



# EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA Y SUS RECEPTORES EN TEJIDO ADIPOSO. REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN LA ADIPOGÉNESIS.

Memoria presentada por

**MELINA MARA MUSRI**

Para optar al título de Doctora en Bioquímica.

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Ramon Gomis** y la **Dra. Roser Casamitjana**, en el laboratorio de Diabetes Experimental del Servicio de Endocrinología del Hospital Clínic de Barcelona.

Melina Mara Musri

Dr Ramon Gomis

Director

Dra. R. Casamitjana

Dr. C. Enrich Bastùs

Codirector

Tutor

Tesis inscrita en el programa de doctorado de Biología Celular en Medicina  
*Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia patologica, Facultat de medicina*  
*Bienio 2003-2004*



“Ciencia. La madre celestial para algunos, una  
vaca aplicada que da leche para otros.”

Goethe

Fotos. Foto de Portada. Inmunocitoquímica de adipocitos con anti acetil H3, anti dimetil H3K4 y anti trimetil H3K4 modificadas con adobe photoshop.

Página iii. Las amigas de Gustav Klimt.

Página 3. Corte histológico de Tejido adiposo blanco.

Página 9. Microscopía electrónica de adipocitos blancos.

Página 25. Esquema de una histona con su DNA asociado.

Página 45. Phylosophy de Gustav Klimt.

Página 49. Detalle del Frizo de Bethoven. "El arte" de Gustav Klimt.

Página 69. Detalle de Medicine de Gustav Klimt.

Página 71. Detalle de Medicine. Hygieia de Gustav Klimt.

Página 99. Jurisprudency de Gustav Klimt.

Página 113. Detalle del Árbol de la vida de Gustav Klimt.

A mis padres, Alba y Humberto  
Quienes me enseñaron sobre la ciencia más importante: el amor.



## **AGRADECIMIENTOS**





Supongo que la mayoría que me conoce sabrá a ciencia cierta que este es mi momento!! Y que además lo aprovecharé... Tengo muchísima gente a quien agradecer... han sido casi 3 añitos, pero muy intensos!!

Cuando llegué a Barcelona lo que menos tenía pensado era embarcarme en el mundo de la investigación; cruzar el charco era para mi una experiencia de viaje. Pero la vida te conduce por caminos que ni te imaginás. Por tanto mi primer y mayor agradecimiento es a la vida que me ha sorprendido y me sigue sorprendiendo!!

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Ramon Gomis y a la Dra. Roser Casamitjana por permitirme realizar esta tesis doctoral. Gracias Roser también por haberme aceptado cuando aparecí aun con muchísimo acento argentino y cara de susto en tu puerta!!

Quiero aclarar que esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo si no hubiera colaborado, aprendido, trabajado, interactuado y entablado una amistad, con la Dra. Marcelina Párrizas. Marce, gracias por hacerme entrar en este mundo, digo entrar de verdad. La pasión por la ciencia la aprendí con vos. Ahora te extraño, aunque no lo creas. Te admiro y aprecio profundamente.

A la gente de hormonal, los que están y los que ya no están. A mis primeras "mamis", Rosa Pagés, Leo (mi abogada particular) y Monste Guillén, con quienes compartí mis primeros días en el clínic. Gracias por todo el cariño que me obsequiaron entre RIAs y risas desde el primer momento. También a Marga y Lluisa, que han dejado claramente demostrado que una PCR puede hacerse con la mejor onda. Quiero agradecer también a Cristina Ferrán "la de la tarde", quien siempre tiene tiempo para darte ánimos por el pasillo. A Pili Pérez, Nuri, Eulalia, a Espe y Mercè. También a la Cristinita, la Vane López y Miriam (mis primeros cafés en el clínic) y a Carmen Cano, con quien nos encontrábamos, al igual que con Monste a horas intempestivas por el pasillo hormonal-bioquímica. También a la Sra. Ana, a María, a Mercè y a Montse quienes hicieron que todo esté limpio y ordenado (perdón por ser la más desordenada de todas!!)

Lo de hormonal es eterno... han pasado por allí grandes valores... A mi querida amiga y compañera Mónica Bescos, quien me rescató, ha sido clave en mi vida en Barcelona. Gracias Moni, por las caminatas, los mates con pipas (mezcla española-argentina), la una que otra ayuda científica y las muchísimas largas charlas. Esto se extiende para Judit Peix (Judico!) quien me encontró en su piso con una gran sonrisa... característico de ella (lo de Londres aun me hace reír a carcajadas... they lie!!). Jamás olvidaré nuestros días en la calle Aragón. Bueno, y

como no al gran grupo del club de la fiamblera o Catering dicho de otra manera. Los momentos de comida, servían para todo, risas, lágrimas, recetas de comidas, comentarios científicos, filosofía y bueno... desahogo!! Toda una terapia para quien se atreve a seguir este camino: a la Dra Josefa Ros, Pepa! Que además me aguantó en cultivos varias veces, a la Dra. Ester Titos, la persona más dulce que he conocido, ánimos Esterica, a la Dra. Natalia Ferrer, otra gran luchadora y una gran persona, a nuestro único hombre, que se abrió camino hacia Paris, el Dr. Daniel Glez., a la mami Monste Bernat, vull dirte que ets una gran persona, siempre allí para lo que la necesites... gracias monste por todo el amor y cariño!! a la gran reciente Dra. Sylvia F. Boj, que como siempre estás en todos lados tu turno viene con otro grupo, y a mi querida compañera de lab. la Dra. Marta López-Parra. Martita!! Cuantos días juntas, frente a frente, vos si que me aguantaste, gracias por escucharme y escucharme y escucharme... gracias por tu amor y comprensión (que siendo Flora necesité mucha!). Serás una mamá maravillosa!!. También quiero agradecer a la gente que compartía estos momentos, (las técnicos y enfermeras de bioquímica). Pero hormonal no se termina allí, a la Dra. Pilar Cejudo, la Pili C, otra amiga que está ahora lejos con un gran descapotable, que siempre da ánimos, con una gran sonrisa enigmática!! (a ver si nos comemos unas facturas en argentina juntas!!). A Guillermo y Leire, no solo por los momentos de pasillo, sino también por la atención con Pancho y Bruno! (y ahora pronto papis!!). A la Dra. Montserrat Batlle, sempre m'has adjudat en tot el que he necessitat y a la Esther "de cardio" con su sonrisa y su cariño siempre al día (volvé al clinic!!). Gracias a Sergio Lario y Cristina, a Blanca, ahora mamá, a Cristina Mur, paciencia Cris; a Jordi, Alex y el Fritz; a Elisenda y Mary que están sufriendo lo mismo en estos días, a los más jovencitos, Javi, Pedro, Alessandro, Marc, Isa, a Sonia (gracias por las primeras enseñanzas), la dulce Anita G., a Raquel, a las fugaces charlas con el reciente Dr. Pau Sancho, la Dra. Loreto Boix y todas las chicas de hepato; también quiero agradecer a la Dra. Francisca Rivera por haberme aceptado en hormonal cuando llegué, al Dr. Joan Clarià, quien siempre está interesado en mis logros, al Dr. Manuel Morales, gracias por todos los consejos informáticos, la Dra. María Jesús y el Dr. Josep Oriola, quien me enseñó uno que otro de los primeros trucos en el laboratorio.

Al meu grup de reserca, el Laboratori de Diabetis Experimental, quienes tuvieron la suerte de aguantarme por momentos... a las 8 y 15 de la mañana en los seminarios (cuando llegaba puntual), mis escapadas a "hacer la compra", y obviamente los cafés y meetings diarios. A la Belén, que encuentro en los mismos sitios y hablamos en clave de lo interesante que es la ciencia, a la Martita, ya sabés que admiro tu orden, gracias por los pedidos de último momento y la paciencia con mis impaciencias, a Sandra con sus consejos de vida que me han sido útiles (al final algo aprendí) a Helena, a Eugenia, a Silvia Barcelo, suerte en mis tierras, a Felip, a Rosa, a Conxi, Laura, Ainoa, Mamen, a Albert, vos si que tenés buena onda! Gracias por la mano en Munich! al Nacho, a ver si terminás que al final la leptina no es para tanto che!, a la Silvia Casas, otra dulzura que anda suelta, a la Marzo, Nuri, gracias por los ánimos que siempre me das, suerte en Italia campeona!, a María y nuestras confesiones rápidas, a la Palau, niña

que no queda mucho, tenés que acabarlo! Al Jordi... otro que me ayuda a cerrar las puertas del hospital, que sepas que admiro tu capacidad! Terminá eso Jordi y andá a enseñar al mundo lo que sabés! A la moreno, Silvia! Pensarás que estoy loca, pero hay cosas que solo entendés vos... a ver esa cervecita!!;

A mi otro grupo... se que he sido una infiltrada, pero la vida es así, la afinidad no se elige, la tenés o no... Mi gente de los tantos desayunos en el Fornet, de cada duda y no sólo de ciencia, de escapadas por ahí, de escapadas por aquí: al Miguel, el más paciente y mejor canulador y citoquimiquero, a Joan Marc, a ver si me das unas clases de ese tan buen castellano..., a Meritxell, niña, que paciencia con el grupo!!, a Marta, muchísima suerte en el nuevo emprendimiento!, a Myriam, la baby del grupo... danos un respiro que estamos viejitos... no te podemos seguir, a Joris, a la Neus, que fins i tot ha estat poc de temps al clínic, hem continuat aquet camí molt a prop, Merci maca y... quin festival!!!. Y al fin ahora si es tu momento, a la Dra. Sylvia Fernandez Boj (a mi también me gusta pronunciarlo todo); Syl, sos una persona infinitamente especial, (no voy a entrar en eso de que a nivel científico y personal, porque ya lo sabemos) sos especial en todo, gracias por los ánimos, por la confianza, por el apoyo, por tu amistad incondicional. A Reini, tía, vos vas a llegar lejos, gracias por la ayuda, y por compartir mis manías artísticas, costó lo nuestro eh? Pero ahí estamos!. A mi querida compatriota, la Dra. Carina Cardalda, Cari, que te voy a decir, amiga, has estado siempre en todo y demostrás con cada gesto y palabra que estarás. Eso es mucho y lo valoro. Se que me entendés viste? Y a mi niña del alma (que mataría muchas veces) a Natalia del Pozo Ramos, nat, mi nati. Gracias por tus mimos y tus locuras, al fin he estado en España. Vivir con vos fue hermoso... tal vez repitamos algún día no?...

Quiero hacer una mención especial al Dr. Víctor Peinado (mi actual jefe) y a todo el grupo del Laboratorio de Función Pulmonar. Si no hubiera estado aquí, esto no se terminaba nunca! Gracias Víctor por la acogida, he aprendido muchas cosas: que los jefes pueden ser amigos, que no es necesario presionar para obtener resultados y que no quiero trabajar con cobayas en el futuro! Jeje. Al Dr. Ricardo Bastos, gracias por varias cosas también, te leíste mi tesis (que es mucho), y aunque me ganaste alguna apuesta, me enseñas de otras cosas, aunque quisiera saber como se aprende tanto en una sola vida. A la Dra. Raquel F-Lloris (Rakeluchi!!), viniste en el mejor momento, y ya no soy la que mas habla!! Gracias por la ayuda con la tesis y con la vida! Sos una personita muy pero que muy especial. Praga quedará en mi memoria...me encanta la gente con tanta energía!!! A Belén (si algún día soy jefa, perdón Víctor pero me la llevo, la mejor técnico que nunca vi), gracias por todo, a Elizabet, a quién he mareado más de una vez con mi energía, a la guapa, dulce y geniosa Marta y a Laia, que no se la escucha mucho pero allí está trabajando y trabajando y siempre sonriendo!!

Quiero agradecer también a quienes han contribuido con mi trabajo, concretamente con el primero, a la casi Dra. Rosa Morinigo, a ver si terminas eso!!, al Dr. Pep Vidal y a mi otra compatriota Violeta Moize. Extiendo el agradecimiento a todo el servicio de Endocrinología del

## Agradecimientos

---

Hospital Clínic, pero en especial a Rosa María, a Berta y a Ana Bosch, por toda su ayuda y paciencia.

También quiero agradecer a toda la gente del estabulario. A "Meri", por su ayuda y ánimos, a Carmen, a Carme, a Blanca y a Loli. Gracias por la paciencia cuando hacía la tesis y luego cuando llenaba todo con tabaco!

Bueno y como no, a toda esa gente que forma parte del clínico y que hacen que ir desde el IDIBAPS al hospital o a la Fundación sea una trayectoria (para mi) que no se termina nunca... A las Isabeles, a Alfredo, a Sergi, a Ifi, a Miriam y a un montón más que he conocido a lo largo de mis interminables idas y venidas.

Al grupo del Dr Fernández-Checa, que por razones obvias los he conocido... A la Dra. Montserrat Mari que me facilitó más de un reactivo, a Susana Núñez, por la cantidad de ratones, sonrisas y charlas rápidas, a Ana Moles, siempre con una palabra de ánimo, (respeto y admiro tu paciencia Ana:), a Ana Fernández, Laura Llacuna, Joanet y Franky.

También quiero agradecer a la gente que no está en el clínico pero que han hecho que mi mundo se sostenga. A mi amiga Valeria Manzoni, sin vos amichi la filosofía se queda chueca. Gracias por... todo lo que sabés. A mi amiga Glaucia Grohs, otro tesoro que la vida me regaló. A Carolina Zeitune, mi gran amiga y odontóloga, a Federico Guillermon, Fede, pasás por el clínico hoy??!! Y a Kerstin, que a pesar de la distancia es de gran apoyo. También quiero agradecer profundamente todo el cariño y amor que recibo de Pilar Duquez y Josep Maria Lluís Bello. A el Raul Escalona... bomboncito!! Y a Luis Germanó.

Y por supuesto no puedo dejar de mencionar a mi querida gente de Argentina, que extraño mucho y son una parte muy importante de mi vida. A Eugenia Mitchell, mi amigasa, cuantos brazos pinchamos juntitas, cuántas confesiones y cuánta vida... Necesito unos mates achucarados ya! No puede ser que no conozca a Valentina!!, a Santi y Barto Rolotti, a la Sole Maezo, con quien crecí y empecé a aprender y a Sole Juarez, otro complemento en mi vida. A José Ramirez (cómo costó la última materia Jose!!), a mi gran compañero Hugo Menéndez con quien comencé los primeros pasos en la química, a Ale Varela una gran persona y por supuesto a Diego Domínguez, un poco culpable de que me guste la bioquímica!

