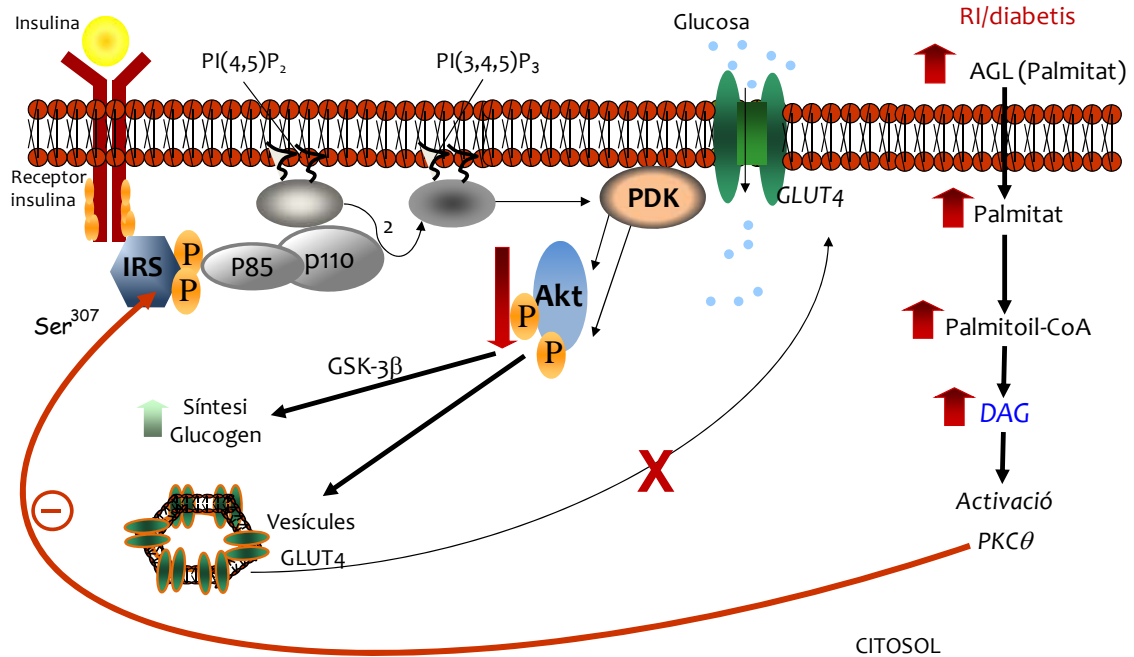


Figura 13. Esquema dels mecanismes implicats en l'atenuació de la via de senyalització de la insulina a conseqüència dels nivells elevats de palmitat.

5. INFLAMACIÓ I RESISTÈNCIA A LA INSULINA INDUÏDES PER AG

Molts estudis han relacionat els nivells elevats d'AGL en plasma amb la RI, indicant que els AGL són responsables de l'aparició de la RI (Boden i col., 2001; Itani i col., 2002). Tanmateix, la RI s'ha associat a la presència d'un procés inflamatori crònic i de baixa intensitat (Pickup i Crook, 1998; Festa i col., 2000). De fet, en els últims anys han aparegut clares evidències que relacionen l'obesitat i la RI induïda per AG amb les citocines i l'activació de vies de senyalització inflamatòries (Wei i col., 2008). Diferents estudis indiquen que les molècules inflamatòries juguen un paper important en la regulació del metabolisme de la glucosa, i que una activació excessiva de les vies inflamatòries desencadena l'aparició de RI (Shoelson i col., 2006; Stump i col., 2006).

La primera citocina proinflamatòria que es relacionà amb la RI fou el TNF- α (Hotamisligil i col., 1993; Feinstein i col., 1993), tot i que posteriorment altres citocines han pres rellevància pels seus efectes sobre el metabolisme, com la IL-6, IL-1 β i adipocitocines, entre d'altres (Wellen i Hotamisligil, 2005). D'entre aquestes citocines destaca la IL-6. Així, s'ha descrit que els nivells de IL-6 són de 2 a 3 vegades superiors en pacients obesos diabètics comparats amb individus sans (Kern i col., 2001) i tractaments amb IL-6 mostren una reducció de la captació de glucosa en resposta a la insulina en múscul esquelètic de ratolins (Kim i col., 2004b). El múscul esquelètic és el teixit que més glucosa capta en resposta a la insulina i qualsevol canvi en la seva massa, taxa metabòlica o resposta a hormones o altres factors poden afectar les reserves energètiques i el metabolisme de tot el cos. De la mateixa manera que el teixit adipós, el múscul també és capaç de produir i secretar nombroses citocines com el TNF- α , TNF- β i diverses interleucines (Plomgaard i col., 2005; Raj i col., 2005). Estudis realitzats en el nostre laboratori (Jové i col., 2005a) i en d'altres (Weigert i col., 2004) mostren que l'exposició de cèl·lules musculars esquelètiques a l'AG saturat palmitat estimula la producció i secreció de la IL-6 i d'altres treballs mostren alteracions de la via de senyalització de la insulina quan la IL-6 s'expressa de manera crònica (Franckhauser i col., 2008). Per tant, la interferència en l'activació d'aquestes vies inflamatòries podria esdevenir una diana terapèutica important per a millorar la sensibilitat a la insulina.

5.1. INFLAMACIÓ, RI I ÀCIDS GRASSOS INSATURATS

L'aparició de DM2 està lligada a la predisposició genètica de cada individu, tot i que l'augment de persones obeses i diabètiques de tipus 2 en els països desenvolupats o en vies de desenvolupament indica que factors com la dieta i

L'activitat física són importants en el desenvolupament d'aquesta patologia (Seidell, 2000). Des de fa anys es coneix que tant la quantitat com la qualitat dels AG de la dieta poden influir en el desenvolupament de la RI i altres desordres metabòlics associats. Diversos estudis de principis dels anys 90 ja mostraven que una proporció elevada d'AG insaturats de cadena llarga i una baixa proporció d'AG saturats en els fosfolípids que conformen la membrana de la cèl·lula muscular esquelètica augmenten la sensibilitat a la insulina en humans (Borkman i col., 1993; Pan i col., 1995). Estudis posteriors han descrit que l'adherència a la dieta Mediterrània, la qual es caracteritza per ser una dieta rica en vegetals, oli d'oliva com a font d'AG, fruites, llegums i cereals, baixa en carn i moderada pel que fa a l'ingesta de productes làctics, ous, peix i vi s'associa negativament amb l'índex de massa corporal (Schroder i col., 2004; Shubair i col., 2005). En el mateix sentit, estudis amb individus que ingereixen una dieta rica en AG saturats demostren una disminució del 10% de la sensibilitat a la insulina respecte una dieta isoenergètica rica en AG monoinsaturats (Vessby i col., 2001). L'AG saturat i l'insaturat més importants de la dieta són el palmitat (16:0) i l'oleat (18:1), respectivament, ja que representen un 27% i un 31% del total d'AGL que es troben al plasma (Staiger i col., 2004). Estudis amb palmitat i oleat mostren efectes oposats en la via de senyalització de la insulina i en la viabilitat cel·lular. En aquest sentit, s'ha observat que el palmitat incrementa l'acumulació lipídica intracel·lular i genera RI en miotubs humans, mentre que tractaments amb oleat no provoquen alteracions en la resposta a la insulina malgrat augmentar el contingut de TG (Bastie i col., 2004; Chavez i col., 2003b; Pickersgill i col., 2007). Resultats semblants han estat publicats per Koves i col. (2008), els quals mostren que la incubació de miotubs de rata L6 amb palmitat 500 μ M provoca una disminució dels nivells de TG i l'aparició de RI, alteracions que no apareixen quan s'incuben les cèl·lules amb concentracions similars d'oleat.

La RI s'ha associat a un estat d'inflamació crònic i a un augment de l'expressió de la citocina IL-6 induïda pels AG saturats com el palmitat (Staiger i col., 2004), mentre que els AG poliinsaturats com el linoleat no provoquen alteracions de l'expressió de IL-6 en cèl·lules musculars llises (Toborek i col., 2002). D'acord amb aquests resultats, estudis realitzats pel nostre grup han demostrat un increment de l'expressió i la secreció de la citocina IL-6 quan es tracten cèl·lules musculars esquelètiques C2C12 amb palmitat que no s'observa quan s'incuben les cèl·lules amb oleat (Jové i col., 2005a). Altres treballs de Jové i col. (2006) mostren l'efecte del palmitat i l'oleat sobre l'expressió de la citocina TNF- α , demostrant que ambdós AG es comporten de manera similar a com ho feien sobre l'expressió de la IL-6. Aquest fet podria indicar que els AG insaturats, a diferència dels saturats, no provoquen inflamació ni RI. Tot i haver-hi molts estudis que fan referència a les conseqüències de les dietes riques en AG saturats o insaturats, els mecanismes responsables d'aquests efectes diferents de l'oleat i el palmitat encara no es coneixen amb exactitud.

5.2. VIES INFLAMATÒRIES IMPLICADES EN LA RI INDUÏDA PER AG

S'han proposat dues vies que podrien estar implicades en la inflamació i la RI induïdes per AGL en el múscul esquelètic, una via dependent de receptor i una altra independent de receptor.

5.2.1. Via independent de receptor

En aquesta via, l'increment dels AGL en plasma provoca l'acumulació de DAG, el qual és un activador al·lostèric de la PKC- θ . Aquesta cinasa, a més d'incrementar la fosforilació de la IRS-1 en Ser 307 (Griffin i col., 1999; Itani i col., 2002), activa la IKK i,

per tant, la via del factor de transcripció proinflamatori NF- κ B (Pieper i Riaz, 1997; Coudronniere i col., 2000). D'aquesta forma, l'acumulació de DAG i la posterior activació de NF- κ B provoca un increment de la producció de citocines inflamatòries com la IL-6 i el TNF- α (Jové i col., 2005a; Jové i col., 2006; Weigert i col., 2004) que contribueixen al desenvolupament del procés inflamatori i la RI (Figura 14).

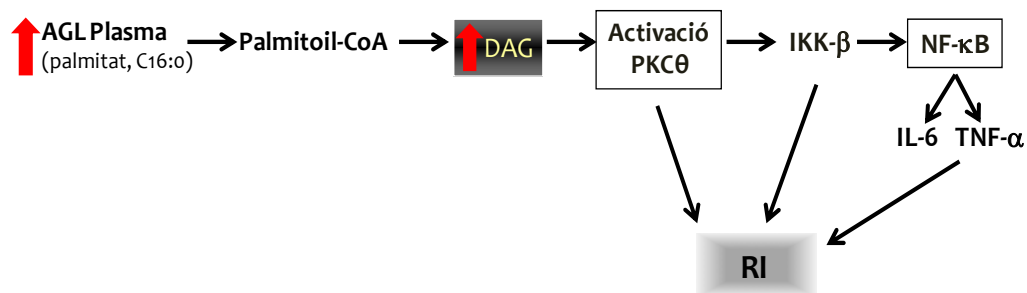


Figura 14. Esquema de la via DAG-PKC- θ -NF- κ B.

5.2.2. Via dependent de receptor: TLRs

Recentment s'ha descobert que els senyals inflamatoris induïts per AGL poden provocar RI a través de la seva unió directa als Receptors de tipus *Toll-like* (TLRs) i desencadenar una resposta proinflamatòria (Lee i col., 2003a).

Els TLRs són glicoproteïnes integrals de membrana tipus I que, per la semblança de la regió intracitoplasmàtica amb els receptors de la IL-1, formen part de la superfamília que inclou aquests receptors. Els receptors TLRs, sols o bé formant heterodímers amb altres TLRs o no TLRs, estan implicats en la resposta del sistema immune innat enfront infeccions causades per microorganismes (Lemaitre i col., 1996). En mamífers se n'han identificat tretze membres, dels quals TLR-1, TLR-2 i TLR-4 es localitzen a la superfície de la cèl·lula, mentre que TLR-3, TLR-7 i TLR-9 es localitzen

a l'interior cel·lular (Ahmad-Nejad i col., 2002). La seva expressió és ubíqua (Muzio i col., 2000), tot i que predomina en macròfags, adipòcits, múscul i fetge (Lin i col., 2000; Netea i col., 2004) i diversos estudis han suggerit que en models cel·lulars musculars s'expressen en particular TLR-2 i TLR-4 (Frost i col., 2006; Jimenez i col., 2005). Tots ells es caracteritzen per tenir dominis extracel·lulars repetits rics en leucina i regions intracitoplasmàtiques anomenades dominis d'homologia dels receptors Toll/IL-1 (TIR), els quals són claus per a la senyalització. Els TLRs s'uneixen a un nombre considerable de lligands. TLR-2 i TLR-4, per exemple, se sap que reconeixen específicament estructures bacterianes molt conservades com ara lipopolisacàrids, peptidoglicans i lipopèptids (Akira i Takeda, 2004). El component clau dels lipopolisacàrids involucrat en l'activació dels TLRs és la subunitat anomenada lípid A, la qual està composta per AG. S'ha determinat que l'activació de TLR-2 o TLR-4 es fa en funció de la composició dels AG (Muller i col., 2004). Estudis realitzats per Weatherill i col. (2005) en cèl·lules dendrítiques mostren que els AG saturats activen el TLR-4 i els dímers de TLR-2, mentre que els AG insaturats inhibeixen l'activació dels TLRs (Lee i col., 2001; Lee i col., 2004). En macròfags, adipòcits i cèl·lules musculars esquelètiques s'ha descrit que els AG saturats són potents activadors de TLR-2 i TLR-4 (Shi i col., 2006).

L'unió del lligand provoca una dimerització d'aquests receptors i un posterior canvi conformacional que és necessari per al reclutament de molècules implicades en la via de senyalització, com és el cas de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary-response protein 88*). Aquesta molècula adaptadora s'uneix al domini citoplasmàtic TIR i facilita l'associació de la cinasa IRAK1 (*IL-1R-associated kinase*), que al seu torn s'autofosforila i li permet unir-se a TRAF6 (*tumor necrosis factor(TNF)-associated factor 6*). En última instància, el complex IRAK1-TRAF6 acaba activant la cinasa TAK1 (*transforming-growth-factor-b-activated kinase*), la qual provoca l'activació de les

cinases IKKs, la fosforilació de les I κ Bs i finalment l'activació de NF- κ B (Akira i Takeda, 2004). Paral·lelament, també s'ha descrit que TAK1 pot activar NF- κ B a través de la inducció de la via de les MAPK en cèl·lules musculars llises (Son i col., 2008) (Figura 15). El fet que els AGL siguin capaços d'utilitzar el receptors TLRs per induir l'expressió de citocines proinflamatòries en macròfags, adipòcits i fetge mostra la relació entre els lípids i la inflamació i consegüentment, l'aparició de RI (Shi i col., 2006).

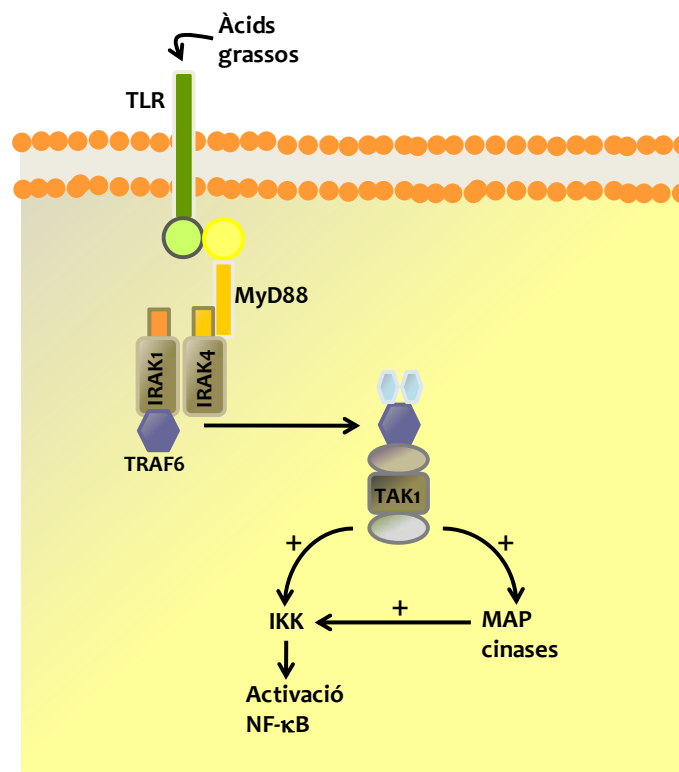


Figura 15. Senyalització a través dels receptors Toll-like (TLRs). L'activació dels TLRs pels AG és responsable d'induir l'activitat de NF- κ B.

Estudis realitzats en múscul esquelètic de rata i ratolí mostren que els lipopolisacàrids augmenten l'expressió de múltiples citocines i molècules de senyalització, com I κ B α , a través de TLR-4 (Frost i col., 2004) i TLR-2 (Lang i col.,

2003). Al seu torn, diverses citocines poden regular l'expressió gènica dels TLRs. En macròfags, per exemple, l'expressió del gen TLR-2 és induïda per les citocines IL-2, IL-15, IL-1 β , Interferó- γ (INF- γ) i TNF- α (Matsuguchi i col., 2000).

Altres estudis realitzats en miotubs C2C12 tractats amb l'AG saturat palmitat mostren una activació de TLR-2 i la producció de citocines inflamatòries com la IL-6 (Fan i Cook, 2004b), alhora que també s'ha observat un augment de l'expressió de TLR-4 i TLR-2 en múscul esquelètic d'individus amb DM2 (Reyna i col., 2008). En el mateix sentit, estudis en rosegadors indiquen que l'activació de TLR-4 en resposta als lipopolisacàrids és suficient per induir l'activació de NF- κ B i l'expressió dels seus gens diana, com la ciclooxygenasa-2 (COX-2) (Tanabe i Tohnai, 2002), en macròfags (Rhee i Hwang, 2000) i en d'altres tipus cel·lulars (Schwenger i col., 1998), que s'explica pel fet que en la regió 5' del gen de la COX-2 hi ha elements reguladors de la transcripció que inclou dos llocs d'unió a NF- κ B, entre d'altres (Tanabe i Tohnai, 2002).

5.3. NF- κ B

Tant la via dependent (a través de TLR) com la via independent de receptor (DAG-PKC- θ), una vegada activades pels AGL poden promoure l'activitat del factor de transcripció proinflamatori NF- κ B i aquest, al seu torn, incrementar l'expressió dels seus gens diana com la IL-6 i la COX-2.

NF- κ B és una família de factors de transcripció involucrats en la proliferació, apoptosi i inflamació cel·lular que s'expressen de manera ubiqua (Perkins, 2007). La família NF- κ B de mamífers consta de cinc subunitats, RelA (p65), c-Rel, RelB, p50/p105 i p52/p100, els quals formen complexos com a homodímers o heterodímers. El domini Rel conté seqüències que permeten la dimerització amb altres subunitats, la

interacció amb l'inhibidor de la proteïna NF- κ B (I κ Bs) i la unió amb l'ADN (Baldwin, 1996). A més, contenen un domini de transactivació a l'extrem carboxi-terminal necessari per a l'activació de la transcripció, i tant p50 com p52 han d'heterodimeritzar amb alguna de les subunitats que contenen aquest domini per també ser capaces d'activar la transcripció (Hayden i Ghosh, 2004).

En la seva forma inactiva NF- κ B, el qual està format majoritàriament per p50 i p65, es troba al citoplasma unit a la proteïna I κ B. Existeixen set membres de la família I κ B: les I κ B típiques (I κ B α , I κ B β i I κ B ϵ), les I κ B atípiques (Bcl-3 i I κ B ζ) i els precursors de les proteïnes p100 i p105. La degradació de les proteïnes I κ Bs és regulada per la cinasa de I κ B (IKK). La proteïna IKK consta de dues subunitats catalítiques (IKK α i IKK β) i una subunitat reguladora (IKK γ o NF- κ B *essential modifier* (NEMO)). La IKK β pot afectar la via de senyalització de la insulina mitjançant dues vies, una és fosforilant directament la proteïna IRS-1 en Ser 307 (Gao i col., 2002), i l'altra és fosforilant l'inhibidor de NF- κ B. En aquest últim cas, les subunitats IKK β i NEMO són responsables de fosforilar la proteïna I κ B α (DiDonato i col., 1997; Barnes i Karin, 1997) per tal que s'alliberi de NF- κ B i sigui ubiquitinitzada i posteriorment degradada al proteosoma. D'aquesta manera NF- κ B pot migrar des del citosol fins al nucli per unir-se a les regions promotores de gens inflamatoris com IL-1 β , TNF- α i IL-6 i activar-ne la transcripció (Shoelson i col., 2003) (Figura 16).

El propi NF- κ B indueix la síntesi de la proteïna I κ B α , de manera que les I κ B α sintetitzades de nou s'uneixen a NF- κ B fent que retorni al citoplasma i finalitzi la transcripció gènica (Arenzana-Seisdedos i col., 1995). De fet, ratolins *knockout* IKK β que han rebut una infusió lipídica no desenvolupen RI (Yuan i col., 2001).

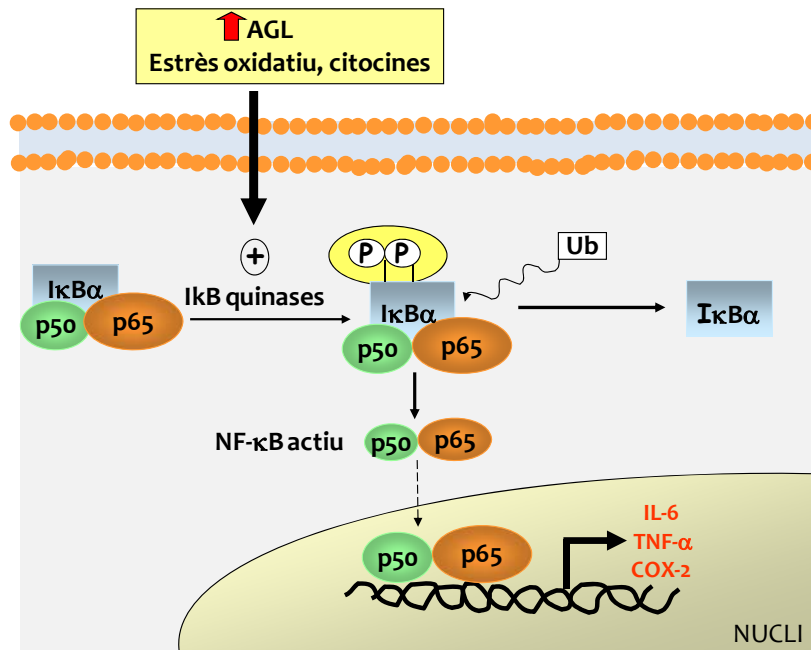


Figura 16. Esquema de l'activació de NF-κB. Estímuls com els AGL poden provocar la ubiquitinització i degradació de la proteïna IκBα al proteosoma, fent que NF-κB entri al proteosoma i augmenti l'expressió de gens proinflamatoris.

Estudis realitzats al nostre laboratori (Jové i col., 2005a) i en d'altres (Weigert i col., 2004) mostren que els AGL poden activar la producció de la citocina IL-6 a través de NF-κB. A més dels AGL, estímuls inflamatoris com la mateixa citocina TNF-α i IL-1 o p38 MAPK, entre d'altres, poden activar la via IKKβ-IκBα-NF-κB mitjançant l'activació d'IKK (Zandi i col., 1997).

D'altra banda, s'ha demostrat que la inhibició de IKKβ mitjançant tractaments amb dosis elevades de salicilats milloren la senyalització de la insulina en pacients diabètics (Hundal i col., 2002). En la mateixa línia, altres estudis observen una millora de la RI induïda per AGL en ratolins IKKβ^{+/-} o bé ratolins tractats amb aspirina (Kim i col., 2001). Compostos com el partenolide, el qual impedeix la degradació de les IκB a concentracions micromolars, o la pirrolidina ditiocarbamat (PDTC) també poden inhibir l'activació de NF-κB (Patel i col., 2000).

5.3.1. IL-6

La IL-6 és una citocina proinflamatòria d'aproximadament 25 KDa. Les citocines s'han definit com a proteïnes de baix pes molecular i farmacològicament actives que poden tenir múltiples activitats biològiques i actuar de manera autocrina o paracina (McDermott, 2001). La producció de IL-6 té lloc als adipòcits, monòcits i macròfags, fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars esquelètiques, essent els adipòcits el tipus cel·lular més important en l'alliberament d'aquesta citocina amb un 35% del total present a la circulació (Kern i col., 2001), fet que la situa com un possible mediador metabòlic.

En condicions normals, els nivells plasmàtics de IL-6 són baixos, però diferents condicions d'estrés, infecció o exercici poden elevar-ne la producció (Plomgaard i col., 2005). S'ha observat que la IL-6 pot tenir efectes positius i negatius en les respostes metabòliques al fetge, teixit adipós i múscul esquelètic. En cultius d'hepatòcits s'ha descrit que la IL-6 altera l'acció de la insulina (Senn i col., 2002), en el teixit adipós impedeix la diferenciació dels preadipòcits i redueix l'acció de la insulina en els adipòcits madurs (Lagathu i col., 2003), però en cèl·lules musculars esquelètiques existeix controvèrsia respecte l'efecte d'aquesta citocina. D'una banda, el múscul produeix i allibera IL-6 després de la realització d'exercici i millora l'acció de la insulina, però d'altra banda, la IL-6 s'associa a estats d'obesitat i RI.

Se sap que diferents estímuls fisiològics o patològics com ara l'exercici, la sepsis o el dany muscular poden induir la producció de IL-6 en el múscul esquelètic (Schmidt i Duncan, 2003). S'ha descrit que un increment agut dels nivells circulants de IL-6 poden millorar l'oxidació de lípids i la captació de glucosa en resposta a la insulina, a més de produir efectes antiinflamatoris (Weigert i col., 2005a). Aquests efectes semblen ser mediats per l'activació de l'AMPK perquè desapareixen quan

s'infecten les cèl·lules amb un adenovirus dominant negatiu per l'AMPK (Carey i col., 2006; Kahn i col., 2005). No obstant, nivells elevats de manera crònica d'aquesta citocina s'han associat a l'obesitat i a estats de RI (Lazar, 2005). De fet, els nivells de IL-6 en plasma d'individus obesos i diabètics tipus 2 són de dues a tres vegades superiors que en individus control i aquest fet s'ha relacionat amb una reducció de l'acció de la insulina (Kern i col., 2001; Kopp i col., 2003; Fernandez-Real i col., 2001). Estudis *in vitro* realitzats en miotubs de ratolí mostren un augment de l'alliberament de IL-6 a través de la via NF- κ B quan s'exposen a estrès oxidatiu durant 24 hores (Kosmidou i col., 2002). Altres estudis han mostrat un augment dels nivells de producció de citocines proinflamatòries com la IL-6 a conseqüència de l'activació de la via MAPK-ERK-STAT3 provocada per la leptina (Tilg i Moschen, 2006) i en el mateix sentit, Chung i col. (2006) van observar un augment de l'expressió de citocines com a resultat de la inducció de NF κ -B i MAPK provocada per LPS en preadipòcits, i com a conseqüència, el desenvolupament de RI.

5.3.2. MAPK

Les proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK) juguen un paper molt important en la transmissió de senyals captats pels receptors situats a la superfície cel·lular cap a la maquinària transcripcional del nucli. Les funcions biològiques que realitzen depenen del tipus cel·lular, però estan relacionades amb el control de la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi de la cèl·lula (Chang i Karin i col., 2001).

La cascada de les MAPK està composta per tres proteïnes cinases citoplasmàtiques: la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) encarregada d'activar una MAP cinasa cinasa (MAPKK) que, finalment, activa la MAPK. Les MAPKKKs són les proteïnes que reben informació des de la superfície cel·lular o altres estímuls

mitjançant la interacció amb una proteïna d'unió a GTP i poden fosforilar residus crítics de treonina i tirosina de les MAPKs. Finalment, aquestes MAPKs són una família de serina-treonina cinases que poden translocar al nucli i fosforilar factors de transcripció, com ara NF- κ B (Palona i col., 2006) en residus específics per tal de regular-ne l'activació. La primera cascada MAPK que es va identificar, i la més coneguda en mamífers, fou la composta per les MAPK anomenades ERK-1 i ERK-2 (també conegudes com a p42 i p44 MAPK), les quals activen MEK-1 i MEK-2 que, al seu torn, són activades per una MAPKKK que pertany al grup de les Raf (Cobb i Goldsmith, 1995) (Figura 17).

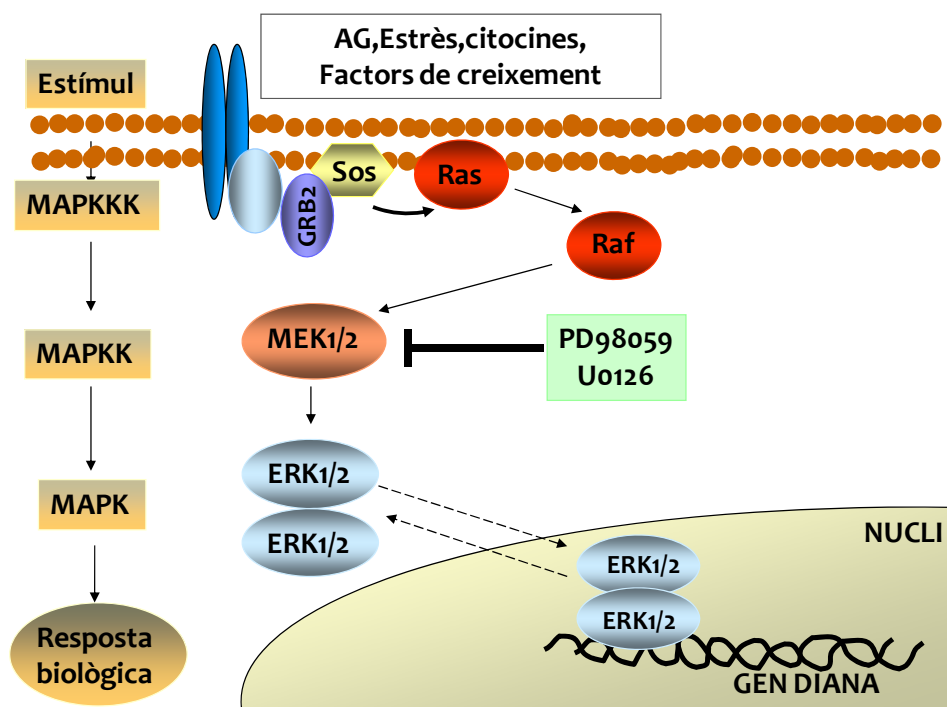


Figura 17. Esquema de la via de les MAPK composta per les proteïnes Raf, MEK1/2 i ERK1/2.

Posteriorment es van identificar tres subfamílies més, la de les JNKs, p38 MAPKs i ERK-5 (Chang i Karin, 2001). La cascada de les JNKs està formada per JNK-1, JNK-2 i JNK-3, les quals són activades per JNKK-1 i JNKK-2 (també conegudes

com a MKK4 i MKK7). Aquestes, al seu torn, poden ser activades per diverses MAPKKs com, MEKK-1, MEKK-2, MEKK-3, MEKK-4, ASK i MLK-3 entre d'altres. Pel que fa a les p38 (p38 α i p38 β) són activades per la MKK-4, MKK-3 i MKK-6 i les responsables de l'activació d'aquestes són MEKK-1, MEKK-3, TAK-1, MLK-3 i ASK entre d'altres (Chang i Karin i col., 2001). Tant JNK com p38 són conegudes com a proteïnes cinases activades per estrès (*stress-activated protein kinases*; SAPKs), ja que les citocines proinflamatòries i l'estrès ambiental com les radiacions ultraviolades o el xoc osmòtic en produeixen l'activació. D'altra banda, les ERKs s'activen majoritàriament en resposta a senyals originats per receptors o per proteïnes tirosina cinases. Per exemple, la insulina a més d'activar la via de la PI3-K per tal de realitzar accions metabòliques, també pot activar la via MEK-ERK en miotubs de rata L6 i realitzar efectes mitogènics (Gao i col., 2008). D'altra banda, en la mateixa via MEK-ERK s'ha observat que tractaments amb TNF- α poden bloquejar l'activació produïda per la insulina (Begum i col., 1996).

S'ha descrit que les MAPKs poden activar-se per estrès metabòlic com ara dietes riques en greixos i models genètics d'obesitat. L'activitat de la JNK, per exemple, està elevada en fetge, teixit adipós i múscul esquelètic d'animals alimentats amb una dieta grassa o en models genètics d'obesitat, fet que s'ha relacionat amb l'aparició de RI (Hirosumi i col., 2002). La p38 MAPK també està hiperactivada en múscul esquelètic, fetge i cor d'animals que se'ls ha induït obesitat a través de la dieta (Leng i col., 2004; Li i col., 2005), i el mateix s'observa amb l'activitat ERK en fetge i teixit adipós de models genètics d'obesitat (Gum i col., 2003; Bost i col., 2005). De fet, el tractament d'adipòcits 3T3-L1 amb palmitat causa un increment de la IL-6 que es reverteix quan s'inhibeix l'activació de les proteïnes MEK i PKC amb els inhibidors U0126 i bisindolilmaleimida (Bis), respectivament (Ajuwon i Spurlock, 2005). En el mateix sentit, estudis previs realitzats pel nostre grup mostren que els inhibidors de la

via ERK-MAPK, PD98059 i U0126, prevenen l'augment de l'expressió de la citocina TNF- α induïda pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques C2C12 (Jové i col., 2006).

5.3.3. CICLOOXIGENASA-2

Un dels gens diana de NF- κ B que juga un paper important en la inflamació és la COX-2 (Tanabe i Tohnai, 2002). La COX-2 forma part de les tres isoformes que existeixen de la COX, les quals són: COX-1, COX-2 i COX-3. La COX-1 s'expressa de manera constitutiva i està involucrada en l'homeòstasi cel·lular de molts teixits, en concret de la mucosa gàstrica i les plaquetes. La COX-2 és la isoforma induïble i s'expressa en situacions de dany o inflamació (McCormack, 1998), tot i que s'han detectat concentracions basals de l'enzim al cervell i al ronyó. Pel que fa a la COX-3, sembla estar involucrada en el control de la febre per part del sistema nerviós central (Warner i Mitchell, 2002). Tots els fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus són capaços d'inhibir la COX i suprimir la inflamació, la febre i el dolor, tot i que dins d'aquest grup existeixen els inhibidors selectius de la COX-2, com ara l'inhibidor NS-398, per tal d'evitar els efectes negatius de la inhibició de la COX-1 sobre el tracte gastrointestinal (Lanas i col., 2003).

La COX és l'enzim clau per a la síntesi de prostaglandines (PGs) a partir de l'àcid araquidònic. L'àcid araquidònic és un fosfolípid de membrana que, per acció de la fosfolipasa citoplasmàtica A_2 (cPLA $_2$), és alliberat al citosol on serà utilitzat per a generar PGs. De manera seqüencial, la COX transforma l'àcid araquidònic a prostaglandina (PG) G_2 (PGG $_2$) i posteriorment aquesta és reduïda per formar PGH $_2$. Finalment, sintases específiques converteixen la PGH $_2$ a PGE $_2$, D $_2$ i F $_2$, prostaciclina (PGI $_2$) i tromboxans (TX). L'àcid araquidònic també pot ser transformat a altres

productes, a més de les PGs, mitjançant els enzims lipooxigenasa i citocrom P450 (Figura 18). Els productes formats a partir de l'àcid araquidònic són coneguts com a eicosanoids i s'ha descrit que poden afectar moltes vies de senyalització que modulen processos fisiològics com la inflamació, l'ovulació, la mitogènesi i respostes immunes (Kam i See, 2000). La formació de PGs s'ha detectat a gairebé tots els teixits i fluids corporals i un cop sintetitzades són alliberades a l'espai extracel·lular on produeixen efectes autocrins o paracrins.

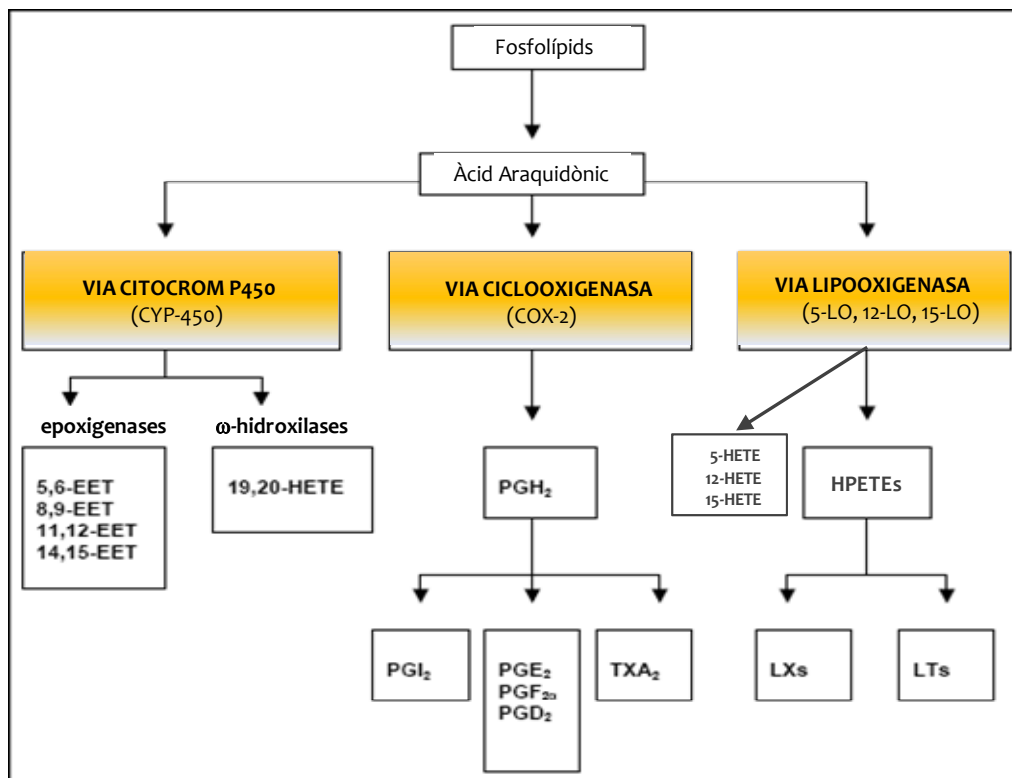


Figura 18. Esquema de les vies a través de les quals l'àcid araquidònic és transformat en diferents productes. (Adaptat de: Kompanowska-Jeziarska i col., J Physiol Pharmacol. 59: 137-49, 2008)

La PGE₂ sembla ser un important mediador de la inflamació en el múscul esquelètic que promou la síntesi de citocines proinflamatòries, la vasodilatació amb un augment de la permeabilitat vascular i la quimiotaxi de les cèl·lules inflamatòries

(Sakamoto i col., 2004; Shen i col., 2005), mentre que la 15d-PGJ₂ desenvoluparia efectes immunomoduladors i antiinflamatoris (Lawrence i col., 2002; Gilroy i col., 2003). De fet, estudis realitzats en ratolins COX2^{-/-} mostren una disminució de la síntesi de PGE₂ i una resposta inflamatòria més moderada (Shen i col., 2006). D'altra banda, TXA₂ és un agent vasoconstrictor i proagregatori.

De tota manera, el rol de les PGs no està ben establert. Les activitats de les PGs són mediades per receptors de membrana, tot i que alguns efectes els porten a terme mitjançant la unió a proteïnes intracel·lulars. Es tracta de receptors acoblats a proteïnes G específics per a cadascun dels tipus de PGs, tot i que hi ha certa reactivitat creuada entre els diversos tipus de PGs i els diferents receptors. Els que corresponen a la PGE₂ s'anomenen receptors EP, i per a la PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ i TXA₂ s'anomenen FP, DP, IP i RP, respectivament (Narumiya i col., 1999). En el cas de la PGE₂, existeixen quatre subtipus de receptors EP: EP₁, EP₂, EP₃ i EP₄ que poden exercir accions diferents. S'ha descrit, per exemple, que EP₁ i EP₃ provoquen un efecte constrictor en múscul llis, mentre que EP₂ i EP₄ exerceixen efectes dilatadors en els bronquïols i en venes i arteries, respectivament (Coleman i col., 1994a i 1994b). A més, estudis recents mostren que la PGE₂ pot induir l'expressió de la citocina inflamatòria IL-8 a través del receptor EP₄ (Dey i col., 2009).

Els nivells de l'enzim COX-2 es troben incrementats en adipòcits d'humans obesos, fet que suggereix que l'activació de la COX-2 en la inflamació produïda per l'obesitat visceral és important en el desenvolupament de la RI (Fain i col., 2002; Hsieh i col., 2009). En el mateix sentit, s'ha observat una associació entre la inflamació mediada per la COX-2 i l'estrés oxidatiu amb l'aparició de DM2 en homes ancians (Helmersson i col., 2004) i en indis Pima s'ha relacionat la DM2 amb una variant del promotor del gen induïble de la COX-2 (Konheim i Wolford, 2003). L'increment de la COX-2 en estats d'hiperglucèmia sembla ser mediada per les espècies reactives de

l'oxígen i l'activació de la PKC en monòcits i endoteli (Cosentino i col., 2003, Shanmugam i col., 2003).

Malgrat que totes aquestes dades fan pensar que la COX-2 està relacionada amb l'extensió de la inflamació, hi ha altres dades que semblen indicar el contrari, ja que les PGs generades per la COX-2 poden exercir efectes antiinflamatoris (Peebles i col., 2002). Així, estudis recents mostren que la 15-deoxi PGJ₂ (15-dPGJ₂), formada a partir de la deshidratació de la PGJ₂, pot desenvolupar funcions antiinflamatòries perquè és capaç d'inhibir la IKK (Scher i Pillinger, 2005), impedir la interacció de NF- κ B als seus llocs d'unió a l'ADN (Straus i col., 2000; Rossi i col., 2000) i inhibir la formació de IL-6 i TNF- α (Azuma i col., 2001). A més, pot activar les vies Ras/Erk i PI3-K. Tanmateix, també pot unir-se i activar PPAR γ (Su i Lewis, 2001; Ide i col., 2003) i realitzar efectes antiinflamatoris, ja que augmenta l'expressió de la proteïna inhibidora de NF- κ B, I κ B α (Scher i Pillinger, 2005). El paper que juguen altres PGs com la PGF_{2 α} i la PGE₂ en la inflamació, en canvi, genera més controvèrsia. Mentre que alguns estudis mostren els efectes proinflamatoris d'aquestes dues PGs (Chung i col., 2009; Chen i col., 2009; Dey i col., 2009), d'altres suggereixen que en determinats contextos poden realitzar accions antiinflamatòries. En aquest sentit, treballs de Pillinger i col. (2004, 2005) mostren que la PGE₂ és capaç d'inhibir l'activitat de NF- κ B (Gomez i col., 2005; Pillinger i col., 2004), i que la PGF_{2 α} pot contribuir en la resolució de la inflamació (Colville-Nash i col., 2005). Per tant, hi ha resultats contradictoris sobre el paper de la COX-2 en la inflamació i es desconeix quin paper juga en la inflamació induïda per AG en cèl·lules musculars esquelètiques.

OBJECTIUS



El fet que més del 80% de pacients diabètics tipus 2 pateixin obesitat (Boden i col., 1995) mostra una estreta relació entre aquestes dues patologies. La presència de nivells elevats d'AG circulants, alliberats pel teixit adipós, en pacients amb obesitat s'ha relacionat amb el desenvolupament de RI en el múscul esquelètic. De fet, s'ha suggerit que els nivells elevats d'AGL són els responsables d'iniciar un procés inflamatori que desencadena un empitjorament de la sensibilitat a la insulina (Kim i col., 2001) a través, entre d'altres factors, d'un increment en la secreció de citocines com la IL-6. Tot i que el vincle entre l'increment d'AGL en plasma i la diabetis està àmpliament acceptat, els mecanismes implicats en l'aparició de RI i DM2 induïda per aquests AGL no són ben coneguts. En conseqüència, aprofundir en aquests mecanismes i en la seva modulació podria afavorir el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per atenuar i millorar la RI. En concret, els objectius plantejats en aquesta Tesi Doctoral han estat els següents:

1. Determinar els efectes de l'AG saturat palmitat i el monoinsaturat oleat sobre l'expressió del coactivador PGC-1 α en cèl·lules musculars esquelètiques i investigar els mecanismes implicats.
2. Avaluar l'efecte de l'AG monoinsaturat oleat per a prevenir la inflamació i la RI induïdes per l'AG saturat palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques.
3. Estudiar l'efecte dels AG palmitat i oleat sobre la regulació de l'expressió dels gens COX-2 i TLR-2 i determinar la funció de la COX-2 en el procés inflamatori induït per palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques.
4. Determinar la capacitat de l'agonista PPAR δ GW501516 per a reduir el procés inflamatori i la RI induïts per palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques.

RESULTATS



PUBLICACIÓ 1

Palmitate-Mediated Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α in Skeletal Muscle Cells Involves MEK1/2 and Nuclear Factor- κ B

Teresa Coll, Mireia Jové, Ricardo Rodríguez-Calvo, Elena Eyre, Xavier Palomer, Rosa M. Sánchez, Manuel Merlos, Juan C. Laguna i Manuel Vázquez-Carrera

Diabetes 55:2779-2787, 2006

Diversos estudis determinen que nivells elevats d'AGL en circulació, en part a conseqüència d'una lipòlisi excessiva del teixit adipós, són els responsables de la RI en pacients diabètics tipus 2. En presència d'aquests nivells elevats d'AGL, el múscul esquelètic veu reduïda la taxa d'oxidació d'aquests, provocant una acumulació de metabolits lipídics en forma de TG, DAG i ceramides a l'interior cel·lular. De fet, s'ha relacionat l'acumulació intracel·lular de DAG amb l'aparició de RI. A més, l'exposició de cèl·lules musculars esquelètiques a nivells elevats d'AGL pot afectar l'expressió de diferents gens, entre ells PGC-1 (PPAR γ coactivator-1), que poden contribuir al desenvolupament de la RI. PGC-1 regula l'expressió de molts gens que codifiquen per proteïnes mitocondrials, promovent així la capacitat oxidativa de les cèl·lules musculars esquelètiques. S'ha descrit que la seva expressió està reduïda en estats d'insulino-resistència. No obstant, no es coneixen els tipus d'AG que poden provocar la disminució de l'expressió de PGC-1 ni tampoc els mecanismes implicats.

En el present estudi s'utilitzaren cèl·lules musculars esquelètiques C2C12 i s'exposaren a l'AG saturat palmitat i a l'AG monoinsaturat oleat durant 16 hores amb l'**objectiu** de determinar els efectes de cadascun d'aquests AG en l'expressió del gen PGC-1 i els mecanismes responsables de causar la disminució de l'expressió de PGC-1 α .

Els **resultats** obtinguts mostren que el palmitat redueix en un 66% l'expressió de PGC-1 α , però no afecta l'expressió de PGC-1 β , i en canvi l'AG monoinsaturat oleat no altera l'expressió de cap d'aquests gens. El mecanisme mitjançant el qual el palmitat realitza aquests efectes sembla involucrar la via ERK-MAPK i NF- κ B, ja que l'exposició de les cèl·lules als inhibidors tant de la via ERK-MAPK (PD98059 i U0126) com de NF- κ B (partenolide) prevenen la reducció de l'expressió de PGC-1 α .

Aquestes dades estableixen els mecanismes implicats en la reducció de l'expressió de PGC-1 α per part del palmitat i aporten noves connexions entre l'activació del procés inflamatori i les alteracions metabòliques.

Original Article

Palmitate-Mediated Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α in Skeletal Muscle Cells Involves MEK1/2 and Nuclear Factor- κ B Activation

Teresa Coll, Mireia Jové, Ricardo Rodríguez-Calvo, Elena Eyre, Xavier Palomer, Rosa M. Sánchez, Manuel Merlos, Juan Carlos Laguna, and Manuel Vázquez-Carrera

The mechanisms by which elevated levels of free fatty acids cause insulin resistance are not well understood. Previous studies have reported that insulin-resistant states are characterized by a reduction in the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1, a transcriptional activator that promotes oxidative capacity in skeletal muscle cells. However, little is known about the factors responsible for reduced PGC-1 expression. The expression of PGC-1 mRNA levels was assessed in C2C12 skeletal muscle cells exposed to palmitate either in the presence or in the absence of several inhibitors to study the biochemical pathways involved. We report that exposure of C2C12 skeletal muscle cells to 0.75 mmol/l palmitate, but not oleate, reduced PGC-1 α mRNA levels (66%; $P < 0.001$), whereas PGC-1 β expression was not affected. Palmitate led to mitogen-activated protein kinase (MAPK)-extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 (MEK1/2) activation. In addition, pharmacological inhibition of this pathway by coinubation of the palmitate-exposed cells with the MEK1/2 inhibitors PD98059 and U0126 prevented the downregulation of PGC-1 α . Furthermore, nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation was also involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation, since the NF- κ B inhibitor parthenolide prevented a decrease in PGC-1 α expression. These findings indicate that palmitate reduces PGC-1 α expression in skeletal muscle cells through a mechanism involving MAPK-ERK and NF- κ B activation. *Diabetes* 55:2779–2787, 2006

From the Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Manuel Vázquez-Carrera, Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

Received for publication 14 November 2005 and accepted in revised form 11 July 2006.

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-related kinase; FFA, free fatty acid; I κ B, inhibitor of κ B; IL, interleukin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK1/2, MAPK-ERK 1/2; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PMA, phorbol myristate acid; PGC, PPAR- γ coactivator; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PKC, protein kinase C.

DOI: 10.2337/db05-1494

© 2006 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Different lines of evidence support the contention that elevated plasma free fatty acids (FFAs) are responsible for much of the insulin resistance present in type 2 diabetic patients. In fact, several studies (1–3) have consistently demonstrated that elevated plasma FFA levels generate insulin resistance in healthy subjects. Although insulin-resistant subjects exhibit chronic increases in plasma FFAs, due in part to excess lipolysis (4), their rates of fatty acid oxidation in skeletal muscle are reduced (5). As a result of these changes, fatty acids accumulate in skeletal muscle of insulin-resistant subjects and lead to enhanced levels of triglycerides (6), fatty acyl CoA (7), diacylglycerol (7), and ceramides (8). It is worth noting that a positive correlation has been reported between increased intramyocellular triglyceride content and insulin resistance (9), suggesting that prevention of lipid accumulation in skeletal muscle may improve insulin resistance. Despite such data, it is not known how elevated levels of FFAs result in lipid accumulation in skeletal muscle cells.

Exposure of skeletal muscle cells to elevated FFAs may affect the expression of several genes, contributing to the development of insulin resistance. We (10) and other researchers (11–13) have reported that insulin-resistant states are characterized by a reduction in skeletal muscle of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1), the transcriptional coactivator driving the expression of many genes coding for proteins in mitochondria. PGC-1 was initially identified as a protein that interacted with PPAR γ (14). Several isoforms of PGC-1 have been cloned, including PGC-1 α , PGC-1 β , and the PGC-related coactivator (15). PGC-1 α is highly expressed in tissues with high metabolic rates, such as the heart, muscle, and brown adipose tissue (15). PGC-1 α acts as a transcriptional coactivator for PPARs and activates the expression of genes involved in fatty acid metabolism. It has recently been reported that lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and PGC-1 in human skeletal muscle (16). This discovery suggests that enhanced lipid levels in plasma may be responsible for the downregulation of PGC-1 in insulin-resistant states. Consistent with this finding, it has been reported that PGC-1 expression has been shown to be inversely correlated with plasma FFA concentration (13). However, nothing is yet known either about the kind of

fatty acid that may reduce PGC-1 expression or the mechanisms involved. To gain a better understanding of the mechanism by which skeletal muscle cell exposure to fatty acids may result in PGC-1 downregulation, we used the myoblast C2C12 cell line, which develops biochemical and morphological properties characteristic of skeletal muscle and which has been proven useful in studies of skeletal muscle metabolism (17). Exposure of skeletal muscle C2C12 cells to the saturated fatty acid palmitate, but not to the monounsaturated fatty acid oleate, reduced PGC-1 α mRNA expression, whereas PGC-1 β was not significantly affected. The mechanism by which palmitate reduced the expression of PGC-1 α seems to involve mitogen-activated protein kinase (MAPK)–extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 (MEK1/2), since inhibition of this pathway prevented PGC-1 α downregulation. These results identify high plasma levels of the saturated fatty acid palmitate as one of the factors potentially contributing to the downregulation of PGC-1 α in skeletal muscle.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Anti-interleukin (IL)-6 antibody, C₂-ceramide, ISP1, and pyrrolidine dithiocarbamate were obtained from Sigma (St. Louis, MO) and PD95059 and calphostin C from Biomol Research Labs (Plymouth Meeting, PA). Other chemicals were purchased from Sigma.

Cell culture. Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. When cells reached confluence, the medium was switched to the differentiation medium containing DMEM and 2% horse serum, which was changed every other day. After 4 additional days, the differentiated C2C12 cells had fused into myotubes. Lipid-containing media were prepared by conjugation of FFAs with FFA-free BSA, using a method modified from that described by Chavez et al. (18). Briefly, FFAs were dissolved in ethanol and diluted 1:100 in DMEM containing 2% (wt/vol) fatty acid-free BSA. Myotubes were incubated for 16 h in serum-free DMEM containing 2% BSA in either the presence (FFA-treated cells) or absence (control cells) of FFAs. Cells were then incubated with 100 nmol/l insulin for 10 min. Following incubation, RNA was extracted from myotubes as described below.

Measurements of mRNA. Levels of PGC-1 α and - β mRNA were assessed by RT-PCR, as previously described (19). Total RNA was isolated by using the Ultraspec reagent (Biotecx, Houston). The total RNA isolated by this method was undegraded and free of protein and DNA contamination. The sequences of the sense and antisense primers used for amplification were PGC-1 α , 5'-CCCCTGGATGAAGACGGATTG-3' and 5'-GTGGGTGTGGTTTGTGTCATG-3'; PGC-1 β , 5'-CCTTTATCTGTGCCCCAGC-3' and 5'-CAAGGCGCGT GACTTCTGGAA-3'; and *Aprt* (adenosyl phosphoribosyl transferase), 5'-GCCTCTGGCCAGTCACTGA-3' and 5'-CCAGGCTCACACTCCACCA-3'. Amplification of each gene yielded a single band of the expected size (PGC-1 α : 228 bp, PGC-1 β : 185 bp, and *Aprt*: 329 bp). Preliminary experiments were carried out with various amounts of cDNA to determine nonsaturating conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed by the RT-PCR method described in this study (20). Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilbert Lourmat Imaging). The results for the expression of specific mRNAs are always presented relative to the expression of the control gene (*Aprt*).

Determination of ceramide levels. The content of ceramides in skeletal muscle and C2C12 myotubes was determined by the diacylglycerol kinase method. Briefly, lipids were extracted from ~50 mg skeletal muscle with 600 μ l chloroform, methanol, and 1 N HCl (100:100:1). After agitation and centrifugation, the lower phase containing the chloroform-extracted lipids was transferred to a new microfuge tube. Chloroform was evaporated under an N₂ stream. Dried lipids were resuspended in 300 μ l of 0.1 N KOH in methanol and incubated for 1 h at 37°C to eliminate diacylglycerol. Then, 300 μ l PBS were added and lipid extraction was repeated as indicated above. Lipids were resuspended in 100 μ l of reaction buffer (150 μ g/100 μ l cardiolipin, 250 μ mol/l diethylenetriaminepentaacetic acid, 51 nmol/l octyl β -D-glucopyranoside, 50 nmol/l NaCl, 51 nmol/l imidazol, 1 nmol/l EDTA, 12.5 nmol/l MgCl₂, 2 mmol/l dithiothreitol, 0.7% glycerol, 70 μ mol/l β -mercaptoethanol, 500 μ mol/l ATP, and 5 μ Ci/100 μ l [γ -³²P]ATP), and 35 ng of diacylglycerol kinase was added to each sample. Reactions were incubated at 30°C for 30 min and stopped by the addition of 170 μ l of stop buffer (135

nmol/l NaCl, 1.5 mmol/l CaCl₂, 0.5 mmol/l glucose, and 10 mmol/l HEPES, pH 7.2) and 30 μ l of 100 mmol/l EDTA. Lipids were extracted again with 1 ml chloroform, methanol, and 1 N HCl (100:100:1), resuspended in 40 μ l chloroform, spotted onto silica gel TLC plates (Whatman), and resolved using chloroform:methanol:acetic acid (65:15:5) as a solvent. Plates were measured in a PhosphorImager (BioRad). Quantification of ceramide mass was obtained by comparison with a standard curve ranging from 0 to 1,000 pmol ceramide-1-phosphate (Sigma), which was processed in parallel to the samples.

Isolation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay. Nuclear extracts were isolated according to Andrews et al. (21). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed using double-stranded oligonucleotides (Promega, Madison, WI) for the consensus binding site of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) nucleotide (5'AGTTGAGGGGACTTTC CCAGGC-3'). Oligonucleotides were labeled in the following reaction: 2 μ l of oligonucleotide (1.75 pmol/ μ l), 2 μ l of 5 \times kinase buffer, 1 μ l of T4 polynucleotide kinase (10 units/ μ l), and 2.5 μ l [γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol at 10 mCi/ml) incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by adding 90 μ l of TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, and 1 mmol/l EDTA). To separate the labeled probe from the unbound ATP, the reaction mixture was eluted in a Nick column (Pharmacia, Sant Cugat, Spain) according to the manufacturer's instructions. Five micrograms of crude nuclear protein were incubated for 10 min on ice in binding buffer [10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 25 mmol/l KCl, 0.5 mmol/l dithiothreitol, 0.1 mmol/l EDTA, pH 8.0, 5% glycerol, 5 mg/ml BSA, 100 μ g/ml tRNA, and 50 μ g/ml poly(dI-dC)] in a final volume of 15 μ l. The labeled probe (~60,000 cpm) was added and the reaction incubated for 15 min at room temperature. Where indicated, specific competitor oligonucleotide was added before the labeled probe and incubated for 10 min on ice. p65 antibody was added 15 min before incubation with the labeled probe at 4°C. Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4°C on a 5% acrylamide gel and subjected to autoradiography.

Immunoblotting. To obtain total proteins, C2C12 myotubes were homogenized in cold lysis buffer (5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 0.1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/l sodium orthovanadate, and 5.4 μ g/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Total and nuclear proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Western blot analysis was performed using antibodies against total MEK1/2, phospho-MEK1/2 (Ser^{216/221}), total ERK1/2, and phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), pan-protein kinase C (PKC) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), PGC-1 (Chemicon, Temecula, CA), α -actin, and β -tubulin (Sigma). Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). The equal loading of proteins was assessed by red phenol staining. The size of detected proteins was estimated using protein molecular mass standards (Invitrogen, Barcelona, Spain).

Statistical analyses. Results are expressed as the mean \pm SD of five separate experiments. Significant differences were established by either the Student's *t* test or one-way ANOVA, according to the number of groups compared, using the computer program GraphPad Instat (GraphPad Software V2.03; GraphPad Software, San Diego, CA). In the latter case, when significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was performed. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Palmitate, but not oleate, reduces PGC-1 α mRNA levels in skeletal muscle cells. To study the effects of FFA on PGC-1 expression in C2C12 skeletal muscle cells, we chose the saturated FFA palmitate (16:0) and the monounsaturated FFA oleate (18:1 n-9), which are among the most common fatty acids (22). Because we recently observed that exposure of C2C12 skeletal muscle cells to palmitate for 16 h leads to reduced insulin-stimulated glucose uptake (19), we used this experimental condition to evaluate the effects of palmitate and oleate on PGC-1 α expression. Skeletal muscle cells exposed to 0.75 mmol/l palmitate showed a 66% ($P < 0.001$) reduction in PGC-1 α expression compared with control cells, whereas the reduction attained by the same concentration of oleate did not reach significance (Fig. 1A). The effects of palmitate on PGC-1 α expression in skeletal muscle cells were specific, since neither palmitate nor oleate affected the expression of PGC-1 β (Fig. 1B). Further, we studied the time response

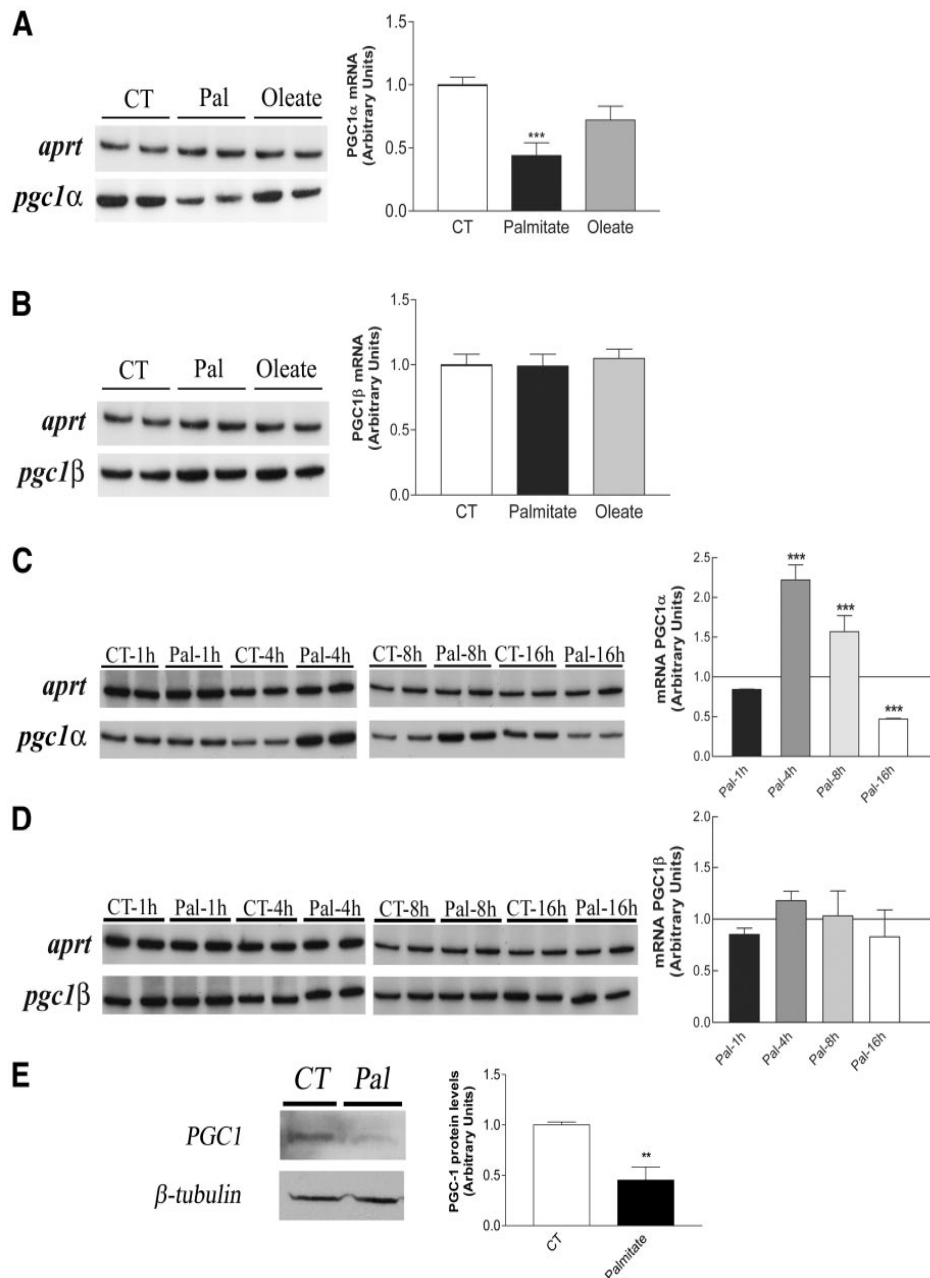


FIG. 1. Palmitate, but not oleate, downregulates PGC-1α mRNA levels in skeletal muscle cells. Analysis of the mRNA levels of PGC-1α (A) and PGC-1β (B) in C2C12 myotubes incubated in the presence or in the absence of the indicated FFAs (16 h, 0.75 mmol/l). A total of 0.5 μg of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification, normalized to the APRT mRNA levels, are shown. Data are expressed as the mean ± SD of five different experiments. ****P* < 0.001 vs. control cells. Time course of palmitate effects on PGC-1α (C) and PGC-1β (D) mRNA levels in C2C12 myotubes incubated with 0.75 mmol/l palmitate for the indicated time points. A representative autoradiogram and quantification, normalized to the APRT mRNA levels, are shown. Data (mean ± SD of five different experiments) are expressed as the relative increase to control cells at the same time point. ****P* < 0.001 vs. control cells. E: Nuclear extracts from C2C12 myotubes incubated in the presence or in the absence of 0.75 mmol/l palmitate for 16 h were assayed for Western blot analysis with PGC-1 and β-tubulin antibodies. Data are expressed as means ± SD of three different experiments normalized to β-tubulin levels. ***P* < 0.01 vs. control cells.

effects of palmitate on PGC-1 mRNA levels. Whereas palmitate treatment for 1 h did not significantly affect PGC-1α mRNA expression, a slight increase was observed after four (twofold, *P* < 0.001) and 8 h (1.5-fold, *P* < 0.001), reaching a deep reduction after 16 h of treatment (Fig. 1C). In contrast to PGC-1α, a time course study with palmitate did not show changes in PGC-1β expression

(Fig. 1D). The reduction in mRNA expression was correlated with protein levels, since Western immunoblot analysis revealed that skeletal muscle cells exposed to palmitate for 16 h showed a significant reduction (55%, *P* < 0.01) in PGC-1 protein expression (Fig. 1E).

Ceramides and PKC activation are not involved in palmitate-mediated PGC-1α downregulation in skel-

etal muscle cells. Since palmitoyl-CoA is a precursor of sphingolipid synthesis, palmitate treatment may result in enhanced ceramide synthesis and apoptosis (23). Thus, to gain further insight into the mechanism by which palmitate downregulates PGC-1 α mRNA levels, we tested the effects of one inhibitor of de novo ceramide synthesis. The initial step in ceramide synthesis is the formation of 3-ketodihydrosphingosine from palmitoyl-CoA and L-serine. This step is inhibited by the sphingosine analog ISP1 at picomole concentrations (24). To further clarify the potential involvement of ceramides, we treated C2C12 skeletal muscle cells with C₂-ceramide, a cell-permeable ceramide analog. First, we evaluated the effects of palmitate, ISP1, and C₂-ceramide on the intracellular concentrations of ceramides. Incubation of C2C12 myotubes with palmitate and the C₂-ceramide analog enhanced ceramide levels (4.5- and 2.7-fold induction, respectively), whereas coinubation of the cells with palmitate and ISP1 prevented the increase in the levels of these lipid mediators (Fig. 2A). Regarding the expression of PGC-1 α , coinubation of the cells with palmitate in the presence of ISP1 did not affect the fall (69%, $P < 0.001$) in the mRNA levels of this coactivator attained by palmitate (Fig. 2B). Similarly, the addition of 50 $\mu\text{mol/l}$ C₂-ceramide did not modify PGC-1 α mRNA levels (Fig. 2B). Overall, these data suggest that de novo ceramide synthesis is not involved in the effects of palmitate on PGC-1 α expression.

As elevations in plasma FFAs may lead to diacylglycerol-mediated activation of PKC (25), we subsequently investigated whether palmitate-mediated PGC-1 α downregulation involved PKC activation. To test this hypothesis, we used two approaches. We first verified the effects of calphostin C, a strong and specific inhibitor of PKC (26), on PGC-1 α downregulation caused by palmitate in C2C12 myotubes. Cells were preincubated with calphostin C (100 $\mu\text{mol/l}$) for 30 min and subsequently stimulated with 0.75 mmol/l palmitate for 16 h. We then pretreated cells with 0.5 $\mu\text{mol/l}$ phorbol myristic acid (PMA) for 24 h before stimulation with palmitate. This long-term pretreatment with PMA causes PKC downregulation (27,28) (Fig. 2C). As shown in Fig. 2D, no changes were observed in PGC-1 α mRNA levels in those cells exposed to palmitate coinubated with either calphostin C or PMA. These data seem to rule out the involvement of PKC activation in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation in skeletal muscle cells. Finally, since we have recently reported that skeletal muscle cells exposed to palmitate secrete IL-6 into culture media (19), and that this IL-6 may affect cell metabolism, we determined whether IL-6 was involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation using an anti-IL-6 antibody. While treatment with palmitate led to a reduction in PGC-1 α mRNA levels, coinubation with anti-IL-6 antibody did not prevent this change (Fig. 2E).

Activation of the ERK-MAPK pathway and NF- κ B are involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation. Since activation of the ERK-MAPK cascade is reportedly activated by palmitate (29), we next evaluated its involvement in the downregulation of PGC-1 α following palmitate exposure. We first confirmed that under our conditions, exposure of the cells to palmitate led to MEK1/2 activation. Subsequent immunoblotting detection of total and phosphorylated MEK1/2 (Fig. 3A) revealed that palmitate treatment activated this pathway (1.75-fold induction, $P < 0.05$), whereas no significant changes were observed in cells exposed to oleate. To clearly demonstrate the involvement of the ERK-MAPK cascade in PGC-1 α downregulation in those cells incubated with

palmitate, we utilized pharmacological inhibitors to block the upstream regulators of ERK1/2. We assayed the effects of two MEK1/2 inhibitors: PD98059, a more general inhibitor of this pathway, and U0126, a more potent and specific ERK1/2 inhibitor that binds to MEK, thereby inhibiting its catalytic activity as well as phosphorylation of ERK1/2. The reduction in PGC-1 α mRNA levels achieved by palmitate (58%, $P < 0.001$ vs. control cells) was abrogated when the cells were coinubated with either PD98059 (19%, $P < 0.01$ vs. palmitate-treated cells) or U0126 (9%, $P < 0.001$ vs. palmitate-treated cells) (Fig. 3B), indicating that activation of the MAPK-ERK cascade was involved in the decrease of this coactivator following palmitate treatment. As control, we verified that U0126 treatment condition inhibited ERK1/2 activation (Fig. 3C).

Since we have previously reported that C2C12 exposure to palmitate activates NF- κ B (19), and activation of the ERK-MAPK cascade may influence NF- κ B activation in skeletal muscle (30), we next determined whether activation of this transcription factor was involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation. We first confirmed whether palmitate-mediated NF- κ B activation involved activation of the ERK-MAPK cascade by performing EMSA studies using nuclear extracts from palmitate-treated cells incubated either in the presence or in the absence of U0126. The NF- κ B probe formed two complexes with nuclear proteins (complexes I and II) (Fig. 4A). Specificity of the two DNA-binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabeled NF- κ B oligonucleotide. NF- κ B binding activity, primarily involving specific complex II, increased in nuclear extracts from palmitate-treated cells. However, U0126 prevented this increase in NF- κ B binding activity, indicating that in the presence of this MEK1/2 inhibitor, palmitate failed to induce this transcription factor. The addition of antibody against the p65 subunit of NF- κ B supershifted complex II, indicating that this band was mainly comprised of this subunit. No changes were observed in the DNA binding of nuclear proteins to an Oct-1 probe, indicating that the increase observed for the NF- κ B probe was specific (data not shown). As control, we verified that the NF- κ B inhibitor parthenolide prevented palmitate-induced NF- κ B activation (Fig. 4A). Since palmitate-induced NF- κ B activation is mediated by degradation of inhibitor of κ B (I κ B) α (19,31), we examined the effects of palmitate and U0126 on I κ B α protein levels. Whereas cells exposed to palmitate showed reduced I κ B α protein levels, this reduction was prevented in cells coinubated with palmitate and U0126 (Fig. 4B). The effect of palmitate on I κ B α protein levels was specific for this saturated fatty acid, given that oleate did not significantly affect the levels of this protein (Fig. 4C). To clearly demonstrate whether NF- κ B activation was involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation, we used the NF- κ B inhibitor parthenolide, which specifically inhibits NF- κ B activation by preventing I κ B degradation (32). The reduction in PGC-1 α mRNA expression levels attained by palmitate (51%, $P < 0.001$ vs. control cells) was prevented when C2C12 cells were coinubated with parthenolide (27%, $P < 0.05$ vs. palmitate-exposed cells) (Fig. 4D). In agreement with the results obtained for mRNA expression, coinubation of the cells with palmitate, in either the presence of U0126 or parthenolide, prevented the reduction in PGC-1 protein levels (Fig. 4E). Overall, these results suggest that PGC-1 α downregulation in skeletal muscle cells following palmitate exposure is regulated by the ERK-MAPK-NF- κ B pathway.

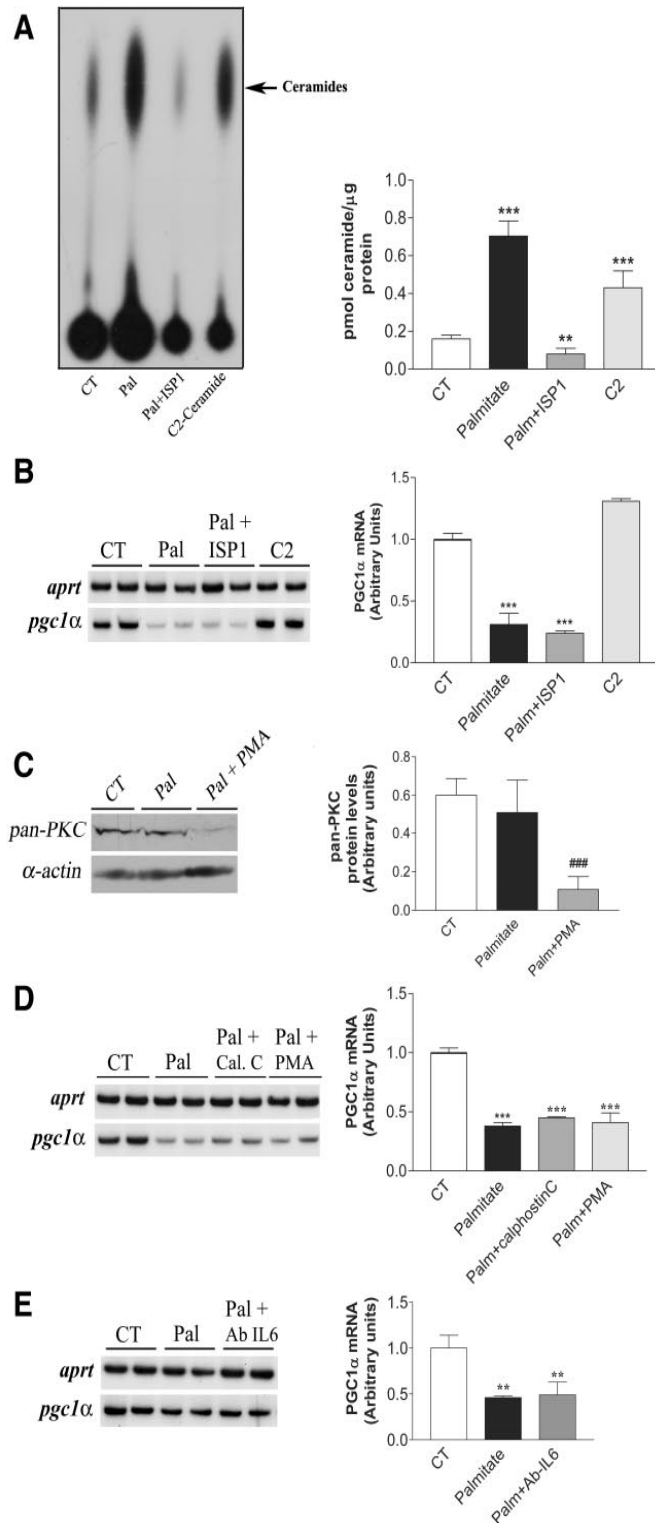


FIG. 2. Ceramides and PKC activation are not involved in palmitate-mediated downregulation of PGC-1 α in skeletal muscle cells. Measurement of ceramide (A) and PGC-1 α mRNA (B) levels in C2C12 myotubes incubated (16 h) with 0.75 mmol/l palmitate in the presence or in the absence of 100 nmol/l ISP1, an inhibitor of de novo ceramide synthesis. Cells were also treated with 50 μ mol/l C₂-ceramide, a cell-permeable ceramide analog. Lipid extracts were prepared and assayed for ceramides as detailed under RESEARCH DESIGN AND METHODS. Data are expressed as the mean \pm SD of three different experiments. A total of 0.5 μ g of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification, normalized to the APRT mRNA levels, are shown. C: Total protein extracts from C2C12 myotubes incubated with 0.75 mmol/l palmitate for 16 h in the presence or in the absence of 500 nmol/l PMA were assayed for Western blot analysis with pan-PKC and α -actin antibodies. Data are expressed as the mean \pm SD of three different experiments. C2C12 myotubes were incubated (16 h) with 0.75 mmol/l palmitate in the presence or in the absence of either 100 μ mol/l calphostin C, 500 nmol/l PMA (D), or 5 μ g/ml of anti-IL-6 antibody (E), and the mRNA levels of PGC-1 α were analyzed. Data are expressed as the mean \pm SD of five different experiments. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 vs. control cells; ###*P* < 0.001 vs. palmitate-treated cells.

DISCUSSION

Skeletal muscle insulin resistance is the major characteristic of type 2 diabetes (33). Insulin resistance correlates more strongly with intramyocellular lipid levels than with any other factor, including BMI or percent body fat

(7,34,35). Despite these data, the mechanisms by which elevated FFA levels cause intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance are not well understood. Elevated FFAs may affect the expression of several genes, contributing to intramyocellular lipid accumulation and,

PALMITATE DOWNREGULATES PGC-1 α

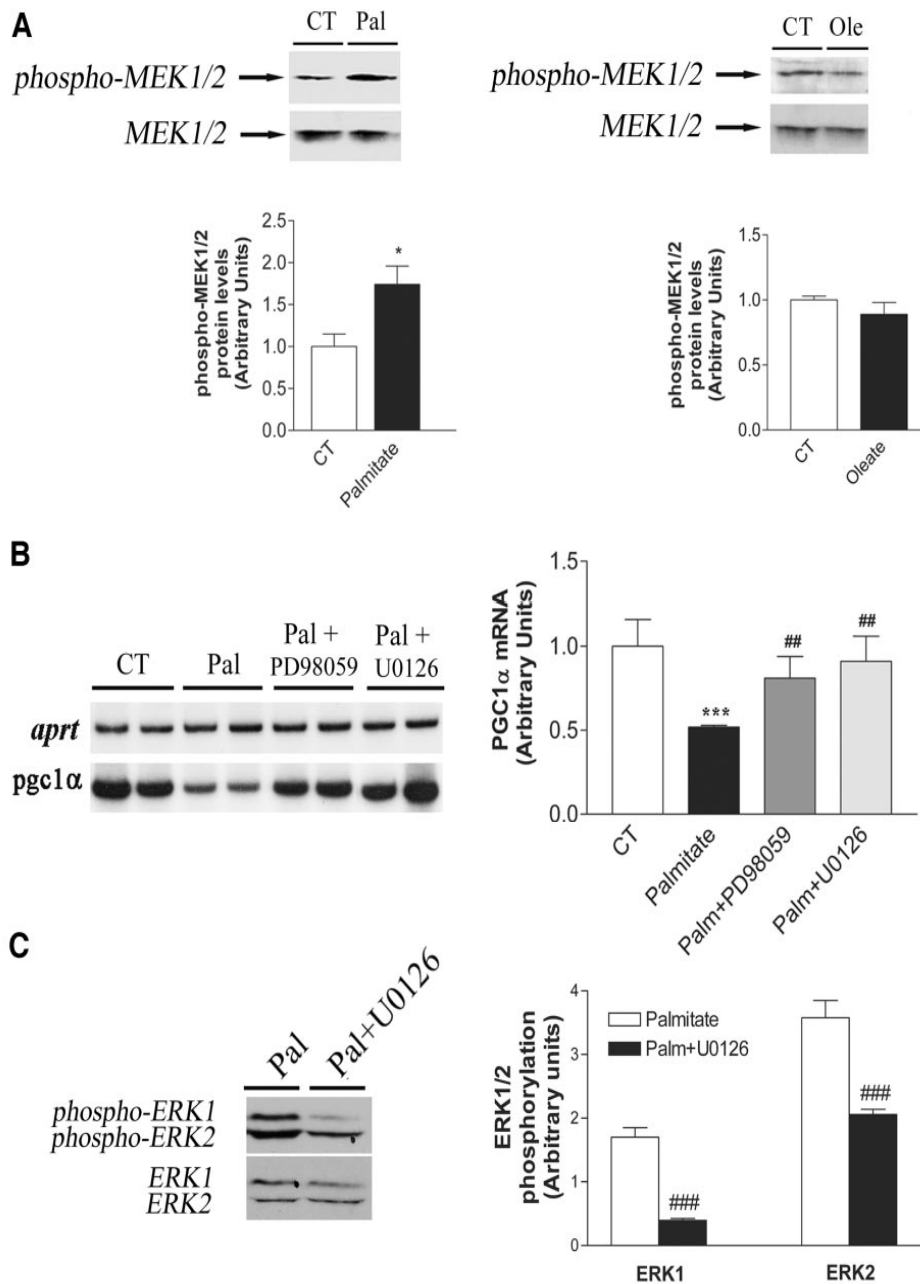


FIG. 3. The ERK-MAPK pathway is involved in palmitate-mediated PGC-1 α downregulation in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated (16 h) with 0.75 mmol/l fatty acids in the presence or in the absence of 100 μ mol/l PD98059 or 10 μ mol/l U0126, inhibitors of the ERK-MAPK pathway. **A**: Analysis of MEK 1/2 activity determined by immunoblotting. The level of phosphorylated MEK1/2 was normalized against total MEK1/2 in each sample. **B**: Analysis of the mRNA levels of PGC-1 α . A total of 0.5 μ g total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification, normalized to the APRT mRNA levels, are shown. Data are expressed as the mean \pm SD of five different experiments. * P < 0.05 and *** P < 0.001 vs. control cells; ## P < 0.01 vs. palmitate-treated cells. **C**: Analysis of ERK and phospho-ERK by immunoblotting of total protein extracts from C2C12 myotubes incubated with 0.75 mmol/l palmitate for 16 h in the presence or in the absence of 10 μ mol/l U0126. The level of phosphorylated ERK1/2 was normalized against total ERK1/2 in each sample. Data are expressed as the mean \pm SD of three different experiments. ### P < 0.001 vs. palmitate-treated cells.

as a result, to the development of insulin resistance. Interestingly, insulin-resistant states have been associated in skeletal muscle with decreased expression of PGC-1 α , a transcriptional coactivator promoting oxidative capacity in this tissue (10,13,16). Thus, overexpression of PGC-1 α in cultured myoblasts increases mitochondrial biogenesis

and oxidative respiration (36). Moreover, muscle-specific overexpression of PGC-1 α in transgenic mice results in enhanced mitochondrial biogenesis and more slow-twitch (type I) fiber formation (37). Although PGC-1 expression has been inversely correlated with plasma FFA levels (13) and lipid infusion decreased PGC-1 in skeletal muscle (16),

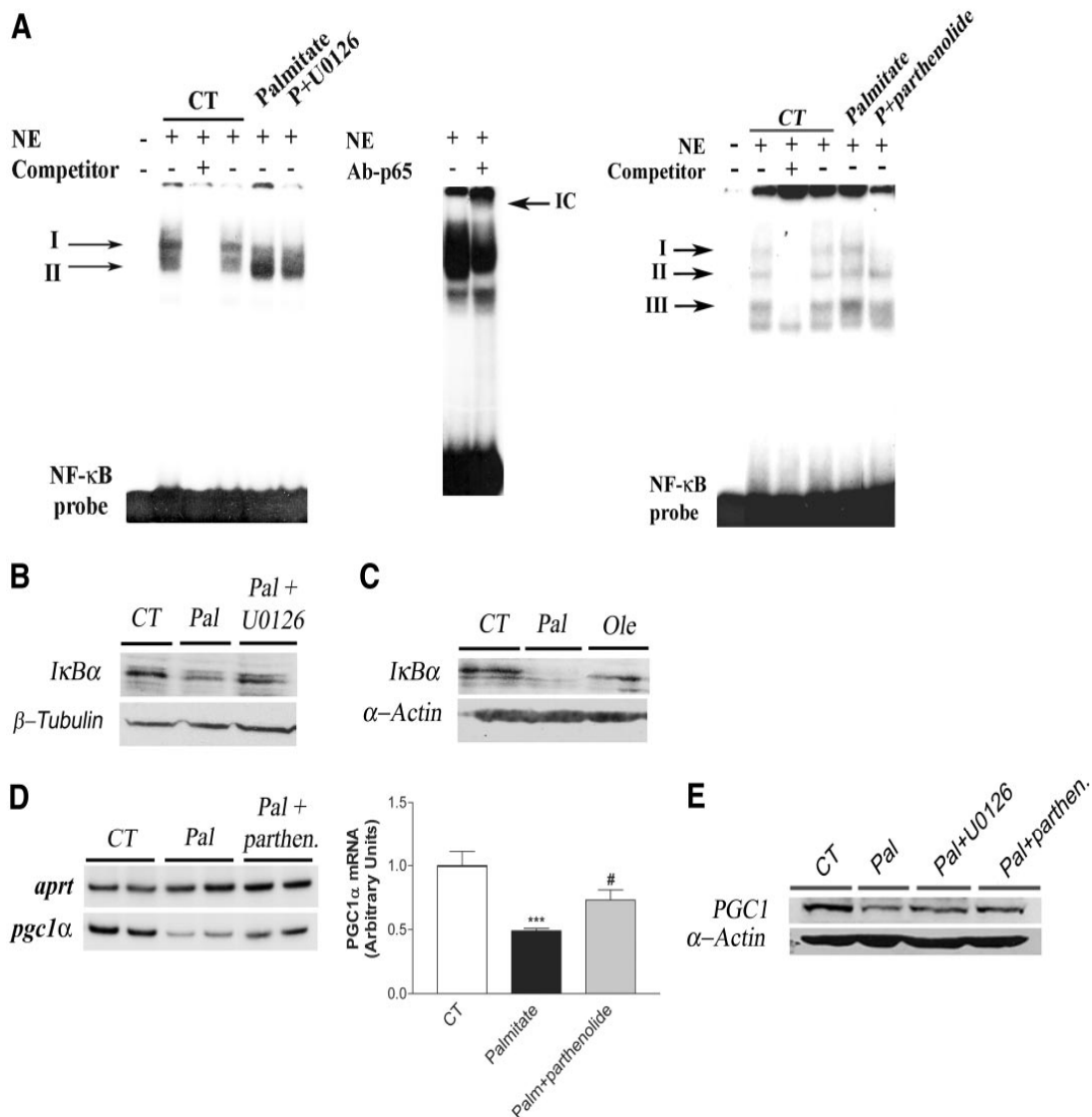


FIG. 4. NF-κB activation is involved in palmitate-mediated PGC-1α downregulation in skeletal muscle cells. *A*: The MEK1/2 inhibitor U0126 blocks the action of NF-κB by palmitate. C2C12 myotubes were incubated for 16 h with 0.75 mmol/l palmitate in the presence or in the absence of either 10 μmol/l U0126 or 10 μmol/l parthenolide. An autoradiograph of EMSA performed with a ³²P-labeled NF-κB nucleotide and crude nuclear protein extract (NE) is shown. Specific complexes, based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. A supershift analysis performed by incubating NE with an antibody directed against the p65 subunit of NF-κB is also shown. *B* and *C*: total protein extracts from C2C12 myotubes incubated for 16 h with either 0.75 mmol/l palmitate or oleate in the presence or in the absence of 10 μmol/l U0126 were assayed for Western blot analysis with IκBα antibody. *D*: C2C12 myotubes were incubated (16 h) with 0.75 mmol/l palmitate in the presence or in the absence of the NF-κB inhibitor (10 μmol/l) parthenolide. Analysis of PGC-1α mRNA levels. A total of 0.5 μg of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification, normalized to the APRT mRNA levels, are shown. Data are expressed as the mean ± SD of five different experiments. ****P* < 0.001 vs. control cells; #*P* < 0.05 vs. palmitate-treated cells. *E*: ERK-MAPK and NF-κB inhibitors prevent the decrease in PGC-1 protein levels in skeletal muscle cells exposed to palmitate. Nuclear extracts from C2C12 myotubes incubated with 0.75 mmol/l palmitate for 16 h in the presence or in the absence of U0126 (10 μmol/l) or parthenolide (10 μmol/l) were assayed for Western blot analysis with PGC-1 and α-actin antibodies.

little was known about the type of FFAs that may reduce PGC-1α or the biochemical pathways involved. Here, we report that the FFA palmitate reduces PGC-1α expression in skeletal muscle cells through a mechanism involving activation of the ERK-MAPK-NF-κB pathway.

The results presented here confirm the role that elevated FFA plays in the downregulation of PGC-1α in skeletal muscle cells. It is worth noting that the type of fatty acid may be central to the development of insulin resistance. In this study, we used the saturated fatty acid

palmitate. Intramuscular triglycerides and their palmitate fraction of these triglycerides, though not the oleate fraction, negatively correlated with insulin-stimulated glucose uptake (38). Interestingly, simultaneous to the effects of PGC-1α on mitochondrial respiration in skeletal muscle cells, this coactivator also induces gene expression for the insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) and increases glucose uptake (39). These data suggest that the palmitate fraction of fatty acids present in intramuscular triglycerides, which is elevated in the muscle of obese

patients compared with lean subjects (38), may also have deleterious effects on muscle glucose and fatty acid metabolism through the decrease in the expression of PGC-1 α .

The mechanism by which palmitate reduces PGC-1 α mRNA levels in skeletal muscle cells seems to involve activation of the ERK-MAPK cascade, which in turn activates NF- κ B, whereas enhanced ceramide levels and PKC activation seem not to be implicated. Our results demonstrate for the first time that exposure of skeletal muscle cells to palmitate leads to PGC-1 α downregulation through a mechanism involving MEK1/2 activation, whereas inhibition of this cascade prevents the fall in PGC-1 α expression caused by palmitate. The results reported here suggest that MEK activation depends on the type of fatty acids, since oleate treatment did not result in MEK activation. However, the mechanisms through which palmitate treatment results in MEK activation remain to be established. Interestingly, it has been reported that the conjugated linoleic acid activates MEK in human adipocytes through unidentified upstream signal that may involve activation of membrane proteins or generation of metabolites, which, in turn, triggers a signal that activates this pathway (40). To our knowledge, there are no reports in the literature addressing the direct effect of either MEK activation or inhibition on PGC-1 α mRNA levels. However, Watt et al. (41) reported that enhanced PGC-1 α mRNA levels in human skeletal muscle following exercise was accompanied by a reduction in phospho-ERK levels, supporting the contention that these kinases play a role in controlling PGC-1 α mRNA levels.

Furthermore, our results suggest that NF- κ B activation by palmitate is also involved in the regulation of PGC-1 α expression in skeletal muscle cells, thereby bolstering the considerable evidence supporting a link between inflammation and type 2 diabetes. This relationship between palmitate-activated NF- κ B and PGC-1 α downregulation in skeletal muscle cells is interesting since NF- κ B has been linked to the fatty acid-induced impairment of insulin action in rodent skeletal muscle (42,43), while palmitate-induced insulin resistance is reportedly prevented by inhibition of this transcription factor (44). Palmitate may activate NF- κ B through several mechanisms. First, it has been suggested that palmitate activates NF- κ B by proteasome-mediated degradation of I κ B α (31). This is consistent with the reported reduction in I κ B α mass after palmitate treatment shown in this study (Fig. 4B). Second, MEK1/2 is important for NF- κ B activation (45), and in this study we report that palmitate-mediated activation of MEK1/2 contributes to NF- κ B activation, a process that is prevented when MEK1/2 is inhibited. Here, we do not provide an explanation about how palmitate-mediated NF- κ B activation results in PGC-1 α downregulation, but several mechanisms could be involved. Interestingly, while this study was under evaluation, Hondares et al. (46) reported the presence of a PPAR γ response element in the promoter of the PGC-1 α gene. Since MEK activation decreases PPAR γ activity by phosphorylating this nuclear receptor and/or by interfering its transactivation activity (47), this provides a potential mechanism for the MEK-mediated downregulation of PGC-1 α after palmitate exposure. Similarly, NF- κ B activation results in reduced PPAR γ activity (48), suggesting that this mechanism may also contribute to the reduction in PGC-1 α expression after palmitate treatment. In agreement with this possibility, we have reported that skeletal muscle cells exposed to palmi-

tate show reduced PPAR binding activity (49). Further, since the NF- κ B inhibitor parthenolide, compared with MEK inhibitors, only partially reversed the effect of palmitate on PGC-1 α expression, this may indicate that a blockade of upstream targets, i.e., MEK, is required to completely reverse the effects attained by palmitate or that additional proteins, such as Akt (50), are involved in the changes observed.

In summary, we report here that exposure of skeletal muscle cells to palmitate results in a reduction in PGC-1 α expression via a mechanism involving the activation of the ERK-MAPK-NF- κ B axis. These results not only confirm the hypothesis that enhanced plasma FFAs reduce PGC-1 α expression but also identify the biochemical pathway involved, providing an attractive target for therapeutics in diabetes and related diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Fundació Ramón Areces, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (SAF2003-01232 and SAF2006-01475) and European Union FEDER funds. We also thank the Generalitat de Catalunya for grant 2001SGR00141. T.C., M.J., and X.P. (programa Juan de la Cierva) were supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. R.R.-C. was supported by a grant from the Fundació Ramón Areces.

We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for their helpful assistance.

REFERENCES

1. Boden G, Chen XH: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 96:1261-1268, 1995
2. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI: Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865, 1996
3. Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997
4. Bonora E, Bonadonna RC, Delprato S, Gulli G, Solini A, Matsuda M, DeFronzo RA: In vivo glucose metabolism in obese and type 1 diabetic subjects with or without hypertension. *Diabetes* 42:764-772, 1993
5. Colberg SR, Simoneau JA, Thaete FL, Kelley DE: Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* 95:1846-1853, 1995
6. Goodpaster BH, Kelley DE: Skeletal muscle triglyceride: marker or mediator of obesity-induced insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Curr Diab Rep* 2:216-222, 2002
7. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Shulman GI, Roden M: Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a H-1 NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-116, 1999
8. Adams JM, Pratipanawat T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ: Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53:25-31, 2004
9. Kelley DE, Slasky BS, Janosky J: Skeletal muscle density: effects of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 54:509-515, 1991
10. Jove M, Salla J, Planavila A, Cabrero A, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, Vazquez-Carrera M: Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPAR gamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *J Lipid Res* 45:113-123, 2004
11. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003
12. Yang X, Pratley RE, Tokraks S, Bogardus C, Permana PA: Microarray profiling of skeletal muscle tissues from equally obese, non-diabetic

- insulin-sensitive and insulin-resistant Pima Indians. *Diabetologia* 45:1584-1593, 2002
13. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471, 2003
 14. Puigserver P, Wu ZD, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839, 1998
 15. Finck BN, Kelly DP: PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116:615-622, 2006
 16. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, DeFronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ: Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 280:10290-10297, 2005
 17. McMahon DK, Anderson PAW, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE, Malouf NN: C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *Am J Physiol* 266:C1795-C1802, 1994
 18. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li GB, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA: A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278:10297-10303, 2003
 19. Jove M, Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M: Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor [kappa]B activation and leads to GLUT4 downregulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 146:3057-3065, 2005
 20. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE: Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-122, 1999
 21. Andrews NC, Faller DV: A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acid Res* 19:2499, 1991
 22. Gorski J, Nawrocki A, Murthy M: Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. *Mol Cell Biochem* 178:113-118, 1998
 23. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T: Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272:3324-3329, 1997
 24. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T: Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* 211:396-403, 1995
 25. Bronfman M, Morales MN, Orellana A: Diacylglycerol activation of protein kinase-C is modulated by long-chain Acyl-Coa. *Biochem Biophys Res Commun* 152:987-992, 1988
 26. Kobayashi E, Ando K, Nakano H, Iida T, Ohno H, Morimoto M, Tamaoki T: Calphostins (UCN-1025), novel and specific inhibitors of protein kinase-C. I. Fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiotics* 42:1470-1474, 1989
 27. Sanders JL, Stern PH: Expression and phorbol ester-induced down-regulation of protein kinase C isozymes in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 11:1862-1872, 1996
 28. Bordin L, Priante G, Musacchio E, Giunco S, Tibaldi E, Clari G, Baggio B: Arachidonic acid-induced IL-6 expression is mediated by PKC alpha activation in osteoblastic cells. *Biochemistry* 42:4485-4491, 2003
 29. Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzman M: De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J* 14:2315-2322, 2000
 30. Ho RC, Hirshman MF, Li Y, Cai D, Farmer JR, Aschenbach WG, Witezak CA, Shoelson SE, Goodyear LJ: Regulation of I kappa B kinase and NF-kappa B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C794-C801, 2005
 31. Weigert C, Brodbeck K, Staiger H, Kausch C, Machicao F, Haring HU, Schleicher ED: Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 279:23942-23952, 2004
 32. Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W, Schmitz ML: Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem* 273:1288-1297, 1998
 33. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
 34. Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Haring HU: Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48:1113-1119, 1999
 35. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzzi L: Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48:1600-1606, 1999
 36. Wu ZD, Puigserver P, Andersson U, Zhang CY, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM: Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124, 1999
 37. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu ZD, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM: Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801, 2002
 38. Manco M, Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Gnuli D, De GA, Gasbarrini G: Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism* 49:220-224, 2000
 39. Michael LF, Wu ZD, Cheatham RB, Puigserver P, Adelman G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM: Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3820-3825, 2001
 40. Chung SK, Brown JM, Provo JN, Hopkins R, McIntosh MK: Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NF-kappa B dependent cytokine production. *J Biol Chem* 280:38445-38456, 2005
 41. Watt MJ, Southgate RJ, Holmes AG, Febbraio MA: Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1 alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J Mol Endocrinol* 33:533-544, 2004
 42. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee JS, Yuan MS, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI: Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-446, 2001
 43. Yuan MS, Konstantopoulos N, Lee JS, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta. *Science* 293:1673-1677, 2001
 44. Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM: Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 279:41294-41301, 2004
 45. Jiang BB, Brecher P, Cohen RA: Persistent activation of nuclear factor-kappa B by interleukin-1 beta and subsequent inducible NO synthase expression requires extracellular signal-regulated kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1915-1920, 2001
 46. Hondares E, Mora O, Yubero P, de la Concepcion MR, Iglesias R, Giral M, Villarroya F: Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147:2829-2838, 2006
 47. Camp HS, Tafuri SR: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:10811-10816, 1997
 48. Ruan H, Pownall H, Lodish H: Troglitazone antagonizes TNF-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappa B (Abstract). *Diabetes* 52 (Suppl. 1):A50, 2003
 49. Jove M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M: Agonist-induced activation releases peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta from its inhibition by palmitate-induced nuclear factor-kappa B in skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1734:52-61, 2005
 50. Southgate RJ, Bruce CR, Carey AL, Steinberg GR, Walder K, Monks R, Watt MJ, Hawley JA, Birnbaum MJ, Febbraio MA: PGC-1alpha gene expression is downregulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *FASEB J* 19:2072-2074, 2005

PUBLICACIÓ 2

***Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance and
Inflammation in Skeletal Muscle Cells***

*Teresa Coll, Elena Eyre, Ricardo Rodríguez-Calvo, Xavier Palomer, Rosa M. Sánchez,
Manuel Merlos, Juan C. Laguna i Manuel Vázquez-Carrera*

Journal of Biological Chemistry 283:11107-11116, 2008

La RI està estretament relacionada amb l'obesitat i la DM2. El principal teixit que capta glucosa en resposta a la insulina és el múscul esquelètic, fet que explica que sigui el més afectat per la RI. Aquesta alteració s'ha relacionat amb la presència de nivells elevats d'AGL al plasma, que poden superar la capacitat oxidativa del múscul, tot provocant la seva acumulació en forma de TG i DAG. Estudis previs assenyalen que l'AG saturat palmitat, pot activar la via PKC- θ -NF- κ B i, consegüentment, augmentar l'expressió de la citocina inflamatòria IL-6. De fet, s'ha descrit que els nivells plasmàtics de la IL-6 estan incrementats de 2 a 3 vegades en pacients amb obesitat i DM2 respecte als individus sans, relacionant d'aquesta manera la inflamació i la RI/DM2. No obstant, els AG saturats contribueixen de manera diferent que els AG monoinsaturats al desenvolupament de la RI i actualment no es coneixen amb exactitud els mecanismes responsables d'aquest fet.