A mi gran amigo Victor Tamanaha, presente en mi vida esté donde esté. Gracias por el apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida!

A mis gatitos Pancho y Bruno, que son mi descarga de amor maternal... me calman y relajan! Y por supuesto a mi querido Andrés Calamaro que me ha acompañado en más de un experimento! Sin música la ciencia no sería lo mismo...

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. José Maria Lluís Duquez... nene!! Gracias por el apoyo y el amor, gracias por la ayuda científica y emocional, gracias por el pasado y el presente mirando al futuro.

Y también especialmente a mi familia, a mis padres y hermanos: ma, mi mami, gracias por darme fuerza y apoyo en cada momento, por enseñarme a perseverar y por darme la libertad siempre de elegir la libertad; pa, viejo, mi querido viejo, gracias por la filosofía barata y

los zapatos de goma, gracias por enseñarme a dudar... y a reírme de mi. A los dos por enseñarme que el amor es lo más importante. Y a los dos también por ser mis grandes amigos. Los he extrañado y los extraño profundamente. A mis hermanos, especialmente a los que no son tan vagos y están llamando y apoyando a la hermana chiquita! Gabriel (no pienso prestarte plata!) a Alfredo (lo siento, nunca me podrás ganar al Rumi!) Beto (el otro pequeño...amor!), Sonia (nos falta tiempo siempre!) y Claudio. A todos mis sobrinos, Gastón, Matías, Nadia (falté a tu fiestita amor, perdón!), Karen (mi hermosa ahijada), Nahir (con esa vocecita tan dulce!), Romi (que charlas nos esperan!), Marianela (mi dulce amor!! Tenés que estudiar mucho!), Ornela (la belleza salvaje), Francesco (no te voy a reconocer!) y a la nueva que ni conozco! Por la ternura y el cariño... he perdido cosas ya lo se, pero ya las recuperaremos!

No quiero olvidarme de nadie...pero saben que voy siempre corriendo. Por eso, agradezco a todos porque siempre he sentido un gran apoyo en general y si bien solo uno mismo puede pisar sus propios pasos, saber que hay huellas a tu lado, te hace el tránsito mucho más liviano. Muchas Gracias a todos!!!

Estar al Clínic ha estat para mi una molt bellisima experiencia... He conegut les coses bones i les dolentes de fer recerca, però em quedarà el carinyo de la gent que ha estat al meu costat i se ha quedat amb mi construint una amistat i també la que ha passat però m'ha deixat algo. Mai oblidaré tots aquets anys al clinic i a Barcelona... Moltissimes Gràcies a tots!!



## **ABREVIATURAS**



<b><math>\alpha</math>MSH</b>	Hormona estimuladora del melanocito $\alpha$
<b>ACC</b>	acetil coenzima A carboxilasa
<b>ADD1/SREBP1</b>	Factor dependiente de determinación y diferenciación de adipocito 1/ proteína de unión a elementos regulatorios de esterol 1.
<b>AGRP</b>	Proteína relacionada con la proteína agouti
<b>AGT</b>	angiotensinógeno
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenina
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>aP2</b>	Proteína de unión a ácidos grasos
<b>ASCV</b>	Enfermedad arteriosclerótica cardiovascular
<b>ASP</b>	Proteína estimuladora de la asilación
<b>At</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenina
<b><math>\beta</math>HSD</b>	Beta hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b><math>\beta</math>ZIP</b>	Cierre de leucina básico $\beta$
<b>CARM1</b>	Catalizador de dimetil-arginina asimétrica de histona
<b>CART</b>	Tránsito regulado por cocaína y anfetamina
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CBP</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta de AMP cíclico?(creb
<b>CDK</b>	Quinasas dependientes de ciclinas
<b>CD36/FAT</b>	Ácido graso sintasa
<b>C/EBP</b>	CCAAT/ proteína de unión a potenciador ( <i>enhancer</i> )
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina
<b>CKIs</b>	Inhibidores de ciclinas
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de la corticotrofina
<b>CS</b>	Suero bovino
<b>Dm</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo II
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos trifosfato
<b>DXM</b>	Dexametasona
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol tetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FABP</b>	Proteína de unión a ácidos grasos
<b>FBS</b>	Suero Bovino Fetal

<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>FoXO1</b>	Factor de transcripción <i>forkhead 1</i>
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón-1
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>G6Pasa</b>	Glucosa-6-fosfatasa
<b>H3K4</b>	Lisina 4 de la histona H3
<b>H3K9</b>	Lisina 9 de la histona H3
<b>HAT</b>	Acetiltransferasa de histonas
<b>HDAC</b>	Deacetilasa de histonas
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HDM</b>	Demetilasa de histonas
<b>HMT</b>	Metiltransferasas de histonas
<b>HP1</b>	Proteína de la Heterocromatina 1
<b>Hs</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>HSD1</b>	alfa hidroxisteroide deshidrogenasa
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IATT</b>	Tejido adiposo intra-abdominal
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento semejante a la insulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS1 y 2</b>	Substrato del receptor de insulina 1 y 2
<b>JHDM</b>	Demetilasa de histonas que contiene el dominio JmjC
<b>LCR</b>	Regiones de control de locus
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LSD1</b>	Demetilasa específica de lisinas 1
<b>MBP</b>	Proteína de unión al metil
<b>MCH</b>	Hormona concentradora de la melanina
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioattractante de monocitos-1
<b>MnSOD2</b>	Manganeso superóxido dismutasa 2
<b>Mm</b>	<i>Mus musculus</i>
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Nc</b>	<i>Neurospora crassa</i>
<b>PC</b>	Proteína Polycomb
<b>Rb</b>	Proteína retinoblastoma
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino

---

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEPCK</b>	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
<b>PI</b>	Pre-inmune
<b>PIC</b>	Complejo de preiniciación de la transcripción
<b>PI3-quinasa</b>	Inositol-3-fosfato-quinasa
<b>Pol II</b>	RNA polimerasa II
<b>POMC</b>	Pro-opiomelanocortina
<b>PPAR</b>	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas
<b>PPRE</b>	Elemento de respuesta a PPAR
<b>Pref-1</b>	Factor del preadipocito-1
<b>PRMT1</b>	<i>Catalized histone asymmetric dimethyl-arginine 1</i>
<b>PRMT5</b>	<i>Catalized histone symmetric dimethyl-arginine 5</i>
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>RPs</b>	<i>Random primers</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	transcripción reversa
<b>SAM</b>	S-adenosil-metionina
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SCD1</b>	Desaturasa estearoil-CoA 1
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SET</b>	<i>Drosophila Su(var)3-9, Enhancer of zeste (E(z)), and trithorax (trx)</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Sp</b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAM</b>	Tejido adiposo marrón
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>TBP</b>	Proteína de unión a la caja TATA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>TFs o TAFs</b>	Factores de transcripción basales o generales
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformador β
<b>TIS</b>	Sitio de inicio de la transcripción
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoiforbol 13- acetato
<b>TSH</b>	Hormona estimuladora de tirotrofinas
<b>TZD</b>	Tiazolidindionas

## Abreviaturas

---

<b>UTR</b>	Región no transcripta
<b>+</b>	efecto estimulante
<b>-</b>	efecto inhibidor

# ÍNDICE



<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ABREVIATURAS</b>	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
PARTE 1. LA OBESIDAD	3
1.1. CONCEPTO DE OBESIDAD	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD	4
1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD	5
1.4. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD	5
Factores genéticos	6
Factores ambientales	6
1.5. COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD	6
Enfermedades cardiovasculares	6
Resistencia a la insulina y diabetes mellitas tipo 2	7
Apnea del sueño	7
Enfermedades neoplásicas	8
Enfermedades osteoarticulares	8
PARTE 2. EL TEJIDO ADIPOSO	9
2.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	9
2.2. EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO SECRETOR	9
Adiponectina	11
Leptina	15
TNF $\alpha$	16
IL-6	16
Resistina	17
Adipsina	17
2.3. LA DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO	17
El proceso de diferenciación del adipocito	18
La cascada de factores de transcripción en la adipogénesis	20
2.4. PPARs Y LA FISIOLOGÍA DEL ADIPOCITO MADURO	23
3. PARTE 3. TRANSCRIPCIÓN Y CROMATINA	25
3.1. REGULACIÓN A NIVEL DE LOS ELEMENTOS DE SECUENCIA	27
3.1.1. Elementos de regulación en cis	27
Promotores	27
Potenciadores o Enhancers	27
Silenciadores	27
Delimitadores	28

Los elementos de control de locus	28
3.1.2. Elementos de regulación en trans	29
La RNA polimerasa y los factores generales de transcripción	29
Factores de transcripción específicos de secuencia	30
Coactivadores y corepresores	32
3.2. LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA	32
3.2.1. Metilación del DNA	33
3.2.2. Modificaciones covalentes de las histonas	33
Acetilación de histonas	34
Metilación de histonas	35
Código de histonas	38
3.2.3. Intercambio de histonas	39
3.2.4. Los complejos de remodelación ATP-dependientes	40
3.3. LA REGULACIÓN A NIVEL NUCLEAR	40
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	45
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	49
1. CULTIVOS CELULARES	49
1.1. Medios de cultivos	49
1.2. Protocolo de diferenciación de células 3T3-L1	50
1.3. Protocolos experimentales	50
1.4. Inmunocitoquímica	51
2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA Y DNA	51
2.1. Obtención de RNA	51
RNA de tejido adiposo humano	51
RNA de células, preadipocitos y adipocitos primarios	52
2.2. Valoración de RNA	53
2.3. Retrotranscripción inversa	53
2.4. PCR	54
2.5. PCR a tiempo real	56
3. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS	58
3.1. Obtención de histonas	58
3.2. Obtención de extractos nucleares	59
3.3. Cuantificación de proteínas	59
3.4. Western Blot	60
3.5. Inmunoprecipitación de cromatina	61

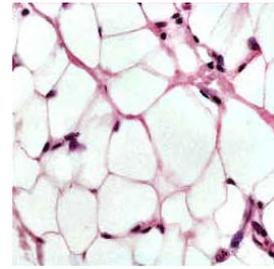
---

4. PRUEBAS FUNCIONALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.1. PRUEBAS FUNCIONALES	64
4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	65
<b>RESULTADOS</b>	67
<b>Primer trabajo.</b> Expresión los receptores de adiponectina en el tejido adiposo intra-abdominal y su asociación con factores de riesgo metabólicos y cardiovasculares en obesidad y diabetes.	67
<b>Segundo trabajo.</b> La dimetilación de la histona H3 en la lisina 4 marca la competencia transcripcional del promotor de adiponectina en preadipocitos.	79
<b>DISCUSIÓN</b>	99
<b>RESÚMEN Y CONCLUSIONES</b>	107
RESÚMEN	107
CONCLUSIONES	109
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	113



# **INTRODUCCIÓN**





## PARTE 1. LA OBESIDAD

### 1.1. CONCEPTO DE OBESIDAD

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que origina un aumento de peso corporal con respecto a lo que correspondería según sexo, talla y edad. En condiciones normales, el cuerpo humano contiene una cantidad de tejido graso que varía entre un 15% o 18% en el hombre joven y entre un 20% o 25% del peso corporal en la mujer.

El indicador universalmente aceptado para definir el grado de obesidad es el BMI (*Body Mass Index*) o **índice de masa corporal (IMC)**, el cual establece una relación entre el peso y la altura al cuadrado (Keys *et al.*, 1972; Gallagher *et al.*, 2000):

$$\text{IMC} = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$$

Siguiendo los criterios de la OMS (1995) y la SEEDO (2000) se acepta la clasificación de los diferentes grados de obesidad según el valor del índice de masa corporal tal como se expresa en la tabla 1.1. Hay que destacar que el sobrepeso hasta valores de IMC = 27 puede considerarse normal siempre y cuando no se asocie a algún factor de riesgo y la distribución de grasa no sea central.

La determinación de la distribución de grasa corporal tiene gran importancia desde el punto de vista clínico, ya que permite valorar el riesgo metabólico y cardiovascular vinculado a la acumulación de la misma (Janssen *et al.*, 2002; Pouliot *et al.*, 1994).

La distribución de la acumulación grasa puede tener un predominio superior, **obesidad central o androide**, o inferior, **obesidad periférica o ginoide**. Esta valoración suele hacerse mediante la medición del cociente cintura/cadera (C/C) y tiene una muy buena correlación con el IMC. Los pacientes con índices cintura/cadera superiores a 1 en los varones o superiores a 0.9 en las mujeres definen una distribución androide de la grasa corporal (acumulación de grasa principalmente en la cara, región cervical, tronco y supraumbilical, aumentando de modo notable la grasa visceral profunda). Este tipo de acumulación grasa está ligado a trastornos severos metabólicos y a la enfermedad cardiovascular. Por otra parte, en la obesidad periférica o ginoide (acumulación de grasa en la parte inferior del cuerpo: región infraumbilical del abdomen, caderas, región glútea y muslos) se relaciona con alteraciones mecánicas osteoarticulares y trastornos vasculares venosos inferiores (Bray, 1992; Pouliot *et al.*, 1994).

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

La obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente en el mundo occidental. En los últimos tiempos ha habido un incremento alarmante del número de individuos obesos tanto en las sociedades desarrolladas, como en las en vías de desarrollo (Kuczmarski *et al.*, 1994). La OMS reconoce esta disfunción heterogénea como uno de los diez problemas de salud más importantes del planeta (1995). Actualmente se estima que 1 billón de personas son víctimas del sobrepeso y que más de 300 millones de personas padecen de obesidad.

La obesidad, definida como con un IMC  $\geq 30$ , es una condición común en todos los continentes. La información más completa a nivel europeo proviene del proyecto MONICA de la OMS (1988). Este estudio demuestra que existe una gran variabilidad en la prevalencia entre países (sobre todo en el sexo femenino) con un incremento en los países mediterráneos y del este de Europa. Otro estudio confirmó esta tendencia, obteniendo datos de prevalencia del 13% en los varones del norte de Europa con respecto al 23% obtenido en los países del sur (Aranceta *et al.*, 1998). En este trabajo, España presenta una prevalencia global del 15%, datos que concuerdan con el estudio de la SEEDO'97, que estimaron una prevalencia de obesidad del 14,4%, significativamente más elevada en el sexo femenino (15,75%) en comparación con los varones (13,39%).

En Estados Unidos, los datos epidemiológicos más recientes provienen del estudio de NHANES III (*Nacional Health and Nutrition Examination Survey*) (Flegal *et al.*, 2002) que contempla que la prevalencia de sobrepeso es del 65% y de obesidad es del 31%. Aunque los datos más preocupantes son los que hacen referencia a la infancia, con una prevalencia situada alrededor del 15%, lo cual hace presagiar que la obesidad pasará a ser un problema médico de primera magnitud en las próximas décadas (Troiano and Flegal, 1998).

El creciente aumento de la prevalencia de obesidad no es un problema exclusivo de Europa y de Estados Unidos, sino que en muchos otros países (como China, Japón, Malasia, Samoa y Los Emiratos Árabes, entre otros) comienza a ser un fenómeno preocupante (Kopelman, 2000).

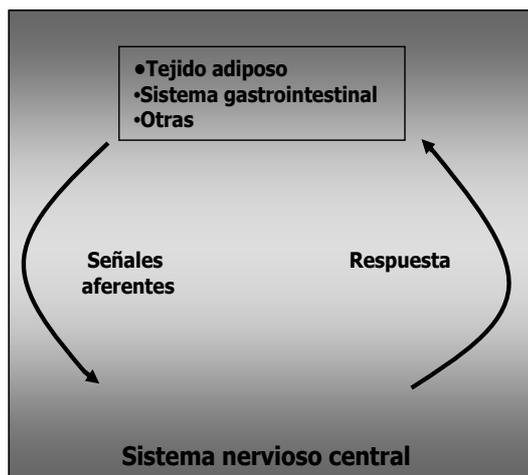
**Tabla 1. Grados de obesidad según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad y recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud**

Tipo	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Lenguaje habitual
Normalidad	20-26.9	Delgado
Obesidad grado I	27-29.9	Sobrepeso
Obesidad grado II	30-34.9	Obesidad
Obesidad grado III	35-39.9	Obesidad Mórbida
Obesidad grado IV	>40	Obesidad Extrema

### 1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

El peso corporal está regulado por un fino control homeostático del balance energético, entendiéndose por éste, a los mecanismos fisiológicos que permiten que la ingesta y el gasto energético sean equivalentes durante un período de tiempo.

La regulación del balance energético consta de un centro regulador, el sistema nervioso central (SNC), el cual recibe una serie de señales provenientes del gasto y la utilización metabólica. Estas señales pueden ser sensoriales (vista, olfato, gusto); derivadas del tracto gastrointestinal (Ghrelina, GLP-1, colecistoquinina, enterostatina, bombesina); provenientes de depósitos corporales de energía (leptina, adiponectina) y señales derivadas del metabolismo de los sustratos energéticos (glucosa, lactato, malonil-CoA). Una vez integradas las señales, se desencadena una respuesta efectora que modula la ingesta y el gasto energético, la utilización metabólica de los sustratos y, en último término, es capaz de modificar los depósitos de energía (Figura 1.1). Existen numerosas moléculas implicadas en el control hipotalámico del balance energético, ya sea en las vías anabólicas que estimulan la ingesta y disminuyen el gasto energético (neuropéptido Y, MCH, AGRP, orexinas) o en las catabólicas (CRH,  $\alpha$ MSH, CART).



**Figura 1.1. Regulación del balance energético.**

El sistema nervioso central es el mediador de las señales que recibe del tejido adiposo y otros sistemas, las integra y genera una respuesta. Cuando en el organismo existe una falta de energía, el SNC responderá secretando péptidos encargados de aumentar el apetito (orexigénicos). Cuando existe un exceso de energía o adiposidad, hay un aumento en la síntesis y secreción de leptina que generará una respuesta anorexigénica por parte del SNC. El fallo de esta fina y flexible regulación metabólica, provoca obesidad o pérdida de peso.

Este sistema posee a su vez dos tipos de circuitos: un sistema que actúa a corto plazo y que regula el patrón de las diferentes comidas (señales gastrointestinales, glucosa, aminoácidos) y otro que actúa a largo plazo controlando los depósitos energéticos del organismo (leptina, insulina). Estos sistemas están a su vez, relacionados entre sí.

Cuando ocurre un desequilibrio que provoca el fallo de la capacidad reguladora del balance energético se producirá obesidad o pérdida de peso.

### 1.4. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

La aparición de obesidad es el resultado de interacciones entre factores genéticos, ambientales, psicológicos, sociales y culturales que conducen a un desequilibrio energético (balance energético positivo) y, como consecuencia, a una excesiva acumulación de grasa

corporal. La contribución relativa de cada factor se ha estudiado intensamente y, aunque las diferencias genéticas son de vital importancia, actualmente se ha establecido que los factores ambientales y de comportamiento son los principales responsables de la actual epidemia de obesidad.

**Factores genéticos.** Diversos estudios en los cuales utilizaron parejas de gemelos y niños adoptados demostraron que existe una mayor concordancia en el grado de sobrepeso entre gemelos monozigóticos que entre gemelos dizigóticos (Stunkard *et al.*, 1986a) y que la tendencia a desarrollar obesidad en niños adoptados se encontraba más correlacionada con sus padres biológicos que con los adoptivos (Stunkard *et al.*, 1986b). Dejando de lado los síndromes de baja prevalencia asociados a obesidad (Prader-Willi o Bardet-Biedl, entre otros), las influencias genéticas parecen actuar, en la mayoría de los casos, a través de genes de susceptibilidad. Estos genes pueden conferir una predisposición a padecer la enfermedad, pero no son esenciales ni suficientes para desarrollarla, teniendo que coincidir para su manifestación, con circunstancias ambientales concretas (Bouchard *et al.*, 1990).

**Factores ambientales.** En la sociedad actual, los patrones nutricionales contribuyen substancialmente al desarrollo de obesidad, ya que promueven el consumo de alimentos altamente calóricos, de fácil acceso y económicos. Por otro lado, las mejoras en la calidad de vida llevan a una disminución de la actividad física, tanto en el trabajo como en el hogar y a la práctica de actividades de ocio sedentarias, como la televisión y los videojuegos.

## 1.5. COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD

La obesidad constituye un verdadero problema de salud pública, ya que ocasiona una disminución de la esperanza de vida (Kopelman, 2000; Simopoulos *et al.*, 1984), siendo la segunda causa de mortalidad previsible, superada sólo por el consumo de tabaco (McGinnis and Foegen, 1993).

La acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo provoca profundos cambios en la fisiología del organismo. De manera general la obesidad se ha asociado con la aparición de enfermedades cardiovasculares, metabólicas, digestivas, respiratorias, osteoarticulares y neoplásicas (Kopelman, 1984). El incremento de mortalidad está fundamentalmente relacionado con los problemas cardiovasculares así como también por la susceptibilidad a padecer otra de las enfermedades crónicas con gran morbi-mortalidad en el mundo: la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

**Enfermedades Cardiovasculares.** La obesidad está asociada con diversos factores de riesgo cardiovascular, como la hiperinsulinemia, la dislipemia y la hipertensión. La obesidad se encuentra íntimamente asociada con importantes cambios hemodinámicos que afectan drásticamente la función cardíaca. El incremento de peso corporal provoca un aumento proporcional del volumen sanguíneo y, en consecuencia de la carga del ventrículo izquierdo. Estas adaptaciones fisiológicas provocan cambios estructurales a nivel del corazón (incremento de la masa ventricular e hipertrofia del miocardio) que comprometen la óptima funcionalidad

del órgano. Además, la hipertrofia del ventrículo izquierdo se relaciona con enfermedad coronaria, arritmias y muerte repentina (Kopelman, 2000).

#### **CUADRO 1.1. CONCEPTO DE RESISTENCIA A LA INSULINA**

Según el "Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes" (2002), la resistencia a la insulina se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en sus tejidos diana, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Aunque la sensibilidad a la insulina con frecuencia hace referencia a la capacidad de la insulina de estimular el uso de la glucosa, la hormona ejerce una amplia acción pleiotrópica. Los cambios mínimos en la concentración plasmática de insulina ejercen un efecto intenso sobre el metabolismo de lípidos. Además la insulina afecta el metabolismo de iones, la función endotelial, la agregación plaquetaria y la coagulación, la termogénesis, el crecimiento, la captación y transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas y la función cardíaca (Ferrannini *et al.*, 1999). Se ha visto además que la insulina influye directamente en la función y supervivencia de las células beta pancreáticas. Todas estas acciones finamente entrelazadas son las que explican probablemente muchas de las alteraciones asociadas al deterioro de la utilización de glucosa mediada por la insulina.

Hoy en día se considera que la RI crónica o mantenida es el rasgo común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM2, la obesidad, la hipertensión arterial (HTA), las dislipemias o la enfermedad cardiovascular (Ferrannini *et al.*, 1999).

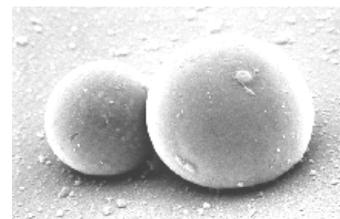
**Resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2.** La obesidad, particularmente la central, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (Kopelman, 2000). En términos generales, la obesidad se caracteriza por hiperinsulinemia basal en ayuno y por una respuesta secretora de insulina exagerada cuando se aplica un test de tolerancia oral a la glucosa. En el individuo obeso existe una elevada tasa de lipólisis, la cual provoca una liberación de una gran cantidad de ácidos grasos libres (FFA) al sistema portal. Este fenómeno induce la resistencia hepática a la insulina, a la vez que estimula la gluconeogénesis parte del hígado y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Este conjunto de alteraciones provocan la aparición de dislipemia, hiperglucemia e hiperinsulinemia, acompañada de una incipiente resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos (músculo esquelético y tejido adiposo) (ver cuadro 1.1) y por lo tanto una menor captación de glucosa. En los estadios iniciales, el páncreas puede responder a este conjunto de alteraciones, mediante la producción de más insulina, estado que se denomina hiperinsulinemia compensatoria. Pero esta sobrecarga secretora de insulina, acaba por provocar el fallo de la célula  $\beta$  pancreática y la aparición de DM2 (Kopelman, 2000).

**Apnea del sueño y problemas respiratorios.** La acumulación de grasa en la zona del pecho y el diafragma es la responsable de que los pacientes obesos puedan sufrir diferentes problemas respiratorios, como la apnea obstructiva del sueño, el síndrome de hipoventilación, síntomas de disnea y un mayor riesgo de asma. La hipoventilación alveolar y los episodios de

apnea pueden provocar una disminución en la concentración alveolar de oxígeno (hipoxia) y un aumento en la concentración de dióxido de carbono (hipercapnia). Además de la disminución en la calidad del descanso, la descompensación de gases puede conducir al desarrollo de hipertensión pulmonar y fallo cardíaco y respiratorio (Kopelman, 1992).

**Enfermedades neoplásicas.** Los tumores más comunes en pacientes obesos son el cáncer colorrectal, de próstata y de vesícula biliar en hombres, y de pecho y endometrio en mujeres. La incidencia es mayor cuando la obesidad es central. El desarrollo de algunos de estos cánceres mencionados son consecuencia directa de alteraciones hormonales (Kopelman, 1984).

**Enfermedades osteoarticulares.** El exceso de peso provoca la sobrecarga de diferentes articulaciones, sobretodo de las intervertebrales, la articulación coxofemoral, la de las rodillas y las del tobillo (Kopelman, 1984). Esta patología provoca un dolor intenso y una importante limitación funcional.



## PARTE 2. EL TEJIDO ADIPOSO

El preocupante aumento en la incidencia de la obesidad y las complicaciones derivadas de ésta, como la diabetes mellitus y la enfermedad cardiovascular, ha incrementado dramáticamente la necesidad de dilucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo del tejido adiposo.

En mamíferos, existen dos tipos de tejido adiposo: el **tejido adiposo blanco (TAB)** y el **tejido adiposo marrón (TAM)** (Cinti, 2001). Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, pero presentan claras diferencias en cuanto a su morfología, distribución, expresión génica, así como en su función. El tejido adiposo blanco es el órgano específico que almacena la energía sobrante en forma de grasa; mientras que el tejido adiposo marrón, tiene una función fisiológicamente opuesta: permite la disipación de energía en forma de calor. Nuestra investigación se ha centrado en el estudio del TAB, por lo tanto, dirigiremos nuestra atención en la descripción del mismo.

### 2.1. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

En mamíferos, el TAB se encuentra extensamente distribuido en el organismo, principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal (Cinti, 2001). Una vez que el tejido adiposo está completamente formado, los adipocitos representan entre uno y dos tercios del mismo. El resto del tejido está constituido por células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos, aunque también pueden encontrarse preadipocitos (células intersticiales o vacías de lípidos) y células mesenquimales pobremente diferenciadas (las cuales poseen pequeñas gotas de lípidos) (Hauer *et al.*, 1989).

Como se ha mencionado, el TAB es el mayor reservorio energético del organismo. Participa en el control de la homeostasis lipídica, almacenando la energía sobrante en forma de triacilglicéridos y liberando ácidos grasos libres y glicerol cuando el gasto energético excede la ingesta de energía. Todo ello está regulado por los sistemas nervioso y endocrino.

### 2.2. EL TEJIDO ADIPOSO COMO ORGANISMO SECRETOR

Originalmente el TAB era visto como un tejido inerte, que contenía una cantidad fija de adipocitos, su principal componente celular y que actuaba como un depósito de energía pasivo. Sin embargo, hoy en día se considera que el TAB es un órgano muy dinámico con funciones pleiotrópicas y que es capaz de expresar numerosos receptores (tabla 2.2) y expresar y secretar

una gran variedad de péptidos bioactivos, conocidos como **adipocitoquinas** (tabla 2.1): la adiposina (Cook *et al.*, 1985), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Hotamisligil *et al.*, 1995), la leptina (Friedman, 2000), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (Shimomura *et al.*, 1996), la resistina (Steppan *et al.*, 2001b) y la adiponectina (Hu *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1996; Keys *et al.*, 1972). Estas citoquinas pueden actuar de manera local (función autocrina/paracrina) o sistémica (endocrina) y poseen además un papel muy importante en la regulación del metabolismo, la reproducción, la función cardiovascular y la inmunidad. La secreción de estas citoquinas por el TAB está regulada entre otros factores por el ayuno, la ingesta y la obesidad (Hamilton *et al.*, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1998). De esta manera, el adipocito se ha convertido en el integrador central del programa metabólico del organismo y está completamente establecido, que la función endocrina del adipocito ejerce una influencia directa sobre otros órganos clave, como el cerebro, el hígado o el músculo esquelético.