L'**objectiu** del nostre treball ha estat caracteritzar els mecanismes cel·lulars responsables del diferent comportament de l'oleat i el palmitat sobre la via de senyalització de la insulina i investigar si l'oleat pot prevenir els efectes negatius que provoca el palmitat sobre aquesta via. L'estudi s'ha realitzat en cèl·lules musculars esquelètiques C2C12 tractades durant 16 hores amb aquests AG.

Els **resultats** obtinguts mostren que el palmitat, a diferència de l'oleat, promou l'acumulació de DAG, l'aparició de RI i l'activació de la via PKC- θ -NF- κ B provocant finalment un augment de la secreció de la IL-6. Tanmateix, aquest AG saturat redueix l'expressió del coactivador PGC-1 α i de l'enzim DGAT2, el qual controla la síntesi de TG a partir de DAG. En canvi, la coïncubació de les cèl·lules amb palmitat i oleat impedeix aquests efectes gràcies a que l'oleat promou un increment en l'expressió dels gens implicats en la β -oxidació mitocondrial i l'acumulació de TG. Com a

conseqüència d'aquests canvis, l'oleat evita l'acumulació de DAG i la posterior activació de la via inflammatòria PKC- θ -NF- κ B, fet que millora la sensibilitat a la insulina.

En resum, les dades d'aquest estudi semblen indicar que l'oleat evita la inflamació i la RI causats pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques gràcies a la seva capacitat per evitar l'acumulació de DAG.

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance and Inflammation in Skeletal Muscle Cells*

Received for publication, October 22, 2007, and in revised form, February 11, 2008. Published, JBC Papers in Press, February 14, 2008, DOI 10.1074/jbc.M708700200

Teresa Coll^{†§¶1}, Elena Eyre^{†§¶}, Ricardo Rodríguez-Calvo^{†§¶2}, Xavier Palomer^{†§¶1}, Rosa M. Sánchez^{†§¶}, Manuel Merlos^{†§¶}, Juan Carlos Laguna^{†§¶}, and Manuel Vázquez-Carrera^{†§¶3}

From the [†]Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, the [§]CIBERDEM, Instituto de Salud Carlos III, and the [¶]Institut de Biomedicina de la UB, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Here we report that in skeletal muscle cells the contribution to insulin resistance and inflammation of two common dietary long-chain fatty acids depends on the channeling of these lipids to distinct cellular metabolic fates. Exposure of cells to the saturated fatty acid palmitate led to enhanced diacylglycerol levels and the consequent activation of the protein kinase C θ /nuclear factor κ B pathway, finally resulting in enhanced interleukin 6 secretion and down-regulation of the expression of genes involved in the control of the oxidative capacity of skeletal muscle (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ -coactivator 1 α) and triglyceride synthesis (acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 2). In contrast, exposure to the monounsaturated fatty acid oleate did not lead to these changes. Interestingly, co-incubation of cells with palmitate and oleate reversed both inflammation and impairment of insulin signaling by channeling palmitate into triglycerides and by up-regulating the expression of genes involved in mitochondrial β -oxidation, thus reducing its incorporation into diacylglycerol. Our findings support a model of cellular lipid metabolism in which oleate protects against palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells by promoting triglyceride accumulation and mitochondrial β -oxidation through PPAR α - and protein kinase A-dependent mechanisms.

These lines, several studies have consistently demonstrated that a rise in plasma FFA produces insulin resistance in both diabetic patients and non-diabetic subjects (2–5). High FFA levels presumably increase FFA uptake, exceeding its oxidation, which in turn leads to increased intramuscular triglycerides and diacylglycerol (DAG), the latter being a potent allosteric activator of both conventional and novel PKC isoforms. Interestingly, it has been reported that the incubation of skeletal muscle cells with the saturated fatty acid palmitate results in the activation of PKC θ , which is the most abundant PKC isoform in skeletal muscle (6–8). This PKC isoform phosphorylates insulin receptor substrate 1 (IRS-1) (9), the main mediator of insulin response in muscle (10), leading to impaired insulin signaling. In addition, PKC θ has the unique ability among the PKC isoforms to activate pro-inflammatory NF κ B (6), which has been linked to fatty acid-induced impairment of insulin action in skeletal muscle in rodents (12, 13). The activation of this pathway during insulin resistance supports a link between inflammation and type 2 diabetes (for review, see Ref. 14). In fact, markers of inflammation, including pro-inflammatory cytokines (such as tumor necrosis factor α , interleukin (IL) 1, interferon- γ , and IL-6) have been reported to be high in type 2 diabetes (15, 16). Of these cytokines, IL-6 correlates most strongly with insulin resistance and type 2 diabetes (15–17), and its plasma levels are increased 2–3-fold in patients with obesity and type 2 diabetes compared with lean control subjects (16). Further, recent evidence suggests that skeletal muscle cells generate IL-6 production when exposed to the saturated fatty acid palmitate (18, 19) through activation of the PKC θ -NF κ B pathway.

Interestingly, saturated and monounsaturated fatty acids differ significantly in their contribution to insulin resistance (20, 21). Thus, it is generally accepted that saturated fatty acids induce insulin resistance (21–23), whereas monounsaturated fatty acids increase insulin sensitivity in diabetic patients (24, 25) and healthy subjects (21). However, the mechanisms by which enrichment with oleate favors insulin sensitivity are still unknown. The present study was designed to characterize the cellular mechanisms by which the two most common fatty acids, palmitate and oleate (26), exert their differential effects on fatty acid-induced impairment of insulin signaling and

Insulin resistance is a major characteristic of type 2 diabetes mellitus and is also associated with obesity, hypertension, and cardiovascular disease (1). Skeletal muscle accounts for most insulin-stimulated glucose utilization and is, therefore, the main site of insulin resistance. Impairment of glucose utilization and insulin sensitivity during this process has been related to the presence of high free fatty acids (FFA)⁴ in plasma. Along

* This work was supported in part by funds from the Fundación Ramón Areces, Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-01475), ISCIII-RETIC RD06/0015/FEDER, European Union FEDER funds, and Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

² Supported by a grant from the Fundación Ramón Areces.

³ To whom correspondence should be addressed: Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-4024531; Fax: 34-93-4035982; E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu.

⁴ The abbreviations used are: FFA, free fatty acids; PGC-1, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1; NF κ B, nuclear factor κ B; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKC θ , protein kinase C θ ; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; DAG, diacylglycerol; TG, triglyceride;

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; DGAT, acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase.

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

inflammation in skeletal muscle cells and to find whether oleate prevents the deleterious effects of palmitate. We report that the different effects of these fatty acids are related to their ability to promote DAG accumulation. Thus, exposure to palmitate increased DAG levels and activated the PKC θ -NF κ B pathway, resulting in enhanced secretion of IL-6 and down-regulation of PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), enzyme that controls the rate of triglyceride (TG) synthesis from DAG. In contrast, co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate reversed these changes by promoting TG accumulation and mitochondrial β -oxidation, thus preventing DAG synthesis and activation of the PKC θ -NF κ B pathway. The different effects of these two fatty acids seem to be related to the ability of oleate to activate PPAR α and protein kinase A (PKA).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Wy-14,643, H89, and MK886 were obtained from Sigma and GW501516 from Biomol Research Labs Inc. (Plymouth Meeting, PA). Other chemicals were purchased from Sigma.

Cell Culture—Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. When cells reached confluence, the medium was switched to the differentiation medium containing DMEM and 2% horse serum, which was changed every other day. After 4 additional days, the differentiated C2C12 cells had fused into myotubes. Lipid-containing media were prepared by conjugation of FFA with FFA-free bovine serum albumin, using a method modified from that described by Chavez and Summers (27). Briefly, FFAs were dissolved in ethanol and diluted 1:100 in DMEM containing 2% (w/v) fatty acid-free bovine serum albumin. Myotubes were incubated for 16 h in serum-free DMEM containing 2% bovine serum albumin in either the presence (FFA-treated cells) or absence (control cells) of FFAs. Cells were then incubated with 100 nM insulin for 10 min. Following incubation, RNA was extracted from myotubes as described below. Culture supernatants were collected, and the secretion of IL-6 was assessed by ELISA (Amersham Biosciences).

Measurements of mRNA—Levels of mRNA were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as previously described (28). Total RNA was isolated by using the Ultraspec reagent (Biotex, Houston). The total RNA isolated by this method was undegraded and free of protein and DNA contamination. The sequences of the sense and antisense primers used for amplification were: Il-6, 5'-TCCAGCCAGTTGC-CTTCTTGG-3' and 5'-TCTGACAGTGCATCATCGCTG-3'; Pgc-1 α , 5'-CCCCTGGATGAAGACGGATTG-3' and 5'-GTGGGTGTGGTTTGTCTGCATG-3'; Cpt-1, 5'-TATGTGAGGATGCTGCTCC-3' and 5'-CTCGGAGAGCTAAGC-TTGTG-3'; Dgat1, 5'-GCGACGGCTACTGGGATCTGA-3' and 5'-CAGGCCAGCTGTAGGGTCTCCT-3' and 5'-GAGGCCAGCTGTAGGGTCTCCT-3'; Dgat2, 5'-ATGCCTGGCA-AGAACGCAGTC-3' and 5'-CAGAGGAGAAGAGGCCT-CGGC-3' and Aprt (adenosyl phosphoribosyl transferase), 5'-GCCTCTTGCCAGTCACCTGA-3' and 5'-CCAGGCTCA-

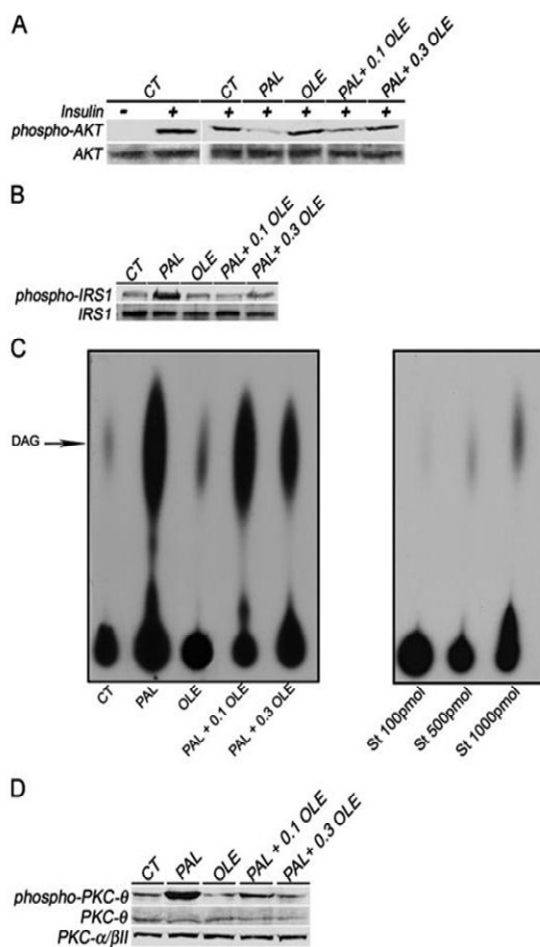


FIGURE 1. Oleate prevents palmitate-induced impairment of insulin signaling pathway and DAG accumulation in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of different fatty acids (0.5 mM palmitate, 0.5 mM oleate, or 0.5 mM palmitate supplemented with either 0.1 or 0.3 mM oleate). Cell lysates were assayed for Western blot analysis with antibodies against (A) total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³) and (B) total and phospho-IRS1 (Ser³⁰⁷). The blot data are the result of three separate experiments. C, measurement of DAG levels. Lipid extracts were prepared and assayed for DAG as detailed under "Experimental Procedures." D, analysis of PKC θ levels. Total membrane protein extracts from C2C12 myotubes incubated in the presence or absence of fatty acids for 16 h were assayed for Western blot analysis with specific antibodies against total and phospho-PKC θ (Thr⁵³⁸) and phospho-PKC- α/β II (Thr^{638/641}). The blot data are the result of three separate experiments. CT, control; PAL, palmitate; OLE, oleate; St, standard.

CACACTCCACCA-3'. Amplification of each gene yielded a single band of the expected size (Il-6; 229 bp; Pgc-1 α : 228 bp, Cpt-1: 629 bp; Dgat1: 219 bp; Dgat2: 226 bp and Aprt: 329 bp). Preliminary experiments were carried out with various amounts of cDNA to determine non-saturating conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed by the RT-PCR method described in this study (29). Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilbert Lourmat Imaging). The results for the expression of specific mRNAs are always given in relation to the expression of the control gene (Aprt).

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

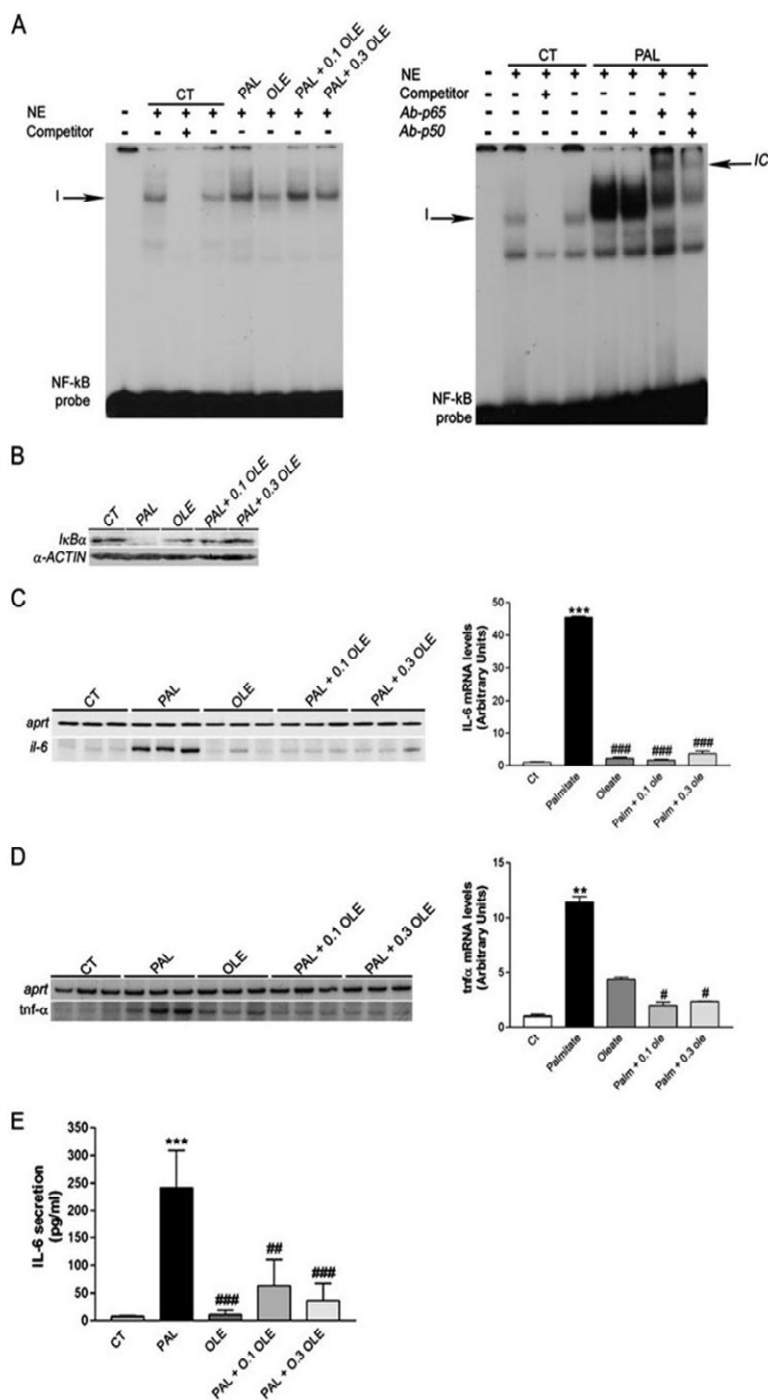


FIGURE 2. Oleate prevents palmitate-induced NFκB activation and IL-6 expression and secretion in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of different fatty acids (0.5 mM palmitate, 0.5 mM oleate, or 0.5 mM palmitate supplemented with either 0.1 or 0.3 mM oleate). *A*, autoradiograph of EMSA performed with a ³²P-labeled NFκB nucleotide and crude nuclear protein extract (NE) is shown. Specific complexes, based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. A supershift analysis performed by incubating NE with an antibody directed against the p65 subunit of NFκB is also shown. *B*, protein levels of IκBα. Protein extracts from C2C12 myotubes were assayed for Western blot analysis with IκBα and α-actin antibodies. The blot data are the result of three separate experiments. Analysis of the mRNA levels of IL-6 (*C*) and Tnf-α (*D*). 0.5 μg of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram normalized to the APRT mRNA levels is shown. *E*, determination by ELISA of IL-6 secretion to the culture medium. Data are expressed as mean ± S.D. of six experiments. ***, *p* < 0.001 versus control; ##, *p* < 0.01; ###, *p* < 0.001 versus palmitate-treated cells.

Determination of Diacylglycerol Levels—Diacylglycerol and ceramide levels were determined by the diacylglycerol kinase method, as described elsewhere (28).

Incorporation of [¹⁴C]FA into Lipid Fractions—Cells were incubated with [1-¹⁴C]palmitic acid and/or [1-¹⁴C]oleic acid for 16 h. The cell monolayers were then washed three times with phosphate-buffered saline, and the lipids were extracted twice with CHCl₃/MeOH (2:1) and 0.1 M KOH. After drying under nitrogen stream, the lipid extract was re-dissolved in chloroform-methanol (2:1) and separated on thin-layer chromatography (TLC), using hexane-diethyl ether-acetic acid (70:30:1). Plates were measured in a PhosphorImager (Bio-Rad). DAG and TG were identified by comparison with standards (Sigma) processed in parallel to the samples.

Isolation of Nuclear Extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)—Nuclear extract isolation and EMSA were performed as described elsewhere (28).

Immunoblotting—To obtain total proteins, C2C12 myotubes were homogenized in cold lysis buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5.4 μg/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 10,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Total and nuclear proteins (30 μg) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Western blot analysis was performed using antibodies against total and phospho-PKCθ (Thr⁵³⁸), PKC-α/βII (Thr^{638/641}) (Cell Signaling Technology Inc.), total (Santa Cruz Biotechnology) and phospho-Akt (Ser⁴⁷³), total and phospho-IRS1 (Ser³⁰⁷) (Cell Signaling), PPARα, PPARβ/δ (provided by W. Wahli), and α-actin (Sigma). Detection was achieved using the EZ-ECL chemi-

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

luminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek Ltd.). The equal loading of proteins was assessed by red phenol staining. The size of detected proteins was estimated using protein molecular mass standards (Invitrogen).

Statistical Analyses—Results are expressed as the mean ± S.D. of six separate experiments. Significant differences were established by one-way analysis of variance using the computer program GraphPad Instat (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). When significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was performed. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Oleate Prevents Palmitate-induced Insulin Resistance and IL-6 Secretion by Inhibiting the DAG-PKC θ -NF κ B Pathway—As exposure of skeletal muscle cells to the saturated fatty acid palmitate leads to both phosphorylation of IRS-1 on serine residues and inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation, thereby attenuating insulin signaling (14), we first evaluated whether oleate prevented these effects. As expected, insulin stimulated Akt phosphorylation, whereas this process was inhibited by 0.5 mM palmitate (Fig. 1A). However, no changes were observed when cells were exposed to the same concentration of oleate. Interestingly, co-incubation of palmitate-exposed cells with increasing concentrations of oleate (0.1 and 0.3 mM) prevented this effect in a concentration-dependent manner. Likewise, palmitate exposure enhanced Ser³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1 (Fig. 1B), whereas exposure to oleate did not, and co-incubation with oleate reversed the effect of the saturated fatty acid.

Because phosphorylation of IRS1 on Ser³⁰⁷ after exposure of skeletal muscle cells to palmitate is mediated by DAG-mediated activation of PKC θ , we next assessed whether oleate prevented these changes. As previously reported (27), palmitate treatment led to enhanced DAG levels (Fig. 1C), whereas cells exposed to oleate showed DAG amounts similar to those observed in control cells. When palmitate-exposed cells were co-incubated with oleate, a concentration-dependent reduction was observed in the content of this complex lipid. Consistent with the changes in the levels of DAG, palmitate induced phosphorylation of PKC θ , unlike cells exposed to bovine serum albumin (Fig. 1D). However, oleate did not affect phospho-PKC θ levels, and co-supplementation of palmitate-treated cells with oleate prevented the phosphorylation of this PKC isoform.

Palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells occurs through a mechanism involving NF κ B activation by PKC θ (30). To determine whether oleate prevented palmitate-induced inflammation, we measured NF κ B binding activity by EMSA. NF κ B formed one complex with nuclear proteins (Fig. 2A). Specificity of the DNA binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabeled NF κ B oligonucleotide. NF κ B binding activity increased in nuclear extracts from palmitate-treated cells, whereas in those from oleate-exposed cells, the binding activity was similar to that observed in control cells. Notably, co-incubation of palmitate-treated cells with oleate reduced NF κ B binding activity, especially at 0.3 mM. Addition of antibody against the p65 subunit of NF κ B supershifted the complex, indicating that this band mainly consisted of this subunit. Further, the p50 subunit

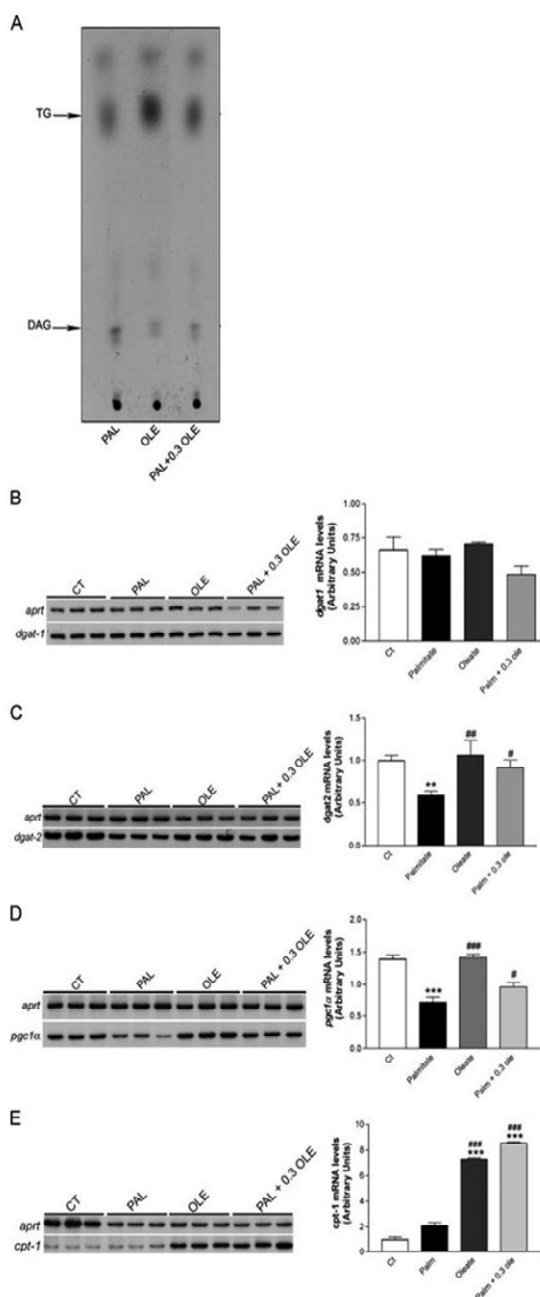


FIGURE 3. Palmitate and oleate differ in their incorporation into complex lipids and in their effects on the expression of genes involved in fatty acid metabolism in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of different fatty acids. A, incorporation of [¹⁴C]palmitate, [¹⁴C]oleate, and a mixture of both fatty acids into DAG and TG. Lipid extracts were prepared and assayed as detailed under "Experimental Procedures." Analysis of the mRNA levels of *Dgat1* (B), *Dgat2* (C), *Pgc-1 α* (D), and *Cpt-1* (E). 0.5 μ g of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as mean ± S.D. of six experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus control; #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$ versus palmitate-treated cells.

of NF κ B was also present in this complex, although in minor quantities. No changes were observed in the DNA binding of nuclear proteins from control and palmitate-treated cells to an

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

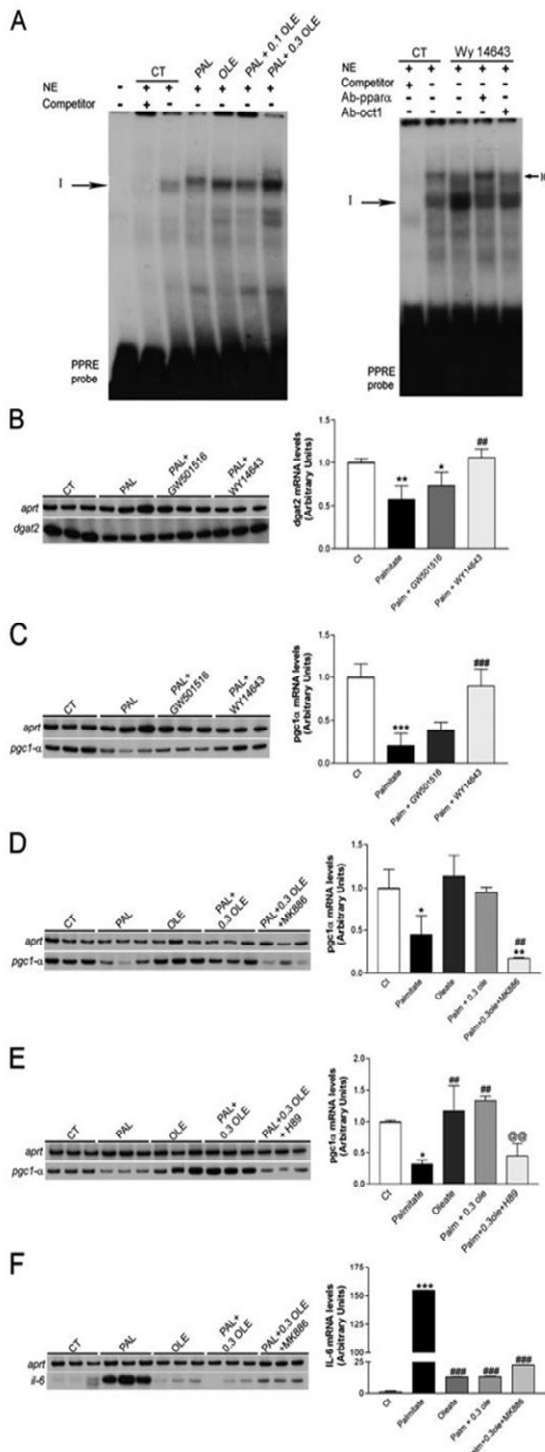


FIGURE 4. Oleate, but not palmitate, increases PPAR DNA binding activity in skeletal muscle cells. A, autoradiograph of EMSA performed with a ³²P-labeled PPRE nucleotide and nuclear extracts (NE) from C2C12 myotubes incubated for 16 h with different fatty acids. Two specific complexes (I to II), based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. The supershift immune complex (IC) obtained by incubating NE with an antibody directed against PPARα and β/δ is also shown. The autoradiogram data are the result of three separate experiments. mRNA levels of Dgat2 (B), Pgc-1α (C,

Oct-1 probe, indicating that the changes observed for the NFκB probe were specific (data not shown). NFκB is located in the cytosol bound to inhibitor κB (IκB), and palmitate supplementation causes phosphorylation and degradation of IκBα, thus liberating and activating NFκB (18, 19). When we examined the effects of the fatty acids on the protein levels of IκBα (Fig. 2B), we observed that palmitate caused a fall in its levels, whereas supplementation with oleate did not. Finally, in cells co-incubated with palmitate and oleate, a recovery was observed in the levels of this NFκB inhibitor, which is consistent with the reduction in NFκB binding activity.

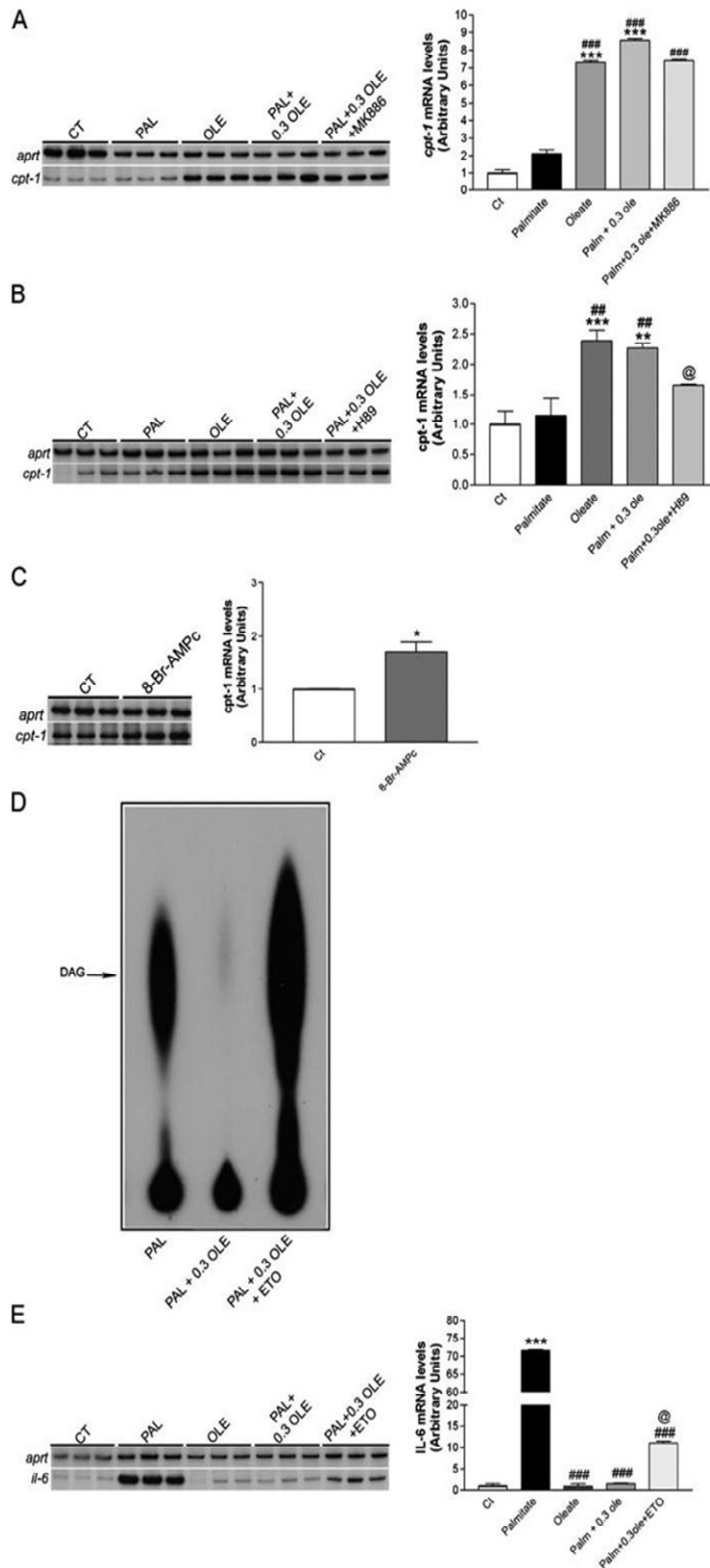
Palmitate-induced activation of NFκB in skeletal muscle cells results in enhanced expression and secretion of pro-inflammatory cytokines, such IL-6, that contribute to the development of insulin resistance (18, 19). Because co-incubation of palmitate-treated cells with oleate prevented activation of the DAG-PKCθ-NFκB pathway, we next explored whether oleate prevented palmitate-induced IL-6 expression and secretion. As Fig. 2C shows, palmitate strongly induced IL-6 mRNA levels, whereas supplementation with oleate showed expression levels similar to those observed in control cells. In addition, oleate supplementation prevented the increase in IL-6 expression caused by palmitate. The same pattern of expression was observed for TNF-α (Fig. 2D). Consistent with the changes in mRNA levels of IL-6, incubation with palmitate led to a 31-fold induction in the levels of IL-6 protein secreted into the culture media (control 7.7 ± 1.0 versus palmitate 241 ± 68 pg/ml, p < 0.001, Fig. 2E). Oleate did not significantly modify secretion of this interleukin (control 7.7 ± 1.0 versus oleate 10.9 ± 3.3 pg/ml), whereas oleate co-supplementation prevented the increase in IL-6 secretion caused by palmitate (74% reduction at 0.1 mM and 85% at 0.3 mM, p < 0.01 and p < 0.001 versus palmitate-treated cells, respectively). Overall, these findings indicate that oleate reverses palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by preventing activation of the DAG-PKCθ-NFκB pathway.

Oleate Reduces Palmitate-mediated DAG Accumulation by Promoting Triglyceride Synthesis and Fatty Acid Oxidation—Because DAG accumulation in skeletal muscle cells exposed to palmitate is the first step leading to palmitate-induced insulin resistance and inflammation, we explored the potential mechanisms by which oleate prevents the accumulation of this complex lipid. Incubation of cells exposed to palmitate and oleate with a diacylglycerol kinase inhibitor did not result in changes in IL-6 mRNA levels, suggesting that oleate did not affect DAG degradation (data not shown). On the other hand, it has been reported that palmitate and oleate are differentially utilized by myotubes (18). Thus, whereas saturated fatty acid seems to be incorporated into TG and DAG, monounsaturated fatty acid is

D, E), and IL-6 (F) were analyzed in skeletal muscle cells incubated for 16 h with different fatty acids in the presence or absence of the PPARα antagonist MK886 (10 μM), the PPARα agonist Wy-14,643 (10 μM), the PPARβ/δ agonist (1 μM), or the PKA inhibitor H89 (10 μM). 0.5 μg of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as mean ± S.D. of six experiments. **, p < 0.01; ***, p < 0.001 versus control; #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001 versus palmitate-treated cells; @@, p < 0.01 versus palmitate plus oleate exposed cells.

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

channeled toward TG (31). When we analyzed the incorporation of palmitate, oleate, and the mixture of these two fatty acids into DAG and TG (Fig. 3A), we found that the saturated fatty acid was mainly incorporated into DAG and TG (the TG:DAG ratio expressed as percentage of total radioactivity was 16:1), the monounsaturated fatty acid was incorporated mainly into TG (TG/DAG ratio was 273:1, 17 times greater induction than palmitate), whereas cells exposed to both palmitate and oleate were incorporated more into TG (TG/DAG ratio was 88:1, 5.5 times greater than cells exposed only to palmitate). These differences in the channeling of fatty acids into TG and DAG may be caused by changes either in the expression of genes involved in TG synthesis or in fatty acid oxidation. Given that DGAT is the enzyme that catalyzes the final reaction in the synthesis of TG from DAG, we assessed the effects of palmitate and oleate on the expression of this gene. Fatty acids did not affect the expression of *Dgat1* (Fig. 3B). However, *Dgat2* mRNA levels were lower in cells exposed to palmitate (36% reduction, $p < 0.01$) (Fig. 3C), whereas oleate did not affect the expression of this gene and supplementation of palmitate-exposed cells with oleate prevented the effect of the saturated fatty acid. This finding suggests that the channeling of palmitate into DAG may be the result of a reduction in the expression of *Dgat2*, whereas supplementation with oleate restores both the expression of this gene and TG synthesis. We also evaluated whether additional mechanisms may account for the effects of oleate on DAG levels. Because up-regulation in the expression of genes involved in the oxidation of fatty acids may reduce their availability for DAG synthesis (32), we focused on the expression of genes, such as *Pgc-1 α* and *Cpt-1*. The former is a co-activator of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) involved in the control of fatty acid oxidation (33), whereas the second allows the



Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

transport of fatty acids into mitochondria for β -oxidation (34). Consistent with previous studies (28), we observed a reduction in the mRNA levels of *Pgc-1 α* in cells exposed to palmitate, whereas oleate did not affect the expression of this gene (Fig. 3D). When cells exposed to palmitate were co-supplemented with oleate, no changes were observed in the levels of *Pgc-1 α* . Nor did palmitate treatment significantly affect *Cpt-1* mRNA levels. However, cells exposed to oleate and those treated with palmitate co-supplemented with oleate showed a 7-times greater induction ($p < 0.001$) in the transcript levels of *Cpt-1* (Fig. 3E).

Oleate Increases the DNA Binding Activity of PPAR—The expression of both *Pgc-1 α* (35, 36) and *Cpt-1* (34) is regulated by PPARs, suggesting that oleate may affect the activity of these transcription factors. EMSA were performed to examine the interaction of PPARs with its *cis*-regulatory element using a 32 P-labeled PPRE (peroxisome proliferator response element) probe and nuclear extracts from C2C12 myotubes exposed to different fatty acids. The PPRE probe formed a single main complex with nuclear proteins (Fig. 4A). Competition studies performed with a molar excess of unlabeled probe revealed that this complex represented a specific PPRE-protein interaction. Nuclear extracts from skeletal muscle cells incubated with 20 μ M Wy-14,643, a selective PPAR α activator at this concentration (37), were used as a positive control to demonstrate that enhanced binding activity was due to increased PPAR α activity. Incubation of nuclear extracts with an antibody against PPAR α supershifted the complex, indicating that this band contained this nuclear receptor. In contrast, an unrelated antibody, directed to Oct-1 protein, did not supershift the complex. In nuclear extracts from cells exposed to oleate and palmitate plus 0.3 mM oleate, a significant increase was observed in the binding activity of complex I than in nuclear extracts from cells exposed to palmitate.

Oleate Affects the Expression of Genes Involved in TG Synthesis and Fatty Acid Oxidation through Mechanisms Involving PPAR α and PKA—We next explored whether enhanced PPAR activation by oleate was responsible for the effects of this fatty acid on DAG amounts using PPAR activators and antagonists. When skeletal muscle cells were co-incubated with palmitate and the PPAR α activator Wy-14,643, reduction in the mRNA levels of *Dgat2* was prevented (Fig. 4B), which is in agreement with the reported regulation of *Dgat2* by PPAR α (38, 39). This finding suggests that the increase in PPAR α activation caused by oleate may prevent the fall in the expression of *Dgat2* and, as a result, in the synthesis of TG. Like *Dgat2*, in the presence of the PPAR α activator Wy-14,643, the reduction in the expression of *Pgc-1 α* caused by palmitate was prevented, whereas in the presence of the PPAR β/δ activator there was a slight increase that did not reach statistical significance (Fig. 4C). Interestingly, in the presence of the PPAR α antagonist MK886,

the effect of oleate on *Pgc-1 α* mRNA levels in cells exposed to palmitate was abolished, clearly demonstrating that *Pgc-1 α* expression was up-regulated by oleate through a PPAR α -dependent mechanism (Fig. 4D). Because it has been reported that PKA activation increases PPAR α and PPAR β/δ DNA binding activity (40–42) and that oleate may activate this kinase (43), we explored whether this mechanism was involved in the effects of oleate. In the presence of the PKA inhibitor H89, the effect of oleate on *Pgc-1 α* in palmitate-exposed cells was also abolished (Fig. 4E), suggesting that PKA activation was involved in the effects of the monounsaturated fatty acid. Finally, the involvement of PPAR α activation in the effects of oleate was demonstrated in those cells co-incubated with palmitate, oleate, and MK886 (Fig. 4F). In the presence of this PPAR α antagonist, the expression of *Il-6* was partially recovered indicating that PPAR α activation by oleate contributes to prevent palmitate-induced expression of this cytokine. Unlike the effects of oleate on *Pgc-1 α* , its effects on *Cpt-1* mRNA levels were not abolished by the PPAR α antagonist MK886 (Fig. 5A), whereas co-incubation of cells with the mixture of palmitate, oleate and H89 reversed the effect of the monounsaturated fatty acid (Fig. 5B), which corroborates the reported regulation of *Cpt-1* by PKA (44). Similar to H89, the PKA inhibitor KT5720 (1 μ M) significantly abolished the effect of palmitate plus oleate on *Cpt-1* up-regulation (data not shown), and the PKA activator 8-Br-AMPC significantly enhanced *Cpt-1* mRNA levels (Fig. 5C). Finally, to demonstrate the contribution of the increase in fatty acid oxidation with the effects of oleate, palmitate-exposed cells co-supplemented with oleate were treated with the CPT-1 inhibitor etomoxir. In the presence of this inhibitor of fatty acid oxidation, the effects of oleate on DAG amounts and on *Il-6* expression were partially abolished (Fig. 5, C and D), indicating that the increase in fatty acid oxidation caused by oleate contributes, at least in part, to prevent the activation of the DAG-PKC θ -NF κ B pathway.

DISCUSSION

Skeletal muscle insulin resistance correlates more strongly with intramuscular lipid levels than with any other factor, including BMI or percentage body fat (45, 46). Furthermore, intramuscular lipid accumulation may lead to inflammation in skeletal muscle, a process that has been linked to the development of type 2 diabetes (14). Despite these data, the mechanisms by which intramuscular lipid accumulation results in inflammation and insulin resistance in skeletal muscle are not well understood. Interestingly, although high fat diets are known to affect glucose metabolism, their contribution to insulin resistance depends on dietary fatty acids. Thus, whereas saturated fatty acids promote insulin resistance (21–23), the monounsaturated oleic acid improves insulin sensitivity (24, 25, 47). These data have led to suggestions that the dietary

FIGURE 5. Up-regulation of *Cpt-1* expression by oleate is mediated by PKA and is necessary to prevent palmitate-mediated induction of *Il-6*. mRNA levels of *Cpt-1* (A and B) were analyzed in skeletal muscle cells incubated for 16 h with different fatty acids in the presence or absence of the PPAR α antagonist MK886 (10 μ M) and the PKA inhibitor H89 (10 μ M). *Cpt-1* mRNA levels were analyzed in skeletal muscle cells incubated for 16 h in the presence or absence of 1 mM 8-Br-AMPC (C). DAG levels (D) and *Il-6* mRNA levels (E) were analyzed in skeletal muscle cells incubated for 16 h with different fatty acids in the presence or absence of the CPT-1 inhibitor etomoxir (40 μ M). 0.5 μ g of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as mean \pm S.D. of six experiments. ***, $p < 0.001$ versus control; #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$ versus palmitate-treated cells; @, $p < 0.05$ versus palmitate plus oleate exposed cells.

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

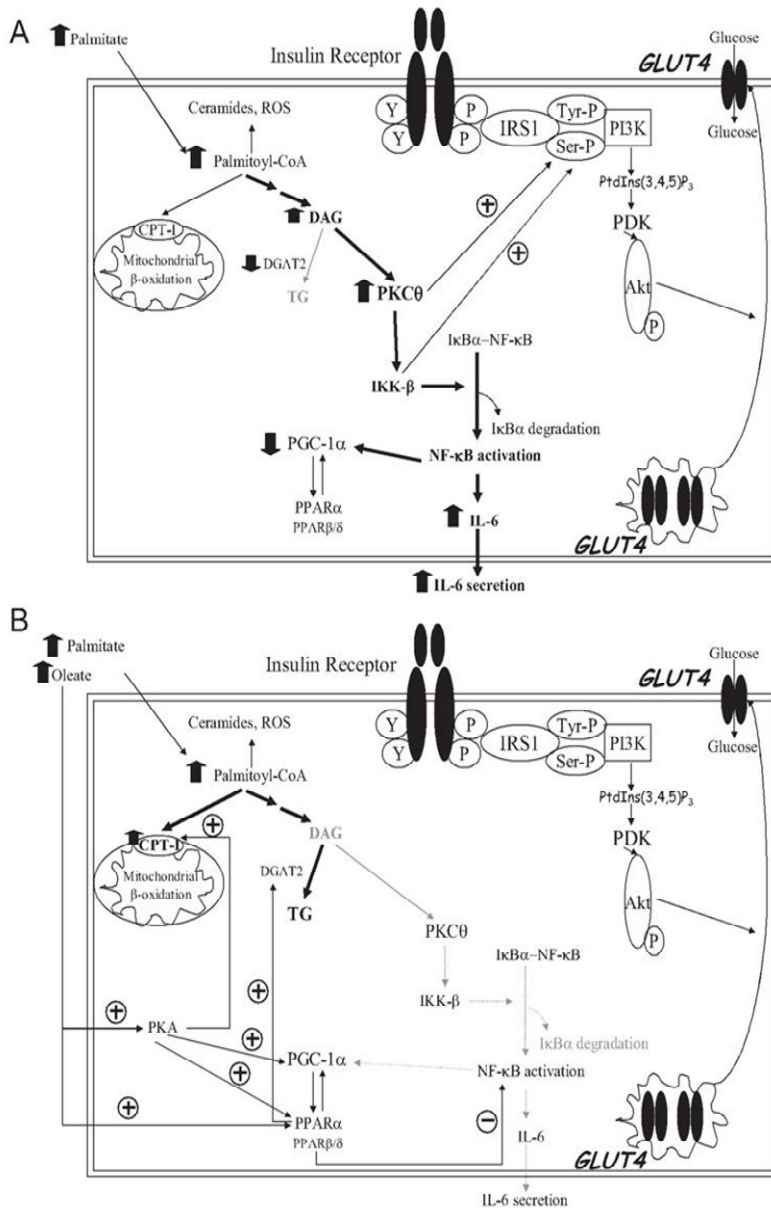


FIGURE 6. Potential mechanisms by which oleate prevents palmitate-induced impairment of insulin signaling and inflammation in skeletal muscle cells. A, saturated fatty acid palmitate induces insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells by promoting DAG accumulation, which in turn activates PKCθ and NFκB, leading to phosphorylation of IRS-1 on Ser³⁰⁷ and inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation and IL-6 secretion. Under these conditions, palmitate is poorly incorporated into the cellular triglyceride pool by a mechanism that may involve a reduction in the expression of *Dgat2*, the enzyme that controls the rate of TG synthesis from DAG. The monounsaturated fatty acid oleate does not affect the expression of *Dgat2* and is mainly incorporated into TG. As a result, this fatty acid does not activate the DAG-PKCθ-NFκB pathway. B, presence of oleate prevents palmitate-induced insulin resistance and inflammation by restoring *Dgat2* expression and TG synthesis and by up-regulating *Cpt-1* and *Pgc-1α* expression. Both mechanisms reduce the availability of fatty acids for incorporation into DAG. These effects of oleate are the result of enhanced PPARα and PKA activation.

of skeletal muscle cells to palmitate increased DAG levels, which in turn activates the PKCθ-NFκB pathway, leading to both phosphorylation of IRS-1 in serine residues and inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation, thereby attenuating insulin signaling (Fig. 6). Further, as a result of NFκB activation, a large increase was observed in *IL-6* expression and secretion. In contrast, oleate did not activate this pathway, and when cells exposed to palmitate were supplemented with oleate, a concentration-dependent reduction was observed in the activation of this pathway. The key point in the activation of this pathway seems to be accumulation of DAG, because this accumulation allows activation of PKCθ that could lead to insulin resistance by phosphorylating IRS-1 or by activating the pro-inflammatory transcription factor NFκB. In fact, it has been reported that PKCθ mice are protected from fat-induced insulin resistance (49). Thus, DAG is accumulated in skeletal cells when exposed to palmitate, but not when exposed to oleic acid, which corroborates with previous studies (27, 31, 50). The reasons for the different channeling toward DAG of palmitate and oleate were unknown. In this study we provide a potential explanation for the different behavior of these fatty acids. Thus, palmitate exposure led to a fall in the expression of *Dgat2*, whereas oleate did not. *Dgat2* is essential for TG synthesis, because mice with a disruption of this gene have severely reduced TG content in their tissues (51). Further, it has been reported that the close association of stearyl-CoA desaturase 1 and *Dgat2* increases the efficiency of palmitate conversion to oleate, which is then preferentially used for TG synthesis (52). Notably, when palmitate-exposed cells were incubated with oleate, *Dgat2* expression was not

intake of oleic acid should be increased in the management of type 2 diabetes mellitus (48). However, the mechanisms by which oleate may improve insulin resistance are unknown. Here we report that oleate prevents palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. Exposure

affected, which is consistent with the shift in the incorporation of palmitate from DAG to TG. In line with previous studies showing that PPARα up-regulates *Dgat2* expression in skeletal muscle and heart (38, 39), the decrease in the expression levels of *Dgat2* caused by palmitate exposure was prevented in the

presence of PPAR α activators, suggesting that oleate may act through a similar mechanism. The findings of our study support this possibility, because oleate exposure led to enhanced PPAR DNA-binding activity. Overall, the results of this study indicate that palmitate is mainly incorporated into DAG because its incorporation into TG is reduced by the fall in the expression of *Dgat2*. However, oleate is mainly incorporated into TG and when palmitate-exposed cells are co-supplemented with oleate the expression of *Dgat2* is not reduced and palmitate is then diverted toward TG instead of DAG. It is worth saying that increased TG accumulation in obese and type 2 diabetic muscle fibers *in vivo* has been considered an adaptive event (50), which initially is not itself toxic. Rather, TG accumulation reduces the formation of additional lipid species with more deleterious effects and thus may serve to prevent lipotoxicity. In line with this hypothesis, it has been reported that TG accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity (53). However, when lipid availability is prolonged, lipotoxicity may occur when cellular capacity for TG accumulation is exceeded or when TG is hydrolyzed. In addition, two recent studies have elegantly demonstrated that either acute exercise or overexpression of *Dgat1* leads to increased triglyceride synthesis in skeletal muscle, preventing fatty acid-induced insulin resistance and inflammation (54, 55). In concordance with the results of our study, the protection against insulin resistance and inflammation reported in these studies was associated with attenuated activation of DAG-responsive PKCs and enhanced I κ B α abundance. Therefore, oleate supplementation and physical activity prevent fatty acid-induced inflammation and insulin resistance through similar mechanisms.

Additional mechanisms may also contribute to the effects of oleate on DAG levels. Our data demonstrate that the effect of oleate on the DAG-PKC θ -NF κ B pathway depends on enhanced fatty acid oxidation, because in the presence of etomoxir, an inhibitor of CPT-I, DAG and *Il-6* levels were enhanced. Oleate, unlike palmitate, led to enhanced expression of *Cpt-1*, which catalyzes the entry of long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix, through a mechanism that was not dependent on PPAR α , because in the presence of the antagonist MK886 it was not reversed. However, the up-regulation of *Cpt-1* caused by oleate was prevented in the presence of the PKA inhibitor H89. As previously reported (44, 56), PKA activation may lead directly to enhanced *Cpt-1* expression and activity. Further, because PKA activators increase ligand-activated and basal activity of PPAR α and PPAR β/δ (40, 41, 57) through a mechanism that seems to stabilize binding of the liganded PPAR to DNA, the oleate-mediated activation of *Cpt-1* may be secondary to the increase in the PPAR DNA binding activity caused by this monounsaturated fatty acid. *Pgc-1 α* , a transcriptional co-activator promoting oxidative capacity in skeletal muscle (33), is also under the control of PPARs and PKA (35, 36). This is consistent with the abolition of the effects of oleate on *Pgc-1 α* expression in palmitate-exposed cells in the presence of MK886 and H89. Further, we have previously reported that palmitate down-regulates *Pgc-1 α* in skeletal muscle cells through a NF κ B-dependent mechanism (28). Given that PPAR α activators prevent NF κ B activation (58, 59), it is likely that the reduction in NF κ B activity caused by oleate could

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

also be involved in the effects of this fatty acid on *Pgc-1 α* expression.

Overall, these findings indicate that oleate may prevent the deleterious effects of palmitate on skeletal muscle cells by increasing *Cpt-1* expression through a PKA-dependent mechanism. The involvement of CPT-I in the changes caused by oleate were confirmed by the use of the CPT-I inhibitor, etomoxir. It should be noted that these findings are consistent with previous studies reporting that overexpression of *Cpt-1* contributes to protecting skeletal muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance (32, 60).

In addition to the reduction of DAG accumulation, additional mechanisms may also contribute to the prevention of palmitate-induced inflammation and insulin resistance by oleate. For instance, exposure of skeletal muscle cells to palmitate leads to the accumulation of ceramides, which are key players in the development of insulin resistance. In fact, a recent study clearly demonstrated the involvement of increased ceramide synthesis in response to excessive saturated fatty acids in the development of insulin resistance by inhibiting Akt phosphorylation and activation (61). Interestingly, Pickersgill *et al.* (11) recently suggested that oleate may also prevent palmitate-induced ceramide synthesis. However, increased ceramide synthesis seems not to be involved in palmitate-induced inflammation because inhibition of ceramide synthesis fails to prevent lipid induction of the inflammatory cytokine *Il-6*, suggesting that ceramides do not affect the PKC θ -NF κ B pathway. This is in agreement with a previous study of our group showing that inhibition of palmitate-induced ceramide synthesis did not prevent the increase in *Il-6* expression (19). Therefore, although the involvement of increased ceramide levels in the development of insulin resistance has been clearly demonstrated, the contribution of this lipid mediator to fatty acid-induced inflammation in skeletal muscle cells is less clear. Moreover, it remains to be studied whether oleate affects the activity of JNK, which is involved in fatty acid-induced insulin resistance and inflammation (55).

In summary, the results reported here demonstrate that oleate protects against palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells by promoting TG accumulation and mitochondrial β -oxidation, thus preventing DAG synthesis and activation of the PKC θ -NF κ B.

Acknowledgment—We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for its helpful assistance.

REFERENCES

- DeFronzo, R. A., and Ferrannini, E. (1991) *Diabetes Care* **14**, 173–194
- Boden, G., Jadali, F., White, J., Liang, Y., Mozzoli, M., Chen, X., Coleman, E., and Smith, C. (1991) *J. Clin. Investig.* **88**, 960–966
- Boden, G., and Chen, X. (1995) *J. Clin. Investig.* **96**, 1261–1268
- Boden, G. (1997) *Diabetes* **46**, 3–10
- Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1996) *J. Clin. Investig.* **97**, 2859–2865
- Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L. J., Kraegen, E. W., White, M. F., and Shulman, G. I. (1999) *Diabetes* **48**, 1270–1274
- Cortright, R. N., Azevedo, J. L., Zhou, Q., Sinha, M., Pories, W. J., Itani, S. L., and Dohm, G. L. (2000) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**,

Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance

- E553–E562
8. Itani, S. I., Zhou, Q., Pories, W. J., MacDonald, K. G., and Dohm, G. L. (2000) *Diabetes* **49**, 1353–1358
 9. Li, Y., Soos, T. J., Li, X., Wu, J., Degennaro, M., Sun, X., Littman, D. R., Birnbaum, M. J., and Polakiewicz, R. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 45304–45307
 10. Kido, Y., Burks, D. J., Withers, D., Bruning, J. C., Kahn, C. R., White, M. F., and Accili, D. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 199–205
 11. Pickersgill, L., Litherland, G. J., Greenberg, A. S., Walker, M., and Yeaman, S. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 12583–12589
 12. Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J. S., Yuan, M. S., Li, Z. W., Karin, M., Perret, P., Shoelson, S. E., and Shulman, G. I. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 437–446
 13. Yuan, M. S., Konstantopoulos, N., Lee, J. S., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001) *Science* **293**, 1673–1677
 14. Wellen, K. E., and Hotamisligil, G. S. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 1111–1119
 15. Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., and Burt, D. (1997) *Diabetologia* **40**, 1286–1292
 16. Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E745–E751
 17. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., and Ridker, P. M. (2001) *J. Am. Med. Assoc.* **286**, 327–334
 18. Weigert, C., Brodbeck, K., Staiger, H., Kausch, C., Machicao, F., Haring, H. U., and Schleicher, E. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 23942–23952
 19. Jove, M., Planavila, A., Laguna, J. C., and Vazquez-Carrera, M. (2005) *Endocrinology* **146**, 3087–3095
 20. Schmitz-Peiffer, C., Craig, D. L., and Biden, T. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 24202–24210
 21. Vessby, B., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Tapsell, L. C., Nansen, C., Berglund, L., Louheranta, A., Rasmussen, B. M., Calvert, G. D., Maffettone, A., Pedersen, E., Gustafsson, I. B., and Storlien, L. H. (2001) *Diabetologia* **44**, 312–31
 22. Hunnicutt, J. W., Hardy, R. W., Williford, J., and McDonald, J. M. (1994) *Diabetes* **43**, 540–545
 23. Hu, F. B., van Dam, R. M., and Liu, S. (2001) *Diabetologia* **44**, 805–817
 24. Ryan, M., McInerney, D., Owens, D., Collins, P., Johnson, A., and Tomkin, G. H. (2000) *QJM* **93**, 85–91
 25. Parillo, M., Rivellese, A. A., Ciardullo, A. V., Capaldo, B., Giacco, A., Genovese, S., and Riccardi, G. (1992) *Metabolism* **41**, 1373–1378
 26. Gorski, J., Nawrocki, A., and Murthy, M. (1998) *Mol. Cell. Biochem.* **178**, 113–118
 27. Chavez, J. A., and Summers, S. A. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* **419**, 101–109
 28. Coll, T., Jove, M., Rodriguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sanchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C., and Vazquez-Carrera, M. (2006) *Diabetes* **55**, 2779–2787
 29. Freeman, W. M., Walker, S. J., and Vrana, K. E. (1999) *BioTechniques* **26**, 112–+
 30. Jove, M., Planavila, A., Sanchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C., and Vazquez-Carrera, M. (2006) *Endocrinology* **147**, 552–561
 31. Montell, E., Turini, M., Marotta, M., Roberts, M., Noe, V., Ciudad, C. J., Mace, K., and Gomez-Foix, A. M. (2001) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E229–E237
 32. Sebastian, D., Herrero, L., Serra, D., Asins, G., and Hegardt, F. G. (2007) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E677–E686
 33. Finck, B. N., and Kelly, D. P. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 615–622
 34. Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J. A., Marrero, P. F., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8560–8563
 35. Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., Rodriguez de la, C. M., Iglesias, R., Giral, M., and Villarroya, F. (2006) *Endocrinology* **147**, 2829–2838
 36. Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J. M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., and Metzger, D. (2006) *Cell Metab.* **4**, 407–414
 37. Kliewer, S. A., Forman, B. M., Blumberg, B., Ong, E. S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D. J., Umeson, K., and Evans, R. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7355–7359
 38. Finck, B. N., Bernal-Mizrachi, C., Han, D. H., Coleman, T., Sambandam, N., LaRiviere, L. L., Holloszy, J. O., Semenkovich, C. F., and Kelly, D. P. (2005) *Cell Metab.* **1**, 133–144
 39. Finck, B. N., Lehman, J. J., Leone, T. C., Welch, M. J., Bennett, M. J., Kovacs, A., Han, X., Gross, R. W., Kozak, R., Lопасchuk, G. D., and Kelly, D. P. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 121–130
 40. Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D., and Wahli, W. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 1962–1975
 41. Hansen, J. B., Zhang, H., Rasmussen, T. H., Petersen, R. K., Flindt, E. N., and Kristiansen, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3175–3182
 42. Burns, K. A., and Vanden Heuvel, J. P. (2007) *Biochim. Biophys. Acta.* **1771**, 952–960
 43. Chang, C. H., Chey, W. Y., and Chang, T. M. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G295–G303
 44. Brady, P. S., Park, E. A., Liu, J. S., Hanson, R. W., and Brady, L. J. (1992) *Biochem. J.* **286**, 779–783
 45. Jacob, S., Machann, J., Rett, K., Brechtel, K., Volk, A., Renn, W., Maerker, E., Matthaei, S., Schick, F., Claussen, C. D., and Häring, H.-U. (1999) *Diabetes* **48**, 1113–1119
 46. Perseghin, G., Scifo, P., De Cobelli, F., Pagliato, E., Battezzati, A., Arcelloni, C., Vanzulli, A., Testolin, G., Pozza, G., Del Maschio, A., and Luzi, L. (1999) *Diabetes* **48**, 1600–1606
 47. Low, C. C., Grossman, E. B., and Gumbiner, B. (1996) *Diabetes* **45**, 569–575
 48. Berry, E. M. (1997) *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 991S–997S
 49. Kim, J. K., Fillmore, J. J., Sunshine, M. J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D. W., Liu, Z. X., Soos, T. J., Cline, G. W., O'Brien, W. R., Littman, D. R., and Shulman, G. I. (2004) *J. Clin. Invest.* **114**, 823–827
 50. Gaster, M., Rustan, A. C., and Beck-Nielsen, H. (2005) *Diabetes* **54**, 648–656
 51. Stone, S. J., Myers, H. M., Watkins, S. M., Brown, B. E., Feingold, K. R., Elias, P. M., and Farese, R. V., Jr. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11767–11776
 52. Man, W. C., Miyazaki, M., Chu, K., and Ntambi, J. (2006) *J. Lipid Res.* **47**, 1928–1939
 53. Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3077–3082
 54. Liu, L., Zhang, Y., Chen, N., Shi, X., Tsang, B., and Yu, Y. H. (2007) *J. Clin. Invest.* **117**, 1679–1689
 55. Schenk, S., and Horowitz, J. F. (2007) *J. Clin. Invest.* **117**, 1690–1698
 56. Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L., Kaneda, Y., Guzman, M., and Brownlee, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 25096–25100
 57. Krogsdam, A. M., Nielsen, C. A., Neve, S., Holst, D., Helledie, T., Thomsen, B., Bendixen, C., Mandrup, S., and Kristiansen, K. (2002) *Biochem. J.* **363**, 157–165
 58. Delerive, P., Gervois, P., Fruchart, J. C., and Staels, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36703–36707
 59. Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Fruchart, J. C., Tedgui, A., Haegeman, G., and Staels, B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32048–32054
 60. Perdomo, G., Commerford, S. R., Richard, A. M., Adams, S. H., Corkey, B. E., O'Doherty, R. M., and Brown, N. F. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 27177–27186
 61. Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L. P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K. L., Knotts, T. A., Siesky, A., Nelson, D. H., Karathanasis, S. K., Fontenot, G. K., Birnbaum, M. J., and Summers, S. A. (2007) *Cell Metab.* **5**, 167–179

PUBLICACIÓ 3

COX-2 inhibition enhances palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells

*Teresa Coll, Xavier Palomer, Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil,
Rosa M. Sánchez, Juan C. Laguna, and Manuel Vázquez-Carrera*

L'aparició de RI en models animals i en humans s'ha relacionat amb la capacitat dels AGL per activar vies de senyalització proinflamatòries. Cada vegada hi ha proves més evidents que estableixen un vincle entre la RI i un estat d'inflamació crònic de baixa intensitat. La RI causada per l'increment dels nivells d'AGL també sembla implicar l'activació d'un procés inflamatori. Així, estudis recents mostren que els AGL poden activar vies inflamatòries a través de l'activació de la família dels receptors *Toll-like*, en concret TLR-2 i TLR-4. En aquest sentit, estudis realitzats en múscul esquelètic mostren que només els AG saturats són potents activadors de TLR-2 i TLR-4, i a resultes d'aquest fet són capaços d'estimular la transcripció de gens inflamatoris a través del factor de transcripció NF- κ B. Tanmateix, ha estat descrit recentment que l'activació de NF- κ B per palmitat és capaç d'incrementar l'expressió de TLR-4 en el múscul esquelètic de pacients amb DM2, fet que podria facilitar l'amplificació del procés inflamatori. Es desconeix però, si l'oleat és capaç de prevenir aquest increment causat per l'AG saturat. D'altra banda, un altre gen regulat per NF- κ B, la COX-2, té un interès especial en el procés inflamatori, ja que codifica per un enzim que pot sintetitzar PGs proinflamatòries, raó per la qual s'ha relacionat amb l'aparició de RI. De fet, estudis recents suggereixen que la inflamació mediada per la COX-2 en el teixit adipós és clau en el desenvolupament de la RI lligada a l'obesitat (Hsieh 2009). Malgrat això, altres estudis suggereixen que en determinades etapes la inhibició de la síntesi de PGs podria afavorir el procés inflamatori.

L'**objectiu** d'aquest treball ha estat investigar els efectes de l'AG saturat palmitat i del monoinsaturat oleat sobre l'expressió dels gens COX-2 i TLR-2 i 4 en cèl·lules musculars esquelètiques C2C12, així com també determinar la funció de la COX-2 en el procés inflamatori i en la RI induïdes pel palmitat.

Els **resultats** obtinguts mostren un increment de l'expressió dels gens TLR-2, però no TLR-4, i COX-2 mediat per NF- κ B quan s'exposen les cèl·lules a l'AG palmitat, que no s'observa quan s'exposen a l'AG monoinsaturat oleat. La incubació conjunta dels dos AG evita l'increment de l'expressió de TLR-2 i de COX-2. A més, els efectes de l'AG monoinsaturat oleat semblen ser mediat parcialment per l'activació de PPAR α , ja que tractaments amb l'agonista PPAR α , Wy-14643, redueixen l'expressió d'aquests dos gens, revertint els efectes causats pel palmitat. Finalment, la inhibició de la COX-2 amb l'inhibidor selectiu per a aquest enzim, NS-398, augmenta la inducció de l'expressió de IL-6 i TNF- α i la secreció de IL-6 induïdes pel palmitat en les cèl·lules musculars esquelètiques, així com també atenua la fosforilació d'Akt mediada per la insulina. D'acord amb aquests resultats, sembla que els AG palmitat i oleat actuen de manera diferent en la regulació de l'expressió dels gens COX-2 i TLR-2 en cèl·lules C2C12, i que la inhibició de la COX-2 pot afavorir el procés inflamatori i la RI en el nostre model.

COX-2 inhibition enhances palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells

Teresa Coll^{1,2}, Xavier Palomer^{1,2}, Francisco Blanco-Vaca^{2,3}, Joan Carles Escolà-Gil^{2,3}, Rosa M. Sánchez^{1,2}, Juan C. Laguna^{1,2}, and Manuel Vázquez-Carrera^{1,2}.

¹Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

³Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Running title: COX-2 inhibition promotes inflammation

Key words: Oleate, Palmitate, COX-2, TLR-2, NF- κ B, PPAR α , IL-6, TNF- α .

Corresponding author: **Manuel Vázquez-Carrera**
Unitat de Farmacologia. Facultat de Farmàcia.

Diagonal 643. E-08028 Barcelona. Spain

Phone: 34 93 4024531

Fax: 34 93 4035982

E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

Abstract

Palmitate-induced inflammation is involved in the development of insulin resistance in skeletal muscle cells. Here, we evaluated the effect of the saturated fatty acid palmitate and the monounsaturated fatty acid oleate on Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 and cyclooxygenase 2 (COX-2) expression and examined whether the inhibition of this enzyme modulates fatty acid-induced inflammation. Skeletal muscle cells exposed to palmitate showed enhanced TLR-2 and COX-2 mRNA levels, whereas oleate did not modify their expression. Palmitate-induced expression of these genes was dependent on NF- κ B activation, since expression was reduced in the presence of the NF- κ B inhibitor parthenolide. Co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate also prevented the increase in the expression of TLR-2 and COX-2, through a mechanism that may involve activation of PPAR α by this monounsaturated fatty acid. COX-2 inhibition by NS-398 enhanced IL-6 and TNF- α expression and IL-6 protein secretion induced by palmitate. NF- κ B binding activity and TNF- α mRNA levels were enhanced in palmitate-exposed cells in the absence or in the presence of NS-398, whereas co-incubation of palmitate-exposed cells with NS-398 and prostaglandin E₂ (PGE₂) prevented these changes. In contrast, 12- lipoxygenase and cytochrome P450 hydroxylase pathways were not involved in these changes. Similarly, COX-2 inhibition impaired insulin-stimulated Akt phosphorylation in palmitate-exposed skeletal muscle cells and this effect was abolished in the presence of PGE₂. These findings indicate that COX-2 activity, through the production of PGE₂, attenuates the fatty acid-induced inflammatory process.

Introduction

Plasma free fatty acids (FFAs) are elevated in obese individuals and animals and play a critical role in the development of insulin resistance. Experimental evidence indicates that FFAs are a primary trigger for insulin resistance in both animal models and humans (1). FFAs may cause insulin resistance in skeletal muscle through several mechanisms, including activation of pro-inflammatory pathways, linking the development of this pathology with a low-grade chronic systemic inflammatory response (2). Thus, evidence suggests that high FFAs levels increase their uptake, exceeding its oxidation. This in turn leads to increased intramuscular FFA metabolites which stimulate inflammatory pathways, including the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B, leading to impaired insulin signaling (3). In addition, recent reports indicate that FFAs also stimulate inflammatory pathways in skeletal muscle cells through direct activation of plasma membrane receptors (4). Consistent with this, it has been reported that FFAs may serve as ligands for several members of the Toll-like receptor (TLR) family (5;6). TLRs 2 and 4 play an important role in the innate immune system by activating inflammatory pathways in response to a wide spectrum of exogenous and endogenous ligands, including the lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacterial cell walls (7). The critical component of LPS involved in the activation of TLRs is the lipid A moiety, which consists almost entirely of fatty acids (8). In macrophages, adipocytes and skeletal muscle cells saturated fatty acids are potent activators of TLR-2 and TLR-4 (9;10). In the presence of ligands, the TLR4 complex (including its co-receptors CD14 and MD-2) recruits the adaptor protein myeloid differentiation factor-88 (MyD88), which in turn leads to the auto-phosphorylation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK). Finally, when IRAK is activated, it interacts with tumor necrosis factor (TNF)-associated factor 6 (TRAF6), which leads to NF- κ B activation.

Thus, whatever the mechanism involved, whether intracellular FFA metabolite accumulation or TLR activation, elevated FFAs finally result in NF- κ B activation. Once activated, NF- κ B stimulates the transcription of several inflammatory genes including IL-6, cyclooxygenase 2 (COX-2) and TNF- α (11), which may modulate insulin signaling. NF- κ B activation by the saturated fatty acid palmitate has also been implicated in the increase in TLR-4 and TLR-2 expression observed in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects (12). In these patients the increased availability of these receptors may potentiate the effect of fatty acids on inflammation and insulin resistance. Thus, those strategies aimed at preventing NF- κ B activation may reduce inflammation in skeletal muscle cells. Of these strategies, we recently reported that the monounsaturated fatty acid oleate prevents inflammation caused by palmitate in skeletal muscle cells (13). However, further research is necessary in order to ascertain whether oleate prevents the increase in TLR and COX-2 expression caused by saturated fatty acids.

COX-2, also known as prostaglandin-endoperoxide synthase-2, synthesizes pro- and anti-inflammatory prostaglandins that may affect the development of inflammation and, therefore, insulin resistance. Chronic COX-2-mediated inflammation seems to be involved in the development of insulin resistance since type 2 diabetes mellitus in Pima Indians has been associated with a promoter variant in the inducible COX-2 gene (14) and COX-mediated inflammation and oxidative stress has been related to type 2 diabetes mellitus in elderly men (15). Moreover, a recent report suggests that chronic COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance (16). However, an increasing number of recent reports have revealed that prostaglandins can exert a protective role during inflammation (17). In particular, some prostaglandins increase during the resolution phase of inflammation and alleviate this process in

animal models (18-20). Moreover, reduced production of prostaglandins due to genetic deficiency or through administration of COX-2 inhibitors may even worsen inflammation (21-23). Furthermore, inhibition of COX-2 may increase the availability of arachidonic acid to be transformed by lipoxygenase and cytochrome P450 and by no enzymatic oxidative modification (24), leading to enhanced synthesis of active compounds that may modulate the inflammatory process. Therefore, COX-2 may differently modulate inflammation.

The purpose of this research was to study the effects of saturated and monounsaturated fatty acids on COX-2 and TLR expression in skeletal muscle cells and to investigate whether COX-2 inhibition modulates fatty acid-induced inflammation. Our results indicate that whereas palmitate increases the expression of COX-2 and TLR-2 through a NF- κ B-dependent mechanism, oleate does not. Oleate prevented palmitate-induced up-regulation of COX-2 and TLR-2 through a mechanism that involves Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) activation. Finally, COX-2 inhibition enhanced palmitate-induced IL-6 and TNF- α expression and IL-6 secretion in skeletal muscle cells, indicating that COX-2 activity attenuates fatty acid-induced inflammation.

Materials and methods

Materials

Fatty acids, Wy-14,643, MK886, PGE₂, baicalein and 17-Octadecynoic acid (17-ODYA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Cell culture

Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. When cells reached confluence, the medium was switched to the differentiation medium containing DMEM and 2% horse serum, which was changed every other day. After 4 additional days, the differentiated C2C12 cells had fused into myotubes. Lipid-containing media were prepared by conjugation of FFA with FFA-free bovine serum albumin, using a modified version of the method described by Chavez *et al.* (25). Briefly, FFAs were dissolved in ethanol and diluted 1:100 in DMEM containing 2% (w/v) fatty-acid-free bovine serum albumin. Myotubes were incubated for 16 hours in serum-free DMEM containing 2% bovine serum albumin in either the presence (FFA-treated cells) or absence (control cells) of FFAs. Following incubation, RNA was extracted from myotubes as described below. Culture supernatants were collected and the secretion of IL-6 was assessed by ELISA (Invitrogen) and the levels of PGE₂ by EIA (Cayman Chemical).

Measurements of mRNA

Levels of mRNA were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as described elsewhere (13;13). Total RNA was isolated by using the Ultraspec reagent (Biotecx, Houston). The total RNA isolated by this method was undegraded and free of protein and DNA contamination. The sequences of the sense

and antisense primers used for amplification were: IL-6, 5'-TCCAGCCAGTTGCCTTCTTGG-3' and 5'-TCTGACAGTGCATCATCGCTG-3'; TLR-2, 5'-AAGAAGCTGGCATTCCGAGGC-3' and 5'-CGTCTGACTCCGAGGGGTTGA-3'; COX-2, 5'-TCCCGTAGATGACTGCCC-3' and 5'-ATGGGTGAAGTGCTGGGCAA-3'; TNF- α , 5'-GTGCCAGCCGATGGGTTGTAC-3' and 5'-CGCTGAGTTGTTCCCCCTTCT-3', and Aprt (adenosyl phosphoribosyl transferase), 5'-GCCTCTTGGCCAGTCACCTGA-3' and 5'-CCAGGCTCACACACTCCACCA-3'. Amplification of each gene yielded a single band of the expected size (TLR-2: 151 bp; COX-2: 163 bp; TNF- α : 284 bp; IL-6; 229 bp and Aprt: 329 bp). Preliminary experiments were carried out with varying amounts of cDNA to determine non-saturating conditions of PCR amplification (TLR-2: 22 cycles; COX-2: 21 cycles; TNF- α : 25 cycles; IL-6: 32 cycles) for all the genes studied. Thus, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed using the RT-PCR method described in this study (26). Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilbert Lourmat Imaging). The results for the expression of specific mRNAs are always given in relation to the expression of the control gene (Aprt).

Isolation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts isolation and EMSA were performed as described elsewhere (13).

Immunoblotting

To obtain total proteins, C2C12 myotubes were homogenized in cold lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5.4 μ g/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Total and nuclear proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Western blot analysis was performed using antibodies against total and (Santa Cruz

Biotechnology, CA) and phospho-Akt (Ser⁴⁷³), total and phospho-IRS1 (Ser³⁰⁷). Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek Ltd., Israel). The equal loading of proteins was assessed by red phenol staining. The size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen, Barcelona, Spain).

Statistical Analyses

Results are expressed as the mean \pm S.D. of 6 separate experiments. Significant differences were established by one-way ANOVA using the computer program GraphPad InStat (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). When significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was performed. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Palmitate increases TLR-2 mRNA levels through a mechanism which does not require COX-2 activity

First we studied the time response effects of 0.5 mM palmitate on the mRNA levels of several inflammatory markers in skeletal muscle cells (Fig. 1A). Whereas palmitate treatment for 1 h caused a non-significant reduction in COX-2 mRNA levels, a significant increase was observed after 8 (3.3-fold, $p < 0.01$) and 16 h (22-fold, $p < 0.001$) in palmitate exposed cells compared to control cells. In contrast, the mRNA levels of TNF- α were barely detectable until cells were exposed to palmitate for 16 h, when a strong induction was observed. IL-6 mRNA levels followed a similar profile to that reported for COX-2, with huge inductions in cells exposed to palmitate for 8h and 16h.

When we analyzed TLR-4 and TLR-2 mRNA levels, no changes were observed in the former whereas TLR-2 mRNA levels showed a transient increase (2-fold induction, $p < 0.001$) after 8 h and then returned to basal levels in cells exposed to palmitate for 16 h (Fig. 1B).

Since it has been reported that several prostaglandins may modulate TLR-2 expression (27), we then evaluated whether the effect of palmitate on TLR-2 expression was dependent on COX-2 activity. To this end, cells were incubated with palmitate for 8 h either in the presence or in the absence of the COX-2 specific inhibitor NS-398. Inhibition of COX-2 activity by NS-398 did not affect either TLR-2 or COX-2 mRNA levels (Figure 2), indicating that in this cellular model the increase in the expression of these genes was independent of prostaglandin synthesis. As a control, we measured PGE₂ secretion to the culture media as a surrogate marker of COX-2 activity. In agreement with the increase in COX-2 mRNA levels, palmitate exposure caused a 2.3-fold increase ($P < 0.001$ vs control cells) in PGE₂ levels, whereas in cells exposed to palmitate plus NS-398 this increase was abolished.

Induction of COX-2 and TLR-2 mRNA levels by palmitate are mediated through NF- κ B activation

It has been reported that activation of NF- κ B is both sufficient and necessary to induce maximal expression of COX-2 (28). Therefore, we investigated whether palmitate-induced COX-2 expression was mediated through the activation of NF- κ B in skeletal muscle cells by using the NF- κ B inhibitor parthenolide, which specifically inhibits the activity of this pro-inflammatory transcription factor by preventing the degradation of I κ B α (29). In the presence of parthenolide, the palmitate-mediated induction of COX-2 was almost completely abolished (Fig. 3A). Likewise, the NF- κ B inhibitor prevented the increase in TLR-2 mRNA caused by palmitate (Fig. 3B). These findings are consistent with those of previous studies (12;28), and demonstrate that the saturated fatty acid palmitate increases COX-2 and TLR-2 mRNA levels through a mechanism involving NF- κ B activation.

Oleate prevents palmitate-mediated increases in COX-2 and TLR-2 mRNA levels

In contrast to the effects of the saturated fatty acid palmitate, we previously reported elsewhere that the monounsaturated fatty acid oleate does not stimulate NF- κ B (13) in skeletal muscle cells. In addition, co-incubation of palmitate-exposed cells with oleate prevented NF- κ B activation (13). Therefore, in this research we investigated whether oleate affected COX-2 and TLR-2 mRNA levels and whether this fatty acid prevented palmitate-induced expression of these genes. Skeletal muscle cells exposed to 0.5 mM oleate did affect neither COX-2 nor TLR-2 mRNA levels compared to control cells (Figure 4). Moreover, when cells were co-incubated with 0.5 mM palmitate and 0.3 mM oleate the increase in COX-2 and TLR-2 mRNA levels caused by palmitate was

completely abolished. These data indicate that low concentrations of oleate prevent palmitate-mediated inflammation in skeletal muscle cells.

PPAR α activation inhibits the palmitate-mediated increase in COX-2 mRNA

As we have previously reported elsewhere that oleate activates PPAR α in skeletal muscle cells (13) and PPAR α agonists prevent PMA-induced expression of COX-2 in human colorectal carcinoma cells (30), in this study we evaluated whether the PPAR α agonist Wy-14,643 prevented the induction in COX-2 and TLR-2 mRNA levels caused by palmitate. When palmitate-exposed cells were co-incubated with Wy-14,643 a significant reduction was observed in COX-2 mRNA expression (9.8-fold induction compared to 18-fold induction in cells exposed to palmitate only, $p < 0.05$) (Fig. 5A). Similarly, co-incubation with Wy-14,643 significantly reduced the induction in TLR-2 mRNA levels caused by palmitate (2-fold vs 2.6-fold induction, $p < 0.05$) (Fig. 5B). To demonstrate that oleate reduces palmitate-mediated induction of COX-2 mRNA levels by activating PPAR α we used MK886, an antagonist of this receptor. In the presence of MK886, the effect of oleate on COX-2 mRNA levels in cells exposed to palmitate was partially reversed, suggesting that COX-2 expression was down-regulated by oleate, at least in part, through a PPAR α -dependent mechanism (Fig. 5C).

COX-2 inhibition enhances palmitate-induced IL-6 and TNF- α expression

Since it has been reported that prostaglandins may limit stimulus-induced cytokine secretion in macrophages (31) we evaluated the contribution of COX-2 to palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells. Skeletal muscle cells co-incubated with palmitate and the COX-2 inhibitor NS-398 showed higher IL-6 and TNF- α mRNA levels than those exposed to palmitate alone (Fig. 6A and B). In addition, when we evaluated

the secretion of IL-6 protein levels we observed that palmitate exposure caused a 7-fold increase in the secretion of this cytokine compared to control cells (259 ± 18 vs. 37 ± 2 pg/ml, $p<0.001$), whereas co-incubation with palmitate and NS-398 caused a 3-fold increase compared to cells exposed to palmitate alone (813 ± 49 vs. 259 ± 18 pg/ml, $p<0.001$) (Fig. 6C).

PGE₂ prevents the pro-inflammatory effect and ameliorates insulin resistance caused by COX-2 inhibition in palmitate-exposed skeletal muscle cells

The pro-inflammatory effect caused by COX-2 inhibition in palmitate-exposed cells can be related to the reduction in PGE₂ synthesis or to the increased availability of arachidonic acid to be transformed by 12-lipoxygenase and cytochrome P450 hydroxylase, leading to increased levels of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE), respectively, which can elicit pro-inflammatory actions (32;33). We examined the contribution of these mediators to palmitate-mediated inflammation by measuring NF- κ B binding activity by EMSA. NF- κ B formed three complexes with nuclear proteins (Figure 7A) and specificity of the DNA-binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabeled NF- κ B oligonucleotide. Palmitate-exposed cells in the presence or in the absence of NS-398 showed an increase in NF- κ B DNA-binding activity, mainly of complex III, compared with control cells, whereas in cells co-incubated with palmitate plus NS-398 and PGE₂ the increase in NF- κ B DNA-binding activity was abolished. No changes were observed in the NF- κ B DNA-binding activity when cells were incubated with palmitate and NS-398 and baicalein and 17-ODYA, inhibitors of the 12-lipoxygenase and cytochrome P450 hydroxylase, respectively. Similarly, cells incubated with 12-HETE and 20-HETE did not show increased NF- κ B DNA-binding activity. Addition of antibody against the p65 subunit of NF- κ B supershifted the

complexes, indicating that these bands mainly consisted of this subunit. In agreement with these changes, PGE₂ addition to skeletal muscle cells incubated with palmitate plus NS-398 prevented the increase in TNF- α mRNA levels (Figure 7B). Finally, we assessed whether COX-2 inhibition impaired insulin sensitivity in palmitate-exposed skeletal muscle cells by measuring insulin-stimulated Akt phosphorylation. Palmitate exposure reduced insulin-stimulated Akt phosphorylation and this reduction was more intense in palmitate-exposed cells co-incubated with the COX-2 inhibitor NS-398 (Figure 7C). Interestingly, insulin sensitivity was restored in cells co-incubated with palmitate plus NS-398 and PGE₂, whereas inhibitors of 12-lipoxygenase and cytochrome P450 hydroxylase had no effect.

Discussion

In this research we evaluated the effect of the most abundant saturated and monounsaturated fatty acids in plasma (34), palmitate and oleate, respectively, on the mRNA levels of TLR-2 and COX-2 in skeletal muscle cells. TLR-2 and TLR-4 are considered the receptors that mediate FFA-induced activation of inflammatory pathways, especially NF- κ B, and metabolic signaling in insulin resistance (9;10). Once activated, either by TLR receptors or intracellular accumulation of FFA metabolites, NF- κ B increases the transcription of pro-inflammatory genes which modulate insulin signaling, such as IL-6 and TNF- α . COX-2 gene expression is also under the control of NF- κ B and it may modulate the inflammatory process in skeletal muscle cells through the synthesis of prostaglandins. Long regarded as pro-inflammatory molecules, some prostaglandins also have anti-inflammatory effects (35). However, the contribution of COX-2 to fatty acid-induced inflammation in skeletal muscle cells remains understood.

Exposure of skeletal muscle cells to palmitate increased TLR-2 and COX-2 mRNA levels. However, whereas a transient increase in TLR-2 expression was observed following 8 h of palmitate exposure, the increase in COX-2 mRNA levels began at 8 h and peaked at 16 h. The induction of other inflammatory genes, such as IL-6, also began at 8 h, indicating that the increase in the transcription of NF- κ B-target genes mediated by palmitate requires this time period. However, 16h of palmitate treatment were necessary for the induction of TNF- α . We have demonstrated that the increase in TLR-2 mRNA levels by palmitate is dependent on NF- κ B activation, whereas prostaglandins are unlikely to be involved. In contrast to TLR-2, TLR-4 mRNA levels were not affected by palmitate treatment. In fact, it has been reported that TLR-2 is essential for the development of palmitate-induced inflammation and insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells (10). Similarly, it has been reported that in 3T3-L1

adipocytes palmitate also increased TLR-2 mRNA levels, whereas TLR-4 expression was not altered (36) and knockdown of TLR-2 prevented the increase in TNF- α by FFAs (37). All these data suggest that TLR-2 contributes to fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in several tissues, which is consistent with the significantly higher frequency of polymorphisms in the TLR-2 gene that seems to correlate to populations at higher risk of insulin resistance (38). Furthermore, the mRNA levels of both TLR-2 and TLR-4 in human myotubes were significantly higher in obese and type 2 diabetic patients than in lean patients and the increase in TLR-4 expression following palmitate treatment was dependent on NF- κ B activation (12).

In this study we also observed that the palmitate-mediated increase in COX-2 mRNA levels was dependent on NF- κ B activation, which is consistent with the fact that human and murine COX-2 genes contain two putative NF- κ B binding sites in their 5'-flanking regions (39).

Fatty acids differ in their contribution to inflammation and insulin resistance. In fact, whereas saturated fatty acids promote insulin resistance (40;41), oleic acid improves insulin sensitivity (34;42;43). However, the mechanisms by which oleate may ameliorate insulin sensitivity are not well understood. Here we report that oleate, in contrast to palmitate, does not induce either TLR-2 or COX-2 mRNA levels. We have previously reported elsewhere that oleate does not activate the diacylglycerol (DAG)-Protein kinase C (PKC) θ -NF- κ B pathway and, as a result, the expression of inflammatory markers (IL-6, TNF- α) was not induced (13). In addition, the lack of effect of oleate on inflammation could be also attributed to its effects on TLR-2 signaling, since it has been reported that unsaturated FFAs do not activate this pathway (6). Therefore, oleate, in contrast to palmitate, is not pro-inflammatory. Interestingly, oleate, even at a lower concentration (0.3 mM), abolished the induction in COX-2 and TLR-2

mRNA levels caused by 0.5 mM palmitate. Although several mechanisms may be involved, here we show that PPAR α activation by Wy14,643 reduces palmitate-mediated expression of COX-2 and TLR-2. In fact, in the presence of the PPAR α antagonist MK886 the effect of oleate on COX-2 mRNA levels was partially reversed. These findings indicate that oleate may prevent palmitate-mediated NF- κ B activation and COX-2 mRNA up-regulation by activating PPAR α , as we reported previously (13). In fact, it is well-known that PPAR α inhibits NF- κ B activation through several mechanisms (44).

Additional mechanisms not explored in this work may also contribute to prevent palmitate-induced inflammation by oleate. In macrophages, it has been reported that unsaturated fatty acids, including oleic acid, inhibit lauric acid-induced activation of NF- κ B and COX-2 expression (5;39;45). In the case of unsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid, the target of this inhibition was TLR-2 itself or its associated molecules, but not downstream signaling components (5). Further research is needed in order to determine whether oleate acts in a similar way in skeletal muscle cells to prevent palmitate-induced inflammation.

Finally, we explored the contribution of COX-2 to the development of palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by using a selective inhibitor of this enzyme. Our findings demonstrate that COX-2 inhibition amplifies the inflammatory process caused by palmitate. This is consistent with previous studies showing that prostaglandin E₂ and 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibit TNF- α expression in macrophages (31;46). Therefore, these data suggest that prostaglandins can limit the acute inflammatory process and that COX-2 inhibition may amplify it. Furthermore, inhibition of COX-2 may increase the availability of arachidonic acid to be transformed by lipooxygenase and cytochrome P450 and by no enzymatic oxidative modification (24). The increase in

these transformations may lead to enhanced synthesis of active compounds that may modulate the inflammatory process. Thus, 12-lipoxygenase and its major product 12-HETE have been reported to increase the expression of IL-6 and TNF- α in macrophages (32). Likewise, the product of the cytochrome P450 hydroxylase, 20-HETE, stimulates NF- κ B and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells (33). Our findings suggest that the increase in inflammation and insulin resistance attained by COX-2 inhibition in palmitate-exposed cells is caused by the reduction in PGE₂, since co-incubation with this prostaglandin prevent these changes. PGE₂, the best known and most well-studied PG, plays a critical role in inflammation. However, its role is complex, and both pro- and anti-inflammatory properties have been reported for this prostaglandin. For instance, most of the effects of PGE₂ in macrophages are anti-inflammatory (47). Interestingly, peritoneal macrophages from diabetes-prone Bio-Breeding (BB) rats secrete more TNF- α than macrophages from diabetes-resistant BB or normal Wistar rats (48) and this increase secretion has been related to a defect in PGE₂ production, making feedback inhibition by this prostaglandin insufficient and leading to prolonged secretion of TNF- α . In addition, in dendritic cells it has been reported that COX-2-generated PGE₂ also inhibits IL-6 and TNF- α production (49).

In contrast to the effects of PGE₂, our findings make unlikely the involvement of 12-HETE and 20-HETE in the increase in inflammation and insulin resistance after COX-2 inhibition in palmitate-exposed skeletal muscle cells.

Based on the data shown here, we hypothesize that during acute inflammation COX-2 up-regulation leads to increased synthesis of prostaglandin E₂, which limit the extension of inflammation by reducing the expression of IL-6 and TNF- α . Since COX-2 expression is under the control of NF- κ B, the more potent the inflammatory process the higher the synthesis of these prostaglandins. Likewise, those strategies which reduce

inflammation (oleate and PPAR activators) also down-regulate the expression of COX-2 and the synthesis of these prostaglandins. Whilst the action of these prostaglandins may limit the extension of acute inflammation, it is probable that when inflammation becomes chronic, COX-2 up-regulation contributes to an increase in inflammation.

To summarize, the findings of this study imply the possibility that cellular expression of COX-2 and TLR-2 in skeletal muscle cells can be differentially regulated by palmitate and oleate which, in turn, can be altered by the kinds of dietary fats consumed. Further, COX-2 inhibition enhances palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells, suggesting that prostaglandin synthesis may attenuate this process, at least during the acute phase of the inflammatory process.

Acknowledgements- This study was partly supported by funds from the Fundació Ramón Areces, Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-01475), European Union FEDER funds and Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an ISCIII (Instituto de Salud Carlos III) project. Teresa Coll was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for its help.