**Tabla 2.1. Ejemplos de proteínas derivadas de adipocitos con funciones endocrinas**

Citoquinas y proteínas relacionadas	Leptina TNF $\alpha$ IL-6
Proteínas relacionada con el sistema inmunitario	MCP-1
Proteínas implicadas en el sistema fibrinolítico	PAI-1 Factor Tisular
Proteínas del Complemento y relacionadas	Adipsina (Factor D del complemento) Factor B del complemento ASP Adiponectina
Lípidos y proteínas del metabolismo y transporte de lípidos	Lipoproteína lipasa (LPL) CEPT (Cholesterol Ester Transfer Protein) Apolipoproteína E FFA aP2
Enzimas implicadas en el metabolismo esteroideo	Citocromo p450 dependiente de aromatasas 17 $\beta$ HSD 11 $\beta$ HSD1
Proteínas de RAS	AGT
Otras	Resistina

A continuación haremos una breve descripción de algunas de las más importantes adipocitoquinas secretadas por el TAB. Como nuestro trabajo se ha centrado más en la adiponectina y sus receptores, estos elementos serán analizados con más detalle.

**Tabla 2.2. Ejemplo de receptores que se expresan en el TAB**

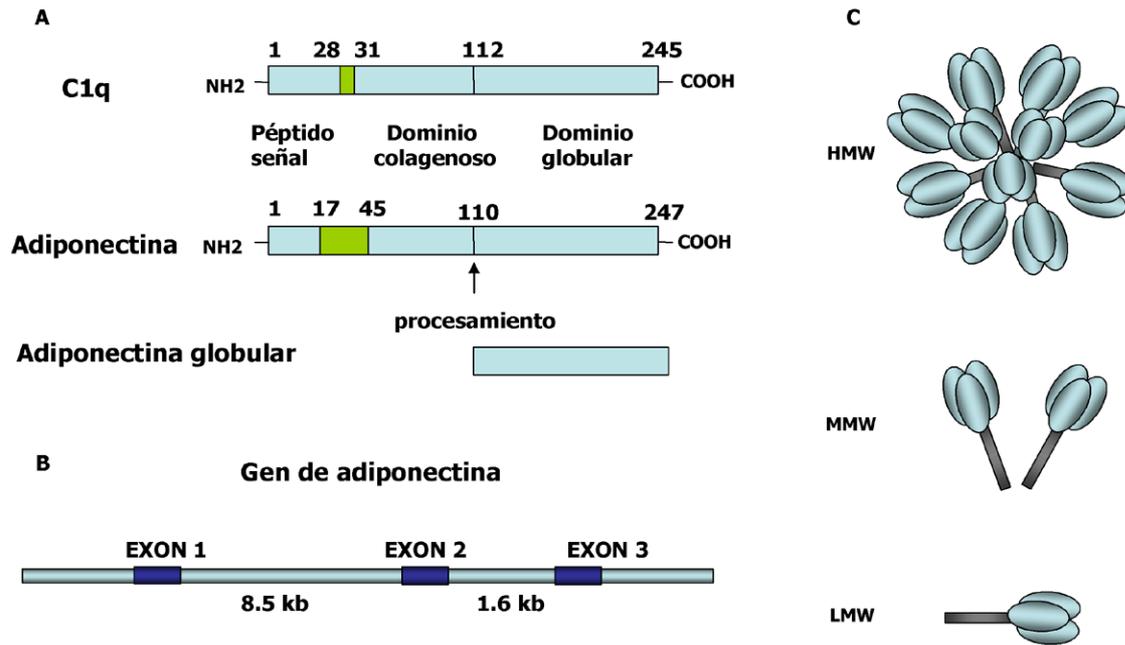
Receptores de membrana para hormonas	insulina glucagón GH TSH Gastrina/CCK-B péptido 1 similar al glucagón tipo I y II para angiotensina II
Receptores hormonales nucleares	glucocorticoides vitamina D hormona tiroidea andrógenos estrógenos progesterona
Receptor de citoquinas	leptina tipo I y II para Adiponectina IL-6 TNF $\alpha$
Receptor de catecolaminas	$\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3 $\alpha$ 1, $\alpha$ 2

### Adiponectina

La adiponectina también llamada AdipoQ, Acrp30, apM1 y GP28 es una hormona peptídica que se expresa abundantemente en el adipocito maduro y circula en grandes concentraciones en el plasma. Tiene un peso de 30 KDa aproximadamente, consta de 244 aminoácidos y está compuesta por una secuencia señal en el extremo amino terminal, un dominio variable, un dominio colagenoso y un dominio globular situado en el extremo carboxilo terminal. Comparte una alta homología con el colágeno tipo VIII y X y con el componente del complemento C1q (figura 2.1.A). Cabe destacar que la secuencia terciaria del dominio globular tiene una alta similitud con el TNF $\alpha$ , a pesar de no ser parecidas en su estructura primaria (Kadowaki and Yamauchi, 2005).

La adiponectina circula en plasma en diferentes isoformas producidas por modificaciones post-traduccionales (hidroxilaciones y glicosilaciones), las cuales se ensamblan formando trímeros, hexámeros y estructuras oligoméricas de mayor orden (figura 2.1.C) (Chandran et al., 2003). Asimismo el dominio globular de adiponectina, producido por corte proteolítico, se encuentra también en plasma a concentraciones fisiológicas significativas y posee actividad biológica (Chandran et al., 2003). El gen de adiponectina está formado por 3 exones y 2 intrones (figura 2.1.B), y está regulado principalmente por PPAR $\gamma$ , C/EBP y ADD1, los factores de transcripción claves en la adipogénesis (Gustafson *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004).

## Adiponectina (ApM1, Acrp30, AdipoQ, GBP28)

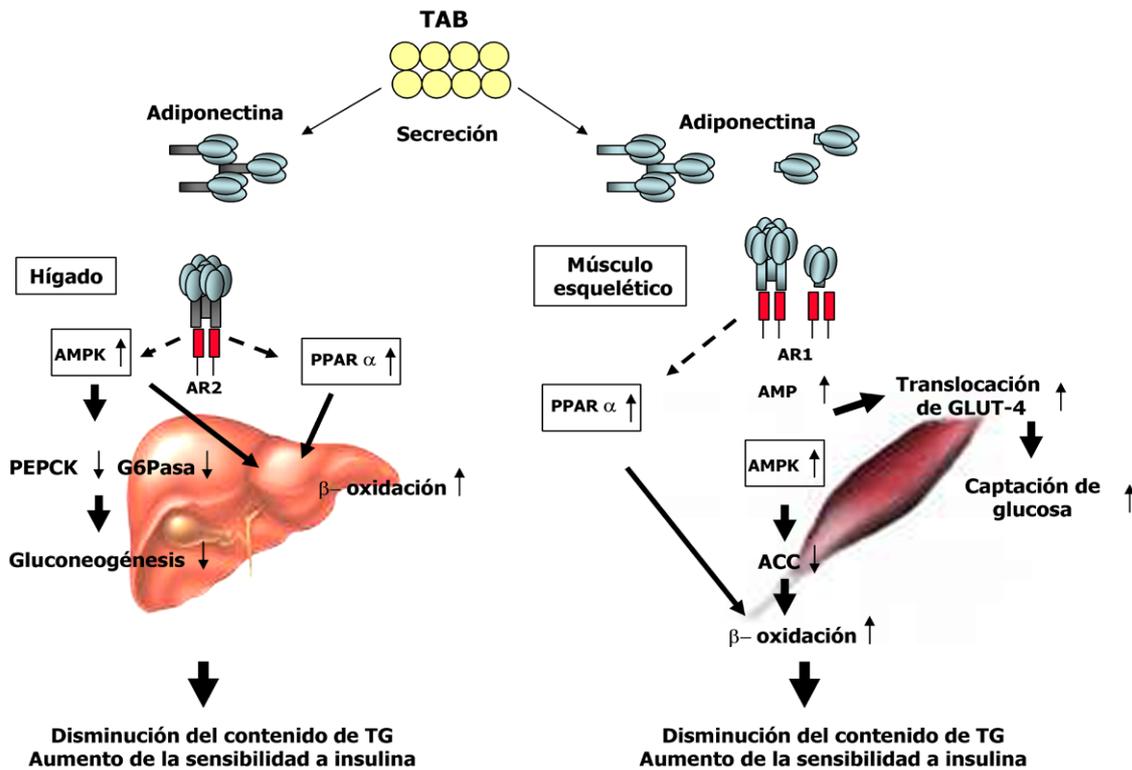


**Figura 2.1.** A. Estructura y dominios de la adiponectina. La adiponectina está compuesta por un extremo amino terminal similar al colágeno y un extremo carboxilo terminal globular. Presenta alta similitud con el C1q y circula en plasma como proteína entera o en la forma procesada globular. B. Esquema del gen de adiponectina de ratón. C. Formación de multímeros de adiponectina. LMW: peso molecular bajo, MMW: peso molecular medio, HMW: peso molecular alto.

La expresión de adiponectina se encuentra disminuida en todos los procesos relacionados con estados de inflamación y resistencia a la insulina, como en la obesidad, la diabetes mellitus y la enfermedad coronaria (Hotta *et al.*, 2000; Weyer *et al.*, 2001; Adamczak *et al.*, 2003; Kishida *et al.*, 2003; Weyer *et al.*, 2001). La adiponectina plasmática disminuye antes del comienzo de la obesidad y de la resistencia a la insulina en primates, sugiriendo que la hipoadiponectinemia contribuye en la patogénesis de estas enfermedades (Hotta *et al.*, 2001). Los niveles de adiponectina aumentan cuando la sensibilidad a la insulina mejora, ya sea por una disminución del peso corporal o por tratamientos con drogas sensibilizadoras de la insulina (Chandran *et al.*, 2003; Diez and Iglesias, 2003). Se ha demostrado también que varios polimorfismos en el gen de adiponectina están asociados con la obesidad y la resistencia a la insulina (Chandran *et al.*, 2003; Diez and Iglesias, 2003). Los ratones deficientes en adiponectina desarrollan de forma prematura intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina inducida por dieta, elevados valores de FFA séricos y una incrementada proliferación de células del músculo liso vascular en respuesta al daño tisular (Kubota *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2002). Por otra parte, la sobreexpresión de adiponectina en ratones conduce a una mejora en la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa y los niveles séricos de FFA (Combs *et al.*, 2004).

Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales adiponectina ejerce sus efectos (Figura 2.2) (Chandran et al., 2003; Diez and Iglesias, 2003). En hígado, aumenta la sensibilidad a la insulina, disminuye el flujo de FFA, aumenta la oxidación de ácidos grasos y reduce la producción hepática de glucosa. Por otra parte la adiponectina estimula el uso de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en músculo y en la pared vascular, inhibe la adhesión monocitaria mediante la disminución de la expresión de moléculas de adhesión, inhibe la transformación de macrófagos en células espumosas bloqueando la expresión de receptores *scavenger*, y disminuye la proliferación de células del músculo liso. Además, la adiponectina aumenta la producción de óxido nítrico en células endoteliales y estimula la angiogénesis. Todos estos efectos son mediados a través del aumento de la fosforilación del receptor de insulina, la activación de AMPK, y la modulación de la vía del factor nuclear KB.

La adiponectina actúa a través de sus receptores, **adipoR1** y **adipoR2** (Yamauchi *et al.*, 2003), proteínas integrales de membrana, que al contrario de otros receptores acoplados a proteína G, tienen el extremo amino terminal interno, y el extremo carboxil terminal externo. La expresión de estos receptores es bastante ubicua, aunque adipoR1 está expresado principalmente en músculo y posee una mayor afinidad por adiponectina globular que por la adiponectina completa, mientras que adipoR2 se expresa a niveles más altos en hígado y tiene una afinidad intermedia tanto por la adiponectina globular como por la forma completa (Yamauchi *et al.*, 2003). Los efectos biológicos de la adiponectina no dependen solo de sus niveles circulantes en plasma y de las propiedades de sus isoformas, sino también de la expresión de sus subtipos de receptores, que es específica de tejido. Ambos receptores se expresan en el preadipocito pero su expresión aumenta notablemente a lo largo de la adipogénesis (Fasshauer *et al.*, 2004; Bluher *et al.*, 2005). Además se ha descrito que los dos receptores están expresados en célula beta pancreática y que los ácidos grasos regulan sus niveles (Kharroubi *et al.*, 2003). En este sentido, se ha demostrado que la hormona del crecimiento (GH) es un regulador positivo de adipoR2 en células 3T3 y que la insulina regula negativamente los niveles de mRNA de ambos receptores a través de la activación de PI3-quinasa y de la inhibición de Foxo1A (Tsuchida *et al.*, 2005). La expresión de estos receptores aumenta en hígado y músculo esquelético con el ayuno, y la ingesta reestablece rápidamente sus valores. En músculo esquelético de ratones hipoinsulinémicos e hiperglucémicos tratados con estreptozotocina, ambos receptores aumentan significativamente su expresión; el tratamiento con insulina revierte completamente sus niveles. El mRNA de adipoR1 y adipoR2 está disminuido también en músculo y tejido adiposo de ratones con resistencia a insulina (*ob/ob*) que presentan hiperinsulinemia e hiperglicemia; estos ratones tienen además alterados los sitios de unión de baja y alta afinidad para adiponectina globular en músculo esquelético, así como también tienen una disminución de la activación de AMPK por adiponectina. En conjunto estos datos sugieren que en ratones con niveles de expresión reducidos de adipoR1 y adipoR2 existe una resistencia a adiponectina, la cual a su vez es crucial en el desarrollo de resistencia a la insulina, el llamado "círculo vicioso" (Kadowaki and Yamauchi, 2005).



**Figura 2.2.** La adiponectina activa AMPK y PPAR $\alpha$  en hígado y músculo esquelético. En músculo esquelético la activación de AMPK está mediada por la unión de adipoR1 con la forma completa o globular de adiponectina, la cual provoca una estimulación de la fosforilación de ACC, la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa. La activación de PPAR $\alpha$ , provoca también la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y la disminución del contenido de TG en músculo. En el hígado, solo la forma completa de adiponectina, mediante la unión con adipoR2, activa AMPK, reduciendo por lo tanto las moléculas implicadas en la gluconeogénesis y aumentando la fosforilación de ACC y oxidación de ácidos grasos. Como en músculo, la adiponectina, activa también a PPAR $\alpha$  en hígado, estimulando la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo el contenido de TG. Todos estos cambios aumentan la sensibilidad a la insulina *in vivo*.

En humanos existen pocos estudios con respecto a la regulación de los receptores de adiponectina. La expresión de los receptores de adiponectina se encuentra disminuida en el músculo esquelético de pacientes con diabetes mellitus tipo II (Debard *et al.*, 2004). Además, se ha establecido una correlación entre la expresión génica de los receptores de adiponectina y la sensibilidad a insulina en poblaciones de mexicanos americanos no diabéticos con o sin historia familiar de diabetes tipo 2 (Civitarese *et al.*, 2004). Staiger y colaboradores encontraron una correlación positiva entre la expresión de adipoR1 en músculo esquelético humano y concentraciones de insulina, péptido C, primera fase de secreción de insulina, triglicéridos plasmáticos y concentraciones de colesterol, mientras que la expresión de adipoR2 sólo se correlacionó con las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Staiger *et al.*, 2004). En un estudio más reciente, se estableció una correlación positiva de la expresión de ambos receptores en músculo esquelético humano con la composición corporal, la sensibilidad a la

insulina y diferentes parámetros metabólicos (Bluher *et al.*, 2006). Existen varios estudios que asocian ciertos polimorfismos de los receptores con una mayor susceptibilidad a padecer diabetes tipo II (Damcott *et al.*, 2005; Stefan *et al.*, 2005; Vaxillaire *et al.*, 2006).

### **Leptina**

El gen *ob* codifica para una proteína de 164 aminoácidos que pertenece a la familia de las citoquinas que se denominó leptina. Principalmente se sintetiza en el TAB, pero también se ha detectado en la placenta (Masuzaki *et al.*, 1997), la mucosa gástrica (Bado *et al.*, 1998) y el músculo esquelético (Wang *et al.*, 1998), aunque aun no se conoce con exactitud la contribución real de la leptina secretada por éstos tejidos. La forma circulante de la leptina tiene un peso molecular de 16KDa y no presenta modificaciones post-traduccionales (Halaas *et al.*, 1995). Los adipocitos secretan leptina en proporción directa a la masa de tejido adiposo y al estado nutricional (Frederich *et al.*, 1995). La síntesis y secreción de leptina está regulada por una compleja red de señales neuroendocrinas y endocrinas que reflejan el estado fisiológico del organismo.

La leptina se encuentra implicada en una multitud de funciones fisiológicas en varios tejidos. Entre sus funciones principales, cabe destacar importantes efectos en la regulación de la ingesta y el balance energético (Friedman and Halaas, 1998), en la función inmune y reproductiva (Lord *et al.*, 1998; Hileman *et al.*, 2000), en la hematopoyesis (Margetic *et al.*, 2002) y en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Friedman and Halaas, 1998). Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la leptina juega un papel fundamental en la regulación del balance energético. La observación fundamental que permitió relacionar la leptina con los procesos de regulación del peso corporal provienen de estudios realizados con ratones *ob/ob*, en el cual la deficiencia de esta hormona provocaban hiperfagia, obesidad y una disminución de la tasa metabólica. Diversos estudios han demostrado que la administración de leptina es capaz de revertir las alteraciones causadas por la disminución de esta hormona (Rentsch *et al.*, 1995). Por otro lado humanos obesos y diversos modelos murinos de obesidad induída y genética (excepto el modelo *ob/ob*) presentan hiperleptinemia, condición indicativa de resistencia a esta hormona que se normaliza luego de la pérdida de peso (Maffei *et al.*, 1995). La base molecular de esta resistencia es poco conocida, aunque las hipótesis más aceptadas son la incapacidad de leptina de cruzar la barrera hematoencefálica o defectos en el receptor de leptina (El Haschimi *et al.*, 2000).

El gen *db*, que codifica para el receptor de leptina (ObR), se aisló por primera vez en el plexo coroideo de ratón (Tartaglia *et al.*, 1995). Existen al menos 6 isoformas del ObR, pero únicamente la denominada isoforma larga contiene los motivos intracelulares necesarios para la activación de la vía de transducción de señales (Friedman and Halaas, 1998). Los receptores de leptina se expresan prácticamente de manera ubicua, incluyendo el TAB donde se ha descrito que tiene una acción autocrina y paracrina (Fruhbeck *et al.*, 1997).

De manera análoga a insulina, los efectos de la leptina a nivel central se llevan a cabo a través de la activación del ObR expresados en las poblaciones neuronales de los tipos neuropéptido Y/ la proteína relacionada con agouti (NPY/AGRP) y proopiomelanocortina/Tránsito regulado por cocaína (POMC/CART) (Elias *et al.*, 1999). Los cambios en expresión de estos neuropéptidos permiten explicar el efecto saciante de leptina.

La expresión de leptina está regulada por una gran variedad de factores. Así, la insulina, los glucocorticoides, el TNF $\alpha$ , los estrógenos y CEBP $\alpha$  aumentan la concentración de leptina, mientras que la actividad  $\beta$ 3 adrenérgica, los andrógenos, los ácidos grasos libres, la hormona del crecimiento (GH) y PPAR $\gamma$  la disminuyen (Margetic *et al.*, 2002)

### **Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

El TNF $\alpha$  es una citoquina que inicialmente fue identificada en macrófagos y linfocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio. Dentro del tejido adiposo, TNF $\alpha$  se expresa en adipocitos y células estromales vasculares (Fain *et al.*, 2004). Aunque inicialmente se sospechó que podría estar jugando un papel en caquexia, hoy se sabe que está implicado en la patogénesis de la obesidad y la resistencia a la insulina (Fernández-Real and Ricart, 2003; Ruan and Lodish, 2003). La expresión del TNF $\alpha$  de TAB está aumentada en ratones y humanos obesos y está correlacionada positivamente con adiposidad y resistencia a la insulina (Ruan and Lodish, 2003; Hotamisligil *et al.*, 1993; Hotamisligil, 2003). Sus acciones en tejido adiposo incluyen la represión de genes involucrados en la captación y el almacenamiento de FFA y glucosa y de genes implicados en la adipogénesis como C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y el cambio en la expresión de otras adipocitoquinas como leptina, adiponectina e IL-6 (Ruan *et al.*, 2002). Por otro lado, el TNF $\alpha$  deteriora la señalización de insulina mediante la alteración del estado de fosforilación de IRS-1 y 2 (Hotamisligil, 2003) en forma directa e indirectamente a través del aumento de FFA (Ruan and Lodish, 2003). El modelo de deficiencia de TNF $\alpha$  en ratón presenta mejor insulinemia, mejor tolerancia a la glucosa y protección para el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina cuando se administra una dieta rica en grasas (Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997).

### **Interleucina 6 (IL-6)**

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria, que se estima que un tercio de sus valores circulantes provienen del TAB, correlacionándose con el IMC (Fruhbeck *et al.*, 2001; Fernández-Real and Ricart, 2003). Los valores circulantes de IL-6 están incrementados en individuos obesos, aspecto que podría estar mediado por el TNF $\alpha$ , ya que se ha demostrado su capacidad de estimular la expresión de IL-6 en adipocitos (Fruhbeck *et al.*, 2001). En humanos los valores de IL-6 se han correlacionado positivamente con resistencia a la insulina, fenómeno al cual podría contribuir, ya que la IL-6 incrementa la concentración de FFA circulantes e inhibe la actividad de la LPL (Bastard *et al.*, 2000).

## Resistina

La resistina es una proteína de 94 aminoácidos que se expresa exclusivamente en el adipocito maduro (Steppan *et al.*, 2001b). El papel de la resistina en la resistencia a la insulina y la obesidad es objeto de gran controversia. Según estudios iniciales, las concentraciones de resistina se encontraban aumentadas en modelos de obesidad inducida y genética (Steppan *et al.*, 2001a), mientras que la neutralización de la misma mediante anticuerpos específicos disminuía la hiperglucemia y mejoraba la resistencia a la insulina. Otros autores han descrito una disminución de resistina en diversos modelos de obesidad (Moore *et al.*, 2001; Way *et al.*, 2001), además se ha descrito que la insulina, los FFA y el TNF $\alpha$  disminuyen su expresión (Juan *et al.*, 2001; Haugen *et al.*, 2001; Fasshauer *et al.*, 2001). En humanos las discrepancias son aun mayores. Aunque se ha demostrado que la expresión de resistina en TAB aumenta en individuos obesos, no se ha establecido correlación con el peso corporal, la adipocidad o la resistencia a la insulina (Janke *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 2001).

## Adipsina

El TAB secreta diversas proteínas de la vía alternativa del complemento. La adipsina fue la primera que se identificó en adipocitos 3T3-L1 y en TAB (Cook *et al.*, 1985). Su expresión se encuentra marcadamente disminuida en diversos modelos murinos de obesidad y diabetes experimental (Flier *et al.*, 1987). En humanos, la obesidad y la alimentación incrementan su expresión, mientras que el ayuno, la caquexia y la lipodistrofia la disminuyen (Napolitano *et al.*, 1994). Estas diferencias pueden ser debidas a que la obesidad en murinos cursa con altos niveles de glucocorticoides, los cuales regulan negativamente esta citoquina. Por otro lado la adipsina contribuye con la síntesis de ASP, una proteína implicada en el metabolismo lipídico. La ASP estimula la síntesis y almacenamiento de TGs (Yasruel *et al.*, 1991).

### 2.3. LA DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO

La caracterización de los eventos moleculares y celulares que ocurren durante la transición de preadipocitos a células grasas maduras ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de diversos modelos *in vitro* (Smyth *et al.*, 1993). Las líneas celulares utilizadas se pueden dividir en 3 categorías: **1) células embrionarias totipotentes** capaces de generar todos los tipos celulares; **2) células multipotentes** que pueden dar lugar a miocitos, adipocitos y condrocitos; y **3) células ya comprometidas o determinadas** hacia la línea adiposa, que son las denominadas líneas celulares de preadipocitos (tabla 2.3). Las líneas inmortalizadas de ratón, **3T3-L1** (Green and Kehinde, 1975) y **3T3-F442A** (Green and Kehinde, 1976) pertenecen al tercer grupo y son las más ampliamente utilizadas. La línea de células fibroblásticas embrionarias de ratón 10T/2 forma parte del segundo grupo o células multipotentes y se caracteriza por tener metilado el DNA en extensas regiones de su genoma provocando por tanto la inactivación de genes necesarios para su diferenciación. Para

comprometerse en un tipo celular, estas células deben tratarse con el agente demetilante 5-azacitidina (Konieczny and Emerson, Jr., 1984).

Se ha logrado también el cultivo de preadipocitos primarios así como la inducción de su transformación en adipocitos maduros en diversas especies animales incluido el hombre (Li *et al.*, 1989). Aunque presentan la ventaja de que pueden ser obtenidas de diferentes depósitos grasos, su mantenimiento es bastante dificultoso (Darimont and Mace, 2003).

El establecimiento de las líneas celulares mencionadas ha resultado clave para el estudio de la adipogénesis, pero debe tenerse en cuenta algunas características que dificultan una completa extrapolación de los procesos observados *in vitro* a lo que en realidad ocurre *in vivo*. Una de las limitaciones de estos modelos es que las células inmortalizadas son aneuploides, y esto puede influenciar su capacidad de diferenciación. Otra limitación es que estas células existen fuera de un contexto de matriz extracelular. No obstante, son modelos muy bien establecidos, que reflejan fidedignamente lo que ocurre a nivel molecular y celular, y a día de hoy, continúan siendo el modelo de elección de numerosos e importantes estudios.

**Tabla 2.3. Modelos celulares *in vitro* para el estudio de la diferenciación adipocitaria**

<b>Líneas celulares</b>	<b>Origen/especie</b>	<b>Inductores de la diferenciación</b>	<b>Categoría</b>
ES	Blastocitos/Embrión ratón	Ácido retinóico	Totipotente
TA1	Fibroblastos 10T/2 tratadas con 5-azacitidina/Embrión ratón	10% FBS, insulina, dexametasona	Pluripotente
3T3-L1	Fibroblastos/Embrión ratón	10% FBS, insulina, IBMX/ TZD	Unipotente
3T3-F442A Ob17	Fibroblastos/Embrión ratón Grasa epididimal/ Ratón ob/ob adulto	10% FBS, insulina 8% FBS, insulina, triiodotironina	Unipotente Unipotente
<b>Cultivos primarios</b>	<b>Origen</b>	<b>Inductores de la diferenciación</b>	<b>Categoría</b>
Rata	Células estromales vasculares de grasa subcutánea epididimal y retroperitoneal	Insulina con o sin FBS	Unipotente
Ratón	Células estromales vasculares de grasa subcutánea y epididimal	Insulina, HDL, dexametasona	Unipotente
Cerdo	Células estromales vasculares de grasa subcutánea y perirrenal	Insulina con o sin glucocorticoides	Unipotente
Humano	Células estromales vasculares de grasa subcutánea y omental	Insulina y glucocorticoides	Unipotente

### ➤ PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO

La adipogénesis es un proceso complejo en el que los preadipocitos deben interrumpir su crecimiento y detener el ciclo celular previamente a su conversión terminal en adipocitos. Este proceso de diferenciación supone cambios secuenciales en la expresión de numerosos genes. De esta manera, se va iniciando la expresión de genes característicos de los adipocitos,

al mismo tiempo que se van reprimiendo genes que son inhibitorios para la adipogénesis o que no son necesarios para la función del adipocito maduro. Todos estos cambios en la expresión y función de estos genes conducen finalmente a la adquisición del fenotipo característico del adipocito (MacDougald and Lane, 1995).

El tratamiento capaz de inducir o acelerar la diferenciación varía en los distintos modelos celulares descritos anteriormente (tabla 2.4). De forma habitual se utilizan agonistas de glucocorticoides, agentes que incrementan la concentración de AMPc intracelular, y una alta concentración de glucosa (para estimular la vía de los IGF-IR). Los ligandos del receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), por ejemplo las thiazolidindionas (TZDs), también son comúnmente utilizados para estimular la diferenciación de líneas celulares preadipocitarias y primarias. En el caso de la línea celular 3T3-L1, la diferenciación es acelerada tras 48 horas de tratamiento con dexametasona (DXM), un corticoide, isobutilmetilxantina (IBMX), un estimulante del AMPc y altas concentraciones de insulina en presencia de suero fetal bovino (FBS).