References

1. **Liu RH, Mizuta M, Kurose T, Matsukura S** 2002 Early events involved in the development of insulin resistance in Zucker fatty rat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:318-326
2. **Wellen KE, Hotamisligil GS** 2005 Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119
3. **Shulman GI** 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176
4. **Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G** 2005 Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11:90-94
5. **Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, Hwang DH** 2003 Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 44:479-486
6. **Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH** 2004 Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem* 279:16971-16979
7. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O** 2006 Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801
8. **Raetz CR** 1990 Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170
9. **Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS** 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025
10. **Senn JJ** 2006 Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281:26865-26875
11. **Libermann TA, Baltimore D** 1990 Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327-2334
12. **Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, Cersosimo E, Defronzo RA, Coletta DK, Sriwijitkamol A, Musi N** 2008 Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57:2595-2602

13. **Coll T, Eyre E, Rodriguez-Calvo R, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M** 2008 Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283:11107-11116
14. **Konheim YL, Wolford JK** 2003 Association of a promoter variant in the inducible cyclooxygenase-2 gene (PTGS2) with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Hum Genet* 113:377-381
15. **Helmersson J, Vessby B, Larsson A, Basu S** 2004 Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 109:1729-1734
16. **Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC** 2009 COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver. *Obesity (Silver Spring)*
17. **Sandig H, Pease JE, Sabroe I** 2007 Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD2 and its metabolites in leukocyte function. *J Leukoc Biol* 81:372-382
18. **Gilroy DW, Perretti M** 2005 Aspirin and steroids: new mechanistic findings and avenues for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 5:405-411
19. **Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, Jacques TS, Hannon R, Kanaoka Y, Eguchi N, Colville-Nash P, Gilroy DW** 2006 Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5179-5184
20. **Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K** 2002 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* 277:10459-10466
21. **Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, Tiano HF, Lee CA, Langenbach R, Roggli VL, Zeldin DC** 1999 Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest* 104:721-732
22. **Peebles RS, Jr., Hashimoto K, Morrow JD, Dworski R, Collins RD, Hashimoto Y, Christman JW, Kang KH, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell DB, Talati M, Graham BS, Sheller JR** 2002 Selective cyclooxygenase-1 and -2 inhibitors each increase allergic inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1154-1160
23. **Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN** 2003 Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in

steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol* 171:3936-3940

24. **Inserte J, Molla B, Aguilar R, Traves PG, Barba I, Martin-Sanz P, Bosca L, Casado M, Garcia-Dorado D** 2009 Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 46:160-168
25. **Chavez JA, Summers SA** 2003 Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419:101-109
26. **Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE** 1999 Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-115
27. **Yoon HJ, Jeon SB, Kim IH, Park EJ** 2008 Regulation of TLR2 expression by prostaglandins in brain glia. *J Immunol* 180:8400-8409
28. **Rhee SH, Hwang D** 2000 Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 275:34035-34040
29. **Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W, Schmitz ML** 1998 Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem* 273:1288-1297
30. **Grau R, Punzon C, Fresno M, Iniguez MA** 2006 Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J* 395:81-88
31. **Stafford JB, Marnett LJ** 2008 Prostaglandin E2 inhibits tumor necrosis factor-alpha RNA through PKA type I. *Biochem Biophys Res Commun* 366:104-109
32. **Wen Y, Gu J, Chakrabarti SK, Aylor K, Marshall J, Takahashi Y, Yoshimoto T, Nadler JL** 2007 The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology* 148:1313-1322
33. **Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthati VL, Falck JR, Laniado-Schwartzman M** 2008 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 324:103-110

34. **Gorski J, Nawrocki A, Murthy M** 1998 Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. *Mol Cell Biochem* 178:113-118
35. **Scher JU, Pillinger MH** 2005 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114:100-109
36. **Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME** 2009 The c-Jun N-Terminal Kinase Mediates the Induction of Oxidative Stress and Insulin Resistance by Palmitate and Toll-like Receptor 2 and 4 Ligands in 3T3-L1 Adipocytes. *Horm Metab Res*
37. **Murakami K, Bujo H, Unoki H, Saito Y** 2007 High fat intake induces a population of adipocytes to co-express TLR2 and TNFalpha in mice with insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 354:727-734
38. **Yim JJ, Ding L, Schaffer AA, Park GY, Shim YS, Holland SM** 2004 A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40:163-169
39. **Hwang D** 2001 Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *FASEB J* 15:2556-2564
40. **Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nansen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH** 2001 Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 44:312-319
41. **Hunnicutt JW, Hardy RW, Williford J, McDonald JM** 1994 Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 43:540-545
42. **Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH** 2000 Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM* 93:85-91
43. **Parillo M, Rivellese AA, Ciardullo AV, Capaldo B, Giacco A, Genovese S, Riccardi G** 1992 A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 41:1373-1378

-
44. **Chinetti G, Fruchart JC, Staels B** 2000 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49:497-505
 45. **Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D** 2001 Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:16683-16689
 46. **Engdahl R, Monroy MA, Daly JM** 2007 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) mediates repression of TNF-alpha by decreasing levels of acetylated histone H3 and H4 at its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 359:88-93
 47. **Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP** 2002 Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23:144-150
 48. **Rothe H, Ongoren C, Martin S, Rosen P, Kolb H** 1994 Abnormal TNF-alpha production in diabetes-prone BB rats: enhanced TNF-alpha expression and defective PGE2 feedback inhibition. *Immunology* 81:407-413
 49. **Harizi H, Norbert G** 2004 Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* 228:99-109

FIGURES

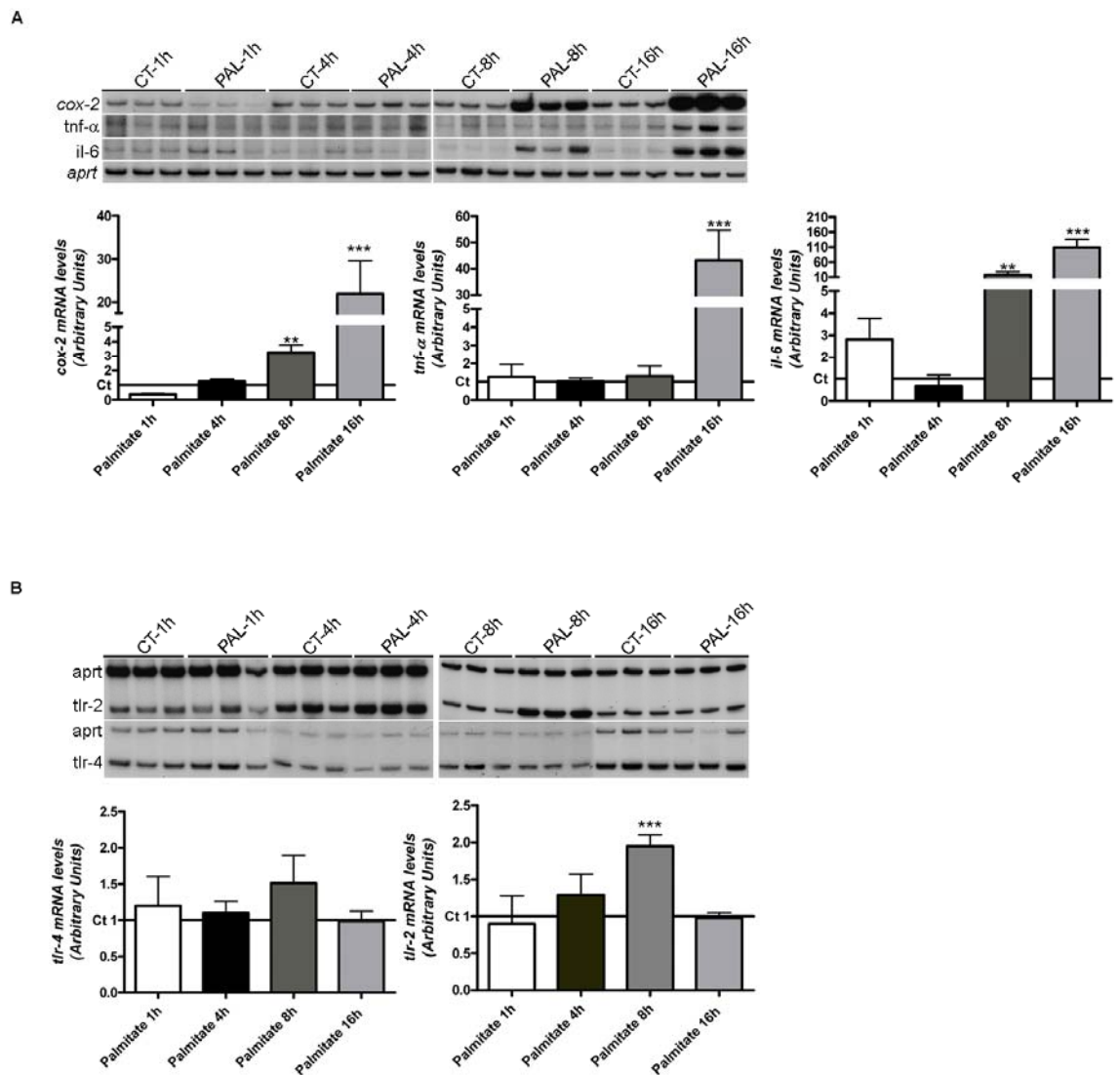


FIG. 1. Palmitate increases the expression of inflammatory genes and TLR-2 in skeletal muscle cells. Time course of palmitate effects on COX-2, TNF- α , IL-6 (A) and TLR-2 and TLR-4 (B) in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for the indicated time points. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data (means \pm S.D. of five independent experiments) are expressed as the relative increase to control (Ct) cells at the same time point. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs control cells.

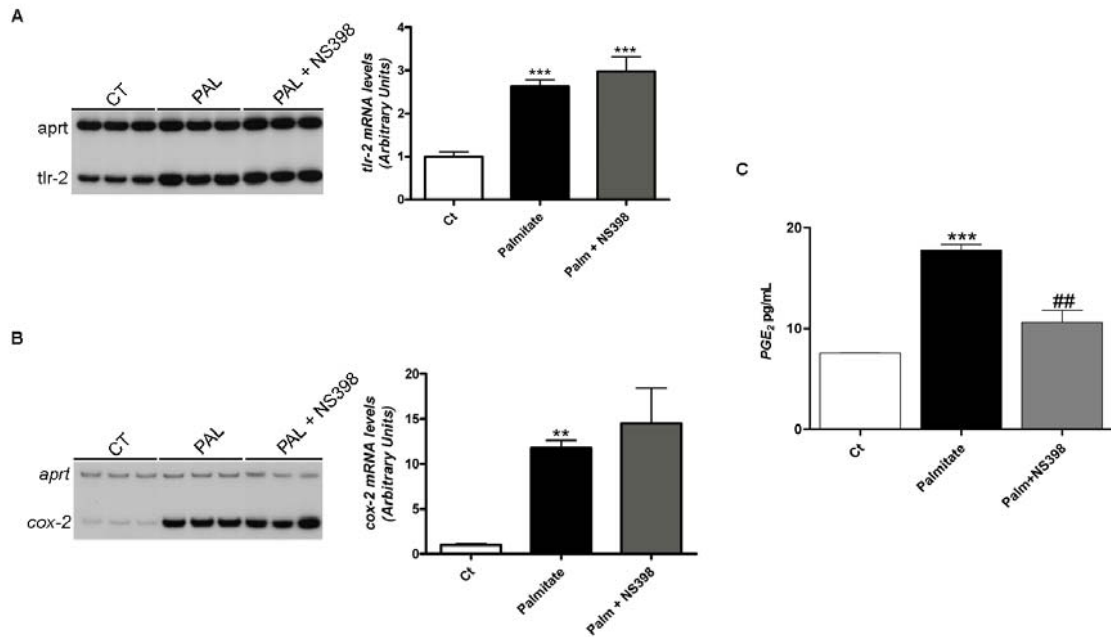


FIG. 2. The palmitate-mediated induction of TLR-2 mRNA levels does not require COX-2 activity. Analysis of the mRNA levels of TLR-2 (A) and COX-2 (B) in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for 8 h in the absence or in the presence of the specific COX-2 inhibitor NS-398 (10 μ M). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. C, Determination by EIA of PGE₂ secretion to the culture media in C2C12 myotubes. ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. control cells. ## p <0.01 vs palmitate-treated cells.

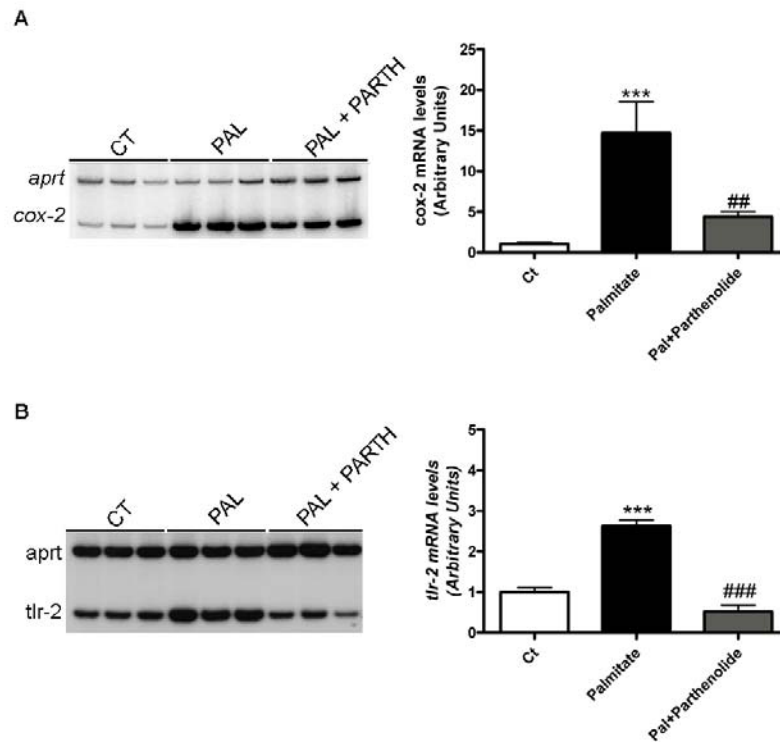


FIG. 3. NF- κ B inhibition prevents palmitate-mediated induction of COX-2 (A) and TLR-2 (B) mRNA levels in skeletal muscle cells. Analysis of the mRNA levels in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for 8 h in the absence or in the presence of the specific NF- κ B inhibitor parthenolide (10 μ M). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. *** p <0.001 vs control cells. ## p <0.01 and ### p <0.001 vs. palmitate-treated cells.

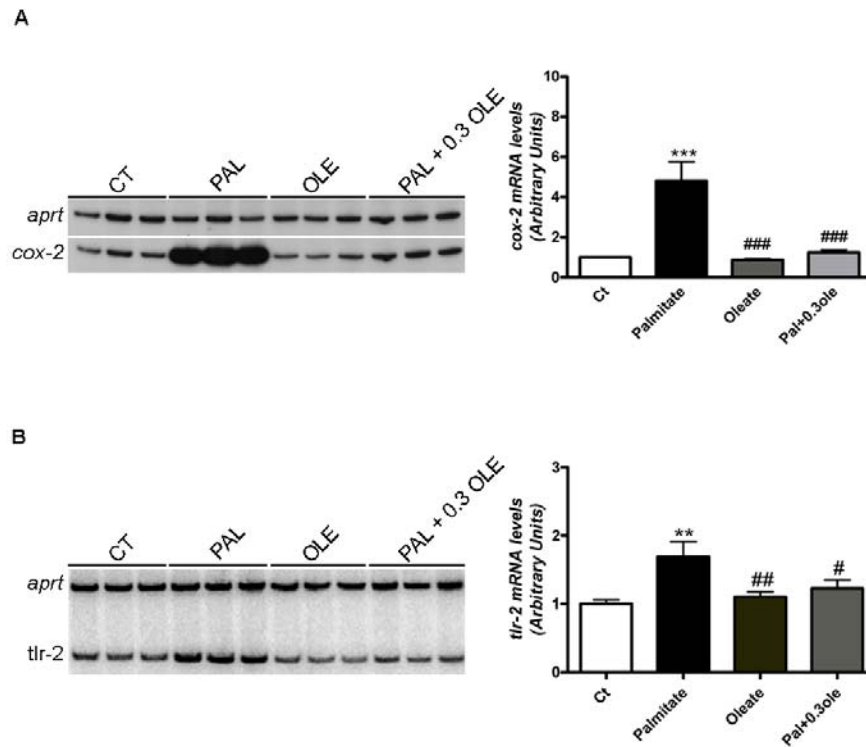


FIG. 4. Oleate prevents palmitate-mediated induction of COX-2 (A) and TLR-2 (B) mRNA levels in skeletal muscle cells. Analysis of the mRNA levels in C2C12 myotubes incubated for 8 h in the presence or absence of different fatty acids (0.5 mM palmitate, 0.5 mM oleate or 0.5 mM palmitate supplemented with 0.3 mM oleate). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs control cells. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. palmitate-treated cells.

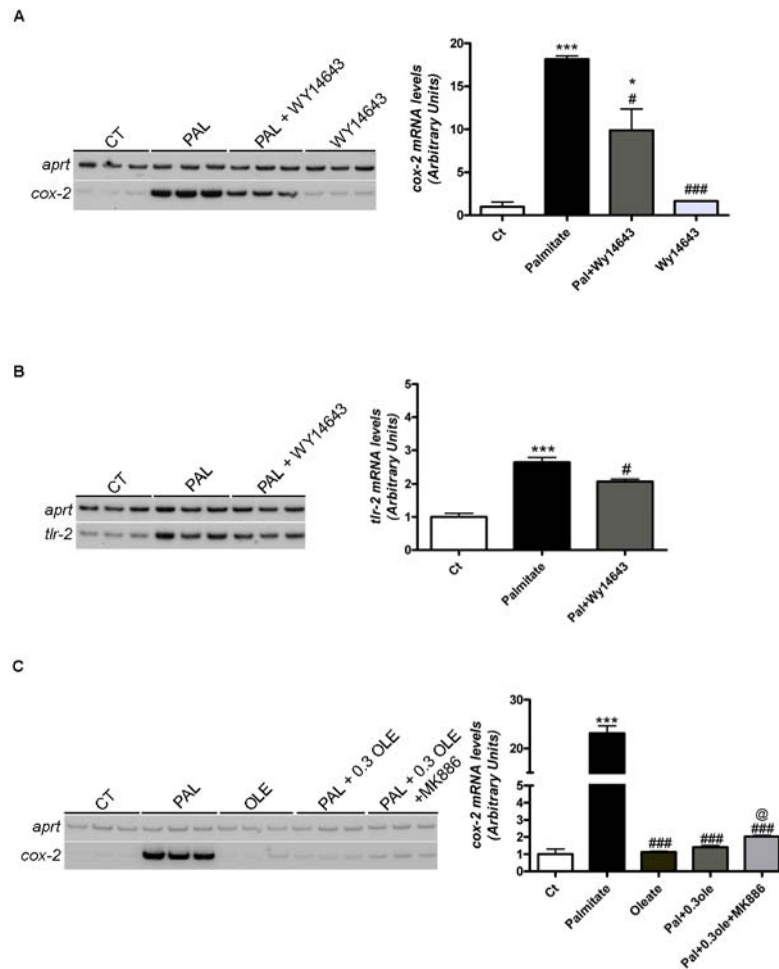


FIG. 5. Oleate prevents the palmitate-mediated increase in COX-2 mRNA levels by activating PPAR α . Analysis of the mRNA levels of COX-2 (A) and TLR-2 (B) in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for 8 h in the absence or in the presence of the PPAR α activator Wy14,643 (10 μ M). C, Analysis of the mRNA levels of COX-2 in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for 8 h in the absence or in the presence of different fatty acids (0.5 mM palmitate, 0.5 mM oleate or 0.5 mM palmitate supplemented with 0.3 mM oleate) and the PPAR α antagonist MK886 (10 μ M). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. control cells. # p <0.05, ## p <0.01 and ### p <0.001 vs. palmitate-treated cells.

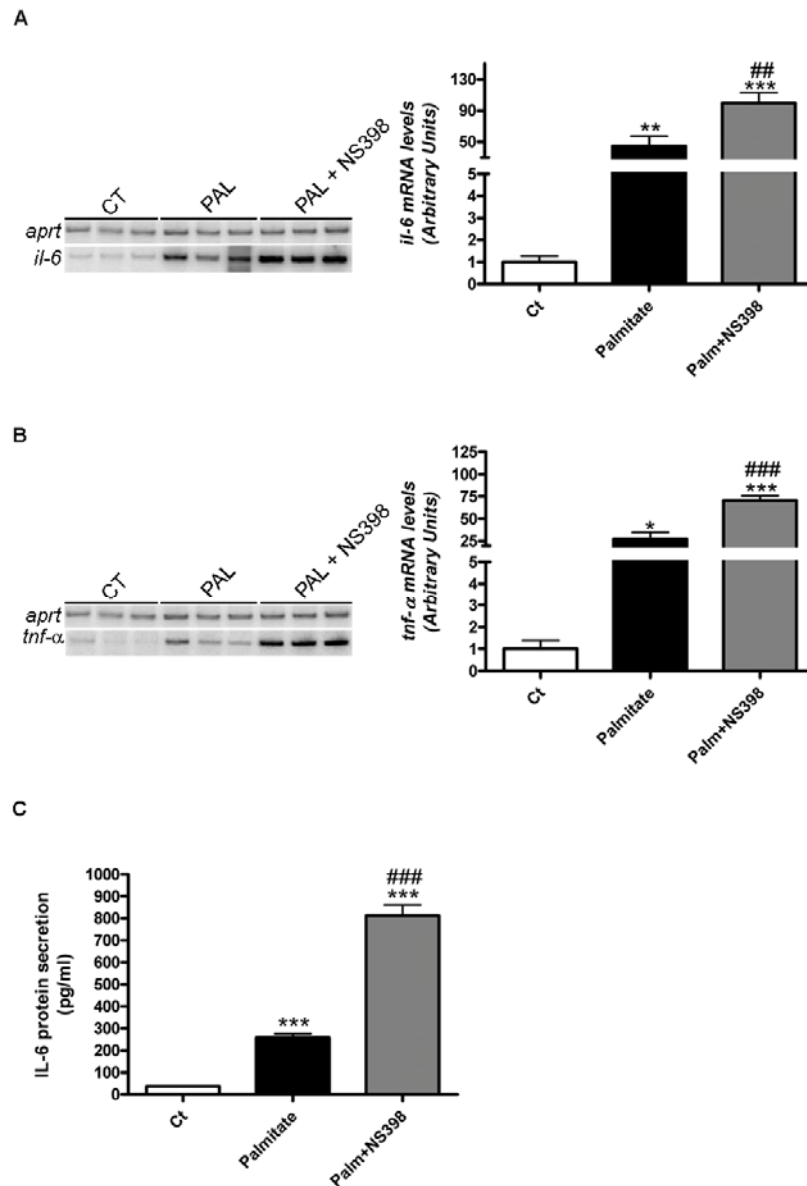


FIG. 6. COX-2 inhibition increases IL-6 and TNF- α mRNA levels in palmitate-exposed skeletal muscle cells. Analysis of the mRNA levels of IL-6 (A) and TNF- α (B) in C2C12 myotubes incubated with 0.5 mM palmitate for 16 h in the absence or in the presence of the specific COX-2 inhibitor NS-398 (10 μ M). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. C, Determination by ELISA of IL-6 secretion to the culture media in C2C12 myotubes. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control cells. ### $p < 0.001$ vs. palmitate-treated cells.

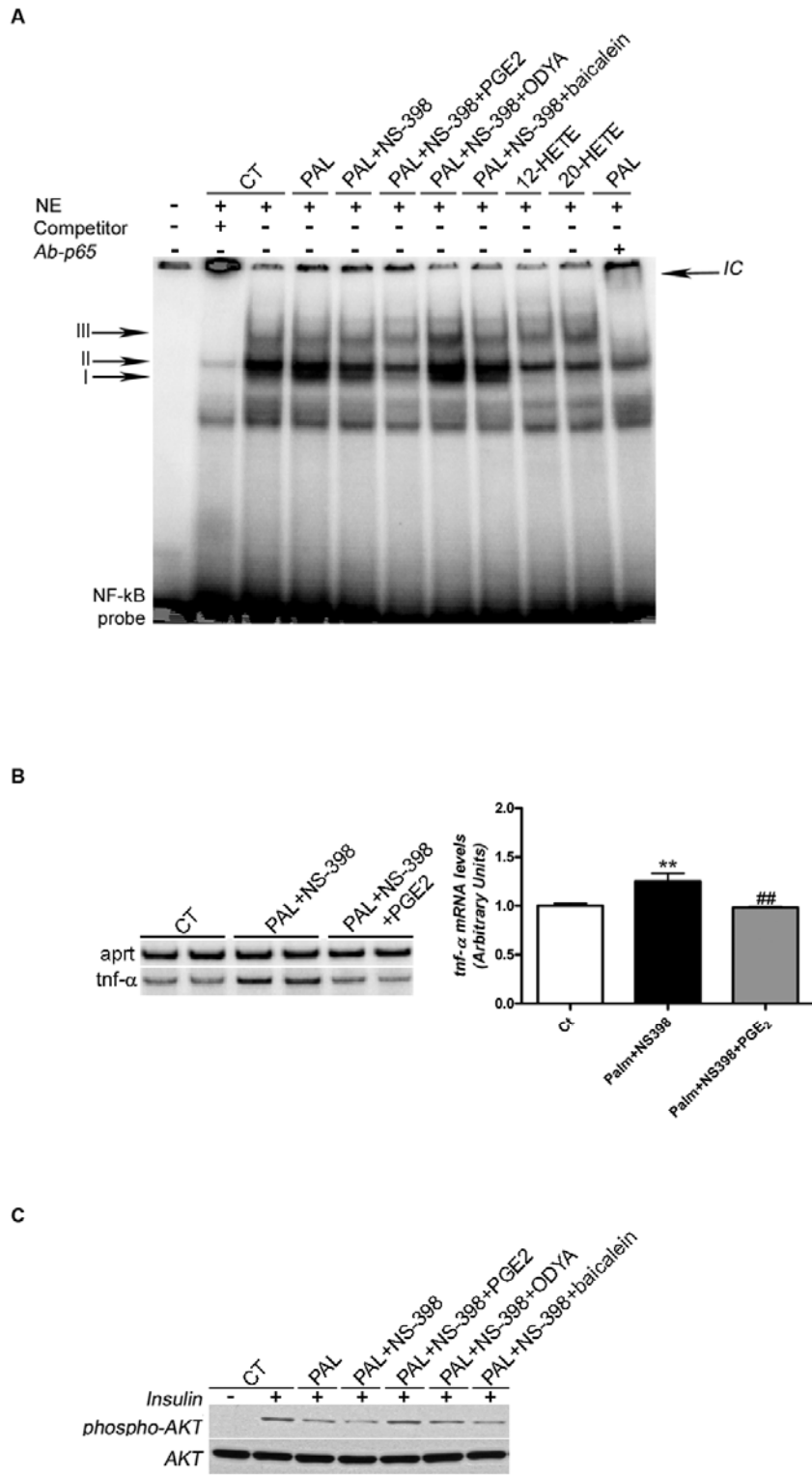


FIG. 7. PGE₂ prevents inflammation and insulin resistance caused by COX-2 inhibition in palmitate-exposed skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16

hours in the presence or absence of 0.5 mM palmitate, NS-398 (10 μ M), PGE₂ (1 μ M), 17-ODYA (20 μ M), baicalein (20 μ M), 12-HETE (1 μ M) or 20-HETE (1 μ M). A, An autoradiograph of EMSA performed with a ³²P-labeled NF- κ B nucleotide and crude nuclear protein extract (NE) is shown. Specific complexes, based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. A supershift analysis performed by incubating NE with an antibody directed against the p65 subunit of NF- κ B is also shown. B, TNF- α mRNA levels. Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the APRT mRNA levels are shown. Data are expressed as means \pm S.D. of six independent experiments. *p<0.05 vs. control cells. #p<0.05 vs. palmitate-treated cells. C, PGE₂ restores insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by COX-2 inhibition. Cell lysates were assayed for Western-blot analysis with antibodies against total and phospho-Akt (Ser473). The blot data are the result of three separate experiments.

PUBLICACIÓ 4

Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ (PPAR δ) by GW501516 Prevents Fatty Acid-Induced NF- κ B Activation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle Cells

*Teresa Coll, David Álvarez-Guardia, Emma Barroso, Anna Maria Gómez-Foix,
Xavier Palomer, Juan C. Laguna i Manuel Vázquez-Carrera*

Els nivells elevats d'AGL s'han relacionat amb un estat de baixa inflamació crònica i amb l'aparició de RI al múscul esquelètic. En aquestes condicions, l'entrada excessiva d'AGL al múscul excedeix la capacitat oxidativa d'aquest, tot provocant una acumulació de lípids en forma de DAG que és capaç d'activar la PKC- θ . Aquesta, al seu torn pot fosforilar cinases que regulen de manera negativa l'acció de la insulina. Per tal d'evitar l'acumulació de DAG intramiocel·lular i millorar la RI induïda per lípids s'ha proposat com a possible estratègia la inducció de la β -oxidació mitocondrial. En aquest sentit, ha estat descrit que un increment dels nivells de CPT-1, el qual regula l'entrada dels AGcL a l'interior del mitocondri per ser oxidats, seria útil per a prevenir l'aparició de RI i inflamació. Actualment PPAR α i PPAR γ són dianes de fàrmacs hipolipemians i antidiabètics respectivament, però de PPAR δ només es coneix que millora el catabolisme lipídic i evita l'aparició d'obesitat. El paper que juga aquest subtipus de PPAR en la inflamació i la RI induïdes per lípids en múscul esquelètic no està ben establert.

Per aquest motiu, l'**objectiu** d'aquest treball ha estat determinar els efectes del GW501516, un agonista PPAR δ , sobre la inflamació i la RI induïdes per l'AG saturat palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques.

Els **resultats** obtinguts evidencien que el palmitat incrementa l'acumulació de DAG intramiocel·lular i l'activació de la PKC- θ , la qual promou la fosforilació de la IRS-1 en posició serina 307 i augmenta l'expressió de la citocina inflamatòria IL-6. El tractament de les cèl·lules amb l'agonista GW501516 aconsegueix evitar la inflamació i la RI induïdes pel palmitat. Aquests efectes semblen ser conseqüència d'una reducció en l'acumulació de DAG en les cèl·lules exposades a palmitat. L'activació de PPAR δ evitaria aquesta acumulació incrementant l'expressió de gens implicats en el

metabolisme dels AG, com la CPT-1 i la PDK-4, i afavorint l'activació/fosforilació de l'AMPK. Com a resultat d'aquests canvis, el GW501516 reduiria la disponibilitat d'AG per formar DAG. A la vegada, la reducció de DAG evitaria l'activació de la via DAG-PKC- θ -NF- κ B i l'increment dels nivells de IL-6.

En resum, podem concloure que l'agonista PPAR δ , GW501516, evita la inflamació i la RI provocades pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques mitjançant l'augment de la β -oxidació mitocondrial.

**Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ (PPAR δ) by
GW501516 Prevents Fatty Acid-Induced NF- κ B Activation and Insulin Resistance
in Skeletal Muscle Cells**

*Teresa Coll¹, David Álvarez-Guardia¹, Emma Barroso¹, Anna Maria Gómez-Foix²,
Xavier Palomer¹, Juan C. Laguna¹, and Manuel Vázquez-Carrera¹.*

*¹Pharmacology Unit, Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry,
Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Institut de Biomedicina de la
Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER de Diabetes y Enfermedades
Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Diagonal 643, E-
08028 Barcelona, Spain, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty
of Biology, University of Barcelona, CIBERDEM-Instituto de Salud Carlos III and
IBUB, Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain*

Running title: PPAR β/δ prevents fatty acid-induced NF- κ B activation

Key words: PPAR β/δ , Palmitate, insulin resistance, DAG, Akt, PKC θ , NF- κ B, IL-6.

Corresponding author: **Manuel Vázquez-Carrera**
Unitat de Farmacologia. Facultat de Farmàcia.

Diagonal 643. E-08028 Barcelona. Spain

Phone 93 4024531

Fax 93 4035982

E-mail: mvazquezcarrera@ub.edu

Objective- Elevated plasma free fatty acids cause insulin resistance in skeletal muscle through the activation of a chronic inflammatory process. This process involves nuclear factor (NF)- κ B activation as a result of diacylglycerol (DAG) accumulation and subsequent Protein Kinase C θ (PKC θ) phosphorylation. At present it is unknown whether Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) δ activation prevents fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells.

Research Design and Methods and Results- In C2C12 skeletal muscle cells, the PPAR δ agonist GW501516 prevented phosphorylation of IRS-1 at Ser³⁰⁷ and the inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation caused by exposure to the saturated fatty acid palmitate. Treatment with the PPAR δ agonist enhanced the expression of two-well known PPAR δ -target genes involved in fatty acid oxidation, carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) and pyruvate dehydrogenase kinase 4, and also the phosphorylation of AMPK. In agreement with these changes, GW501516 treatment reversed the increase in DAG and PKC θ activation caused by exposure to palmitate. These effects were abolished in the presence of the CPT-1 inhibitor etomoxir, thereby indicating that increased fatty acid oxidation was involved in the changes observed. Consistent with these findings, PPAR δ activation by GW501516 blocked palmitate-induced NF- κ B DNA-binding activity. Likewise, drug treatment inhibited the increase in interleukin 6 expression caused by palmitate in C2C12 and human skeletal muscle cells as well as the protein secretion of this cytokine.

Conclusions- These findings indicate that PPAR δ attenuates fatty acid-induced NF- κ B activation and the subsequent development of insulin resistance in skeletal muscle cells by reducing DAG accumulation. Our results point to PPAR δ activation as a pharmacological target to prevent insulin resistance.

Numerous studies have consistently demonstrated that elevated plasma free fatty acids (FFA) cause insulin resistance in diabetic patients and in nondiabetic subjects (1-4). The mechanisms underlying this association are currently unclear, but accumulating evidence points to a link between enhanced FFA levels and activation of a chronic inflammatory process (5). FFA-induced insulin resistance affects mainly skeletal muscle since this tissue accounts for most insulin-stimulated glucose utilization. Once fatty acids are taken up by skeletal muscle cells they are either stored as fatty acid derivatives or undergo β -oxidation in the mitochondria. In the presence of high plasma FFA, fatty acid flux in skeletal muscle cells exceeds its oxidation, thereby leading to the accumulation of fatty acid derivatives, such as diacylglycerol (DAG), which can then activate a number of different serine kinases that negatively regulate insulin action. Thus, DAG is a potent allosteric activator of protein kinase C θ (PKC θ), which is the most abundant PKC isoform in skeletal muscle (6-8). This PKC isoform inhibits the action of insulin by phosphorylating certain serine residues on insulin receptor substrate 1 (IRS1), including Ser³⁰⁷ in the rodent IRS-1 protein (reviewed in ref. (9)). This phosphorylation impairs insulin-receptor signaling through several distinct mechanisms (10). PKC θ also impairs insulin sensitivity by activating another serine kinase, I κ B kinase β (IKK β) (11). In addition to phosphorylating IRS-1 in Ser³⁰⁷, IKK β phosphorylates I κ B, thus activating the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor (NF)- κ B, which has been linked to fatty acid-induced impairment of insulin action in skeletal muscle in rodents (12,13). Once activated, NF- κ B regulates the expression of multiple inflammatory mediators, including interleukin 6 (IL-6). This cytokine correlates strongly with insulin resistance and type 2 diabetes (14-16) and its plasma levels are increased 2-3 fold in patients with obesity and type 2 diabetes compared with lean control subjects (15).

Accumulation of fatty acid derivatives can be attenuated by the mitochondrial β -oxidation process. The rate-limiting step for β -oxidation of long-chain fatty acids is their transport into mitochondria via carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1). The activity of this enzyme is inhibited by malonyl-CoA, the product of acetyl-CoA carboxylase, which, in turn, is inhibited by the AMP-activated protein kinase (AMPK). Interestingly, activation of fatty acid oxidation by over-expressing CPT-1 in cultured skeletal muscle cells (17) and in mouse skeletal muscle (18) improves lipid-induced insulin resistance. These observations indicate that this approach may provide a valid therapeutic strategy to prevent this pathology.

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ (PPAR δ) activation has recently been proposed as a potential treatment for insulin resistance and the metabolic syndrome (19). PPARs are members of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors that control systemic fatty acid metabolism by transcriptional activation of target genes. In addition, PPARs suppress inflammation through diverse mechanisms, such as the reduced release of the inflammatory factors or the stabilization of repressive complexes at inflammatory gene promoters (20). Of the three PPAR isotypes in mammals, PPAR α (NR1C1) (21) and PPAR γ (NR1C3) are the targets for hypolipidemic (fibrates) and anti-diabetic (thiazolidinediones) drugs, respectively. Finally, activation of the third isotype, PPAR δ (NR1C2), by high-affinity ligands (including GW501516) enhances fatty acid catabolism in adipose tissue and skeletal muscle, thereby delaying weight gain (for review see 19). Moreover, transgenic mice that selectively express a constitutive active form of PPAR δ in adipose tissue display a lean phenotype and are protected from high-fat diet-induced and genetically predisposed obesity. In contrast, PPAR δ -deficient mice challenged with a high-fat diet show reduced energy uncoupling and are prone to dramatic weight gain (22). However, no information is available on whether PPAR δ ligands prevent fatty acid-induced

inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. Here we examined the effect of PPAR δ activation by GW501516 on these fatty acid-induced metabolic disorders in skeletal muscle cells. Our results demonstrate that the improvement in insulin sensitivity attained after PPAR δ activation in fatty acid-exposed skeletal muscle cells was associated with the capacity of this ligand to prevent DAG accumulation and the subsequent activation of the pro-inflammatory pathway PKC θ -NF- κ B. In support of this, PPAR δ activation by GW501516 blocked the increase in IL-6 expression and secretion induced by fatty acid exposure. Overall, our findings indicate that PPAR δ is a molecular target to impede lipid induced-inflammation in skeletal muscle cells and the metabolic alterations associated with this process, such as insulin resistance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials. The PPAR β/δ ligand GW501516 was from Biomol Research Labs Inc. (Plymouth Meeting, PA). Other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Cell culture.

Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. When cells reached confluence, the medium was switched to the differentiation medium containing DMEM and 2% horse serum, which was changed every other day. After 4 additional days, the differentiated C2C12 cells had fused into myotubes. Lipid-containing media were prepared by conjugation of palmitic acid with fatty acid-free bovine serum albumin, using a method modified from that described by Chavez et al. (23). Briefly, palmitic acid was dissolved in ethanol and diluted 1:100 in DMEM containing 2% (w/v) fatty-acid-free bovine serum albumin. Myotubes were incubated for 16 h in serum-free DMEM containing 2% fatty acid-free bovine serum albumin (control cells) or palmitate-conjugated bovine serum albumin in either the presence or absence of GW5015161 (with an additional pre-incubation period of 8 h with the drug). Following incubation, RNA or protein were extracted from myotubes as described below. Culture supernatants were collected and the secretion of IL-6 was assessed by ELISA (Invitrogen).

Biopsies, from gastrocnemius and peronæus muscles, were obtained during surgery from four donors with no muscle disease. The biopsies were obtained with the approval of the Ethics Committee of the Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain, and with the informed consent of the subjects concerned. Myoblast cell populations were isolated from the muscle biopsies by the explant culture technique (24) as described in García-Martínez et al. (25). Myoblasts were grown in DMEM/M-199 medium (3:1, v/v), with

10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), 10 µg/ml insulin, 4 mM glutamine, 25 ng/ml fibroblast growth factor and 10 ng/ml epidermal growth factor. Immediately after myoblast fusion, the medium was replaced by DMEM/M-199 devoid of growth factors and glutamine and with 10% FBS. Twenty-four hours before experiments, cells were depleted of insulin and FBS.

Measurements of mRNA. Levels of mRNA were assessed by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described (26). Total RNA was isolated using the Ultraspec reagent (Biotecx, Houston). The total RNA isolated by this method is non-degraded and free of protein and DNA contamination. The sequences of the sense and antisense primers used for amplification were: mouse IL-6, 5'-TCCAGCCAGTTGCCTTCTTGG-3' and 5'-TCTGACAGTGCATCATCGCTG-3'; human IL-6, 5'-AAGATGTAGCCGCCCCACACA-3' and 5'-TCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'; Pdk-4, 5'-AGGTCGAGCTGTTCTCCCGCT-3' and 5'-GCGGTCAGGCAGGATGTCAAT-3'; Cpt-1, 5'-TTCACTGTGACCCCAGACGGG-3' and 5'-AATGGACCAGCCCCATGGAGA-3'; and adenosyl phosphoribosyl transferase (Aprt), 5'-GCCTCTTGGCCAGTCACCTGA-3' and 5'-CCAGGCTCACACACTCCACCA-3'. Amplification of each gene yielded a single band of the expected size (mouse IL-6: 229 bp, human IL-6: 151 bp, Pdk-4: 167 bp, Cpt-1: 222 bp and Aprt: 329 bp). Preliminary experiments were performed with various amounts of cDNA to determine non-saturating conditions of PCR amplification for all the genes studied. Therefore, under these conditions, relative quantification of mRNA was assessed by the RT-PCR method used in this study (27). Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning (Vilbert Lourmat Imaging). The results for the expression of specific mRNAs are presented relative to the expression of the control gene (Aprt).

Isolation of nuclear extracts. Nuclear extracts were isolated as previously described (28). Cells were scraped into 1.5 ml of cold phosphate-buffered saline, pelleted for 10 sec and resuspended in 400 μ l of cold Buffer A (10mM HEPES pH 7.9 at 4°C, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, and 5 μ g/ml aprotinin) by flicking the tube. Cells were allowed to swell on ice for 10 min, and then vortexed for 10 sec. Samples were then centrifuged for 10 sec and the supernatant fraction was discarded. Pellets were resuspended in 50 μ l of cold Buffer C (20mM HEPES-KOH pH 7.9 at 4°C, 25% glycerol, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin and 2 μ g/ml leupeptin) and incubated on ice for 20 min for high-salt extraction. Cellular debris was removed by centrifugation for 2 min at 4°C and the supernatant fraction (containing DNA-binding proteins) was stored at – 80°C. Nuclear extract concentration was determined by the Bradford method.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). EMSA was performed using double-stranded oligonucleotides (Promega, Madison, WI) for the consensus binding site of the NF- κ B nucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') and PPAR (5'-CAAAGTCAAGGTCAAAGGTCA-3'). Oligonucleotides were labeled in the following reaction: 2 μ l of oligonucleotide (1.75 pmol/ μ l), 2 μ l of 5x kinase buffer, 1 μ l of T4 polynucleotide kinase (10 U./ μ l), and 2.5 μ l of [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol at 10 mCi/ml) incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by adding 90 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 and 1 mM EDTA). To separate the labeled probe from the unbound ATP, the reaction mixture was eluted in a Nick column (Amersham) following the manufacturer's instructions. Eight micrograms of crude nuclear protein was incubated for 10 min on ice in binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 5% glycerol, 5 mg/ml BSA and 50 μ g/ml poly(dI-dC)), in a final volume of 15 μ l. Labeled probe (approximately 60,000 cpm) was added and

the reaction was incubated for 15 min at 4°C (NF-κB) or at room temperature (PPRE). Where indicated, specific competitor oligonucleotide was added before the labeled probe and incubated for 10 min on ice. p65 antibody was added 15 min before incubation with the labeled probe at 4°C. Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis at 4°C on a 5% acrylamide gel and subjected to autoradiography.

Measurement of DAG. DAG levels were measured by the DAG kinase method, as described elsewhere (29).

Immunoblotting. To obtain total proteins, C2C12 myotubes were homogenized in cold lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5.4 μg/ml aprotinin). The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured by the Bradford method. Total and nuclear proteins (30 μg) were separated by SDS-PAGE on 10% separation gels and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Western blot analysis was performed using antibodies against total and phospho-PKCθ (Thr⁵³⁸) (Cell Signaling Technology Inc., MA), total (Santa Cruz Biotechnology, CA) and phospho-Akt (Ser⁴⁷³), total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²), total and phospho-IRS1 (Ser³⁰⁷) (Cell Signaling), IκBα (Santa Cruz) and β-actin (Sigma). Detection was achieved using the EZ-ECL chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Beit Haemek Ltd., Israel). The equal loading of proteins was assessed by red phenol staining. The size of proteins detected was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen, Barcelona, Spain).

Statistical Analyses. Results are expressed as means \pm S.D. of 6 separate experiments. Significant differences were established by one-way ANOVA using the GraphPad InStat programme (GraphPad Software V2.03) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). When significant variations were found, the Tukey-Kramer multiple comparisons test was applied. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

PPAR δ activation prevents palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells

We first examined the effects of the PPAR δ agonist GW501516 on palmitate-induced insulin resistance, which was assessed as the increase in the phosphorylation status of IRS-1 on Ser³⁰⁷ and the inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation. As expected, insulin increased the phosphorylation of Akt at Ser⁴⁷³, an effect that was inhibited when cells were exposed to 0.5 mM palmitate for 16 h (Figure 1A). In contrast, in the presence of GW501516 the effect of the saturated fatty acid was attenuated. Skeletal muscle cells exposed to palmitate also showed enhanced phosphorylation of IRS-1 at Ser³⁰⁷, whereas in the presence of GW501516 this effect was blocked (Figure 1B).

PPAR δ activation increases the expression of genes involved in fatty acid oxidation and AMPK phosphorylation

Increased fatty acid oxidation may prevent DAG accumulation and attenuate the consequent fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells (17,18). Under our experimental conditions, we first performed EMSA to examine whether GW501516 increased PPAR δ activity. Incubation of a ³²P-labeled PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) probe and nuclear extracts from C2C12 myotubes rendered two main complexes (I and II) (Figure 2A). Competition studies performed with a molar excess of unlabeled probe revealed that both complexes represented specific PPRE-protein interactions. Cells exposed to palmitate showed a similar pattern of DNA-protein complexes to that observed in control cells, whereas in the presence of palmitate plus GW501516 the PPAR DNA-binding activity of complex I

was increased. Next, we evaluated the expression of two well-known PPAR δ -target genes (30) involved in fatty acid oxidation, *Cpt-1*, which catalyzes the rate-limiting step in mitochondrial fatty acid oxidation, and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk-4*), a key enzyme that mediates the shift from glycolytic to fatty acid oxidative metabolism. Exposure to palmitate caused a slight increase in *Cpt-1* mRNA levels compared to control cells, although it did not reach statistical significance (Figure 2B). In contrast, GW501516 increased *Cpt-1* (2.4-fold increase, $p < 0.05$ vs control cells) and *Pdk-4* (3.3-fold increase vs control and palmitate-exposed cells) mRNA levels (Figures 2B and C). These findings are consistent with previous studies reporting that PPAR δ activation by GW501516 increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells (30-33) through a transcriptional mechanism. In addition, AMPK phosphorylation was increased by GW501516 (Figure 2D), as reported in previous studies (33,34).

PPAR δ activation prevents DAG accumulation and PKC θ phosphorylation in palmitate-exposed skeletal muscle cells

Since DAG accumulation in skeletal muscle cells exposed to palmitate is the first step leading to palmitate-induced insulin resistance and inflammation, we next assessed the capacity of GW501516 to prevent DAG accumulation. In agreement with previous studies (23,35), skeletal muscle cells exposed to palmitate showed enhanced DAG levels compared to control cells (Figure 3A). When palmitate-exposed cells were treated with the PPAR δ specific agonist DAG levels decreased. The mechanism by which GW501516 prevented DAG accumulation appears to involve increased fatty acid oxidation since in the presence of etomoxir, an irreversible inhibitor of *Cpt-1*, the effect of this PPAR δ agonist was blunted. Consistent with the changes in the levels of DAG, exposure to palmitate increased the phosphorylated levels of PKC θ , in contrast to cells exposed to BSA (Figure 3B), and GW501516 treatment prevented the increase in

PKC θ phosphorylation. Co-incubation of palmitate-exposed cells with GW501516 and etomoxir reversed the effect of the former on the phosphorylation levels of PKC θ .

PPAR δ activation prevents NF- κ B activation and IL-6 expression and secretion in palmitate-exposed skeletal muscle cells

PKC θ has the unique ability among PKC isoforms to activate the pro-inflammatory nuclear factor NF- κ B (6). PKC θ phosphorylation leads to the activation of IKK β , which in turn phosphorylates and degrades I κ B α , thus releasing and activating NF- κ B. Exposure to palmitate caused a decrease in I κ B α protein levels, an effect that was blocked by GW501516 treatment (Figure 4A). To demonstrate that GW501516 prevented palmitate-induced NF- κ B activation, we carried out EMSA. The NF- κ B probe formed two main complexes when incubated with nuclear extracts (Figure 4B). The specificity of the DNA-binding complexes was assessed in competition experiments by adding an excess of unlabeled NF- κ B oligonucleotide. Cells exposed to palmitate showed enhanced NF- κ B DNA-binding activity, whereas cells exposed to palmitate and treated with GW501516 showed a remarkable reduction in the binding. Addition of antibody against the p65 subunit of NF- κ B caused a supershift in the complex, thereby indicating that this band consisted mainly of this subunit.

NF- κ B activation in skeletal muscle cells in response to palmitate leads to enhanced expression and secretion of several of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, that contribute to the development of insulin resistance (36,37). We then assessed whether GW501516 prevented palmitate-induced IL-6 expression and secretion. Palmitate strongly induced IL-6 mRNA levels, whereas in the presence of GW501516 a significant reduction in the transcript levels of this cytokine was observed (Figure 5A). Again, in the presence of etomoxir the effect of GW501516 was abolished, thereby

indicating that the PPAR δ agonist acts through an increase in fatty acid oxidation. In support of the changes observed in IL-6 expression, the secretion of this cytokine to the culture media was strongly increased by palmitate treatment and this effect was abolished by GW501516 treatment. Finally, we explored whether GW501516 prevented palmitate-mediated NF- κ B activation in human myotubes by measuring IL-6 mRNA levels. Palmitate significantly increased IL-6 mRNA levels, whereas GW501516 blocked the up-regulation of the expression of this cytokine (Figure 5C).

DISCUSSION

Insulin resistance in skeletal muscle correlates more strongly with intramuscular lipid levels than with any other factor, including BMI or percentage body fat (38,39). Several lines of evidence indicate that activation of PPAR δ enhances insulin sensitivity (22,30,34,40-42). However, the mechanisms behind these effects remain to be elucidated. Here, we examined the effects of the specific PPAR δ agonist GW501516, a selective ligand for PPAR δ with a 1000-fold higher affinity toward PPAR δ than the other PPAR isotypes (41), on fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. Our findings demonstrate that PPAR δ activation by GW501516 prevents palmitate-induced DAG accumulation in these cells. Our data implicate increased CPT-1 activity in this effect, since DAG levels were restored in the presence of the CPT-1 inhibitor etomoxir. As a result of the increased mitochondrial oxidation of fatty acids induced by GW501516 treatment, their availability to be accumulated in the form of DAG would be reduced. In fact, over-expression of CPT-1 in cultured skeletal muscle cells (17) and in mouse skeletal muscle (18) affords protection against lipid-induced DAG accumulation, PKC θ activation, IRS-1 phosphorylation (Ser³⁰⁷) and the inhibition of insulin-stimulated Akt phosphorylation. Therefore, our findings confirm the key role of CPT-1 in the prevention of fatty acid-induced insulin resistance and support the use of GW501516 as a pharmacological tool to prevent DAG accumulation and reduce the metabolic alterations derived from this process.

The reduction in intracellular DAG accumulation after GW501516 treatment involves two mechanisms that lead to increased fatty acid oxidation. First, PPAR δ activation following GW501516 treatment results in a transcriptional-mediated increase in the expression of several genes involved in fatty acid oxidation, such as CPT-1 and PDK-4. This observation is consistent with several studies that reported that GW501516

treatment increases the expression of the PPAR δ -target gene *Cpt-1* in skeletal muscle cells, which then leads to increased palmitate oxidation (30-33,43). Similarly, expression of an activated form of PPAR δ in C2C12 skeletal muscle cells enhances fatty acid β -oxidation (22). Interestingly, two studies have demonstrated that the increase in CPT-1 expression and the concomitant increase in fatty acid oxidation are also observed in human skeletal muscle (44,45). Second, GW501516 also increased AMPK phosphorylation/activation, a mechanism that might also favor palmitate oxidation. This kinase is a metabolic sensor that detects low ATP levels and in turn increases oxidative metabolism (46), by reducing the levels of malonyl-CoA, which inhibits CPT-1 activity. AMPK activation after GW501516 treatment in skeletal muscle cells has been reported to be associated with the increase in the AMP:ATP ratio following drug treatment and is independent of PPAR δ activation (33). Krämer et al. (33) demonstrated that the increase in fatty acid oxidation in human skeletal muscle cells following GW501516 treatment relies on both mechanisms, although some authors did not report AMPK activation after treatment with this drug (32).

Intramuscular lipid accumulation may lead to inflammation, which is linked to the development of type 2 diabetes (5). The key point in the activation of the pro-inflammatory pathway appears to be the accumulation of DAG. Accumulation of this lipid mediator allows the activation of PKC θ , which could lead to insulin resistance by phosphorylating IRS-1 (Ser³⁰⁷) or by activating the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B. Consistent with the reduction in DAG, GW501516 prevented the increase in PKC θ activation in palmitate-exposed cells. The observation that PKC θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance (47) demonstrates the participation of this kinase in the development of this pathology. GW501516 also blocked the palmitate-induced reduction in I κ B α protein levels caused by palmitate and the

consequent increase in NF- κ B DNA-binding activity and IL-6 expression and secretion. This effect may be related to the decrease in DAG accumulation and the subsequent inhibition of PKC θ . However, we cannot rule out additional mechanisms. Thus, we (48) and others (49) have previously proposed that PPAR δ activation inhibits NF- κ B activation in cardiac cells by either promoting a protein-protein interaction between PPAR δ and the p65 subunit of NF- κ B or by increasing the expression of the NF- κ B inhibitor I κ B α .

On the basis of the finding that GW501516 treatment prevented palmitate-induced IL-6 expression in human skeletal muscle cells, we propose that this drug may also prevent fatty acid-induced NF- κ B activation in humans. Since it has been reported that GW501516 increases CPT-1 expression and palmitate oxidation in human skeletal muscle (44,45), this is consistent with the role of increased CPT-1 expression in the prevention of DAG accumulation and NF- κ B activation.

In summary, on the basis of our findings we propose that the PPAR δ activator GW501516 prevents fatty acid-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells by preventing DAG accumulation, thereby impeding PKC θ activation and the subsequent activation of NF- κ B and the production of pro-inflammatory cytokines involved in the development of insulin resistance. These effects of GW501516 may provide a potential therapeutic strategy to prevent lipid-induced insulin resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS- We thank Anna Orozco for experimental assistance in human myotubes cultures. This study was partly supported by funds from the Swiss National Science Foundation, the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-01475 and SAF2009-06939), European Union ERDF funds and the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids. T.C. (Formación de Personal Investigador) was supported by a grant from the Spanish Government. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) is an ISCIII project. We thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

References

1. Boden,G, Jadali,F, White,J, Liang,Y, Mozzoli,M, Chen,X, Coleman,E, Smith,C: Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 88:960-966, 1991
2. Boden,G, Chen,X: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 96:1261-1268, 1995
3. Boden,G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997
4. Roden,M, Price,TB, Perseghin,G, Petersen,KF, Rothman,DL, Cline,GW, Shulman,GI: Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865, 1996
5. Wellen,KE, Hotamisligil,GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119, 2005
6. Griffin,ME, Marcucci,MJ, Cline,GW, Bell,K, Barucci,N, Lee,D, Goodyear,LJ, Kraegen,EW, White,MF, Shulman,GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999
7. Cortright,RN, Azevedo,JL, Zhou,Q, Sinha,M, Pories,WJ, Itani,SI, Dohm,GL: Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 278:E553-E562, 2000

8. Itani,SI, Zhou,Q, Pories,WJ, MacDonald,KG, Dohm,GL: Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 49:1353-1358, 2000
9. Gual,P, Le Marchand-Brustel,Y, Tanti,JF: Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109, 2005
10. Hotamisligil,GS, Peraldi,P, Budavari,A, Ellis,R, White,MF, Spiegelman,BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668, 1996
11. Perseghin,G, Petersen,K, Shulman,GI: Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S6-11, 2003
12. Kim,JK, Kim,YJ, Fillmore,JJ, Chen,Y, Moore,I, Lee,JS, Yuan,MS, Li,ZW, Karin,M, Perret,P, Shoelson,SE, Shulman,GI: Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *Journal of Clinical Investigation* 108:437-446, 2001
13. Yuan,MS, Konstantopoulos,N, Lee,JS, Hansen,L, Li,ZW, Karin,M, Shoelson,SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta. *Science* 293:1673-1677, 2001
14. Pickup,JC, Mattock,MB, Chusney,GD, Burt,D: NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-1292, 1997

-
15. Kern,PA, Ranganathan,S, Li,C, Wood,L, Ranganathan,G: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-E751, 2001
 16. Pradhan,AD, Manson,JE, Rifai,N, Buring,JE, Ridker,PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334, 2001
 17. Sebastian,D, Herrero,L, Serra,D, Asins,G, Hegardt,FG: CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E677-E686, 2007
 18. Bruce,CR, Hoy,AJ, Turner,N, Watt,MJ, Allen,TL, Carpenter,K, Cooney,GJ, Febbraio,MA, Kraegen,EW: Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58:550-558, 2009
 19. Barish,GD, Narkar,VA, Evans,RM: PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116:590-597, 2006
 20. Daynes,RA, Jones,DC: Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2:748-759, 2002
 21. Auwerx,J, Baulieu,E, Beato,M, Becker-Andre,M, Burbach,PH, Camerino,G, Chambon,P, Cooney,A, Dejean,A, Dreyer,C, Evans,RM, Gannon,F, Giguere,V, Gronemeyer,H, Gustafson,JA, Laudet,V, Lazar,MA, Mangelsdorf,DJ, Milbrandt,J, Milgrom,E, Moore,DD, O'Malley,B, Parker,M, Parker,K, Perlmann,T, Pfahl,M, Rosenfeld,MG, Samuels,H, Schutz,G, Sladek,FM, Stunnenberg,HG, Spedding,M,

-
- Thummel,C, Tsai,MJ, Umesono,K, Vennstrom,B, Wahli,W, Weinberger,C, Willson,TM, Yamamoto,K: A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161-163, 1999
22. Wang,YX, Lee,CH, Tjep,S, Yu,RT, Ham,J, Kang,H, Evans,RM: Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-170, 2003
23. Chavez,JA, Summers,SA: Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419:101-109, 2003
24. Askanas,V, Gallez-Hawkins,G: Synergistic influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle. *Arch Neurol* 42:749-752, 1985
25. Garcia-Martinez,C, Marotta,M, Moore-Carrasco,R, Guitart,M, Camps,M, Busquets,S, Montell,E, Gomez-Foix,AM: Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1264-C1272, 2005
26. Rodriguez-Calvo,R, Serrano,L, Coll,T, Moullan,N, Sanchez,RM, Merlos,M, Palomer,X, Laguna,JC, Michalik,L, Wahli,W, Vazquez-Carrera,M: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes* 57:2149-2157, 2008
27. Freeman,WM, Walker,SJ, Vrana,KE: Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-+, 1999

-
28. Coll,T, Jove,M, Rodriguez-Calvo,R, Eyre,E, Palomer,X, Sanchez,RM, Merlos,M, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55:2779-2787, 2006
 29. Jove,M, Planavila,A, Sanchez,RM, Merlos,M, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation. *Endocrinology* 147:552-561, 2006
 30. Tanaka,T, Yamamoto,J, Iwasaki,S, Asaba,H, Hamura,H, Ikeda,Y, Watanabe,M, Magoori,K, Ioka,RX, Tachibana,K, Watanabe,Y, Uchiyama,Y, Sumi,K, Iguchi,H, Ito,S, Doi,T, Hamakubo,T, Naito,M, Auwerx,J, Yanagisawa,M, Kodama,T, Sakai,J: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15924-15929, 2003
 31. Dressel,U, Allen,TL, Pippal,JB, Rohde,PR, Lau,P, Muscat,GE: The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 17:2477-2493, 2003
 32. Dimopoulos,N, Watson,M, Green,C, Hundal,HS: The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett* 581:4743-4748, 2007

-
33. Kramer,DK, Al-Khalili,L, Guigas,B, Leng,Y, Garcia-Roves,PM, Krook,A: Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 282:19313-19320, 2007
 34. Kramer,DK, Al-Khalili,L, Perrini,S, Skogsberg,J, Wretenberg,P, Kannisto,K, Wallberg-Henriksson,H, Ehrenborg,E, Zierath,JR, Krook,A: Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Diabetes* 54:1157-1163, 2005
 35. Coll,T, Eyre,E, Rodriguez-Calvo,R, Palomer,X, Sanchez,RM, Merlos,M, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283:11107-11116, 2008
 36. Weigert,C, Brodbeck,K, Staiger,H, Kausch,C, Machicao,F, Haring,HU, Schleicher,ED: Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappa B. *Journal of Biological Chemistry* 279:23942-23952, 2004
 37. Jove,M, Planavila,A, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 146:3087-3095, 2005
 38. Brady,PS, Park,EA, Liu,JS, Hanson,RW, Brady,LJ: Isolation and characterization of the promoter for the gene coding for the 68 kDa carnitine palmitoyltransferase from the rat. *Biochem J* 286 (Pt 3):779-783, 1992

-
39. Jacob,S, Machann,J, Rett,K, Brechtel,K, Volk,A, Renn,W, Maerker,E, Matthaei,S, Schick,F, Claussen,CD, Haring,HU: Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48:1113-1119, 1999

 40. Leibowitz,MD, Fievet,C, Hennuyer,N, Peinado-Onsurbe,J, Duez,H, Bergera,J, Cullinan,CA, Sparrow,CP, Baffic,J, Berger,GD, Santini,C, Marquis,RW, Tolman,RL, Smith,RG, Moller,DE, Auwerx,J: Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 473:333-336, 2000

 41. Oliver,WR, Jr., Shenk,JL, Snaith,MR, Russell,CS, Plunket,KD, Bodkin,NL, Lewis,MC, Winegar,DA, Sznaidman,ML, Lambert,MH, Xu,HE, Sternbach,DD, Kliewer,SA, Hansen,BC, Willson,TM: A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5306-5311, 2001

 42. Fritz,T, Kramer,DK, Karlsson,HK, Galuska,D, Engfeldt,P, Zierath,JR, Krook,A: Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 22:492-498, 2006

 43. Hondares,E, Mora,O, Yubero,P, Rodriguez de la,CM, Iglesias,R, Giral,M, Villarroya,F: Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147:2829-2838, 2006

-
44. Riserus,U, Sprecher,D, Johnson,T, Olson,E, Hirschberg,S, Liu,A, Fang,Z, Hegde,P, Richards,D, Sarov-Blat,L, Strum,JC, Basu,S, Cheeseman,J, Fielding,BA, Humphreys,SM, Danoff,T, Moore,NR, Murgatroyd,P, O'Rahilly,S, Sutton,P, Willson,T, Hassall,D, Frayn,KN, Karpe,F: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* 57:332-339, 2008
 45. Sprecher,DL, Massien,C, Pearce,G, Billin,AN, Perlstein,I, Willson,TM, Hassall,DG, Ancellin,N, Patterson,SD, Lobe,DC, Johnson,TG: Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:359-365, 2007
 46. Reznick,RM, Shulman,GI: The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* 574:33-39, 2006
 47. Kim,JK, Fillmore,JJ, Sunshine,MJ, Albrecht,B, Higashimori,T, Kim,DW, Liu,ZX, Soos,TJ, Cline,GW, O'Brien,WR, Littman,DR, Shulman,GI: PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114:823-827, 2004
 48. Planavila,A, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Nuclear factor- κ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 280:17464-17471, 2005

49. Ding,G, Cheng,L, Qin,Q, Frontin,S, Yang,Q: PPARdelta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 40:821-828, 2006

FIGURES

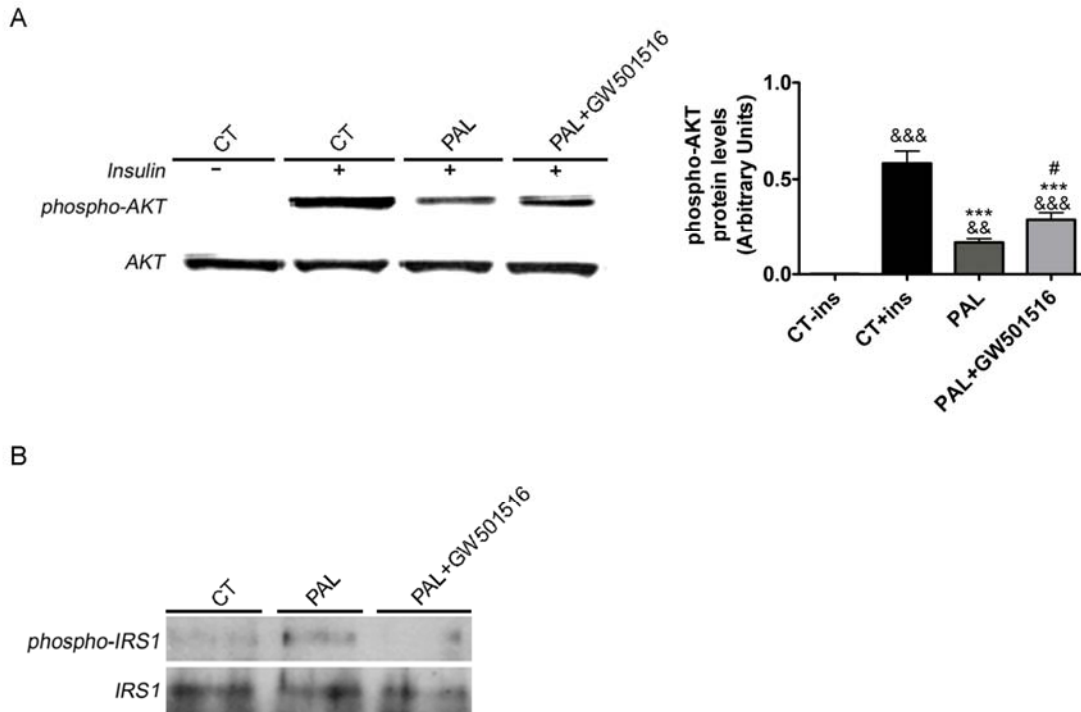
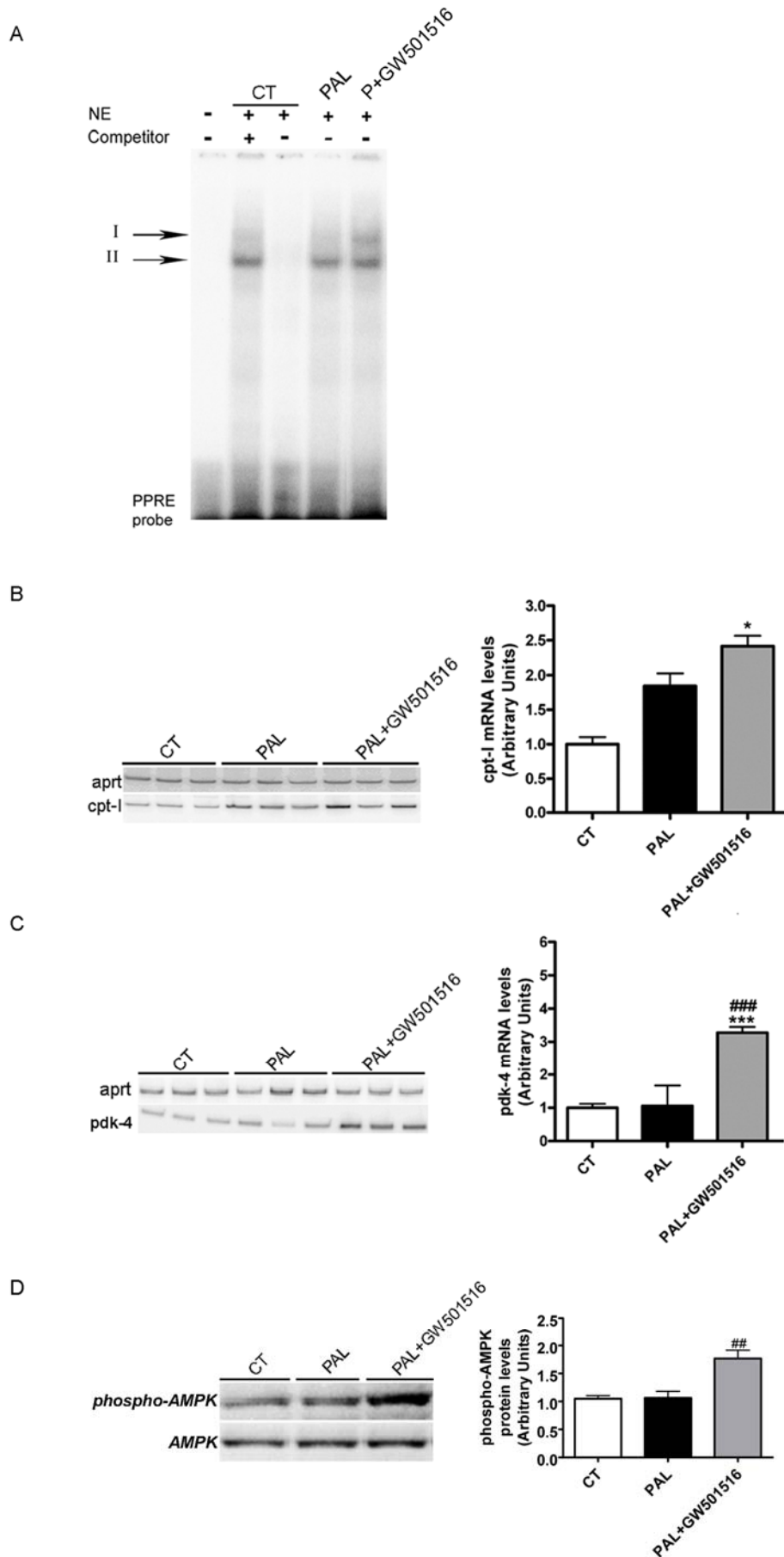


FIG. 1. The PPAR δ agonist GW501516 prevents palmitate-induced impairment of the insulin-signaling pathway in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of 0.5 mM palmitate and 5 μ M GW501516. When indicated cells were treated with 100 nM insulin for 10 min. Cell lysates were assayed for Western-blot analysis with antibodies against (A) total and phospho-Akt (Ser⁴⁷³) and (B) total and phospho-IRS1 (Ser³⁰⁷). The blot data are representative of three separate experiments. CT: control cells. PAL: Palmitate-exposed cells. &&&p<0.001, &&p<0.01 vs control cells notexposed to insulin; ***p<0.001 vs. control cells exposed to insulin; #p<0.05 vs palmitate-exposed cells.



E

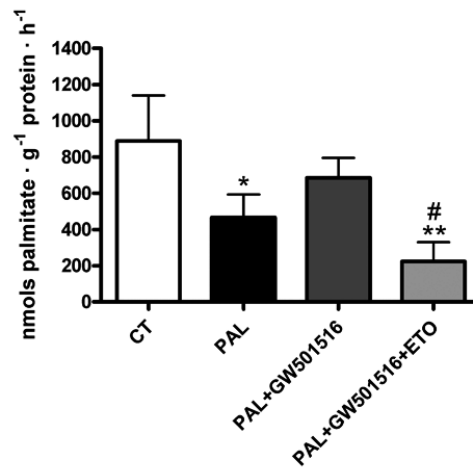


FIG. 2. The PPAR δ agonist GW501516 increases the expression of genes involved in fatty acid metabolism and AMPK phosphorylation. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of 0.5 mM palmitate and 5 μ M GW501516. A, Autoradiograph of EMSA performed with a 32 P-labeled PPRE nucleotide and nuclear extracts (NE) from C2C12 myotubes incubated for 16 h in the presence or in the absence of 0.5 mM palmitate and 5 μ M GW501516. Two specific complexes (I to II), based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. The autoradiograph data are the result of three separate experiments. Analysis of the mRNA levels of *Cpt-1* (B) and *Pdk-4* (C). Total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram and the quantification normalized to the *Aprt* mRNA levels are shown. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 experiments. * $P < 0.05$ vs. control cells, *** $P < 0.001$ vs. control cells and #### $P < 0.001$ vs. palmitate-exposed cells. D, Protein levels of AMPK. Protein extracts from C2C12 myotubes were assayed for Western-blot analysis with total and phospho-AMPK (Thr¹⁷²) antibodies. The blot data are representative of three separate experiments. E, Effect of palmitate and GW501516 on fatty acid oxidation, measured as the production of 14 CO₂ in the incubation medium. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control cells, and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Palmitate exposed cells. CT: control cells. PAL: Palmitate-exposed cells.

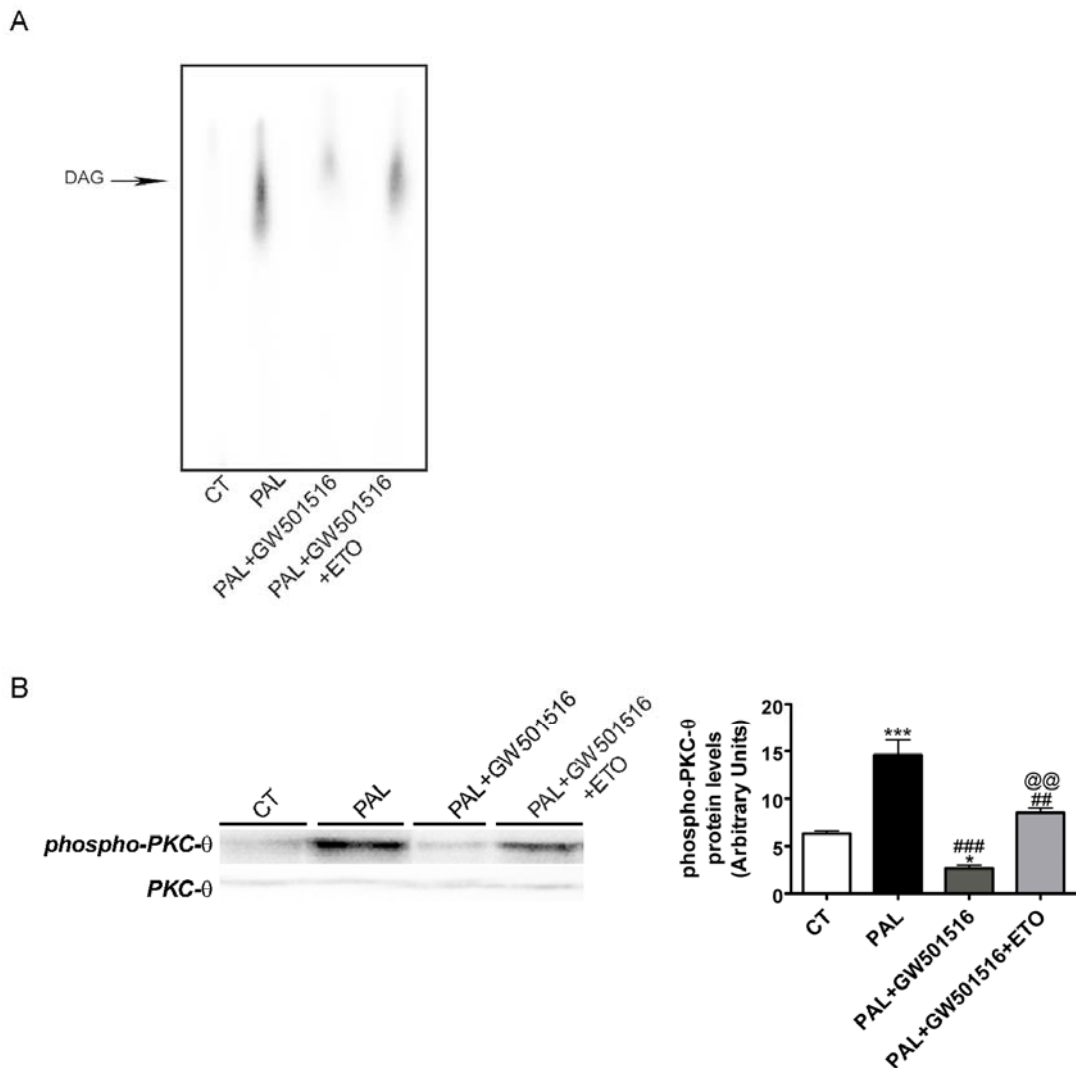


FIG. 3. The PPAR δ agonist GW501516 prevents palmitate-induced DAG accumulation and PKC θ phosphorylation in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of 0.5 mM palmitate and 5 μ M GW501516. When indicated, cells were treated with 40 μ M etomoxir. A, Measurement of DAG levels. Lipid extracts were prepared and assayed for DAG as detailed under "Materials and Methods". B, Analysis of PKC θ levels. Total membrane protein extracts from C2C12 myotubes incubated in the presence or absence of fatty acids for 16 h were assayed for Western-blot analysis with specific antibodies against total and phospho-PKC θ (Thr⁵³⁸). The blot data are representative of three separate experiments. CT: Control, PAL: Palmitate, DAG: Diacylglycerol.

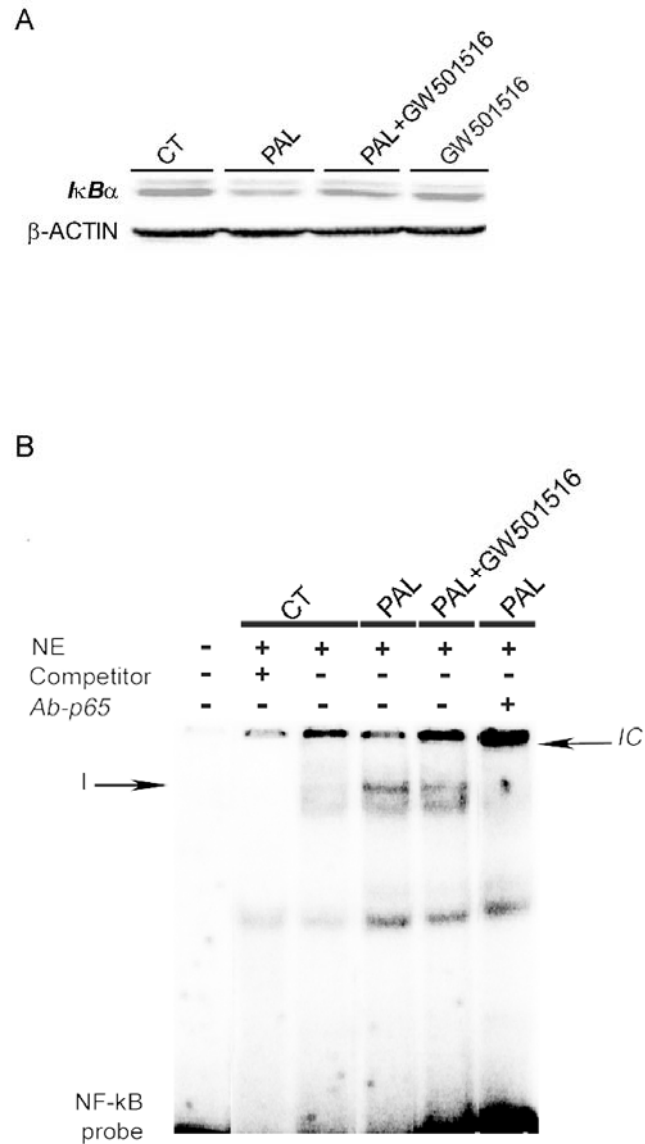


FIG. 4. The PPAR δ agonist GW501516 prevents palmitate-induced NF- κ B activity in skeletal muscle cells. A, Protein levels of I κ B α . Protein extracts from C2C12 myotubes were assayed for Western-blot analysis with I κ B α and β -actin antibodies. B, Autoradiograph of EMSA performed with a 32 P-labeled NF- κ B nucleotide and nuclear protein extracts (NE). Two specific complexes, based on competition with a molar excess of unlabeled probe, are shown. A supershift analysis performed by incubating NE with an antibody directed against the p65 subunit of NF- κ B is also shown.

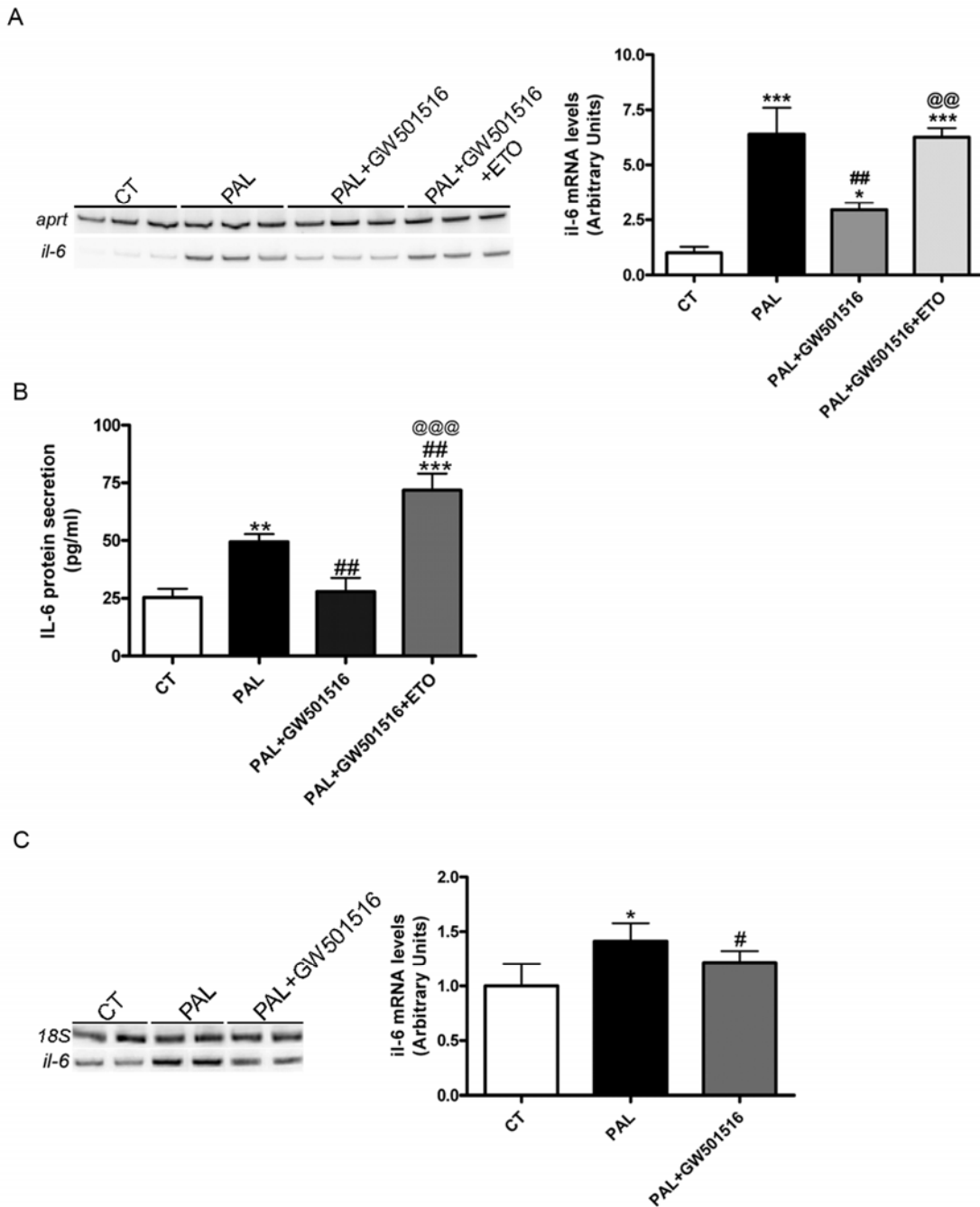


FIG. 5. The PPAR δ agonist GW501516 prevents palmitate-induced IL-6 expression and secretion in skeletal muscle cells. C2C12 myotubes and human myotubes were incubated for 16 h in the presence or absence of 0.5 mM palmitate and 5 μ M GW501516. When indicated, cells were treated with 40 μ M etomoxir. Analysis of the mRNA levels of IL-6 in C2C12 (A) and human (C) myotubes. 0.5 μ g of total RNA was analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram normalized to the APRT mRNA

levels is shown. B, Determination by ELISA of IL-6 secretion to the culture media in C2C12 myotubes. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control cells; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. palmitate-exposed cells; @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$ vs palmitate-exposed cells incubated with GW501516.

DISCUSSIÓ GLOBAL



Nombrosos estudis corroboren l'existència d'una relació entre l'excés d'acumulació lipídica en el múscul esquelètic i l'aparició de RI (Goodpaster i Kelley, 1998; Hulver i col., 2003). L'aparició de RI s'atribueix a una elevada disponibilitat d'AGL per part del múscul, probablement associat a una reducció de la capacitat oxidativa d'aquest i per tant la progressiva acumulació de lípids intramiocel·lulars, entre ells els TG i altres metabolits dels AG com les ceramides i el DAG (Adams i col., 2004; Itani i col., 2002). A més dels efectes que produeixen sobre la via de senyalització de la insulina, l'increment dels AG també s'ha relacionat amb un estat d'inflamació crònica de baixa intensitat que contribueix a l'aparició de RI i DM2 (Franckhauser i col., 2008; Wellen i col., 2005). De fet, la inhibició de la producció de mediadors inflamatoris com el TNF- α en models murins d'obesitat milloren la sensibilitat a la insulina (Uysal i col., 1997), fet que evidencia la relació entre la DM2 i la inflamació.

Model in vitro de RI i inflamació: cèl·lules musculars esquelètiques exposades a l'AG saturat palmitat

D'entre tots els AGL, un dels que s'ha relacionat més estretament amb l'aparició d'inflamació i RI és l'AG saturat palmitat (Weigert i col., 2004; Riccardi i col., 2004). L'exposició de les cèl·lules musculars C2C12 a l'AG palmitat va provocar un augment de l'expressió i la secreció de la citocina inflamatòria IL-6 a partir de les 8 hores de tractament, i de l'expressió de TNF- α , a partir de les 16 hores. Aquest procés inflamatori s'inicia amb l'acumulació del mediador lipídic DAG, el qual activa la PKC- θ i

aquesta, al seu torn, incrementa l'activitat del factor proinflamatori NF- κ B i la conseqüent expressió de IL-6. Així mateix, l'acumulació de DAG i la posterior activació de PKC- θ i IKK- β també provoca la fosforilació de la IRS-1 en posició Ser 307, la qual contribueix al desenvolupament de la RI (Figura 19).

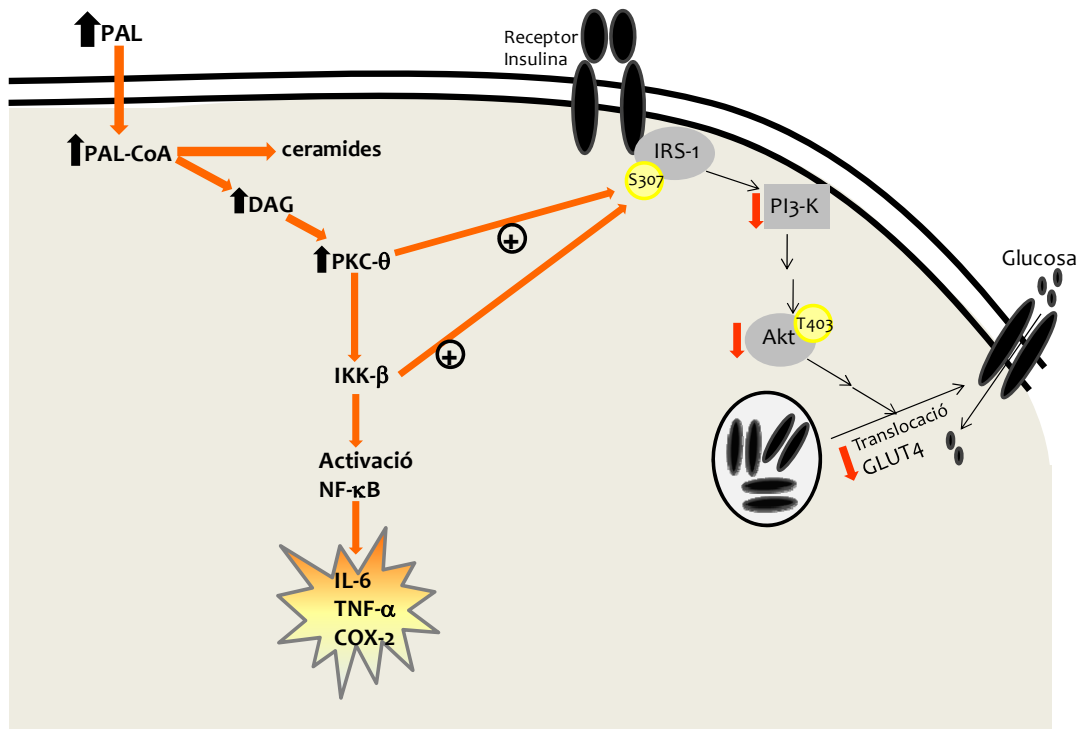


Figura 19. Activació de la via DAG-PKC- θ -NF- κ B per palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques. El palmitat, un cop a l'interior de la cèl·lula, pot provocar l'acumulació de DAG i l'activació de la PKC- θ . Aquesta última és responsable de l'augment de l'expressió de gens relacionats amb el procés inflamatori i l'atenuació de la via de senyalització de la insulina.

La implicació d'aquesta via en el desenvolupament de RI induïda per lípids en el múscul esquelètic ha estat confirmada per estudis que han demostrat que ratolins PKC- $\theta^{-/-}$ estan protegits de la RI induïda per lípids (Kim i col., 2004a). Tanmateix, Itani i col. (2002) han demostrat la implicació de la via DAG-PKC- θ -NF- κ B en el

desenvolupament de RI induïda per lípids en humans. Tot i que el palmitat també promou l'acumulació de ceramides en les cèl·lules musculars, el paper que juga aquest metabolit en el desenvolupament de la RI i la inflamació és, encara avui, motiu de controvèrsia. D'una banda, hi ha autors que afirmen que l'acumulació de ceramides, tant intracel·lularment (Summers, 2006; Holland i Summers, 2008; Strackowski i col., 2007) com en plasma (Haus i col., 2009) provoca l'aparició de RI, ja que aquestes tenen la capacitat d'inhibir la fosforilació de l'Akt. D'altra banda, estudis realitzats en humans descriuen que aquests metabolits lipídics no són un factor clau en el desenvolupament d'aquesta patologia (Skovbro i col., 2008), i treballs previs realitzats pel nostre grup tampoc havien trobat cap relació entre l'acumulació de ceramides i la inflamació mediada pel palmitat en el nostre model (Jové i col., 2005a). En resum, la inflamació i les alteracions en la via de senyalització de la insulina que observàvem en els nostres experiments semblaven ser conseqüència de l'acumulació de DAG i no pas de les ceramides.

No obstant, el palmitat no només és capaç d'activar el factor proinflamatori NF- κ B a través de l'acumulació de DAG intracel·lular, sinó que també ho pot fer mitjançant la seva unió al receptor TLR-2/4 (Shi i col., 2006), receptors que últimament també s'han relacionat amb la RI i la inflamació induïdes per AG en múscul esquelètic.

Aquest model *in vitro* de RI l'hem utilitzat en aquesta Tesi Doctoral per a desenvolupar quatre estudis que ens permetessin aprofundir en el coneixement de la via inflamatòria i la RI induïdes per l'AG saturat palmitat, així com també en les possibilitats d'inhibir aquests processos.

I. L'AG saturat palmitat disminueix els nivells d'expressió de PGC-1 α mitjançant l'activació de la via ERK-MAPK-NF- κ B

Un dels factors que podria estar relacionat amb l'aparició de la inflamació i la RI com a conseqüència de l'acumulació de lípids intracel·lulars és el coactivador PGC-1 α , ja que està implicat en la biogènesi mitocondrial i és capaç de regular gens relacionats amb el metabolisme lipídic (Wu i col., 1999). Estudis previs havien descrit una disminució de l'expressió de PGC-1 α en el múscul esquelètic de pacients diabètics de tipus 2 (Patti i col., 2003), així com també en múscul de ratolins alimentats amb una dieta grassa (Sparks i col., 2005). D'acord amb aquestes observacions, treballs realitzats pel nostre grup en cèl·lules musculars C2C12 tractades amb palmitat també mostraven una disminució de l'expressió del gen PGC-1 (Jové i col., 2004). A més, s'havia descrit que l'acumulació de lípids intracel·lulars en rates Zucker obeses es correlacionava negativament amb PGC-1 α , suggerint que els lípids podien regular l'expressió d'aquest gen (Benton i col., 2006b). Malgrat tots aquests estudis, es desconeixia quins mecanismes estaven implicats en aquesta reducció de PGC-1 α causada per lípids. Al seu torn, la disminució de l'expressió de PGC-1 α també s'havia descrit que podia reduir l'expressió de gens mitocondrials i el consum d'oxigen en miotubs C2C12 (Crunkhorn i col., 2007), de manera que l'acumulació lipídica afectaria PGC-1 α i això podria afavorir de manera indirecta l'aparició d'alteracions com la RI o la inflamació. En concordància amb aquests estudis, els resultats que vam obtenir després de tractar els miotubs amb palmitat van mostrar una disminució tant de l'expressió gènica com de la proteïna PGC-1 α , però no de PGC-1 β , fet que indicava que els efectes del palmitat sobre PGC-1 α eren específics. A diferència dels estudis comentats fins el moment, altres autors no observaven canvis en l'expressió de PGC-1 α en múscul de rates alimentades amb una dieta rica en greixos (Hancock i col.,

2008; Garcia-Roves i col., 2007). Aquesta variabilitat dels resultats podria ser deguda a la composició dels AG i de la dieta o bé a la durada dels tractaments. De fet, l'exposició de les cèl·lules C2C12 al palmitat que vam realitzar a diferents temps mostrava que l'expressió de PGC-1 α és fluctuant, ja que a les 4 hores s'observava un augment i a les 16 hores una disminució de l'expressió d'aquest gen, mentre que a les 8 hores no s'observaven diferències en l'expressió respecte les cèl·lules del grup control. Aquestes fluctuacions podrien ser atribuïdes a un intent de la cèl·lula per augmentar el metabolisme lipídic i compensar així l'excés d'AG del seu interior. De tota manera, els resultats discordants entre els diferents estudis suggereixen que la utilització de diferents models pot ser responsable de la variabilitat observada en l'expressió de PGC-1 α .

Els treballs realitzats per tal d'identificar el mecanisme modulador de l'expressió de PGC-1 α semblaven indicar que l'AG palmitat redueix l'expressió d'aquest gen mitjançant l'activació de la via ERK-MAPK-NF- κ B. De fet, s'ha descrit que l'exercici en humans disminueix la fosforilació de la proteïna ERK1/2 i augmenta els nivells de PGC-1 α (Watt i col., 2004), indicant que la via MEK1/2-ERK1/2 pot estar implicada en el control de l'expressió d'aquest gen. D'acord amb aquesta hipòtesi, vam observar un augment dels nivells de fosforilació de les proteïnes MEK1/2 i ERK1/2 després de tractar els miotubs amb palmitat. Per tal de provar la relació entre l'expressió de PGC-1 α i la via MEK1/2-ERK1/2 vam incubar les cèl·lules amb l'inhibidor de la proteïna MEK1/2, U0126, juntament amb el palmitat. Tal i com esperàvem, l'U0126 va mantenir els nivells d'expressió de PGC-1 α com a les cèl·lules control. Atesa la importància de la inflamació en l'aparició de la RI i la DM2, vam estudiar si el factor proinflamatori NF- κ B estava implicat en la regulació de PGC-1 α , ja que estudis previs del nostre grup havien descrit que el palmitat podia induir l'activació

de NF- κ B (Jové i col., 2005a). Els resultats obtinguts confirmaven que el palmitat incrementava la unió de NF- κ B a l'ADN i que aquesta unió no s'observava quan s'inhibia la MEK1/2. Altres autors han proposat la proteïna p38 MAPK, la qual també forma part de la família MAPK, com a possible reguladora de l'expressió de PGC-1 α (Crunkhorn i col., 2007; Akimoto i col., 2005; Palomer i col., 2009). El fet que p38 MAPK i ERK1/2 comparteixin substrats podria explicar que ambdues vies estiguessin implicades en la regulació de PGC-1 α . De fet, s'ha descrit que tant ERK com p38 MAPK poden activar NF- κ B en mioblasts (Kefaloyianni i col., 2006). Des de fa anys es coneix la relació entre les MAPK i els PPARs, ja que s'ha descrit que l'activació de MEK pot fosforilar PPAR γ i provocar la pèrdua d'activitat d'aquest receptor nuclear (Camp i Tafuri, 1997). A més, diferents treballs suggereixen que ERK també pot realitzar un efecte inhibitori sobre l'activitat de PPAR α i PPAR γ (Pauley i col., 2002). Se sap que els AG són lligands dels PPARs i que PPAR α i PPAR δ , els quals són els principals reguladors de l'oxidació lipídica, també poden regular l'expressió de PGC-1 α . De fet, la sobreexpressió o l'activació de PPAR δ pot incrementar l'expressió de PGC-1 α en miotubs en cultiu (Dimopoulos i col., 2007) i en múscul esquelètic de ratolí (Tanaka i col., 2003), i al seu torn, PGC-1 α pot incrementar l'expressió de PPAR δ (Hondares i col., 2007). A més, NF- κ B també és capaç de reduir l'activitat de PPAR (Ruan i col., 2003) fet que podria explicar la disminució de l'expressió de PGC-1 α després del tractament amb palmitat. D'acord amb aquest fet, vam observar que el tractament dels miotubs amb l'agonista PPAR α Wy-14643 revertia el descens de l'expressió de PGC-1 α provocat pel palmitat, confirmant així que els PPARs modulaven l'expressió d'aquest gen. Contràriament, PPAR δ i PPAR γ no semblaven estar implicats en la regulació de PGC-1 α . De tota manera, els nivells d'expressió d'aquest gen augmentaven lleugerament, però no de manera significativa, quan es

tractava amb el GW501516, fet que indicaria que potser seria necessària una major concentració de fàrmac o un tractament més llarg per descartar o confirmar la implicació de PPAR δ en la regulació gènica de PGC-1 α . Atès que s'havia suggerit que la proteïna cinasa A (PKA) podia unir-se a PPAR α i PPAR δ i induir-ne l'activitat basal (Lazennec i col., 2000; Hansen i col., 20001), era lògic pensar que també podria estar implicada en la regulació de PGC-1 α . El tractament de les cèl·lules amb l'inhibidor de la PKA, H89, va confirmar aquesta hipòtesi. Contràriament al que esperàvem, ni les ceramides ni la PKC semblaven estar implicades en la regulació de PGC-1 α . Estudis posteriors han corroborat que les ceramides no regulen l'expressió d'aquest gen (Crunkhorn i col., 2007).

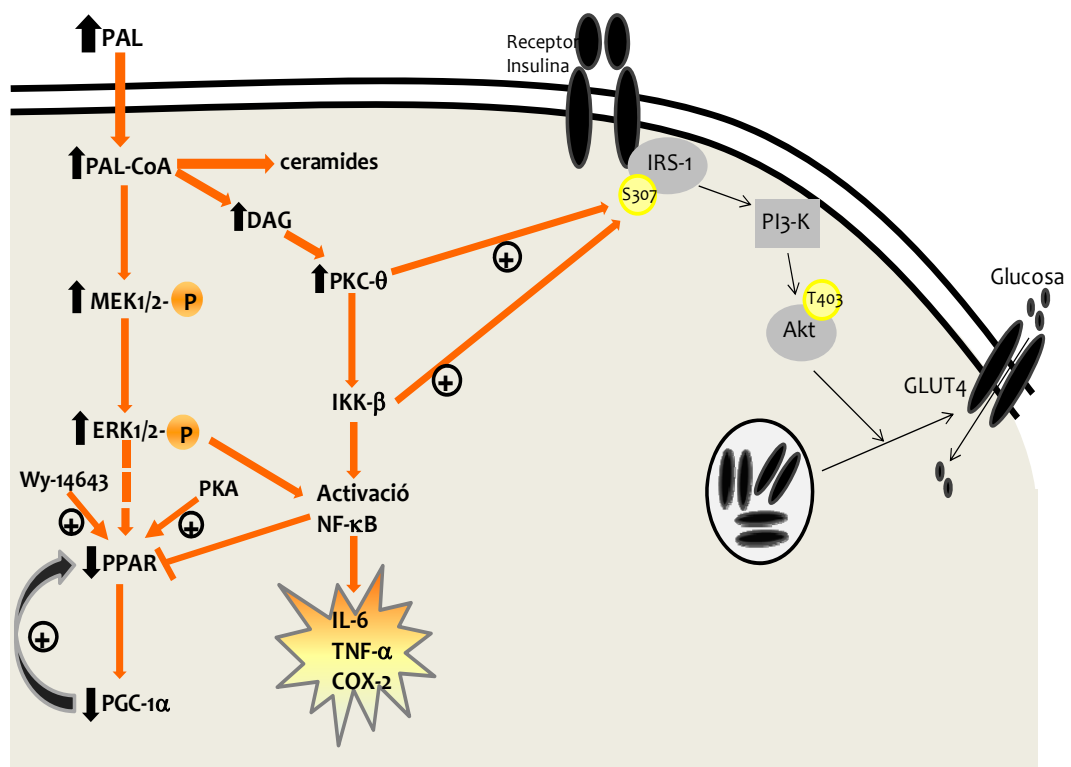


Figura 2. Possibles mecanismes implicats en la regulació de l'expressió de PGC-1 α per palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques. Els nivells elevats de Pal-CoA provoquen l'activació de la via ERK-MAPK i l'acumulació de DAG, el qual activa la via PKC- θ -NF- κ B. L'inducció d'ambdues vies provoca una reducció de l'expressió de PGC-1 α .