**Tabla 2.4. Regulación de la adipogénesis por hormonas, citoquinas y factores de crecimiento**

Factor	Efecto	Comentarios
Insulina	+	Acelera la acumulación de lípidos (líneas celulares)
Glucocorticoides	+	Excepto para 3T3-F442A
3-3'-5-Triiodotironina (T3)	+/no efecto	+ para Ob17
Ácido retinóico	+/-	Efecto concentración dependiente
Hormona de crecimiento	+/-/ no efecto	Depende del modelo celular
IGF-1	+	Requerido para 3T3-L1
EGF/TGF $\alpha$	-	Inhibidor en la mayor parte de modelos
TGF $\beta$	-	Potente inhibidor/efectos irreversibles
TNF $\alpha$ , IL-1	-	
TPA	-	
TZD	+	Estimula PPAR $\gamma$

Aunque los fenómenos moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos no están totalmente dilucidados, la adipogenesis *in vitro* sigue una secuencia de pasos muy bien ordenados y caracterizados. Tomando como modelo de diferenciación la línea celular 3T3-L1, se ha propuesto que el proceso incluye varias etapas:

**A. Inhibición del crecimiento:** Una vez alcanzada la confluencia, los preadipocitos 3T3-L1 sufren una inhibición por contacto y cesan su crecimiento, comenzando a exhibir algunos de los marcadores tempranos de la diferenciación (Richon *et al.*, 1997).

**B. Expansión clonal:** El tratamiento de estas células con inductores de diferenciación promueve a los preadipocitos a reingresar en el ciclo celular, produciéndose una expansión clonal, que da lugar a varias rondas de replicación de DNA y duplicación celular. Esta expansión mitótica clonal de células comprometidas antes de iniciarse la activación transcripcional de

genes marcadores del adipocito es esencial para completar la diferenciación terminal en adipocitos maduros (Gregoire *et al.*, 1998).

**C. Cambios tempranos en la expresión de genes:** Conforme la expansión clonal cesa, se inicia la activación transcripcional coordinada de genes específicos del adipocito. La expresión de estos genes se ve acompañada de cambios bioquímicos y morfológicos dramáticos, es decir, las células comienzan a redondearse para alcanzar la forma característica del adipocito maduro. La expresión de lipoproteína lipasa (LPL) ha sido considerada a menudo como un signo temprano de la diferenciación adipocitaria. La expresión de LPL ocurre, sin embargo, de manera espontánea al alcanzar la confluencia y es independiente de los inductores de la diferenciación. Esta circunstancia sugiere que LPL puede reflejar la etapa de cese del crecimiento más que ser un marcador temprano del proceso de diferenciación (Gregoire *et al.*, 1998). Los receptores de adiponectina (adipoR1 y adipoR2), así como también la manganeso superóxido dismutasa 2 (MnSOD2) se encuentran entre los genes de expresión temprana.

**D. Eventos tardíos y diferenciación terminal:** Durante la fase final de la diferenciación, los adipocitos en cultivo incrementan marcadamente la lipogénesis de novo, observándose por tanto, un incremento en la expresión y actividad de enzimas implicados en esta ruta tales como la sintasa de ácidos grasos, enzima málica y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Durante esta etapa aumenta también considerablemente la sensibilidad a la insulina, debido a un gran aumento en el número de receptores de insulina y transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4). Además, se expresan y sintetizan otros genes y productos específicos de los adipocitos como aP2, una proteína fijadora de ácidos grasos específica de adipocitos, y perilipina, una proteína asociada a las gotas de lípidos. También en esta etapa se comienzan a secretar algunas sustancias endocrinas y paracrinas tales como adiponectina, leptina, adiposina, PAI-1 y angiotensina (Gregoire *et al.*, 1998).

Entre los genes que disminuyen su expresión a lo largo de la diferenciación cabe destacar a Pref-1 (Preadipocyte Factor-1). Pref-1 es un inhibidor de la diferenciación adipocitaria y se encuentra altamente expresado en preadipocitos, mientras que es prácticamente indetectable en adipocitos maduros (Smas and Sul, 1993; Smas and Sul, 1996).

#### ➤ **CASCADA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA ADIPOGENESIS**

Los cambios morfológicos y de expresión génica descritos en la adipogénesis se encuentran regulados por un reducido número de factores de transcripción que se van activando secuencialmente. Según el modelo más establecido, uno de los primeros pasos en la adipogénesis es la activación de los factores de transcripción **C/EBP $\beta$**  y **C/EBP $\delta$**  (figura 2.3) en respuesta a la dexametasona y el IBMX respectivamente (Yeh *et al.*, 1995). Estas proteínas de unión a CCAAT/ *enhancer* (C/EBPs) pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (*basic leucine zipper*), constituida por varias isoformas: C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  (Cao *et al.*, 1991).

Por otra parte, en respuesta al efecto mitogénico de la insulina tiene lugar la inhibición por hiperfosforilación de la **proteína del retinoblastoma (Rb)** (Shao and Lazar, 1997; Classon *et al.*, 2000). La inactivación de Rb permite por un lado, la progresión del ciclo celular dando lugar a la mencionada amplificación clonal, ya que Rb bloquea la actividad de **E2F**, un factor de transcripción que juega un papel fundamental en la regulación de la progresión del ciclo celular (Richon *et al.*, 1997; Shao and Lazar, 1997), y por otro, disminuye la represión de **PPAR $\gamma$**  (Fajas *et al.*, 2002a). PPAR $\gamma$  es el único miembro de una familia de receptores nucleares/factores de transcripción (PPAR), que se encuentra expresado en altos niveles en tejido adiposo y se ha demostrado que es un importante mediador del proceso adipogénico (Tontonoz *et al.*, 1994). Al quedar liberado de Rb, PPAR $\gamma$  puede entonces ser estimulado por C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  (Tontonoz *et al.*, 1994).

PPAR $\gamma$ , a su vez, estimula la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) que bloquean el ciclo celular, tras la expansión clonal, y dan lugar a las últimas etapas de la diferenciación (Morrison and Farmer, 1999). PPAR $\gamma$  colabora también con C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  en estimular la expresión de **C/EBP $\alpha$** , uno de los principales y más pleiotrópicos activadores de marcadores adipogénicos, que entre otras dianas activa al propio PPAR $\gamma$  creando así un circuito retroalimentado (Rosen *et al.*, 2002) que mantiene el estado diferenciado de las células. C/EBP $\alpha$  es un factor nuclear indispensable y crítico en el proceso de diferenciación de los adipocitos, (Lin and Lane, 1994; Yeh *et al.*, 1995) que se une y transactiva a muchos genes relacionados con el fenotipo adipogénico como los ya mencionados: adiponectina, aP2/FABP, SCD1 (*stearoyl-Coa desaturase 1*), GLUT4, PEPCK, leptina y el receptor de insulina. También es conocida su función antimitótica (Umek *et al.*, 1991; Timchenko *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1993).

Recientemente, el factor de transcripción de la familia *forkhead* **FoxO1a**, un importante regulador del ciclo celular, se ha añadido al elenco de principales factores implicados en la adipogénesis (Nakae *et al.*, 2003). En fases tempranas del proceso de diferenciación, FoxO1a es inhibido por la insulina presente en el cóctel adipogénico, lo que permite la progresión del ciclo celular (la expansión clonal) y la fosforilación de Rb, crucial para la posterior estimulación de PPAR $\gamma$ . En fases más tardías, en cambio, FoxO1a debe ser activado, colaborando entonces con PPAR $\gamma$  en la regulación de la expresión de los inhibidores de ciclinas necesarios para bloquear el ciclo, como p21, e iniciar la fase final de la diferenciación (Nakae *et al.*, 2003) (figura 2.3). La descompensación de la función de FoxO1a da lugar a notables alteraciones en la adipogénesis.

Otro factor importante implicado en el proceso de diferenciación es **ADD1/SREBP1** (*Adipocyte Determination Differentiation Dependent Factor 1/ Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*) (Seo *et al.*, 2004). La sobreexpresión de este factor de transcripción incrementa la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  incluso en ausencia de sus ligandos activadores (Kim and Spiegelman, 1996)



Cuando las células están en la diferenciación terminal, E2F4 reprime la expresión de PPAR $\gamma$  a través de la asociación con p130/p107 que reclutan HDAC al promotor de PPAR $\gamma$ .

La regulación **epigenética** (ver apartado 3 de la introducción) juega un papel crucial en la diferenciación de adipocitos. Aunque existen pocos estudios publicados al respecto, numerosos grupos están trabajando para elucidar cuales son los mecanismos necesarios para la apertura de la cromatina y la red transcripcional implicada en el correcto inicio de la diferenciación adipocitaria.

La **acetilación de histonas** parece ejercer una acción crucial en el inicio y mantenimiento de la adipogénesis. En las primeras fases de la adipogénesis, la acción del HDAC1 (histona deacetilasa 1) en los promotores de los genes de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  se correlaciona con una baja expresión de los mismos. Por otro lado C/EBP $\beta$ , está unido al promotor de C/EBP $\alpha$  asociado con el complejo represor HDAC1/mSin3 provocando la deacetilación de la histona H4 en la región colindante al promotor (Wiper-Bergeron *et al.*, 2003). La activación de PPAR $\gamma$  provoca la liberación de HDAC1 del promotor de C/EBP $\alpha$  y su posterior eliminación vía proteosoma 26S (Zuo *et al.*, 2006). La eliminación del complejo represor permite que se active C/EBP $\alpha$ .

Una vez las células entran en la fase de expansión clonal, la expresión de PPAR $\gamma$  aumenta significativamente, implicando la interacción por un lado, con factores de transcripción que regulan la reentrada en el ciclo celular como E2F (Fajas *et al.*, 2002b) y por otro lado con cofactores como CBP/p300 (Takahashi *et al.*, 2002). CBP posee actividad acetiltransferasa, así su interacción con PPAR $\gamma$  provoca una hiperacetilación de histonas en la región colindante al promotor de PPAR $\gamma$  y con esto, la activación transcripcional del mismo. Las enzimas remodeladoras de la cromatina también son necesarias en el desarrollo del adipocito maduro. La interacción de SWI/SNF en el promotor de PPAR $\gamma$  es posterior a la hiperacetilación del mismo, así como también a la unión de los activadores C/EBPs, de la Pol II y de la mayoría de los factores generales de transcripción (Salma *et al.*, 2004). Por su parte la HDAC3 es reclutada por la proteína Rb, que cuando está unido a PPAR $\gamma$  forma el complejo represor PPAR $\gamma$ -Rb-HDAC3, bloqueando así la capacidad de PPAR $\gamma$  de dirigir la activación de sus genes diana. (Fajas *et al.*, 2002a). Por otra parte, la ciclina D1 puede inhibir la acción de PPAR $\gamma$  interaccionando físicamente con él y reclutando histonas deacetilasas, concretamente HDAC1 e HDAC3, y la histona metiltransferasa Suv39, responsable de metilar H3K9, dando como resultado una inhibición de la diferenciación de adipocitos (Fu *et al.*, 2005).

Por otro lado, el complejo HDAC1/mSin3 puede ser reclutado al promotor de la proteína de unión de enhancer/CCAAT promoviendo la deacetilación de la histona H4

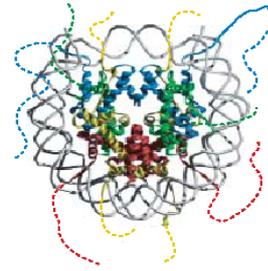
#### **2.4. PPARs Y LA FISIOLÓGÍA DEL ADIPOCITO MADURO**

PPAR $\gamma$  se encuentra altamente expresado en tejido adiposo y se considera, como se ha mencionado, el principal regulador en la formación de células grasas. Además de sus efectos en el número de adipocitos, la activación de PPAR $\gamma$  media diversas funciones metabólicas

fundamentales en el adipocito maduro y por extensión en el organismo (revisado en (Semple *et al.*, 2006)).

El descubrimiento que PPAR $\gamma$  es la diana biológica de las TZDs, una clase de fármacos antidiabéticos, ha significado un avance fundamental (Lehmann *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996). Las TZDs, que tienen la capacidad de unirse y activar a PPAR $\gamma$ , disminuyen la glucemia y mejoran el perfil lipídico en modelos experimentales y en pacientes afectados de DM2 (Boden *et al.*, 2003). Curiosamente estos efectos transcurren estimulando la adipogénesis y por lo tanto el aumento de peso corporal (Fonseca, 2003). Aunque se desconocen los mecanismos exactos de esta aparente paradoja, existen diversas observaciones que permiten relacionar el PPAR $\gamma$  con la mejora de la sensibilidad a la insulina. Las TZDs inducen la diferenciación del adipocito (Tontonoz *et al.*, 1994), permitiendo además el aumento del almacenamiento de lípidos en adipocitos maduros a través de la activación de diversos genes involucrados en este proceso: la lipoproteína lipasa (LPL), aP2, CD36/ FATP-1 y PEPCK (Motojima *et al.*, 1998; Schoonjans *et al.*, 1996; Tontonoz *et al.*, 1995). De esta manera se consigue proteger los tejidos periféricos (músculo, hígado y páncreas) de los efectos nocivos de la acumulación de grasa. Por otra parte, los agonistas de PPAR $\gamma$  alteran la función endocrina del adipocito maduro y mejoran determinados parámetros metabólicos en otros tejidos y órganos. Concretamente se ha descrito que PPAR $\gamma$  reprime la expresión de varias adipocitoquinas que promueven la resistencia a la insulina, como TNF $\alpha$ , IL-6 y resistina, mientras que estimula la expresión de adiponectina, la cual incrementa la sensibilidad a la insulina (Kern *et al.*, 2001).

Paradójicamente, algunos autores han descrito los mismos efectos beneficiosos promovidos por el estado de activación de PPAR $\gamma$ , mediante la inhibición de la proteína. La disminución parcial de la actividad de PPAR $\gamma$ , mediante el modelo transgénico PPAR $\gamma$  (+/-) (Kubota *et al.*, 1999) o mediante el uso de antagonistas (Rieusset *et al.*, 2002), protege del desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina cuando se administra una dieta rica en grasas (Guerre-Millo *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2000). En estas circunstancias tiene lugar un aumento en la expresión de leptina que conduce a un incremento en la combustión de FFA y a una disminución de la lipogénesis. En consecuencia, la acumulación de triglicéridos disminuye en TAB, hígado y músculo, hecho que impide el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina.