II. La inhibició de la COX-2 augmenta la resposta inflamatòria produïda per l'AG saturat palmitat

Un altre dels factors que podria estar relacionat amb la inflamació i, possiblement, la RI mediada per AG en el múscul esquelètic és l'enzim COX-2. De fet, un estudi recent realitzat en teixit adipós de rates alimentades amb dieta grassa mostra l'aparició de RI a conseqüència de la inflamació provocada per la COX-2 (Hsieh i col., 2009). No obstant, el paper que juga aquest enzim en la inflamació i la RI en múscul esquelètic no està ben establert. Es coneix que l'expressió de la COX-2 és regulada per NF- κ B, entre altres factors de transcripció, i que l'activitat d'aquest enzim modula el procés inflamatori a través de la síntesi de PGs. En aquest sentit, el tractament que vam realitzar a les cèl·lules musculars amb palmitat i partenolide, el qual és un potent inhibidor de NF- κ B, disminuïa l'expressió de la COX-2. Com s'ha comentat anteriorment, l'acumulació intracel·lular de DAG és un dels factors que provoca l'activació de NF- κ B, però es coneix un altre factor que pot activar aquesta via inflamatòria: la unió dels AGL als receptors TLR-2 i TLR-4. Tant TLR-2 com TLR-4 es consideren mediadors de la inflamació i la RI induïda per AG (Shi i col., 2006; Senn i col., 2006). Els nostres estudis demostraven que els TLRs, a més d'induir l'activitat NF- κ B, també podien ser regulats per aquest mateix factor de transcripció, ja que en presència de partenolide s'evitava la inducció en l'expressió de TLR-2 causada pel palmitat. A partir d'aquests estudis previs, volíem comprovar si els AG podien regular l'expressió de TLR-2, TLR-4 i COX-2 i, com a conseqüència, modular el procés inflamatori. Els resultats obtinguts després d'incubar les cèl·lules C2C12 amb l'AG saturat palmitat durant 1, 4, 8 i 16 hores confirmaven aquesta hipòtesi, ja que van mostrar que l'expressió de TLR-2, però no TLR-4, estava incrementada a les 8 hores. De fet, com ja havien descrit altres autors, en aquesta línia cel·lular el TLR-2 sembla

jugar un paper més important en el desenvolupament de la RI induïda pel palmitat que no pas el TLR-4 (Senn i col., 2006). Pel que fa a l'expressió de la COX-2, de la mateixa manera que l'expressió de IL-6, augmentava de forma evident a partir de les 8 hores amb un màxim d'expressió a les 16 hores. A diferència dels gens TLR-2, COX-2 i IL-6, els nivells d'expressió de TNF- α no van augmentar fins a les 16 hores d'incubació amb l'AG. Alguns autors suggereixen que, tot i que ambdós poden considerar-se marcadors inflamatoris, el TNF- α i la IL-6 tenen perfils biològics diferents. Així, hi ha estudis que demostren que un augment puntual de la IL-6 durant la realització d'exercici físic que provoca un increment de l'oxidació d'AG, la captació de glucosa mediada per la insulina, així com també que s'exerceixin efectes antiinflamatoris (Carey i col., 2006; Petersen i Pedersen, 2005). Ara bé, nivells elevats i crònics de la IL-6 han relacionat aquesta citocina amb efectes proinflamatoris i amb l'aparició de RI (Bastard i col., 2002). Les accions del TNF- α , en canvi, són sempre proinflamatòries (Bruce i Dick, 2004). D'acord amb aquesta teoria, els nostres resultats podrien indicar que la COX-2 actua de manera similar a com ho fa la IL-6 quan exerceix els seus efectes de manera aguda, ja que el tractament de les cèl·lules musculars amb l'inhibidor selectiu de la COX-2, NS-398, juntament amb palmitat durant un període de temps curt, provocava un major increment de l'expressió i secreció de la IL-6 i de l'expressió de TNF- α que no pas quan s'incubava amb el palmitat sol. Fins no fa gaire es pensava que els productes sintetitzats per la COX-2, com són les PGs, només tenien efectes proinflamatoris, però actualment es coneix que juguen un paper important tant a l'inici de la resposta inflamatòria com en la resolució de la mateixa, de manera que l'efecte antiinflamatori de la COX-2 que observàvem podia ser degut a aquest fet. En aquest sentit, algunes de les PGs produïdes per la COX-2, com la 15-dPGJ₂ i la PGE₂, s'ha descrit que poden inhibir NF- κ B (Straus i col., 2000; Gomez i col., 2005), tal i com observàvem en els nostres treballs quan es

tractaven els miotubs amb la PGE₂. Pel que fa a la 15-dPGJ₂, la qual és un lligand molt potent de PPAR_γ, pot mediar efectes antiinflamatoris com ara regular la proteïna inhibidora de NF-κB, IκBα (Castrillo i col., 2000). Així mateix, estudis realitzats per Harizi i Norbert (2004) mostren que la PGE₂ té la capacitat de suprimir l'alliberament de IL-6 i TNF-α induïdes per LPS en cèl·lules dendrítiques. D'acord amb aquests treballs, una reducció de la secreció de PGE₂ en presència de l'inhibidor de la COX-2 podria explicar per què el tractament amb NS-398 accentuava l'increment de l'expressió de la IL-6. A més, la PGE₂ podria prevenir l'aparició de RI, ja que el tractament amb aquesta PG revertia els efectes causats pel palmitat i l'inhibidor de la COX-2 sobre la fosforilació de l'Akt induïda per insulina en les cèl·lules C2C12. No obstant, i tenint en compte que existeixen pocs estudis sobre el paper de les PGs en l'aparició de RI, caldrien més experiments per confirmar el paper de la PGE₂ en l'aparició de RI.

Per la seva banda, els productes generats pels enzims 12-LO i citocrom P450 hidroxilasa (12-HETE i 20-HETE), els quals s'ha descrit que augmenten l'expressió de citocines proinflamatòries (Wen i col., 2007; Ishizuka i col., 2008), no semblaven estar implicats ni en la inflamació ni la RI induïdes pel palmitat en les cèl·lules C2C12.

Contràriament als efectes que produeix la COX-2 de manera aguda, la presència d'un increment crònic d'aquest enzim s'associa a un procés inflamatori que pot contribuir al desenvolupament de la RI (Hsieh i col., 2009).

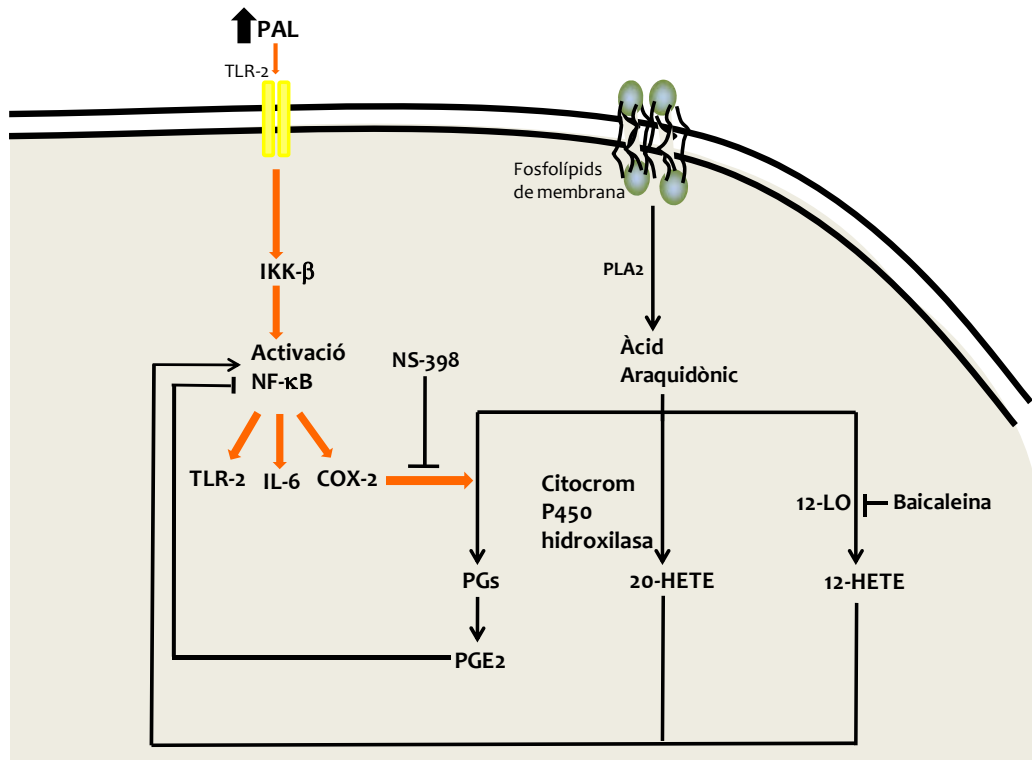


Figura 3. Hipòtesi sobre el paper desenvolupat per l'increment agut de la COX-2 en la inflamació mediada pel palmitat en cèl·lules musculars esquelètiques. La inhibició de la COX-2 augmenta el procés inflamatori per la disminució de la síntesi de PGE₂, la qual té efectes antiinflamatoris.

Estudi de nous mecanismes implicats en la prevenció de la inflamació i la RI induïda per palmitat

Nombrosos treballs han associat els estats d'inflamació crònics amb l'aparició de RI mediada per l'obesitat (Kohn i col., 2005; Shoelson i col., 2006; Stump i col., 2006; Wellen i Hotamisligil, 2005). Aquesta relació entre inflamació i metabolisme pot promoure el desenvolupament de malalties com la DM2 i és per aquesta raó que la investigació de noves estratègies terapèutiques per tractar aquestes patologies ha pres rellevància.

III. L'AG monoinsaturat oleat prevé la inflamació i la RI induïda per l'AG saturat palmitat

Es coneix que els AG saturats són responsables de l'aparició d'estats d'inflamació i RI. No obstant, no tots els AGL contribueixen de la mateixa manera a l'aparició d'aquests estats patològics, ja que diferents estudis indiquen que a diferència de l'AG saturat palmitat (16:0), l'AG monoinsaturat oleat (18:1) millora la sensibilitat a la insulina (Ryan i col., 2000; Vessby i col., 2001). De fet, l'anomenada "dieta Mediterrània", la qual es caracteritza per contenir un percentatge baix d'AG saturats (7-8%) i un percentatge alt d'AG monoinsaturats (20%), afavoreix l'oxidació lipídica i redueix el risc de desenvolupar obesitat (Mendez i col., 2006). D'acord amb aquests treballs previs, els resultats que vam obtenir després d'incubar els miotubs amb l'oleat mostraven que aquest AG monoinsaturat no provocava l'acumulació de DAG i per tant no es van observar alteracions ni en la fosforilació de la proteïna IRS-1 ni d'Akt. La coïncubació de les cèl·lules musculars amb els dos AG tampoc alterava la via de senyalització de la insulina, corroborant l'efecte protector de l'oleat que ja havien observat altres grups d'investigació (Gaster i col., 2005; Montell i col., 2001). L'AG monoinsaturat oleat semblaria doncs, una bona estratègia per combatre la inflamació i la RI, tot i que els mecanismes responsables eren desconeguts fins ara. Per tal d'identificar-los vam realitzar un estudi de la incorporació dels AG a TG i DAG, el qual va mostrar que l'oleat promovia la incorporació del palmitat a TG. L'acumulació de TG evitava la formació de DAG, fet que s'ha relacionat amb un efecte protector que mantindria la sensibilitat a la insulina (Yu i col., 2002; Listenberger i col., 2003). El motiu de l'acumulació de DAG, i no de TG quan s'exposaven les cèl·lules a un AG saturat com és el palmitat no es coneix amb exactitud, tot i que sembla que podria deure's a:

1) alteracions de l'enzim DGAT, el qual és responsable de la síntesi de TG a partir de DAG (Stone i col., 2004).

2) disminució de l'oxidació dels AG (Dobbins i col., 2001).

D'acord amb la primera hipòtesi, la incubació de les cèl·lules musculars amb palmitat va provocar una disminució de l'expressió del gen DGAT-2, però no de DGAT-1, que podia ser responsable de l'acumulació de DAG. D'altra banda, l'expressió d'aquest gen no es veia afectada en les cèl·lules incubades amb oleat o amb els dos AG, on els lípids s'acumulaven més en forma de TG que no pas de DAG. De fet, ja s'havia observat que la sobreexpressió de DGAT-1 augmentava la síntesi de TG i prevenia la RI induïda per AG en múscul esquelètic de ratolins (Liu i col., 2007).

Pel que fa a la segona hipòtesi, relacionada amb l'oxidació dels AG, era probable que l'acumulació de DAG fos conseqüència d'alteracions de l'enzim CPT-1, el qual permet l'entrada dels AGcL al mitocondri per ser oxidats. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'havia descrit que l'activitat de la CPT-1 estava reduïda en el múscul d'individus obesos (Kim i col., 2000) i que la inhibició d'aquest enzim amb l'etomoxir produïa una acumulació de lípids intramiocel·lulars responsable de l'aparició de RI (Dobbins i col., 2001). A diferència del palmitat, l'oleat provocava un increment de l'expressió de la CPT-1. D'acord amb aquestes observacions prèvies, els experiments que vam realitzar amb etomoxir van demostrar que la inhibició de la CPT-1 produïa un augment de l'acumulació de DAG, així com també un augment parcial de l'expressió de la citocina IL-6. El fet que l'etomoxir no revertís completament l'efecte de l'oleat indicava que existien altres mecanismes, a més de l'activitat de la CPT-1, implicats en la regulació de l'expressió de la IL-6. Possiblement les espècies reactives de l'oxigen (ROS) alliberades pel mitocondri hi estiguessin implicades, atès que alguns autors havien suggerit que la presència elevada d'AG al múscul, i per tant l'acumulació

intramiocel·lular de lípids, era capaç de provocar un increment de la producció de ROS (Borradaile i col., 2006; Krebs i Roden, 2004) i la conseqüent activació, de manera indirecta, del factor de transcripció inflamatori NF- κ B (van Loon i Goodpaster, 2006; Russell, 2004; Rachek i col., 2007). A diferència del que s'havia descrit en individus obesos, el tractament dels miotubs C2C12 amb l'AG palmitat elevava lleugerament, tot i que no de manera significativa, els nivells d'expressió de la CPT-1. Aquest fet podia ser conseqüència d'un intent inicial de la cèl·lula per metabolitzar l'excés d'AG, i possiblement amb un major temps d'exposició al palmitat s'hauria observat l'efecte contrari, és a dir, una disminució de l'expressió d'aquest gen.

Com és conegut, els AG són lligands naturals dels PPARs, fet que podria indicar que el mecanisme mitjançant el qual l'oleat exercia els seus efectes protectors estigués relacionat amb l'activació d'aquests receptors nuclears. En aquest sentit, l'estudi de l'activitat d'unió d'aquests factors de transcripció al seu PPRE va mostrar que estava augmentat en els extractes nuclears corresponents a les cèl·lules tractades amb oleat i amb la combinació de palmitat i oleat. D'acord amb aquest resultat, l'exposició dels miotubs a l'agonista de PPAR α , Wy-14643, incrementà l'expressió del gen DGAT-2, però no de CPT-1, i el tractament amb l'antagonista de PPAR α (MK886) semblava revertir parcialment, però no de manera significativa, els efectes de l'oleat tot augmentant l'expressió de la IL-6. Amb aquests experiments es confirmava la implicació de l'oleat i PPAR α en la regulació de l'enzim DGAT-2, però no s'aclariria el mecanisme mitjançant el qual es regulava la CPT-1.

Estudis previs relacionats amb la CPT-1 havien suggerit que tant la PKA (Brady i col., 1992; Yamagishi i col., 2001), com PPAR δ (Tanaka i col., 2003; Dimopoulos i col., 2007; Krämer i col., 2007), podien activar la transcripció d'aquest enzim, de manera que s'obrien noves vies per identificar el mecanisme d'acció de l'oleat sobre

la regulació d'aquest gen. Els tractaments que vam dur a terme amb els inhibidors H89 i KT5720, els quals inhibeixen la PKA, juntament amb la combinació de palmitat i oleat van disminuir parcialment l'expressió de CPT-1 respecte el grup tractat només amb palmitat i oleat. D'altra banda, els tractaments amb l'agonista PPAR δ , GW501516, incrementaven de manera significativa l'expressió de la CPT-1, com ja havien descrit diversos autors, tant en cultius de cèl·lules musculars esquelètiques humanes com en miotubs C2C12. En aquest sentit, també s'havia descrit que la sobreexpressió de la CPT-1 protegia els miotubs L6 contra la RI induïda per lípids (Sebastian i col., 2007; Perdomo i col., 2004), fet que indicava que un increment de la CPT-1 podia proporcionar una nova possibilitat per a prevenir l'aparició d'estats d'inflamació i RI.

IV. L'agonista PPAR δ , GW501516, atenua la inflamació i la RI induïda pel palmitat

El fet que un agonista sintètic d'alta afinitat per PPAR δ com és el GW501516 fos capaç d'induir l'expressió de la CPT-1 presentava una nova estratègia terapèutica per a prevenir l'aparició d'inflamació i RI induïda per AG, ja que dels tres subtipus de PPARs, únicament el PPAR δ no és diana de cap fàrmac comercialitzat actualment. A més de la CPT-1, un altre gen diana de PPAR δ és la PDK-4, un enzim relacionat amb l'oxidació dels AG. El fet que el GW501516 incrementés els nivells d'expressió de PDK-4 suggeria que hi havia un augment de l'oxidació d'AG, ja que aquest enzim regula el pas del metabolisme glucídic al metabolisme lipídic segons les necessitats de la cèl·lula. Aquests resultats coincidien amb altres treballs que afirmaven que la inducció de PPAR δ mitjançant GW501516 promovia la β -oxidació dels AG tant en models *in vitro* com *in vivo* i també en humans (Dimopoulos i col., 2007; Wang i col.,

2003; Dressel i col., 2003; Kleiner i col., 2009; Risérus i col., 2008). De fet, un estudi recent realitzat en humans amb obesitat moderada relaciona el GW501516 amb la millora de múltiples alteracions metabòliques mitjançant l'augment de l'oxidació dels AG (Risérus i col., 2008). No obstant, no tots els estudis que s'han dut a terme fins el moment coincideixen en relació al paper que juga aquest agonista PPAR δ en la prevenció de la RI i la sensibilitat a la insulina. Malgrat tots els estudis existents, no es coneix si l'activació de PPAR δ atenua la inflamació i la RI induïda per palmitat. De tota manera, s'ha descrit que els ratolins PPAR $\delta^{-/-}$ presenten RI (Lee i col., 2006) i que el tractament amb l'agonista PPAR δ incrementa la β -oxidació dels AG en el múscul esquelètic i millora la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina en ratolins (Tanaka i col., 2003). De fet, treballs de Krämer i col. (2005) mostren que l'activació de PPAR δ estimula la captació de glucosa en cèl·lules musculars esquelètiques. D'acord amb aquestes observacions, els nostres resultats mostraven una recuperació de la fosforilació de l'Akt després de tractar els miotubs amb palmitat i GW501516 durant 16 hores respecte a les cèl·lules tractades només amb palmitat. A més, també observàvem una disminució dels nivells de fosforilació de la proteïna IRS-1 en serina 307 després del tractament amb el fàrmac. Aquests resultats es podrien explicar pel fet que el GW501516 afavoriria l'oxidació del palmitat i evitaria l'acumulació de DAG, impedit així l'activació de la PKC- θ i la fosforilació de la IRS-1 en serina 307. Contràriament, estudis realitzats per altres autors (Dimopoulos i col., 2007; Terada i col., 2006; Brunmair i col., 2006) no observen modificacions en la captació de glucosa en el múscul esquelètic en resposta al GW501516. Aquest fet pot deure's a diferències en els temps de pretractament o la concentració de fàrmac utilitzat en cada experiment, de manera que caldrien més estudis per determinar els efectes del GW501516 sobre la via de senyalització de la insulina i la RI induïda per lípids *in vivo*.

Per la seva banda, els efectes dels agonistes PPAR δ sobre el procés inflamatori han estat poc estudiats en múscul esquelètic. Treballs previs realitzats pel nostre grup havien determinat que el fàrmac L-165041, el qual és un agonista PPAR δ menys potent que el GW501516, era capaç de reduir l'activitat NF- κ B en cèl·lules C2C12 i en cèl·lules cardíques (Jové i col., 2005b; Planavila i col., 2005). A més, estudis realitzats en macròfags han descrit que els lligands de PPAR δ inhibeixen l'expressió de gens inflamatoris (Lee i col., 2003b). En el mateix sentit, els nostres resultats determinaren que els nivells d'expressió i secreció de la citocina inflamatòria IL-6 disminuïen en presència de GW501516. Atès que les alteracions metabòliques es caracteritzen per provocar un estat d'inflamació crònica (Hotamisligil, 2006), aquest fàrmac podria ser útil per evitar l'activació de NF- κ B gràcies a la seva capacitat per afavorir l'increment de l'oxidació dels AG. Els mecanismes a través dels quals realitza aquestes accions no estan ben establerts i actualment són motiu de controvèrsia. Malgrat que no tots els estudis realitzats fins el moment estan d'acord amb aquesta teoria, s'ha suggerit que la proteïna AMPK pot ser medidora dels efectes del GW501516. L'AMPK actua com un sensor metabòlic que detecta nivells d'ATP baixos i respon incrementant el metabolisme oxidatiu, ja que la seva activació provoca un descens de la formació de malonil-CoA i consegüentment augmenta l'activitat de la CPT-1 (Mu i col., 2001; Reznick i Shulman, 2006). De fet, s'ha descrit que l'activació de l'AMPK en múscul modula la sensibilitat a la insulina i l'homeòstasi energètica (Zhang i col., 2009). D'acord amb aquestes observacions, els nostres resultats mostraven un increment de la fosforilació de l'AMPK en els tractaments amb GW501516. El mecanisme mitjançant el qual l'agonista PPAR δ pot activar aquesta cinasa no està ben establert, tot i que Krämer i col. (2006) suggereixen que ho pot fer de manera indirecta, a través d'un augment de la ràtio AMP:ATP que provocaria l'increment de l'activitat de l'AMPK. Altres autors proposen la citocina IL-6 com la

reguladora de l'activitat d'aquesta proteïna cinasa (Carey i col., 2006). No obstant, també s'ha descrit que l'AMPK és qui regula l'alliberament de la IL-6, de manera que quan s'activa la cinasa es redueix l'alliberament de la citocina (Glund i col., 2009), fet que semblaria concordar amb els nostres resultats.

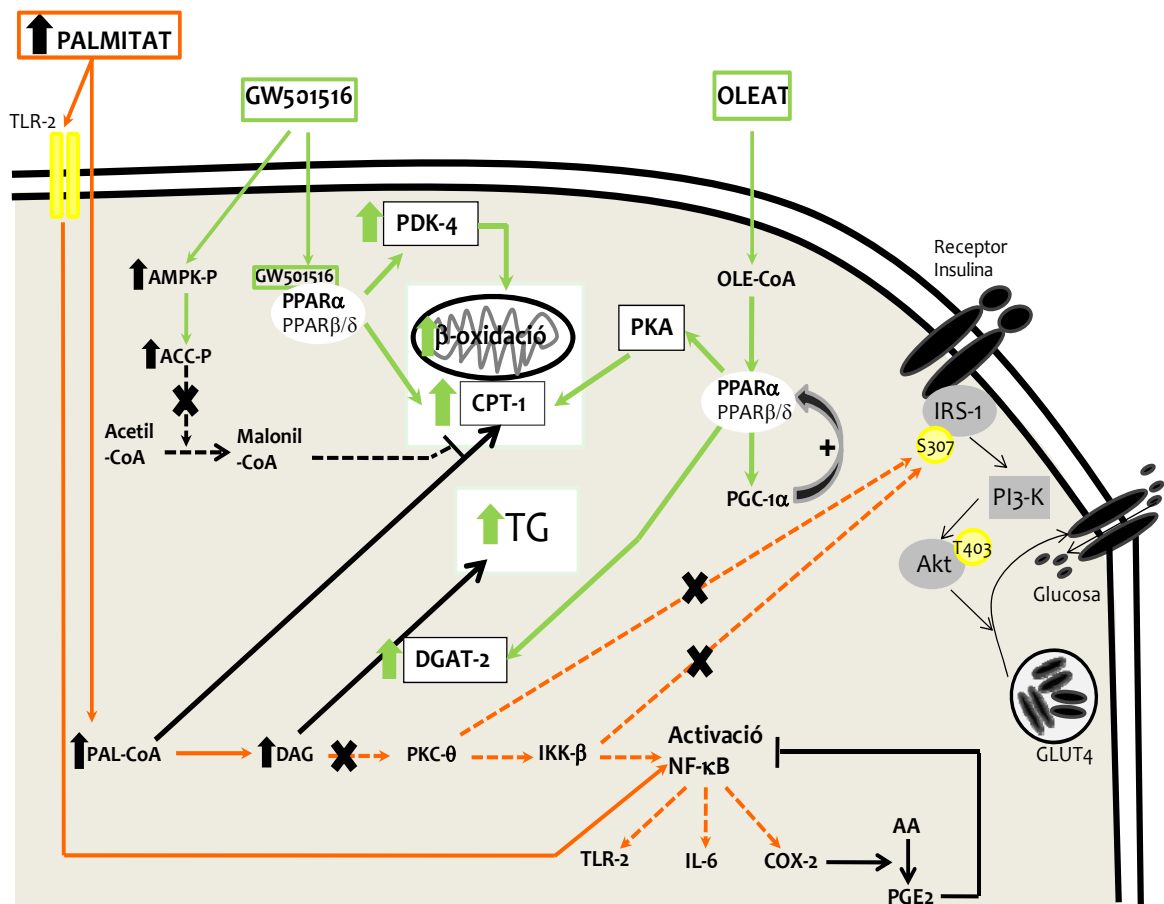


Figura 4. Potencials mecanismes a través dels quals l'oleat i l'agonista PPAR δ , GW501516, atenuen la inflamació i la RI. L'oleat incrementa l'expressió de CPT-1 i DGAT2, mentre que el GW501516 augmenta l'expressió de PDK-4 i CPT-1 al mateix temps que incrementa l'activació de la proteïna AMPK. En ambdós casos hi ha una reducció dels nivells de DAG i l'activació de la via PKC- θ -NF- κ B. Aquestes accions milloren tant la sensibilitat a la insulina com la inflamació.

En resum, els estudis realitzats durant aquesta Tesi Doctoral indiquen que la presència elevada d'AG saturats com el palmitat provoca una disminució de PGC-1 α a través de l'activació de la via ERK-MAPK-NF- κ B, així com també l'acumulació de DAG intramiocel·lular, fent que apareguin estats d'inflamació i RI. Un augment agut de determinats marcadors inflamatoris, com la COX-2, contribueixen a resoldre aquest procés inflamatori generat per l'acumulació de lípids, tot i que la seva presència de manera crònica accentua l'estat inflamatori al mateix temps que es desenvolupen estats de RI que poden derivar a patologies com la DM2. Segons hem pogut constatar amb el nostre model de RI *in vitro*, l'AG monoinsaturat oleat i l'agonista PPAR δ , GW501516, podrien ser dues noves possibilitats terapèutiques per evitar la inflamació induïda pels AG i millorar la sensibilitat a la insulina, ja que tenen la capacitat d'incrementar la β -oxidació impedit així que s'acumulin metabolits lipotòxics.

CONCLUSIONS



- I. L'exposició de les cèl·lules musculars esquelètiques a l'AG saturat palmitat redueix els nivells de PGC-1 α mitjançant l'activació de la via ERK-MAPK i NF- κ B.

- II. L'AG monoinsaturat oleat evita l'aparició de RI i la inflamació provocada pel palmitat en cèl·lules musculars a través de la inducció de gens implicats en el procés de la β -oxidació mitocondrial i l'acumulació de TG.

- III. L'AG saturat palmitat i l'AG monoinsaturat oleat modulen de manera diferent l'expressió dels gens COX-2 i TLR-2 en cèl·lules musculars esquelètiques. La inhibició de la COX-2 augmenta el procés inflamatori en cèl·lules musculars exposades a palmitat.

- IV. L'agonista PPAR δ , GW501516, redueix la inflamació i la RI en cèl·lules musculars esquelètiques exposades a palmitat gràcies a la seva capacitat per reduir l'acumulació de DAG i la posterior activació de la via PKC- θ -NF- κ B.

BIBLIOGRAFIA



A

- Abu-Elheiga,L, Almarza-Ortega,DB, Baldini,A, Wakil,SJ: Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem* 272:10669-10677, 1997
- Abu-Elheiga,L, Brinkley,WR, Zhong,L, Chirala,SS, Woldegiorgis,G, Wakil,SJ: The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1444-1449, 2000
- Adams,JM, Pratipanawatr,T, Berria,R, Wang,E, Defronzo,RA, Sullards,MC, Mandarino,LJ: Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53:25-31, 2004
- Aerts,JM, Ottenhoff,R, Powlson,AS, Grefhorst,A, van,EM, Dubbelhuis,PF, Aten,J, Kuipers,F, Serlie,MJ, Wennekes,T, Sethi,JK, O'Rahilly,S, Overkleeft,HS: Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* 56:1341-1349, 2007
- Aguirre,V, Werner,ED, Giraud,J, Lee,YH, Shoelson,SE, White,MF: Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-1537, 2002
- Ahmad-Nejad,P, Hacker,H, Rutz,M, Bauer,S, Vabulas,RM, Wagner,H: Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968, 2002
- Ajuwon,KM, Spurlock,ME: Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135:1841-1846, 2005
- Akimoto,T, Pohnert,SC, Li,P, Zhang,M, Gumbs,C, Rosenberg,PB, Williams,RS, Yan,Z: Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280:19587-19593, 2005
- Akira,S, Takeda,K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511, 2004
- Altomare,DA, Lyons,GE, Mitsuuchi,Y, Cheng,JQ, Testa,JR: Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 16:2407-2411, 1998
- Anai,M, Funaki,M, Ogihara,T, Terasaki,J, Inukai,K, Katagiri,H, Fukushima,Y, Yazaki,Y, Kikuchi,M, Oka,Y, Asano,T: Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes* 47:13-23, 1998
- Andersson,U, Scarpulla,RC: Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21:3738-3749, 2001
- Antonescu,CN, Foti,M, Sauvonnet,N, Klip,A: Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Biosci Rep* 29:1-11, 2009
- Araki,E, Haag,BL, Kahn,CR: Cloning of the mouse insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and complete sequence of mouse IRS-1. *Biochim Biophys Acta* 1221:353-356, 1994a

Araki,E, Lipes,MA, Patti,ME, Bruning,JC, Haag,B, III, Johnson,RS, Kahn,CR: Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186-190, 1994b

Arany,Z, Lebrasseur,N, Morris,C, Smith,E, Yang,W, Ma,Y, Chin,S, Spiegelman,BM: The transcriptional coactivator PGC-1beta drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab* 5:35-46, 2007

Arenzana-Seisdedos,F, Thompson,J, Rodriguez,MS, Bachelier,F, Thomas,D, Hay,RT: Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15:2689-2696, 1995

Azuma,Y, Shinohara,M, Wang,PL, Ohura,K: 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 283:344-346, 2001

B

Bachmann,OP, Dahl,DB, Brechtel,K, Machann,J, Haap,M, Maier,T, Loviscach,M, Stumvoll,M, Claussen,CD, Schick,F, Haring,HU, Jacob,S: Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50:2579-2584, 2001

Baldwin,AS, Jr.: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683, 1996

Bandyopadhyay,GK, Yu,JG, Ofrecio,J, Olefsky,JM: Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 54:2351-2359, 2005

Bandyopadhyay,GK, Yu,JG, Ofrecio,J, Olefsky,JM: Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 55:2277-2285, 2006

Barber,MC, Price,NT, Travers,MT: Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta* 1733:1-28, 2005

Barish,GD, Narkar,VA, Evans,RM: PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116:590-597, 2006

Barnes,PJ, Karin,M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071, 1997

Bastard,JP, Maachi,M, Van Nhieu,JT, Jardel,C, Bruckert,E, Grimaldi,A, Robert,JJ, Capeau,J, Hainque,B: Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084-2089, 2002

Bastie,CC, Hajri,T, Drover,VA, Grimaldi,PA, Abumrad,NA: CD36 in myocytes channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness. *Diabetes* 53:2209-2216, 2004

- Beeson,M, Sajan,MP, Daspet,JG, Luna,V, Dizon,M, Grebenev,D, Powe,JL, Lucidi,S, Miura,A, Kanoh,Y, Bandyopadhyay,G, Standaert,ML, Yeko,TR, Farese,RV: Defective Activation of Protein Kinase C- ζ in Muscle by Insulin and Phosphatidylinositol-3,4,5,-(PO(4))(3) in Obesity and Polycystic Ovary Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2:49-56, 2004
- Begum,N, Ragolia,L, Srinivasan,M: Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat skeletal muscle cells. *Eur J Biochem* 238:214-220, 1996
- Bellacosa,A, Chan,TO, Ahmed,NN, Datta,K, Malstrom,S, Stokoe,D, McCormick,F, Feng,J, Tsichlis,P: Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17:313-325, 1998
- Benton,CR, Koonen,DP, Calles-Escandon,J, Tandon,NN, Glatz,JF, Luiken,JJ, Heikkila,JJ, Bonen,A: Differential effects of contraction and PPAR agonists on the expression of fatty acid transporters in rat skeletal muscle. *J Physiol* 573:199-210, 2006a
- Benton,CR, Han,XX, Febbraio,M, Graham,TE, Bonen,A: Inverse relationship between PGC-1alpha protein expression and triacylglycerol accumulation in rodent skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100:377-383, 2006b
- Benton,CR, Nickerson,JG, Lally,J, Han,XX, Holloway,GP, Glatz,JF, Luiken,JJ, Graham,TE, Heikkila,JJ, Bonen,A: Modest PGC-1alpha overexpression in muscle in vivo is sufficient to increase insulin sensitivity and palmitate oxidation in subsarcolemmal, not intermyofibrillar, mitochondria. *J Biol Chem* 283:4228-4240, 2008
- Bjornholm,M, Kawano,Y, Lehtihet,M, Zierath,JR: Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46:524-527, 1997
- Blaak,EE: Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:391-403, 2005
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C: Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:267-273, 2003.
- Boden,G, Chen,X, Ruiz,J, White,JV, Rossetti,L: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93:2438-2446, 1994
- Boden,G, Chen,X: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 96:1261-1268, 1995
- Boden,G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997
- Boden,G, Lebed,B, Schatz,M, Homko,C, Lemieux,S: Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 50:1612-1617, 2001
- Boden,G, Shulman,GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23, 2002

- Bokhari,S, Emerson,P, Israelian,Z, Gupta,A, Meyer,C: Metabolic fate of plasma glucose during hyperglycemia in impaired glucose tolerance: evidence for further early defects in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E440-E444, 2009
- Bonen,A, Dyck,DJ, Ibrahim,A, Abumrad,NA: Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol* 276:E642-E649, 1999
- Bonen,A, Parolin,ML, Steinberg,GR, Calles-Escandon,J, Tandon,NN, Glatz,JF, Luiken,JJ, Heigenhauser,GJ, Dyck,DJ: Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J* 18:1144-1146, 2004
- Borkman,M, Storlien,LH, Pan,DA, Jenkins,AB, Chisholm,DJ, Campbell,LV: The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med* 328:238-244, 1993
- Borradaile,NM, Han,X, Harp,JD, Gale,SE, Ory,DS, Schaffer,JE: Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 47:2726-2737, 2006
- Bost,F, Aouadi,M, Caron,L, Even,P, Belmonte,N, Prot,M, Dani,C, Hofman,P, Pages,G, Pouyssegur,J, Le Marchand-Brustel,Y, Binetruy,B: The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54:402-411, 2005
- Boushel,R, Gnaiger,E, Schjerling,P, Skovbro,M, Kraunsoe,R, Dela,F: Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50:790-796, 2007
- Bouzakri,K, Zachrisson,A, Al-Khalili,L, Zhang,BB, Koistinen,HA, Krook,A, Zierath,JR: siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab* 4:89-96, 2006
- Brady,PS, Park,EA, Liu,JS, Hanson,RW, Brady,LJ: Isolation and characterization of the promoter for the gene coding for the 68 kDa carnitine palmitoyltransferase from the rat. *Biochem J* 286 (Pt 3):779-783, 1992
- Braissant,O, Foufelle,F, Scotto,C, Dauca,M, Wahli,W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366, 1996
- Brownsey,RW, Boone,AN, Elliott,JE, Kulpa,JE, Lee,WM: Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 34:223-227, 2006
- Brozinick,JT, Jr., Roberts,BR, Dohm,GL: Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes* 52:935-941, 2003
- Bruce,CR, Anderson,MJ, Carey,AL, Newman,DG, Bonen,A, Kriketos,AD, Cooney,GJ, Hawley,JA: Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5444-5451, 2003
- Bruce,CR, Dyck,DJ: Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E616-E621, 2004

Bruce,CR, Mertz,VA, Heigenhauser,GJ, Dyck,DJ: The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. *Diabetes* 54:3154-3160, 2005

Bruce,CR, Thrush,AB, Mertz,VA, Bezaire,V, Chabowski,A, Heigenhauser,GJ, Dyck,DJ: Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E99-E107, 2006

Bruce,CR, Hoy,AJ, Turner,N, Watt,MJ, Allen,TL, Carpenter,K, Cooney,GJ, Febbraio,MA, Kraegen,EW: Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58:550-558, 2009

Brunmair,B, Staniek,K, Dorig,J, Szocs,Z, Stadlbauer,K, Marian,V, Gras,F, Anderwald,C, Nohl,H, Waldhausl,W, Fornsinn,C: Activation of PPAR-delta in isolated rat skeletal muscle switches fuel preference from glucose to fatty acids. *Diabetologia* 49:2713-2722, 2006

Bryant,NJ, Govers,R, James,DE: Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:267-277, 2002

Buchner,K: Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur J Biochem* 228:211-221, 1995

C

Cahill,GF, Jr.: Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 26:1-22, 2006

Cai,D, Dhe-Paganon,S, Melendez,PA, Lee,J, Shoelson,SE: Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278:25323-25330, 2003

Calvo,JA, Daniels,TG, Wang,X, Paul,A, Lin,J, Spiegelman,BM, Stevenson,SC, Rangwala,SM: Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* 104:1304-1312, 2008

Camp,HS, Tafuri,SR: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:10811-10816, 1997

Cantley,LC: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657, 2002

Carey,AL, Steinberg,GR, Macaulay,SL, Thomas,WG, Holmes,AG, Ramm,G, Prelovsek,O, Hohnen-Behrens,C, Watt,MJ, James,DE, Kemp,BE, Pedersen,BK, Febbraio,MA: Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55:2688-2697, 2006

Cases,S, Smith,SJ, Zheng,YW, Myers,HM, Lear,SR, Sande,E, Novak,S, Collins,C, Welch,CB, Lusis,AJ, Erickson,SK, Farese,RV, Jr.: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13018-13023, 1998

- Cases,S, Stone,SJ, Zhou,P, Yen,E, Tow,B, Lardizabal,KD, Voelker,T, Farese,RV, Jr.: Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276:38870-38876, 2001
- Castrillo,A, Díaz-Guerra,MJ, Hortelano,S, Martin-Sanz,P, Bosca,L: Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20:1692-1698, 2000
- Cazzolli,R, Carpenter,L, Biden,TJ, Schmitz-Peiffer,C: A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50:2210-2218, 2001
- Ceddia,RB, Sweeney,G: Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J Physiol* 555:409-421, 2004
- Cengel,KA, Kason,RE, Freund,GG: Phosphatidylinositol 3'-kinase associates with an insulin receptor substrate-1 serine kinase distinct from its intrinsic serine kinase. *Biochem J* 335 (Pt 2):397-404, 1998
- Cenni,V, Doppler,H, Sonnenburg,ED, Maraldi,N, Newton,AC, Toker,A: Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J* 363:537-545, 2002
- Cha,BS, Ciaraldi,TP, Carter,L, Nikoulina,SE, Mudaliar,S, Mukherjee,R, Paterniti,JR, Jr., Henry,RR: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia* 44:444-452, 2001
- Chabowski,A, Coort,SL, Calles-Escandon,J, Tandon,NN, Glatz,JF, Luiken,JJ, Bonen,A: Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E781-E789, 2004
- Chang,L, Karin,M: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40, 2001
- Chavez,JA, Knotts,TA, Wang,LP, Li,G, Dobrowsky,RT, Florant,GL, Summers,SA: A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278:10297-10303, 2003a
- Chavez,JA, Summers,SA: Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419:101-109, 2003b
- Chen,HC, Smith,SJ, Ladha,Z, Jensen,DR, Ferreira,LD, Pulawa,LK, McGuire,JG, Pitas,RE, Eckel,RH, Farese,RV, Jr.: Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *J Clin Invest* 109:1049-1055, 2002
- Chen,SS, Jenkins,AJ, Majewski,H: Elevated plasma prostaglandins and acetylated histone in monocytes in Type 1 diabetes patients. *Diabet Med* 26:182-186, 2009

- Cho,H, Mu,J, Kim,JK, Thorvaldsen,JL, Chu,Q, Crenshaw,EB, III, Kaestner,KH, Bartolomei,MS, Shulman,GI, Birnbaum,MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292:1728-1731, 2001
- Choi,CS, Savage,DB, bu-Elheiga,L, Liu,ZX, Kim,S, Kulkarni,A, Distefano,A, Hwang,YJ, Reznick,RM, Codella,R, Zhang,D, Cline,GW, Wakil,SJ, Shulman,GI: Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16480-16485, 2007
- Chung,S, Lapoint,K, Martinez,K, Kennedy,A, Boysen,SM, McIntosh,MK: Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 147:5340-5351, 2006
- Chung,WC, Ryu,SH, Sun,H, Zeldin,DC, Koo,JS: CREB mediates prostaglandin F2alpha-induced MUC5AC overexpression. *J Immunol* 182:2349-2356, 2009
- Cleasby,ME, Reinten,TA, Cooney,GJ, James,DE, Kraegen,EW: Functional studies of Akt isoform specificity in skeletal muscle in vivo; maintained insulin sensitivity despite reduced insulin receptor substrate-1 expression. *Mol Endocrinol* 21:215-228, 2007
- Cobb,MH, Goldsmith,EJ: How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846, 1995
- Coe,NR, Smith,AJ, Frohnert,BI, Watkins,PA, Bernlohr,DA: The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 274:36300-36304, 1999
- Colberg,SR, Simoneau,JA, Thaete,FL, Kelley,DE: Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* 95:1846-1853, 1995
- Coleman,RA, Smith,WL, Narumiya,S: International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205-229, 1994a
- Coleman,RA, Grix,SP, Head,SA, Louttit,JB, Mallett,A, Sheldrick,RL: A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47:151-168, 1994b
- Colville-Nash,PR, Gilroy,DW, Willis,D, Paul-Clark,MJ, Moore,AR, Willoughby,DA: Prostaglandin F2alpha produced by inducible cyclooxygenase may contribute to the resolution of inflammation. *Inflammopharmacology* 12:473-476, 2005
- Cooney,GJ, Thompson,AL, Furler,SM, Ye,J, Kraegen,EW: Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 967:196-207, 2002
- Coort,SL, Hasselbaink,DM, Koonen,DP, Willems,J, Coumans,WA, Chabowski,A, van,d, V, Bonen,A, Glatz,JF, Luiken,JJ: Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats. *Diabetes* 53:1655-1663, 2004
- Cosentino,F, Eto,M, De,PP, van der,LB, Bachschmid,M, Ullrich,V, Kouroedov,A, Delli,GC, Joch,H, Volpe,M, Luscher,TF: High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 107:1017-1023, 2003

Coudronniere,N, Villalba,M, Englund,N, Altman,A: NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3394-3399, 2000

Cozzone,D, Frojdo,S, Disse,E, Debard,C, Laville,M, Pirola,L, Vidal,H: Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51:512-521, 2008

Cross,DA, Watt,PW, Shaw,M, van der,KJ, Downes,CP, Holder,JC, Cohen,P: Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett* 406:211-215, 1997

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

D

De Filippis,FE, Alvarez,G, Berria,R, Cusi,K, Everman,S, Meyer,C, Mandarino,LJ: Insulin-resistant muscle is exercise resistant: evidence for reduced response of nuclear-encoded mitochondrial genes to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E607-E614, 2008

De Meyts MP, Whittaker,J: Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1:769-783, 2002

Delarue,J, Magnan,C: Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:142-148, 2007

Deshmukh,A, Coffey,VG, Zhong,Z, Chibalin,AV, Hawley,JA, Zierath,JR: Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. *Diabetes* 55:1776-1782, 2006

Dey,I, Giembycz,MA, Chadee,K: Prostaglandin E(2) couples through EP(4) prostanoid receptors to induce IL-8 production in human colonic epithelial cell lines. *Br J Pharmacol* 156:475-485, 2009

DiDonato,JA, Hayakawa,M, Rothwarf,DM, Zandi,E, Karin,M: A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554, 1997

Dimopoulos,N, Watson,M, Green,C, Hundal,HS: The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett* 581:4743-4748, 2007

Dobbins,RL, Szczepaniak,LS, Bentley,B, Esser,V, Myhill,J, McGarry,JD: Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 50:123-130, 2001

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

Downward,J: Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10:262-267, 1998

Draznin,B: Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55:2392-2397, 2006

Dressel,U, Allen,TL, Pippal,JB, Rohde,PR, Lau,P, Muscat,GE: The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 17:2477-2493, 2003

E

Esposito,K, Pontillo,A, Ciotola,M, Di,PC, Grella,E, Nicoletti,G, Giugliano,D: Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3864-3866, 2002

F

Fain,JN, Kanu,A, Bahouth,SW, Cowan,GS, Jr., Hiler,ML, Leffler,CW: Comparison of PGE₂, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67:467-473, 2002

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

Fan,H, Cook,JA: Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 10:71-84, 2004b

Farese,RV, Sajan,MP, Yang,H, Li,P, Mastorides,S, Gower,WR, Jr., Nimal,S, Choi,CS, Kim,S, Shulman,GI, Kahn,CR, Braun,U, Leitges,M: Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest* 117:2289-2301, 2007

Febbraio,M, Abumrad,NA, Hajjar,DP, Sharma,K, Cheng,W, Pearce,SF, Silverstein,RL: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274:19055-19062, 1999

Febbraio,M, Hajjar,DP, Silverstein,RL: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108:785-791, 2001

Fediuc,S, Gaidhu,MP, Ceddia,RB: Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* 47:412-420, 2006

Feinstein,R, Kanety,H, Papa,MZ, Lunenfeld,B, Karasik,A: Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268:26055-26058, 1993

Fernandez-Real,JM, Vayreda,M, Richart,C, Gutierrez,C, Broch,M, Vendrell,J, Ricart,W: Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1154-1159, 2001

Ferrannini,E, Barrett,EJ, Bevilacqua,S, DeFronzo,RA: Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 72:1737-1747, 1983

Festa,A, D'Agostino,R, Jr., Howard,G, Mykkanen,L, Tracy,RP, Haffner,SM: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102:42-47, 2000

Finck,BN, Kelly,DP: PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116:615-622, 2006

Fink,RI, Wallace,P, Brechtel,G, Olefsky,JM: Evidence that glucose transport is rate-limiting for in vivo glucose uptake. *Metabolism* 41:897-902, 1992

Fluck,M, Hoppeler,H: Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:159-216, 2003

Franckhauser,S, Elias,I, Rotter,S, V, Ferre,T, Nagaev,I, Andersson,CX, Agudo,J, Ruberte,J, Bosch,F, Smith,U: Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* 51:1306-1316, 2008

Frayn,KN, Williams,CM, Arner,P: Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond)* 90:243-253, 1996

Frost,RA, Nystrom,GJ, Lang,CH: Lipopolysaccharide stimulates nitric oxide synthase-2 expression in murine skeletal muscle and C(2)C(12) myoblasts via Toll-like receptor-4 and c-Jun NH(2)-terminal kinase pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1605-C1615, 2004

Frost,RA, Nystrom,GJ, Lang,CH: Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R773-R784, 2006

Frost,RA, Lang,CH: Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *J Appl Physiol* 103:378-387, 2007

G

Gao,T, Toker,A, Newton,AC: The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* 276:19588-19596, 2001

Gao,Z, Hwang,D, Bataille,F, Lefevre,M, York,D, Quon,MJ, Ye,J: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277:48115-48121, 2002

Gao,Y, Ordas,R, Klein,JD, Price,SR: Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3-kinase and MEK-1/2. *J Appl Physiol* 105:1772-1778, 2008

Garcia-Roves,P, Huss,JM, Han,DH, Hancock,CR, Iglesias-Gutierrez,E, Chen,M, Holloszy,JO: Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10709-10713, 2007

Gaster,M, Rustan,AC, Beck-Nielsen,H: Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes. *Diabetes* 54:648-656, 2005

Gaster,M, Beck-Nielsen,H: Triacylglycerol accumulation is not primarily affected in myotubes established from type 2 diabetic subjects. *Biochim Biophys Acta* 1761:100-110, 2006