### PARTE 3. TRANSCRIPCIÓN Y CROMATINA

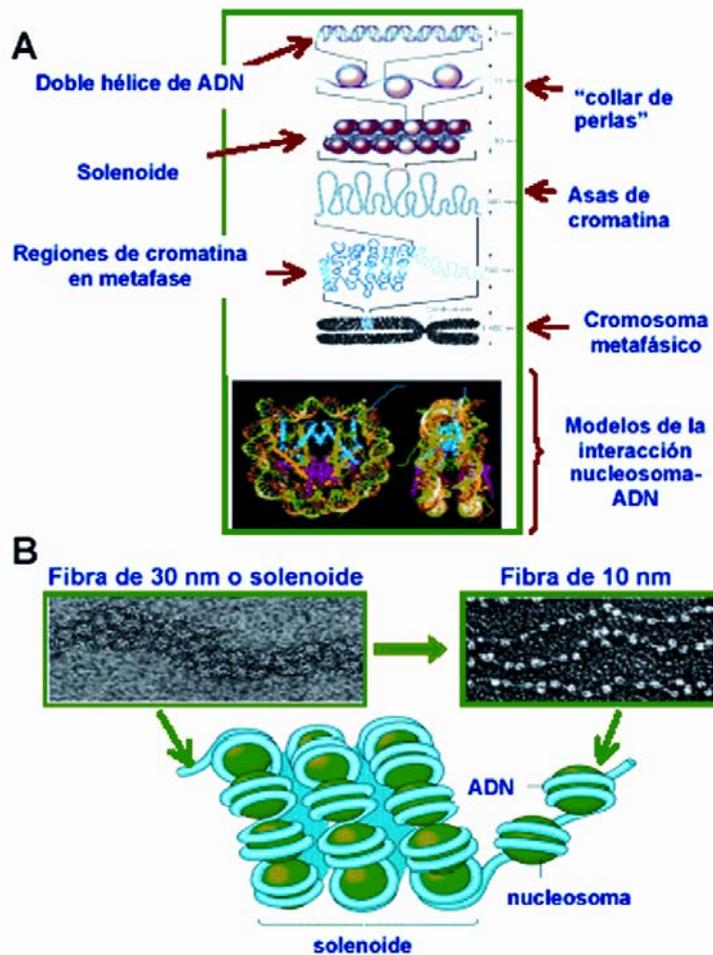
El conjunto de información necesaria para el control del desarrollo y las funciones celulares se encuentra codificada en forma de una simple cadena de cuatro nucleótidos (A, T, C y G), conocida como **ácido desoxirribonucleico (DNA)**. Según la genética clásica, secuencias discretas de estos cuatro nucleótidos, también denominados bases, constituyen los genes, la unidad fundamental de la herencia. En términos generales un gen se define como una secuencia de DNA que contiene la información necesaria y suficiente para dar lugar a RNA y/o proteína y normalmente está compuesto por dos partes principales: una región codificante, que contiene la información de la secuencia de amino ácidos que forma la proteína y una región reguladora que se encarga de controlar dónde y cuándo debe expresarse la misma. La totalidad de los genes de un organismo, así como también las secuencias de DNA de función reguladora, de mantenimiento y desconocida, constituyen su genoma. En las últimas décadas se ha invertido un gran esfuerzo en completar la secuenciación de los genomas de numerosas especies, desde virus o bacterias de interés médico hasta organismos superiores como el ratón y, sobre todo, el genoma humano. Sin embargo, este conocimiento queda incompleto si no se comprende cómo las distintas células interpretan esta información. De hecho, todas las células de un organismo pluricelular son genéticamente homogéneas (es decir contienen exactamente la misma secuencia de DNA), pero estructural y funcionalmente heterogéneas, como puede constatarse al comparar por ejemplo un adipocito con una neurona: aunque ambos tipos celulares presentan obvias coincidencias estructurales y funcionales, también son evidentes grandes diferencias. Por otra parte, se ha visto que en el genoma humano que está constituido por unas 3000Mb, solo un 5% corresponde a genes. Así, a pesar que su tamaño es unas 20 veces mayor que el de un organismo mucho menos complejo, como la mosca de la fruta, posee apenas unos 40,000 genes frente a los 17,000 genes de éste último. Por tanto, la complejidad biológica depende menos del número de genes, y más de cómo éstos se expresan. En consecuencia, el esfuerzo invertido en el estudio de la identificación de genes en décadas anteriores, se redirige hoy hacia el estudio de su regulación y expresión.

En la célula eucariota, la mayor parte del DNA se encuentra compartimentalizado en el núcleo, donde está estructurado mediante interacciones con proteínas estructurales y reguladoras formando el complejo que conocemos como cromatina. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, constituido por un octámero de histonas (dos homodímeros H3-H4 y dos heterodímeros H2A-H2B) alrededor del cual se disponen 147 pares de bases (pb) de DNA. La cromatina permite contener el genoma en el interior del núcleo celular (Figura 3.1),

pero como contrapartida, conlleva una inaccesibilidad de las proteínas reguladoras, y con esto la necesidad de procesos activos de remodelación y reestructuración (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Existen múltiples niveles de compactación del DNA siendo el cromosoma en metafase el nivel más elevado (Figura 3.1A) (Bulger and Groudine, 1999; Felsenfeld and Groudine, 2003). La gran mayoría de los eventos de remodelación de la estructura de la cromatina ocurren a un nivel de mucha menos compactación (Figura 3.1B).

**Figura 3.1.** Distintos niveles de estructuración del DNA. A- El nivel primario de compactación del genoma está dado por el nucleosoma donde se disponen 147 pb de DNA, dando lugar a lo que se conoce como fibra de 10 nm. Con la incorporación de la histona H1 se pasa al nivel superior de compactación representado por un grupo de seis nucleosomas llamado solenoide o fibra de 30 nm. Posteriormente y en su estructura de solenoide se forman asas de cromatina que abarcan centenas de kilobases. Poco se sabe sobre los mecanismos de compactación entre el solenoide y el nivel superior de compactación que es el cromosoma metafásico, estructura necesaria para la segregación de los cromosomas durante la mitosis. En la parte inferior se muestra un esquema de la estructura nucleosomal asociada al DNA (Felsenfeld and Groudine, 2003). B- El solenoide constituye el medio ambiente natural donde deben llevarse a cabo todos los eventos de regulación, en particular la remodelación de su propia estructura. En este esquema se muestran microscopías electrónicas de las fibras de 10 y 30 nm.



En eucariotas, los mecanismos de regulación de la expresión génica están integrados en tres niveles interrelacionados (van Driel *et al.*, 2003). El primero lo constituye la secuencia de nucleótidos de la molécula de DNA. El segundo nivel comprende la estructura de la cromatina, y como se explicará más adelante, la regulación epigenética asociada a la misma (Felsenfeld and Groudine, 2003). Por último, el tercer nivel es la organización espacial del genoma en el interior del núcleo celular.

### 3.1. REGULACIÓN A NIVEL DE LOS ELEMENTOS DE SECUENCIA

#### 3.1.1. Elementos de regulación en *cis*

##### ➤ **Promotores**

Un promotor se define como la secuencia continua de DNA que es suficiente para que la RNA polimerasa II, que es la enzima encargada de sintetizar RNA a partir de DNA, dirija el correcto inicio de la transcripción de un gen (Butler and Kadonaga, 2002; Smale, 2001). Estas secuencias suelen encontrarse en un intervalo que va de -30 a +20 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción (también conocido como +1) (Figura 3.2). Frecuentemente el proceso de regulación implica otros elementos distintos del promotor (*enhancers*, *locus control region*). Cuando alguno de estos elementos se encuentra adyacente al promotor es difícil precisar hasta dónde llega el promotor. Es por ello que se considera al promotor como la región que es necesaria para lograr el inicio de la transcripción, aunque esta región puede no ser suficiente para determinar la regulación completa del gen (Werner, 1999). En las secuencias promotoras, existen diferentes motivos consenso que permiten la unión de proteínas reguladoras al DNA (Butler and Kadonaga, 2002; Smale, 2001). Entre las secuencias consenso más comunes encontramos las denominadas caja TATA, los elementos iniciadores (Inr), los elementos de reconocimiento para el factor TFIIB (BRE) y los elementos promotores 3' (DPE).

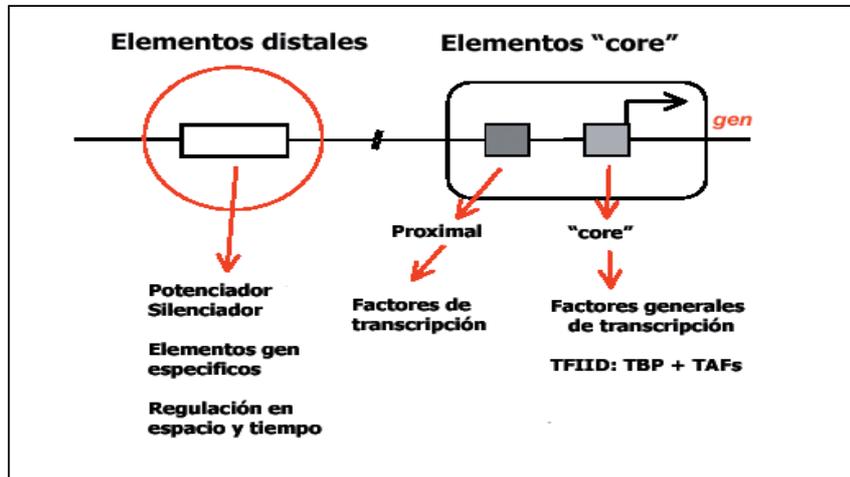
##### ➤ **Potenciadores o *Enhancers***

Los potenciadores son elementos de regulación que dirigen la unión de proteínas que transmiten señales de activación específica a distancia (Blackwood and Kadonaga, 1998). Estos elementos pueden estar localizados a 5' o 3' del inicio de transcripción del gen y actúan de forma independiente a la orientación y distancia en que se encuentren. Se ha propuesto que podrían actuar incrementando la probabilidad para que un gen se active en un momento dado de la diferenciación celular (Blackwood and Kadonaga, 1998), interaccionando físicamente con la secuencia promotora del gen, mediante la formación de un asa o de un complejo transcripcional conocido como holocomplejo. Es decir, el potenciador permitiría que un mayor número de células activen transcripcionalmente un gen determinado, lo que se conoce como el modelo de "encendido y apagado" (Blackwood and Kadonaga, 1998). Un modelo alternativo sugiere que los potenciadores aumentan los niveles transcripcionales de manera homogénea en todas las células (Blackwood and Kadonaga, 1998).

##### ➤ **Silenciadores**

A los silenciadores se unen factores nucleares que tienen un efecto negativo sobre la transcripción de manera independiente de su posición y orientación en relación con el sitio de inicio de la transcripción (Brand *et al.*, 1985; Ogbourne and Antalis, 1998). Se cree que los silenciadores clásicos interfieren con el ensamblaje de la maquinaria transcripcional (Ogbourne

and Antalis, 1998), mientras que lo que se conoce como elementos reguladores negativos, cuya actividad sí depende de su posición, reclutan proteínas que interfieren con la asociación de otros factores de transcripción a su secuencia diana.



**Figura 3.2.** Esquema de los dos tipos de elementos de regulación dependientes de secuencia que intervienen en el control de la expresión génica. El promotor está compuesto por el elemento central o "core" que se localiza cercano al sitio de unión de TFIID, la RNA polimerasa II y el resto del complejo de preiniciación e inicio de la transcripción. En un intervalo de 10 a 200 pb se encuentra el elemento proximal donde se incorporan factores de transcripción tanto específicos como generales. Para completar el escenario, los elementos distales pueden localizarse a gran distancia tanto en dirección 5' como 3' en relación con el gen y tienen la función de aumentar los niveles de expresión de un gen y su especificidad.

### ➤ **Delimitadores**

Recientemente se ha propuesto que los genes que se expresan se encuentran organizados en regiones de cromatina que se encuentran "abiertas" en un tiempo y espacio determinado del desarrollo, es decir, dominios cromosómicos transcripcionalmente activos (Recillas-Targa and Razin, 2001). Se postula que estos dominios cromosómicos tienen límites bien definidos constituidos por lo que conocemos como elementos frontera o delimitadores.

### ➤ **Los elementos de control del locus**

Las regiones de control del locus (LCR), están formadas generalmente por sitios de hipersensibilidad a la endonucleasa DNasa I, agrupados en zonas del genoma que abarcan de 200 a 600 pb, donde la estructura de la cromatina es más laxa y por lo tanto la unión de los factores de transcripción se encuentra favorecida (Bulger and Groudine, ). Los LCRs poseen dos funciones principales: una actividad tipo potenciador y otra que fomenta la apertura de la estructura de la cromatina al nivel de un dominio (Blackwood and Kadonaga, 1998; Bulger and Groudine, 1999; Li *et al.*, 2002; Razin *et al.*, 2003). La función de los LCRs es específica de tejido y, al igual que los potenciadores, se ha propuesto que podrían estar incrementando la

probabilidad de la expresión de un gen o grupo de genes en un mayor número de células (Li *et al.*, 2002; Blackwood and Kadonaga, 1998).

### 3.1.2. Elementos de regulación en *trans*

#### ➤ La RNA polimerasa y los factores generales de transcripción

Existen tres tipos de RNA polimerasa, conocidas como RNA Pol I, II y III, las cuales son activas en diferentes tipos de genes y se distinguen según la sensibilidad a la toxina fúngica  $\alpha$ -amanitina (tabla 3.1). La transcripción de los genes que codifican para proteínas se lleva a cabo por la RNA pol II.

**Tabla 3.1. Diferentes tipos de RNA polimerasas**

Tipo	Genes transcritos	Sensibilidad a la $\alpha$ -amanitina
I	RNA ribosomal (45S precursor de 28S, 18S y 5.8S)	Insensible
II	Todas las proteínas de genes codificantes, RNAs nucleares pequeños U1, U2, U3, etc.	Muy sensible (inhibida a 1 $\mu$ g/ml)
III	RNA de transferencia, RNA ribosomal 5S, RNA nuclear pequeño U6, secuencias de RNA repetitivas: Alu, B1, B2, etc., RNA 7SK, 7SL	Moderadamente sensible (inhibida a 10 $\mu$ g/ml)

Para cumplir su función, la RNA pol II requiere de un conjunto de factores auxiliares, conocidos como factores "generales" o "basales" de transcripción (TFs), entre los cuales se encuentran los complejos: TFIIA, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIIB (tabla 3.2) (Kadonaga, 2004; Lemon and Tjian, 2000; Reinberg *et al.*, 1998). Estos factores pueden unirse a las secuencias promotoras y formar lo que conocemos como el complejo de preiniciación de la transcripción (PIC) (Figura 3.3).

La transcripción mediada por RNA pol II comienza con la unión de factores reguladores específicos cerca del sitio de inicio de transcripción (TIS, +1) (revisado en Reinberg *et al.*, 1998). Éstos pueden actuar indirectamente sobre la maquinaria de transcripción reclutando otros factores que pueden modificar la estructura de la cromatina, o directamente interactuando con la maquinaria de transcripción. En la forma más simple de activación génica, ambos mecanismos, directos e indirectos actúan para reclutar la maquinaria general de transcripción al elemento central del promotor.