- Gavett,SH, Madison,SL, Chulada,PC, Scarborough,PE, Qu,W, Boyle,JE, Tiano,HF, Lee,CA, Langenbach,R, Roggli,VL, Zeldin,DC: Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J.Clin.Invest.* 104:721-732, 1999
- Gilde,A, Fruchart,JC, Staels,B: [PPAR receptors at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular diseases]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*21-38, 2007
- Gilroy,DW, Colville-Nash,PR, McMaster,S, Sawatzky,DA, Willoughby,DA, Lawrence,T: Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J* 17:2269-2271, 2003
- Gilroy,D.W, Perretti,M: Aspirin and steroids: new mechanistic findings and avenues for drug discovery. *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:405-411, 2005
- Gimeno,RE, Ortegon,AM, Patel,S, Punreddy,S, Ge,P, Sun,Y, Lodish,HF, Stahl,A: Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem* 278:16039-16044, 2003
- Glund,S, Treebak,JT, Long,YC, Barres,R, Violet,B, Wojtaszewski,JF, Zierath,JR: Role of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in interleukin-6 release from isolated mouse skeletal muscle. *Endocrinology* 150:600-606, 2009
- Gomez,PF, Pillinger,MH, Attur,M, Marjanovic,N, Dave,M, Park,J, Bingham,CO, III, Al-Mussawir,H, Abramson,SB: Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 175:6924-6930, 2005
- Goni,FM, Alonso,A: Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta* 1788:169-177, 2009
- Goodpaster,BH, Kelley,DE: Role of muscle in triglyceride metabolism. *Curr Opin Lipidol* 9:231-236, 1998
- Goodpaster,BH, He,J, Watkins,S, Kelley,DE: Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5755-5761, 2001
- Goodyear,LJ, Giorgino,F, Sherman,LA, Carey,J, Smith,RJ, Dohm,GL: Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95:2195-2204, 1995
- Goodyear,LJ, Kahn,BB: Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49:235-261, 1998
- Greco,AV, Mingrone,G, Giancaterini,A, Manco,M, Morroni,M, Cinti,S, Granzotto,M, Vettor,R, Camastra,S, Ferrannini,E: Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 51:144-151, 2002
- Griffin,ME, Marcucci,MJ, Cline,GW, Bell,K, Barucci,N, Lee,D, Goodyear,LJ, Kraegen,EW, White,MF, Shulman,GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999
- Grundy,SM: Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:629-636, 2008

Gum,RJ, Gaede,LL, Heindel,MA, Waring,JF, Trevillyan, JM, Zinker,BA, Stark,ME, Wilcox,D, Jirousek,MR, Rondinone,CM, Ulrich,RG: Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice. *Mol Endocrinol* 17:1131-1143, 2003

Gumà,A, Zierath, JR, Wallberg-Henriksson, H, Klip, A: Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 268:E613-E622, 1995

H

Hajduch,E, Balendran,A, Batty,IH, Litherland,GJ, Blair,AS, Downes,CP, Hundal,HS: Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia* 44:173-183, 2001

Hajri,T, Abumrad,NA: Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu.Rev.Nutr.* 22:383-415, 2002

Hall,AM, Smith,AJ, Bernlohr,DA: Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem* 278:43008-43013, 2003

Hammad,H, de Heer,HJ, Soullie,T, Hoogsteden,HC, Trottein,F, Lambrecht,BN: Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J.Immunol.* 171:3936-3940, 2003

Hamilton,JA, Kamp,F: How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48:2255-2269, 1999

Hamilton,JA, Johnson,RA, Corkey,B, Kamp,F: Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *J Mol Neurosci* 16:99-108, 2001

Hancock,CR, Han,DH, Chen,M, Terada,S, Yasuda,T, Wright,DC, Holloszy,JO: High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7815-7820, 2008

Handschin,C, Rhee,J, Lin,J, Tarr,PT, Spiegelman,BM: An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7111-7116, 2003

Hansen,JB, Zhang,H, Rasmussen,TH, Petersen,RK, Flindt,EN, Kristiansen,K: Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* 276:3175-3182, 2001

Hardie,DG, Salt,IP, Hawley,SA, Davies,SP: AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J* 338 (Pt 3):717-722, 1999

Hardie,DG, Pan,DA: Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 30:1064-1070, 2002

Harizi,H, Norbert,G: Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* 228:99-109, 2004

- Haus, JM, Kashyap, SR, Kasumov, T, Zhang, R, Kelly, KR, DeFronzo, RA, Kirwan, JP: Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 58:337-343, 2009
- Hayden, MS, Ghosh, S: Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224, 2004
- Hegarty, BD, Furler, SM, Ye, J, Cooney, GJ, Kraegen, EW: The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 178:373-383, 2003
- Helmersson, J, Vessby, B, Larsson, A, Basu, S: Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 109:1729-1734, 2004
- Heydrick, SJ, Jullien, D, Gautier, N, Tanti, JF, Giorgetti, S, Van, OE, Le Marchand-Brustel, Y: Defect in skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase in obese insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 91:1358-1366, 1993
- Higaki, Y, Wojtaszewski, JF, Hirshman, MF, Withers, DJ, Towery, H, White, MF, Goodyear, LJ: Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem* 274:20791-20795, 1999
- Hirosumi, J, Tuncman, G, Chang, L, Gorgun, CZ, Uysal, KT, Maeda, K, Karin, M, Hotamisligil, GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002
- Hirsch, D, Stahl, A, Lodish, HF: A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8625-8629, 1998
- Hojlund, K, Mustard, KJ, Staehr, P, Hardie, DG, Beck-Nielsen, H, Richter, EA, Wojtaszewski, JF: AMPK activity and isoform protein expression are similar in muscle of obese subjects with and without type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E239-E244, 2004
- Holland, WL, Brozinick, JT, Wang, LP, Hawkins, ED, Sargent, KM, Liu, Y, Narra, K, Hoehn, KL, Knotts, TA, Siesky, A, Nelson, DH, Karathanasis, SK, Fontenot, GK, Birnbaum, MJ, Summers, SA: Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5:167-179, 2007
- Holland, WL, Summers, SA: Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 29:381-402, 2008
- Holloway, GP, Bonen, A, Spriet, LL: Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 89:455S-462S, 2009
- Hondares, E, Pineda-Torra, I, Iglesias, R, Staels, B, Villarroya, F, Giralt, M: PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 354:1021-1027, 2007
- Horowitz, JF: Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab* 14:386-392, 2003
- Hotamisligil, GS, Shargill, NS, Spiegelman, BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993

Hotamisligil,GS, Arner,P, Caro,JF, Atkinson,RL, Spiegelman,BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415, 1995

Hotamisligil,GS, Peraldi,P, Budavari,A, Ellis,R, White,MF, Spiegelman,BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668, 1996

Hotamisligil,GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867, 2006

Hsieh,PS, Jin,JS, Chiang,CF, Chan,PC, Chen,CH, Shih,KC: COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver. *Obesity (Silver Spring)* 2009

Hubbard,SR, Till,JH: Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69:373-398, 2000

Hudson,ER, Pan,DA, James,J, Lucocq,JM, Hawley,SA, Green,KA, Baba,O, Terashima,T, Hardie,DG: A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13:861-866, 2003

Hulver,MW, Berggren,JR, Cortright,RN, Dudek,RW, Thompson,RP, Pories,WJ, MacDonald,KG, Cline,GW, Shulman,GI, Dohm,GL, Houmard,JA: Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E741-E747, 2003

Hundal,RS, Petersen,KF, Mayerson,AB, Randhawa,PS, Inzucchi,S, Shoelson,SE, Shulman,GI: Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 109:1321-1326, 2002

I

Ide,T, Egan,K, Bell-Parikh,LC, FitzGerald,GA: Activation of nuclear receptors by prostaglandins. *Thromb Res* 110:311-315, 2003

Inoue,G, Cheatham,B, Emkey,R, Kahn,CR: Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 273:11548-11555, 1998

Inserte,J, Molla,B, Aguilar,R, Traves,PG, Barba,I, Martin-Sanz,P, Bosca,L, Casado,M, Garcia-Dorado,D: Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 46:160-168, 2009

Ishizuka,T, Cheng,J, Singh,H, Vitto,MD, Manthali,VL, Falck,JR, Laniado-Schwartzman,M: 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 324:103-110, 2008

Itani,SI, Ruderman,NB, Schmedier,F, Boden,G: Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 51:2005-2011, 2002

J

JeBailey,L, Wanono,O, Niu,W, Roessler,J, Rudich,A, Klip,A: Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells. *Diabetes* 56:394-403, 2007

Jiang,ZY, Zhou,QL, Coleman,KA, Chouinard,M, Boese,Q, Czech,MP: Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7569-7574, 2003

Jimenez,R, Belcher,E, Sriskandan,S, Lucas,R, McMaster,S, Vojnovic,I, Warner,TD, Mitchell,JA: Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4637-4642, 2005

Jove,M, Salla,J, Planavila,A, Cabrero,A, Michalik,L, Wahli,W, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPARgamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *J Lipid Res* 45:113-123, 2004

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

Jove,M, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Agonist-induced activation releases peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta from its inhibition by palmitate-induced nuclear factor-kappaB in skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1734:52-61, 2005b

Jove,M, Planavila,A, Sanchez,RM, Merlos,M, Laguna,JC, Vazquez-Carrera,M: Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation. *Endocrinology* 147:552-561, 2006

K

Kahn,BB, Alquier,T, Carling,D, Hardie,DG: AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15-25, 2005

Kam,PC, See,AU: Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55:442-449, 2000

Kamei,Y, Ohizumi,H, Fujitani,Y, Nemoto,T, Tanaka,T, Takahashi,N, Kawada,T, Miyoshi,M, Ezaki,O, Kakizuka,A: PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12378-12383, 2003

Kefaloyianni,E, Gaitanaki,C, Beis,I: ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 18:2238-2251, 2006

Kelley,DE, Mokan,M, Simoneau,JA, Mandarino,LJ: Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 92:91-98, 1993

- Kelley,DE, Simoneau,JA: Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94:2349-2356, 1994
- Kelley,DE, Goodpaster,B, Wing,RR, Simoneau,JA: Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277:E1130-E1141, 1999
- Kelley,DE, Goodpaster,BH: Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 24:933-941, 2001
- Kelley,DE, He,J, Menshikova,EV, Ritov,VB: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950, 2002
- Kelly,M, Keller,C, Avilucea,PR, Keller,P, Luo,Z, Xiang,X, Giralt,M, Hidalgo,J, Saha,AK, Pedersen,BK, Ruderman,NB: AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 320:449-454, 2004
- Kern,PA, Saghizadeh,M, Ong,JM, Bosch,RJ, Deem,R, Simsolo,RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111-2119, 1995
- Kern,PA, Ranganathan,S, Li,C, Wood,L, Ranganathan,G: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-E751, 2001
- Kerner,J, Hoppel,C: Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1486:1-17, 2000
- Kim,KH: Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 17:77-99, 1997
- Kim,YB, Nikoulina,SE, Ciaraldi,TP, Henry,RR, Kahn,BB: Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104:733-741, 1999
- Kim,JY, Hickner,RC, Cortright,RL, Dohm,GL, Houmard,JA: Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1039-E1044, 2000
- Kim,JK, Kim,YJ, Fillmore,JJ, Chen,Y, Moore,I, Lee,J, Yuan,M, Li,ZW, Karin,M, Perret,P, Shoelson,SE, Shulman,GI: Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-446, 2001
- Kim,YB, Kotani,K, Ciaraldi,TP, Henry,RR, Kahn,BB: Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes* 52:1935-1942, 2003
- Kim,JK, Fillmore,JJ, Sunshine,MJ, Albrecht,B, Higashimori,T, Kim,DW, Liu,ZX, Soos,TJ, Cline,GW, O'Brien,WR, Littman,DR, Shulman,GI: PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114:823-827, 2004a
- Kim,HJ, Higashimori,T, Park,SY, Choi,H, Dong,J, Kim,YJ, Noh,HL, Cho,YR, Cline,G, Kim,YB, Kim,JK: Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53:1060-1067, 2004b

- Kim,JA, Wei,Y, Sowers,JR: Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102:401-414, 2008
- Kleiner,S, Nguyen-Tran,V, Bare,O, Huang,X, Spiegelman,BM, Wu,Z: PPARdelta agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1alpha but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem* 2009
- Kleinfeld,AM: Lipid phase fatty acid flip-flop, is it fast enough for cellular transport? *J Membr Biol* 175:79-86, 2000
- Knutti,D, Kressler,D, Kralli,A: Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9713-9718, 2001
- Kohn,LD, Wallace,B, Schwartz,F, McCall,K: Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? *Endocrinology* 146:4189-4191, 2005
- Kola,B, Boscaro,M, Rutter,GA, Grossman,AB, Korbonits,M: Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 17:205-215, 2006
- Konheim,YL, Wolford,JK: Association of a promoter variant in the inducible cyclooxygenase-2 gene (PTGS2) with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Hum Genet* 113:377-381, 2003
- Kopp,HP, Kopp,CW, Festa,A, Krzyzanowska,K, Kriwanek,S, Minar,E, Roka,R, Scherthaner,G: Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1042-1047, 2003
- Kosmidou,I, Vassilakopoulos,T, Xagorari,A, Zakynthinos,S, Papapetropoulos,A, Roussos,C: Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:587-593, 2002
- Koves,TR, Li,P, An,J, Akimoto,T, Slentz,D, Ilkayeva,O, Dohm,GL, Yan,Z, Newgard,CB, Muoio,DM: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* 280:33588-33598, 2005a
- Koves,TR, Noland,RC, Bates,AL, Henes,ST, Muoio,DM, Cortright,RN: Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1074-C1082, 2005b
- Koves,TR, Ussher,JR, Noland,RC, Slentz,D, Mosedale,M, Ilkayeva,O, Bain,J, Stevens,R, Dyck,JR, Newgard,CB, Lopaschuk,GD, Muoio,DM: Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7:45-56, 2008
- Kraegen,EW, Saha,AK, Preston,E, Wilks,D, Hoy,AJ, Cooney,GJ, Ruderman,NB: Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E471-E479, 2006
- Kraegen,EW, Cooney,GJ, Turner,N: Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7627-7628, 2008

Kramer,DK, Al-Khalili,L, Guigas,B, Leng,Y, Garcia-Roves,PM, Krook,A: Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 282:19313-19320, 2007

Krebs,M, Roden,M: Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Curr Med Chem* 11:901-908, 2004

Kressler,D, Schreiber,SN, Knutti,D, Kralli,A: The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 277:13918-13925, 2002

Kristiansen,OP, Mandrup-Poulsen,T: Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2:S114-S124, 2005

Krook,A, Kawano,Y, Song,XM, Efendic,S, Roth,RA, Wallberg-Henriksson,H, Zierath,JR: Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46:2110-2114, 1997

L

Lagathu,C, Bastard,JP, Auclair,M, Maachi,M, Capeau,J, Caron,M: Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 311:372-379, 2003

Lanas,A, Panes,J, Pique,JM: Clinical implications of COX-1 and/or COX-2 inhibition for the distal gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 9:2253-2266, 2003

Lang,CH, Silvis,C, Deshpande,N, Nystrom,G, Frost,RA: Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 19:538-546, 2003

Lardizabal,KD, Mai,JT, Wagner,NW, Wyrick,A, Voelker,T, Hawkins,DJ: DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J Biol Chem* 276:38862-38869, 2001

Larsson,L, Edstrom,L, Lindegren,B, Gorza,L, Schiaffino,S: MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol* 261:C93-101, 1991

Lawrence,T, Willoughby,DA, Gilroy,DW: Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2:787-795, 2002

Lazar,MA: How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307:373-375, 2005

Lazennec,G, Canaple,L, Saugy,D, Wahli,W: Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* 14:1962-1975, 2000

Lee,AD, Hansen,PA, Holloszy,JO: Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett* 361:51-54, 1995

Lee,JY, Sohn,KH, Rhee,SH, Hwang,D: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:16683-16689, 2001

- Lee,JY, Plakidas,A, Lee,WH, Heikkinen,A, Chanmugam,P, Bray,G, Hwang,DH: Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 44:479-486, 2003a
- Lee,CH, Chawla,A, Urbiztondo,N, Liao,D, Boisvert,WA, Evans,RM, Curtiss,LK: Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302:453-457, 2003b
- Lee,JY, Zhao,L, Youn,HS, Weatherill,AR, Tapping,R, Feng,L, Lee,WH, Fitzgerald,KA, Hwang,DH: Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem* 279:16971-16979, 2004
- Lee,JS, Pinnamaneni,SK, Eo,SJ, Cho,IH, Pyo,JH, Kim,CK, Sinclair,AJ, Febbraio,MA, Watt,MJ: Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* 100:1467-1474, 2006
- Lehman,JJ, Barger,PM, Kovacs,A, Saffitz,JE, Medeiros,DM, Kelly,DP: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106:847-856, 2000
- Lemaitre,B, Nicolas,E, Michaut,L, Reichhart,JM, Hoffmann,JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983, 1996
- Leng,Y, Steiler,TL, Zierath,JR: Effects of insulin, contraction, and phorbol esters on mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from lean and ob/ob mice. *Diabetes* 53:1436-1444, 2004
- Leone,TC, Lehman,JJ, Finck,BN, Schaeffer,PJ, Wende,AR, Boudina,S, Courtois,M, Wozniak,DF, Sambandam,N, Bernal-Mizrachi,C, Chen,Z, Holloszy,JO, Medeiros,DM, Schmidt,RE, Saffitz,JE, Abel,ED, Semenkovich,CF, Kelly,DP: PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3:e101, 2005
- Lessard,SJ, Rivas,DA, Chen,ZP, Bonen,A, Febbraio,MA, Reeder,DW, Kemp,BE, Yaspelkis,BB, III, Hawley,JA: Tissue-specific effects of rosiglitazone and exercise in the treatment of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 56:1856-1864, 2007
- Li,L: Regulation of innate immunity signaling and its connection with human diseases. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 3:81-86, 2004
- Li,SY, Liu,Y, Sigmon,VK, McCort,A, Ren,J: High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes Obes Metab* 7:448-454, 2005
- Lin,Y, Lee,H, Berg,AH, Lisanti,MP, Shapiro,L, Scherer,PE: The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275:24255-24263, 2000
- Lin,J, Puigserver,P, Donovan,J, Tarr,P, Spiegelman,BM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 277:1645-1648, 2002a

Lin,J, Wu,H, Tarr,PT, Zhang,CY, Wu,Z, Boss,O, Michael,LF, Puigserver,P, Isotani,E, Olson,EN, Lowell,BB, Bassel-Duby,R, Spiegelman,BM: Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801, 2002b

Listenberger,LL, Han,X, Lewis,SE, Cases,S, Farese,RV, Jr., Ory,DS, Schaffer,JE: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3077-3082, 2003

Liu,L, Zhang,Y, Chen,N, Shi,X, Tsang,B, Yu,YH: Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1679-1689, 2007

Liu,Y, Wan,Q, Guan,Q, Gao,L, Zhao,J: High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 339:701-707, 2006

Lowell,BB, Shulman,GI: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387, 2005

Luiken,JJ, Arumugam,Y, Dyck,DJ, Bell,RC, Pelsers,MM, Turcotte,LP, Tandon,NN, Glatz,JF, Bonen,A: Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J Biol Chem* 276:40567-40573, 2001

Luiken,JJ, Koonen,DP, Willems,J, Zorzano,A, Becker,C, Fischer,Y, Tandon,NN, van,d, V, Bonen,A, Glatz,JF: Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes* 51:3113-3119, 2002

Luiken,JJ, Coort,SL, Willems,J, Coumans,WA, Bonen,A, van,d, V, Glatz,JF: Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 52:1627-1634, 2003

Luo,M, Reyna,S, Wang,L, Yi,Z, Carroll,C, Dong,LQ, Langlais,P, Weintraub,ST, Mandarino,LJ: Identification of insulin receptor substrate 1 serine/threonine phosphorylation sites using mass spectrometry analysis: regulatory role of serine 1223. *Endocrinology* 146:4410-4416, 2005

Luo,J, Sobkiw,CL, Hirshman,MF, Logsdon,MN, Li,TQ, Goodyear,LJ, Cantley,LC: Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell Metab* 3:355-366, 2006

M

Marotta,M, Ferrer-Martinez,A, Parnau,J, Turini,M, Mace,K, Gomez Foix,AM: Fiber type- and fatty acid composition-dependent effects of high-fat diets on rat muscle triacylglyceride and fatty acid transporter protein-1 content. *Metabolism* 53:1032-1036, 2004

Martin,G, Schoonjans,K, Lefebvre,AM, Staels,B, Auwerx,J: Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272:28210-28217, 1997

Matsuguchi,T, Musikachoen,T, Ogawa,T, Yoshikai,Y: Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 165:5767-5772, 2000

- McCormack,K: Roles of COX-1 and COX-2. *J Rheumatol* 25:2279-2281, 1998
- McDermott,MF: TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 47:619-635, 2001
- McGarry,JD, Brown,NF: The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244:1-14, 1997
- Mendez,MA, Popkin,BM, Jakszyn,P, Berenguer,A, Tormo,MJ, Sanchez,MJ, Quiros,JR, Pera,G, Navarro,C, Martinez,C, Larranaga,N, Dorronsoro,M, Chirlaque,MD, Barricarte,A, Ardanaz,E, Amiano,P, Agudo,A, Gonzalez,CA: Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *J Nutr* 136:2934-2938, 2006
- Merrill,AH, Jr., Jones,DD: An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1044:1-12, 1990
- Michael,LF, Wu,Z, Cheatham,RB, Puigserver,P, Adelmant,G, Lehman,JJ, Kelly,DP, Spiegelman,BM: Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3820-3825, 2001
- Mihalik,SJ, Steinberg,SJ, Pei,Z, Park,J, Kim,DG, Heinzer,AK, Dacremont,G, Wanders,RJ, Cuebas,DA, Smith,KD, Watkins,PA: Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem* 277:24771-24779, 2002
- Molero,JC, Jensen,TE, Withers,PC, Couzens,M, Herzog,H, Thien,CB, Langdon,WY, Walder,K, Murphy,MA, Bowtell,DD, James,DE, Cooney,GJ: c-Cbl-deficient mice have reduced adiposity, higher energy expenditure, and improved peripheral insulin action. *J Clin Invest* 114:1326-1333, 2004
- Moller,DE, Berger,JP: Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S17-S21, 2003
- Montell,E, Turini,M, Marotta,M, Roberts,M, Noe,V, Ciudad,CJ, Mace,K, Gomez-Foix,AM: DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E229-E237, 2001
- Mootha,VK, Lindgren,CM, Eriksson,KF, Subramanian,A, Sihag,S, Lehar,J, Puigserver,P, Carlsson,E, Ridderstrale,M, Laurila,E, Houstis,N, Daly,MJ, Patterson,N, Mesirov,JP, Golub,TR, Tamayo,P, Spiegelman,B, Lander,ES, Hirschhorn,JN, Altshuler,D, Groop,LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003
- Morino,K, Petersen,KF, Shulman,GI: Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2:S9-S15, 2006
- Morino,K, Neschen,S, Bilz,S, Sono,S, Tsigotis,D, Reznick,RM, Moore,I, Nagai,Y, Samuel,V, Sebastian,D, White,M, Philbrick,W, Shulman,GI: Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 57:2644-2651, 2008
- Moro,C, Bajpeyi,S, Smith,SR: Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E203-E213, 2008

Mortensen,OH, Frandsen,L, Schjerling,P, Nishimura,E, Grunnet,N: PGC-1alpha and PGC-1beta have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E807-E816, 2006

Motojima,K, Passilly,P, Peters,JM, Gonzalez,FJ, Latruffe,N: Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273:16710-16714, 1998

Mu,J, Brozinick,JT, Jr., Valladares,O, Bucan,M, Birnbaum,MJ: A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085-1094, 2001

Mueckler,M: Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *J Clin Invest* 107:1211-1213, 2001

Muller,SD, Muller,MR, Huber,M, Esche,UU, Kirschning,CJ, Wagner,H, Bessler,WG, Mittenbuhler,K: Triacyl-lipopentapeptide adjuvants: TLR2-dependent activation of macrophages and modulation of receptor-mediated cell activation by altering acyl-moieties. *Int Immunopharmacol* 4:1287-1300, 2004

Munday,MR: Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 30:1059-1064, 2002

Muzio,M, Polentarutti,N, Bosisio,D, Manoj Kumar,PP, Mantovani,A: Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 28:563-566, 2000

N

Narumiya,S, Sugimoto,Y, Ushikubi,F: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226, 1999

Netea,MG, van der,GC, Van der Meer,JW, Kullberg,BJ: Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 75:749-755, 2004

Nikoulina,SE, Ciaraldi,TP, Carter,L, Mudaliar,S, Park,KS, Henry,RR: Impaired muscle glycogen synthase in type 2 diabetes is associated with diminished phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4307-4314, 2001

O

Oh,W, Abu-Elheiga,L, Kordari,P, Gu,Z, Shaikenov,T, Chirala,SS, Wakil,SJ: Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1384-1389, 2005

Oliver,WR, Jr., Shenk,JL, Snaith,MR, Russell,CS, Plunket,KD, Bodkin,NL, Lewis,MC, Winegar,DA, Sznaidman,ML, Lambert,MH, Xu,HE, Sternbach,DD, Kliewer,SA, Hansen,BC, Willson,TM: A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5306-5311, 2001

P

Palanivel,R, Maida,A, Liu,Y, Sweeney,G: Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* 49:183-190, 2006

- Palomer,X, Alvarez-Guardia,D, Rodriguez-Calvo,R, Coll,T,Laguna,JC,Davidson,MM,Chan,TO, Feldman,AM, Vazquez-Carrera,M: TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc.Res.* 81:703-712, 2009
- Palona,I, Namba,H, Mitsutake,N, Starenki,D, Podtcheko,A, Sedliarou,I, Ohtsuru,A, Saenko,V, Nagayama,Y, Umezawa,K, Yamashita,S: BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology* 147:5699-5707, 2006
- Pan,DA, Lillioja,S, Milner,MR, Kriketos,AD, Baur,LA, Bogardus,C, Storlien,LH: Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest* 96:2802-2808, 1995
- Patel,NM, Nozaki,S, Shortle,NH, Bhat-Nakshatri,P, Newton,TR, Rice,S, Gelfanov,V, Boswell,SH, Goulet,RJ, Jr., Sledge,GW, Jr., Nakshatri,H: Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene* 19:4159-4169, 2000
- Patti,ME, Butte,AJ, Crunkhorn,S, Cusi,K, Berria,R, Kashyap,S, Miyazaki,Y, Kohane,I, Costello,M, Saccone,R, Landaker,EJ, Goldfine,AB, Mun,E, DeFronzo,R, Finlayson,J, Kahn,CR, Mandarino,LJ: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471, 2003
- Pauley,CJ, Ledwith,BJ, Kaplanski,C: Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent mechanisms. *Cell Signal* 14:351-358, 2002
- Peebles,RS, Jr., Hashimoto,K, Morrow,JD, Dworski,R, Collins,RD, Hashimoto,Y, Christman,JW, Kang,KH, Jarzecka,K, Furlong,J, Mitchell,DB, Talati,M, Graham,BS, Sheller,JR: Selective cyclooxygenase-1 and -2 inhibitors each increase allergic inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1154-1160, 2002
- Pei,Z, Fraisl,P, Berger,J, Jia,Z, Forss-Petter,S, Watkins,PA: Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J Biol Chem* 279:54454-54462, 2004
- Perdomo,G, Commerford,SR, Richard,AM, Adams,SH, Corkey,BE, O'Doherty,RM, Brown,NF: Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 279:27177-27186, 2004
- Perkins,ND: Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49-62, 2007
- Petersen,KF, Befroy,D, Dufour,S, Dziura,J, Ariyan,C, Rothman,DL, DiPietro,L, Cline,GW, Shulman,GI: Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300:1140-1142, 2003
- Petersen,AM, Pedersen,BK: The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98:1154-1162, 2005
- Petersen,KF, Shulman,GI: New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1:34S-40S, 2006

Pickersgill,L, Litherland,GJ, Greenberg,AS, Walker,M, Yeaman,SJ: Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells. *J Biol Chem* 282:12583-12589, 2007

Pickup,JC, Crook,MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241-1248, 1998

Pieper,GM, Riaz,uH: Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:528-532, 1997

Pilegaard,H, Saltin,B, Neufer,PD: Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546:851-858, 2003

Pillinger,MH, Dinsell,V, Apsel,B, Tolani,SN, Marjanovic,N, Chan,ES, Gomez,P, Clancy,R, Chang,LF, Abramson,SB: Regulation of metalloproteinases and NF-kappaB activation in rabbit synovial fibroblasts via E prostaglandins and Erk: contrasting effects of nabumetone and 6MNA. *Br J Pharmacol* 142:973-982, 2004

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

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

Powell,DJ, Turban,S, Gray,A, Hajduch,E, Hundal,HS: Intracellular ceramide synthesis and protein kinase Czeta activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 382:619-629, 2004

Pradhan,AD, Manson,JE, Rifai,N, Buring,JE, Ridker,PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334, 2001

Previs,SF, Withers,DJ, Ren,JM, White,MF, Shulman,GI: Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 275:38990-38994, 2000

Proctor,DN, Sinning,WE, Walro,JM, Sieck,GC, Lemon,PW: Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* 78:2033-2038, 1995

Puigserver,P, Wu,Z, Park,CW, Graves,R, Wright,M, Spiegelman,BM: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839, 1998

Puigserver,P, Rhee,J, Lin,J, Wu,Z, Yoon,JC, Zhang,CY, Krauss,S, Mootha,VK, Lowell,BB, Spiegelman,BM: Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8:971-982, 2001

R

Rabe,K, Lehrke,M, Parhofer,KG, Broedl,UC: Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14:741-751, 2008

Rachek,LI, Musiyenko,SI, LeDoux,SP, Wilson,GL: Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148:293-299, 2007

- Raj,DS, Dominic,EA, Pai,A, Osman,F, Morgan,M, Pickett,G, Shah,VO, Ferrando,A, Moseley,P: Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease. *Kidney Int* 68:2338-2344, 2005
- Randle,PJ, Garland,PB, Hales,CN, Newsholme,EA: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789, 1963
- Rasmussen,BB, Holmback,UC, Volpi,E, Morio-Liondore,B, Paddon-Jones,D, Wolfe,RR: Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 110:1687-1693, 2002
- Rea,S, James,DE: Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46:1667-1677, 1997
- Reaven,GM, Hollenbeck,C, Jeng,CY, Wu,MS, Chen,YD: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37:1020-1024, 1988
- Reddy,JK, Hashimoto,T: Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21:193-230, 2001
- Reyna,SM, Ghosh,S, Tantiwong,P, Meka,CS, Eagan,P, Jenkinson,CP, Cersosimo,E, Defronzo,RA, Coletta,DK, Sriwijitkamol,A, Musi,N: Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57:2595-2602, 2008
- Reznick,RM, Shulman,GI: The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* 574:33-39, 2006
- Rhee,SH, Hwang,D: Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 275:34035-34040, 2000
- Riccardi,G, Giacco,R, Rivellese,AA: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23:447-456, 2004
- Riserus,U, Sprecher,D, Johnson,T, Olson,E, Hirschberg,S, Liu,A, Fang,Z, Hegde,P, Richards,D, Sarov-Blat,L, Strum,JC, Basu,S, Cheeseman,J, Fielding,BA, Humphreys,SM, Danoff,T, Moore,NR, Murgatroyd,P, O'Rahilly,S, Sutton,P, Willson,T, Hassall,D, Frayn,KN, Karpe,F: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* 57:332-339, 2008
- Ritov,VB, Menshikova,EV, He,J, Ferrell,RE, Goodpaster,BH, Kelley,DE: Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8-14, 2005
- Roden,M, Petersen,KF, Shulman,GI: Nuclear magnetic resonance studies of hepatic glucose metabolism in humans. *Recent Prog Horm Res* 56:219-237, 2001
- Rossi,A, Kapahi,P, Natoli,G, Takahashi,T, Chen,Y, Karin,M, Santoro,MG: Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkkappaB kinase. *Nature* 403:103-108, 2000

Rotter,V, Nagaev,I, Smith,U: Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-45784, 2003

Ruan,H, Pownall,HJ, Lodish,HJ: Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem*. 278:28181-28192, 2003

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

Russell,AP: Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4:S66-S71, 2004

Ryan,M, McInerney,D, Owens,D, Collins,P, Johnson,A, Tomkin,GH: Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM* 93:85-91, 2000

S

Saad,MJ, Araki,E, Miralpeix,M, Rothenberg,PL, White,MF, Kahn,CR: Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90:1839-1849, 1992

Sabin,MA, Stewart,CE, Crowne,EC, Turner,SJ, Hunt,LP, Welsh,GI, Grohmann,MJ, Holly,JM, Shield,JP: Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *J Cell Physiol* 211:244-252, 2007

Saghizadeh,M, Ong,JM, Garvey,WT, Henry,RR, Kern,PA: The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97:1111-1116, 1996

Saha,AK, Schwarsin,AJ, Roduit,R, Masse,F, Kaushik,V, Tornheim,K, Prentki,M, Ruderman,NB: Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275:24279-24283, 2000

Sajan,MP, Standaert,ML, Miura,A, Bandyopadhyay,G, Vollenweider,P, Franklin,DM, Lea-Currie,R, Farese,RV: Impaired activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 in cultured preadipocyte-derived adipocytes and myotubes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3994-3998, 2004

Sakamoto,A, Matsumura,J, Mii,S, Gotoh,Y, Ogawa,R: A prostaglandin E2 receptor subtype EP4 agonist attenuates cardiovascular depression in endotoxin shock by inhibiting inflammatory cytokines and nitric oxide production. *Shock* 22:76-81, 2004

Saltiel,AR, Kahn,CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001

Sampson,SR,Cooper,DR: Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol.Genet.Metab* 89:32-47, 2006

- Sanders,MJ, Grondin,PO, Hegarty,BD, Snowden,MA, Carling,D: Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403:139-148, 2007
- Sandig,H,Pease,JE, Sabroe,I: Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD2 and its metabolites in leukocyte function. *J.Leukoc.Biol.* 81:372-382, 2007
- Sano,H, Kane,S, Sano,E, Miinea,CP, Asara,JM, Lane,WS, Garner,CW, Lienhard,GE: Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278:14599-14602, 2003
- Savage,DB, Petersen,KF, Shulman,GI: Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 87:507-520, 2007
- Sawka-Verhelle,D, Tartare-Deckert,S, White,MF, Van,OE: Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 271:5980-5983, 1996
- Scher,JU, Pillinger,MH: 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114:100-109, 2005
- Schmidt,MI, Duncan,BB: Diabesity: an inflammatory metabolic condition. *Clin Chem Lab Med* 41:1120-1130, 2003
- Schmitz-Peiffer,C, Browne,CL, Oakes,ND, Watkinson,A, Chisholm,DJ, Kraegen,EW, Biden,TJ: Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes* 46:169-178, 1997
- Schmitz-Peiffer,C, Craig,DL, Biden,TJ: Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274:24202-24210, 1999
- Schmitz-Peiffer,C: Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 967:146-157, 2002
- Schrauwen,P: High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 66:33-41, 2007
- Schroder,H, Marrugat,J, Vila,J, Covas,MI, Elosua,R: Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J Nutr* 134:3355-3361, 2004
- Schwenger,P, Alpert,D, Skolnik,EY, Vilcek,J: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B alpha phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol* 18:78-84, 1998
- Sebastian,D, Herrero,L, Serra,D, Asins,G, Hegardt,FG: CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E677-E686, 2007
- Seidell,JC: Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S5-S8, 2000
- Senn,JJ, Klover,PJ, Nowak,IA, Mooney,RA: Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51:3391-3399, 2002

- Senn,JJ: Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281:26865-26875, 2006
- Sesti,G, Federici,M, Hribal,ML, Lauro,D, Sbraccia,P, Lauro,R: Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15:2099-2111, 2001
- Sesti,G: Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:665-679, 2006
- Shanmugam,N, Kim,YS, Lanting,L, Natarajan,R: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 278:34834-34844, 2003
- Shaw,RJ, Kosmatka,M, Bardeesy,N, Hurley,RL, Witters,LA, DePinho,RA, Cantley,LC: The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3329-3335, 2004
- Shen,W, Li,Y, Tang,Y, Cummins,J, Huard,J: NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol* 167:1105-1117, 2005
- Shen,W, Prisk,V, Li,Y, Foster,W, Huard,J: Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2alpha. *J Appl Physiol* 101:1215-1221, 2006
- Shepherd,PR, Withers,DJ, Siddle,K: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3):471-490, 1998
- Shepherd,PR, Kahn,BB: Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-257, 1999
- Shi,H, Kokoeva,MV, Inouye,K, Tzameli,I, Yin,H, Flier,JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025, 2006
- Shibata,T, Kondo,M, Osawa,T, Shibata,N, Kobayashi,M, Uchida,K: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J.Biol.Chem.* 277:10459-10466, 2002
- Shoelson,SE, Lee,J, Yuan,M: Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S49-S52, 2003
- Shoelson,SE, Lee,J, Goldfine,AB: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801, 2006
- Shubair,MM, McColl,RS, Hanning,RM: Mediterranean dietary components and body mass index in adults: the peel nutrition and heart health survey. *Chronic Dis Can* 26:43-51, 2005
- Shulman,GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176, 2000
- Simoneau,JA, Veerkamp,JH, Turcotte,LP, Kelley,DE: Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 13:2051-2060, 1999
- Skovbro,M, Baranowski,M, Skov-Jensen,C, Flint,A, Dela,F, Gorski,J, Helge,JW: Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity. *Diabetologia* 51:1253-1260, 2008

- Son,YH, Jeong,YT, Lee,KA, Choi,KH, Kim,SM, Rhim,BY, Kim,K: Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:71-77, 2008
- Sparks,LM, Xie,H, Koza,RA, Mynatt,R, Hulver,MW, Bray,GA, Smith,SR: A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54:1926-1933, 2005
- Sprecher,DL, Massien,C, Pearce,G, Billin,AN, Perlstein,I, Willson,TM, Hassall,DG, Ancellin,N, Patterson,SD, Lobe,DC, Johnson,TG: Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:359-365, 2007
- St-Pierre,J, Lin,J, Krauss,S, Tarr,PT, Yang,R, Newgard,CB, Spiegelman,BM: Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* 278:26597-26603, 2003
- Stahl,A: A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch* 447:722-727, 2004
- Staiger,H, Staiger,K, Stefan,N, Wahl,HG, Machicao,F, Kellerer,M, Haring,HU: Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes* 53:3209-3216, 2004
- Steinberg,GR, Smith,AC, Van Denderen,BJ, Chen,Z, Murthy,S, Campbell,DJ, Heigenhauser,GJ, Dyck,DJ, Kemp,BE: AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4575-4580, 2004
- Stenbit,AE, Tsao,TS, Li,J, Burcelin,R, Geenen,DL, Factor,SM, Houseknecht,K, Katz,EB, Charron,MJ: GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3:1096-1101, 1997
- Steneberg,P, Rubins,N, Bartoov-Shifman,R, Walker,MD, Edlund,H: The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1:245-258, 2005
- Stone,SJ, Myers,HM, Watkins,SM, Brown,BE, Feingold,KR, Elias,PM, Farese,RV, Jr.: Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 279:11767-11776, 2004
- Straczkowski,M, Kowalska,I, Nikolajuk,A, Dzienis-Straczkowska,S, Kinalska,I, Baranowski,M, Zendzian-Piotrowska,M, Brzezinska,Z, Gorski,J: Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* 53:1215-1221, 2004
- Straczkowski,M, Kowalska,I, Baranowski,M, Nikolajuk,A, Otziomek,E, Zabielski,P, Adamska,A, Blachnio,A, Gorski,J, Gorska,M: Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 50:2366-2373, 2007
- Straus,DS, Pascual,G, Li,M, Welch,JS, Ricote,M, Hsiang,CH, Sengchanthalangsy,LL, Ghosh,G, Glass,CK: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4844-4849, 2000

Stump,CS, Henriksen,EJ, Wei,Y, Sowers,JR: The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med* 38:389-402, 2006

Su,CG, Lewis,JD: Antineoplastic and anti-inflammatory effects of PPAR ligands in colitis. *Gastroenterology* 121:1019-1021, 2001

Summers,SA: Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45:42-72, 2006

Sun,XJ, Crimmins,DL, Myers,MG, Jr., Miralpeix,M, White,MF: Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13:7418-7428, 1993

T

Tamemoto,H, Kadowaki,T, Tobe,K, Yagi,T, Sakura,H, Hayakawa,T, Terauchi,Y, Ueki,K, Kaburagi,Y, Satoh,S, .: Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182-186, 1994

Tanabe,T, Tohno,N: Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:95-114, 2002

Tanaka,T, Yamamoto,J, Iwasaki,S, Asaba,H, Hamura,H, Ikeda,Y, Watanabe,M, Magoori,K, Ioka,RX, Tachibana,K, Watanabe,Y, Uchiyama,Y, Sumi,K, Iguchi,H, Ito,S, Doi,T, Hamakubo,T, Naito,M, Auwerx,J, Yanagisawa,M, Kodama,T, Sakai,J: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15924-15929, 2003

Tarnopolsky,MA, Rennie,CD, Robertshaw,HA, Fedak-Tarnopolsky,SN, Devries,MC, Hamadeh,MJ: Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1271-R1278, 2007

Taylor,EB, Lamb,JD, Hurst,RW, Chesser,DG, Ellingson,WJ, Greenwood,LJ, Porter,BB, Herway,ST, Winder,WW: Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1alpha protein abundance: effects of time and intensity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E960-E968, 2005

Terada,S, Wicke,S, Holloszy,JO, Han,DH: PPARdelta activator GW-501516 has no acute effect on glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E607-E611, 2006

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

Teyssier,C, Ma,H, Emter,R, Kralli,A, Stallcup,MR: Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* 19:1466-1473, 2005

Thirone,AC, Huang,C, Klip,A: Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17:72-78, 2006

Thompson,AL, Lim-Fraser,MY, Kraegen,EW, Cooney,GJ: Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E577-E584, 2000

Thrush,AB, Heigenhauser,GJ, Mullen,KL, Wright,DC, Dyck,DJ: Palmitate acutely induces insulin resistance in isolated muscle from obese but not lean humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1205-R1212, 2008

Thyfault,JP, Kraus,RM, Hickner,RC, Howell,AW, Wolfe,RR, Dohm,GL: Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E1076-E1081, 2004

Tilg,H, Moschen,AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783, 2006

Timmers,S, Schrauwen,P, de,VJ: Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* 94:242-251, 2008

Toborek,M, Lee,YW, Garrido,R, Kaiser,S, Hennig,B: Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 75:119-125, 2002

Toker,A, Newton,AC: Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103:185-188, 2000

Towler,MC, Hardie,DG: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100:328-341, 2007

Trivedi,SG, Newson,J, Rajakariar,R, Jacques,TS, Hannon,R, Kanaoka,Y, Eguchi,N, Colville-Nash,P, Gilroy,W: Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.*103:5179-5184, 2006

Turcotte,LP, Srivastava,AK, Chiasson,JL: Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 166:153-158, 1997

U

Uchida,T, Myers,MG, Jr., White,MF: IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol* 20:126-138, 2000

Uysal,KT, Wiesbrock,SM, Marino,MW, Hotamisligil,GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614, 1997

V

van Loon,LJ, Goodpaster,BH: Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 451:606-616, 2006

van Oort,M.M.; van Doorn,J.M.; Hasnaoui,M.E.; Glatz,J.F.; Bonen,A.; van der Horst,D.J.; Rodenburg,K.W.; JJ,P.Luiken: Effects of AMPK activators on the sub-cellular distribution of fatty acid transporters CD36 and FABPpm. *Arch.Physiol Biochem*. In press. 2009

van Heyningen,HC: Lipid metabolism: peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Opin Lipidol* 18:470-472, 2007

Vanhaesebroeck,B, Leever,SJ, Panayotou,G, Waterfield,MD: Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272, 1997

Vessby,B, Unsitupa,M, Hermansen,K, Riccardi,G, Rivellese,AA, Tapsell,LC, Nansen,C, Berglund,L, Louheranta,A, Rasmussen,BM, Calvert,GD, Maffetone,A, Pedersen,E, Gustafsson,IB, Storlien,LH: Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 44:312-319, 2001

Vianna,CR, Huntgeburth,M, Coppari,R, Choi,CS, Lin,J, Krauss,S, Barbatelli,G, Tzameli,I, Kim,YB, Cinti,S, Shulman,GI, Spiegelman,BM, Lowell,BB: Hypomorphic mutation of PGC-1beta causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metab* 4:453-464, 2006

Virkkamaki,A, Korshennikova,E, Seppala-Lindroos,A, Vehkavaara,S, Goto,T, Halavaara,J, Hakkinen,AM, Yki-Jarvinen,H: Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 50:2337-2343, 2001

Vollenweider,P, Menard,B, Nicod,P: Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 51:1052-1059, 2002

W

Wakil,SJ, Abu-Elheiga,LA: Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 50 Suppl:S138-S143, 2009

Wang,YX, Lee,CH, Tjep,S, Yu,RT, Ham,J, Kang,H, Evans,RM: Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-170, 2003

Wang,YX, Zhang,CL, Yu,RT, Cho,HK, Nelson,MC, Bayuga-Ocampo,CR, Ham,J, Kang,H, Evans,RM: Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2:e294, 2004

Warner,TD, Mitchell,JA: Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13371-13373, 2002

Watt,MJ, Southgate,RJ, Holmes,AG, Febbraio,MA: Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J Mol Endocrinol* 33:533-544, 2004

Weatherill,AR, Lee,JY, Zhao,L, Lemay,DG, Youn,HS, Hwang,DH: Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* 174:5390-5397, 2005

Wei,Y, Chen,K, Whaley-Connell,AT, Stump,CS, Ibdah,JA, Sowers,JR: Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R673-R680, 2008

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

Weigert,C, Hennige,AM, Brodbeck,K, Haring,HU, Schleicher,ED: Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E251-E257, 2005a

Weigert,C, Hennige,AM, Brischmann,T, Beck,A, Moeschel,K, Schauble,M, Brodbeck,K, Haring,HU, Schleicher,ED, Lehmann,R: The phosphorylation of Ser318 of insulin receptor substrate 1 is not per se inhibitory in skeletal muscle cells but is necessary to trigger the attenuation of the insulin-stimulated signal. *J Biol Chem* 280:37393-37399, 2005b

Wellen,KE, Hotamisligil,GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119, 2005

Welsh,GI, Hers,I, Berwick,DC, Dell,G, Wherlock,M, Birkin,R, Leney,S, Tavaré,JM: Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem Soc Trans* 33:346-349, 2005

Wen,Y, Gu,J, Chakrabarti,SK, Aylor,K, Marshall,J, Takahashi,Y, Yoshimoto,T, Nadler,JL: The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology* 148:1313-1322, 2007

Wende,AR, Huss,JM, Schaeffer,PJ, Giguere,V, Kelly,DP: PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 25:10684-10694, 2005

Werner,ED, Lee,J, Hansen,L, Yuan,M, Shoelson,SE: Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem* 279:35298-35305, 2004

White,MF: IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E413-E422, 2002

Wu,Q, Ortegon,AM, Tsang,B, Doege,H, Feingold,KR, Stahl,A: FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26:3455-3467, 2006

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

Wymann,MP, Schneider,R: Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:162-176, 2008

X

Xiao,B, Heath,R, Saiu,P, Leiper,FC, Leone,P, Jing,C, Walker,PA, Haire,L, Eccleston,JF, Davis,CT, Martin,SR, Carling,D, Gamblin,SJ: Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449:496-500, 2007

Xu,HE, Lambert,MH, Montana,VG, Parks,DJ, Blanchard,SG, Brown,PJ, Sternbach,DD, Lehmann,JM, Wisely,GB, Willson,TM, Kliewer,SA, Milburn,MV: Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3:397-403, 1999a

Xu,L, Glass,CK, Rosenfeld,MG: Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9:140-147, 1999b

Y

Yamagishi,SI, Edelstein,D, Du,XL, Kaneda,Y, Guzman,M, Brownlee,M: Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276:25096-25100, 2001

Yamauchi,T, Tobe,K, Tamemoto,H, Ueki,K, Kaburagi,Y, Yamamoto-Honda,R, Takahashi,Y, Yoshizawa,F, Aizawa,S, Akanuma,Y, Sonenberg,N, Yazaki,Y, Kadowaki,T: Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16:3074-3084, 1996

Yen,CL, Stone,SJ, Koliwad,S, Harris,C, Farese,RV, Jr.: Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49:2283-2301, 2008

Yu,C, Chen,Y, Cline,GW, Zhang,D, Zong,H, Wang,Y, Bergeron,R, Kim,JK, Cushman,SW, Cooney,GJ, Atcheson,B, White,MF, Kraegen,EW, Shulman,GI: Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277:50230-50236, 2002

Yuan,M, Konstantopoulos,N, Lee,J, Hansen,L, Li,ZW, Karin,M, Shoelson,SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677, 2001

Z

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

Zdychova,J, Komers,R: Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res* 54:1-16, 2005

Zhang,BB, Zhou,G, Li,C: AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9:407-416, 2009

Zierath,JR, He,L, Guma,A, Odegaard,WE, Klip,A, Wallberg-Henriksson,H: Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* 39:1180-1189, 1996

Zong,H, Ren,JM, Young,LH, Pypaert,M, Mu,J, Birnbaum,MJ, Shulman,GI: AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15983-15987, 2002