La asociación estable de la RNA pol II con la secuencia promotora, requiere de la unión previa de TFIID, un complejo multiprotéico en el cual solo una proteína, TBP (*TATA-Box binding protein*), se une directamente al DNA a través de la caja TATA. En promotores que no tienen

caja TATA, TBP puede tener interacciones proteína-proteína con los factores generales de transcripción e interacciones inespecíficas con el DNA (Reinberg *et al.*, 1998).

Por otra parte, TFIIH incluye la quinasa responsable de fosforilar a la región carboxilo terminal de la RNA pol II, conocida como CTD, mediante la cual regula su actividad (Reinberg

---

**Tabla 3.2. Factores generales de transcripción**

Factor	Nº de subun.	Función	
TFIIA	2	Estabiliza la unión de TBP y TFIID-DNA. Bloquea inhibidores de la transcripción. Regulación génica positiva y negativa.	
TFIIB	1	Se une a TBP, Pol II y al DNA del promotor. Facilita la fijación al sitio de inicio de transcripción.	
TFIID	TBP	1	Se une a elementos TATA y remodela el DNA del promotor. Plataforma de ensamblaje de TFIIB, TFIIA y TAFs.
	TAFs	14	Se une a elementos INR y DPE. Diana de factores reguladores.
Mediador	24	Se une cooperativamente con la Pol II. Posee actividad quinasa y acetiltransferasa. Estimula la transcripción basal y activada. Diana de factores reguladores.	
TFIIF	3	Se une a la Pol II. Involucrado en el reclutamiento de Pol II al PIC y en la formación del complejo abierto.	
TFIIE	2	Se une al promotor cercano al sitio de inicio de transcripción. Puede ayudar a abrir o estabilizar la burbuja de transcripción.	
TFIIH	10	Funciones en transcripción y reparación de DNA. Actividad quinasa y helicasa. Esencial para la formación del complejo abierto.  Mutaciones en IIH puede causar enfermedades humanas.	

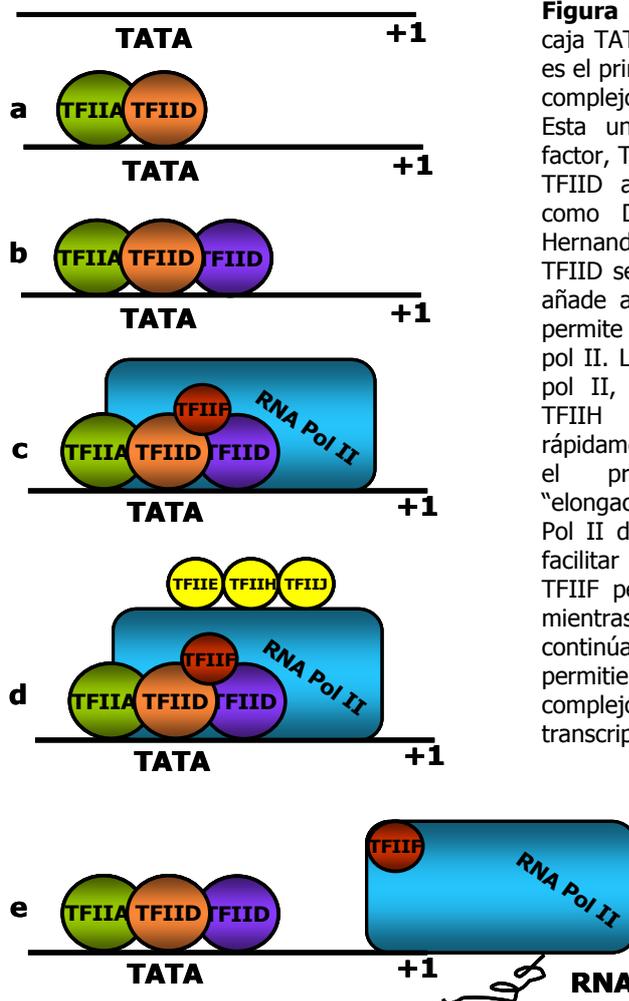
---

*et al.*, 1998; Lemon and Tjian, 2000; Zurita and Merino, 2003). La RNA pol II con un CTD hipofosforilado es inicialmente reclutada al promotor para la formación del PIC. Durante el inicio de transcripción el CTD es fosforilado en la Ser5, mientras que la fosforilación de CTD en la Ser2 por parte de otras quinasas promueve la elongación de la RNA pol II y el reclutamiento de factores de transcripción implicados en la maduración del RNA mensajero.

➤ **Factores de transcripción específicos de secuencia.**

Numerosos factores de transcripción específicos de secuencia, se unen generalmente a elementos 5' con respecto a la caja TATA y actúan aumentando o disminuyendo los niveles de transcripción. Estos pueden clasificarse en: constitutivos, inducibles y específicos de tejido.

Factores de transcripción constitutivos: La unión de este tipo de factores a su secuencias diana y su interacción con la maquinaria basal de transcripción resulta en un aumento de la transcripción en todos los tejidos. En ausencia de éstos, la transcripción ocurre a niveles muy bajos. Los factores constitutivos más estudiados son Sp1 y CREB



**Figura 3.3** .La unión de TFIID a la caja TATA o una región equivalente, es el primer paso en la formación del complejo estable transcripcional. Esta unión es facilitada por otro factor, TFIIA, que impide la unión de TFIID a factores inhibitorios tales como DR1 y DR2 (revisado en Hernandez, 1993). Una vez que TFIID se ha unido al DNA, TFIIB se añade al complejo y junto a TFIIF permite el reclutamiento de la RNA pol II. Luego de la unión de la RNA pol II, otros tres factores, TFIIE, TFIIH y TFIIJ se asocian rápidamente al complejo para lograr el proceso conocido como "elongación". Esto permite liberar la Pol II de la secuencia promotora y facilitar el inicio de transcripción. TFIIF permanece unida a la pol II mientras que TFIIA y TFIID continúan unidos a la caja TATA, permitiendo la formación de otro complejo estable y un nuevo ciclo de transcripción.

Factores de transcripción inducibles: Todas las células, desde las bacterias hasta los mamíferos, responden a varios tratamientos activando o reprimiendo la expresión de genes particulares. Estos genes que responden a tratamientos específicos comparten una corta secuencia de DNA en sus promotores. Dichos estímulos activan factores de transcripción específicos, los cuales se unen a estas secuencias interaccionando a su vez con los factores de transcripción constitutivos y provocando de esta manera un aumento de la transcripción génica. La inducción de la

actividad génica por choque térmico o por hormonas esteroideas son ejemplos de factores de transcripción que son activados en respuesta a un estímulo.

Factores de transcripción específicos de tejido: Los eucariotas superiores poseen una gran variedad de tipos celulares, con patrones de expresión génica específicos, necesarios para su especialización. Existe una gran variedad de factores de transcripción implicados en este tipo de regulación, los cuales son sintetizados o activados en un tejido o tipo celular determinado. Un ejemplo de este tipo de factores de transcripción es PPAR $\gamma$ , que juega un papel clave en la diferenciación del adipocito.

➤ **Coactivadores y Corepresores**

Son elementos reguladores que modifican la transcripción de un gen sin unirse al DNA. Actúan estableciendo un puente de comunicación entre el activador y la maquinaria de transcripción basal mediante interacciones interproteicas. Los coactivadores aumentan la eficiencia de la transcripción génica, mientras que los corepresores la disminuyen.

### **3.2. LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA**

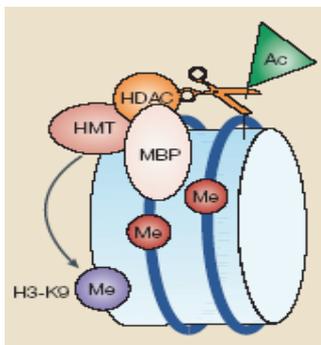
El término epigenética significa literalmente "más allá de la genética". En 1941, Conrad Hal Waddington definió epigenética como "las interacciones de los genes con su ambiente que provoca un fenotipo dado". Hoy este término describe el estudio de los cambios hereditarios que tienen lugar en la expresión génica sin involucrar cambios en la secuencia de DNA. Por ejemplo, cuando en una célula se ha establecido un patrón particular de genes "activo" o "inactivo", este mismo patrón es heredado por su célula hija, aunque durante la división celular la transcripción se detiene y los cromosomas se condensan. La regulación epigenética no sólo es crítica para generar diversidad de tipos celulares durante el desarrollo, sino que también es importante para el mantenimiento de la estabilidad y la integridad de los perfiles de expresión de los diferentes tipos celulares. La regulación epigenética, sirvió en un principio como un mecanismo de defensa contra la invasión parasitaria del genoma, al inactivar de forma permanente genes exógenos integrados en un genoma huésped. Pero a través de silenciamiento génico selectivo (Wolffe and Matzke, 1999), juega también un papel clave en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. El silenciamiento génico selectivo explica como todos los genes del organismo pueden estar presentes en todas las células aunque solo unos cuantos están activados en una célula dada en un momento dado. La activación o inactivación de un gen determina qué proteína estará presente y cual no. Por ejemplo, aunque el gen *myoD1* está presente en todas las células del organismo, está activado únicamente en células del músculo esquelético, y no en otro tipo celular, como en células adiposas. En cambio genes considerados constitutivos o de mantenimiento, como el gen de la  *$\beta$ -actina*, pueden estar activados en todas las células al mismo tiempo.

Los mecanismos epigenéticos son además los responsables de la inactivación del cromosoma X, que es el silenciamiento al azar de uno de los dos cromosomas X en todas las células somáticas de las hembras de mamíferos (revisado en Park and Kuroda, 2001) y de la impronta génica, que es la expresión o represión de ciertos genes de acuerdo a su origen parental (revisado en Ferguson-Smith and Surani, 2001).

Aunque existen potencialmente muchos mecanismos diferentes por los cuales los genes de una célula puede activarse o silenciarse, dos mecanismos juegan un papel clave en la regulación de la expresión génica: la metilación del DNA y los cambios en la estructura de la cromatina debido a modificaciones postraduccionales en las histonas.

### 3.2.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA es el proceso por el cual un área del cromosoma es metilada. En general los genes que son metilados cerca o en el promotor son inactivados (figura 3.4). En células animales, la metilación de DNA está restringida exclusivamente a los residuos CpG (Gruenbaum *et al.*, 1981) y contribuye a mantener la estabilidad del genoma, asegurando que las secuencias repetidas correspondientes a las secuencias de transposones no "salten", evitándose así la inestabilidad genómica (Wolffe and Matzke, 1999). La metilación del DNA participa también en el silenciamiento de genes de manera permanente e irreversible en distintas etapas del desarrollo (Li, 2002), así como también en el fenómeno conocido como impronta genómica (Recillas-Targa, 2002).



**Figura 3.4.** La metilación del DNA en las regiones promotoras inhibe la transcripción mediante diferentes estrategias moleculares. Un modelo simple es que la metilación del DNA en sitios específicos del promotor bloquea la unión de factores que son necesarios para la transcripción (Tate and Bird, 1993). Comúnmente, las CpGs metiladas son reconocidas por proteínas de dominio de unión de metil (MBP) que son capaces de reclutar enzimas modificadoras de histonas tales como histonas deacetilasas (HDAC) o histonas metiltransferasas (HMT) (Sarraf and Stancheva, 2004), de esta manera ocurre una deacetilación de histonas y una metilación de H3-K9 que altera el ambiente local de la cromatina (Eden *et al.*, 1998). (Ver en la figura). La metilación de DNA provoca además una

disminución general de la sensibilidad a la DNase I, así como también alteraciones en las estructuras de orden superior (Keshet *et al.*, 1986) que provoca que esas regiones sean menos accesibles a la maquinaria transcripcional.

### 3.2.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas

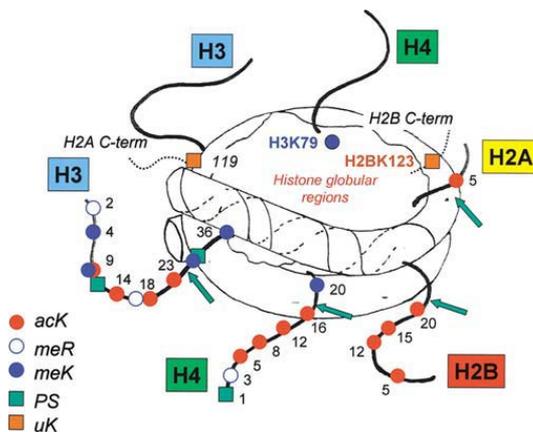
Como se ha mencionado anteriormente las histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman el núcleo del nucleosoma. Las 4 son pequeñas proteínas básicas (11-16 KDa) que están formadas por un extenso dominio de plegamiento en el extremo carboxi terminal (C-) de la proteína, donde ocurren las interacciones histona-histona e histona-DNA, y colas cargadas en el extremo amino terminal (N-), que sobresalen de la estructura globular del nucleosoma y es donde tienen lugar las modificaciones postraduccionales o covalentes (Kuo and Allis, 1999) (Figura 3.5). Los

extremos N-terminales, están implicados también en la formación de estructuras de cromatina de mayor orden de compactación (Hecht *et al.*, 1995; Edmondson *et al.*, 1996).

Las células eucariotas contienen una quinta histona llamada histona conectora, de las cuales la más común es H1. La histona conectora se asocia con el nucleosoma, estabilizando la interacción histona-DNA a través del núcleo de histonas.

Clásicamente se consideraba que las histonas tenían una función netamente estructural. En los últimos años, numerosos estudios han puesto de manifiesto que además de su acción en la organización del nucleosoma, las histonas juegan un papel activo en la regulación de la actividad génica.

Las modificaciones postraduccionales de las histonas afectan la función de la cromatina mediante dos mecanismos. En primer lugar, alteran la carga electrostática de la histona, lo que provoca un cambio de su estructura o un cambio en la unión al DNA. Por otra parte, las modificaciones pueden crear superficies de unión para módulos de reconocimiento de proteínas, resultando así en el reclutamiento de complejos funcionales específicos, tanto activadores



**Figura 3.5. Modificaciones de las histonas.**

El extremo N-terminal de las histonas sobresale de la estructura del nucleosoma y posee además los residuos que se modifican covalentemente. Se muestra las modificaciones más estudiadas. En rojo, acetilación de los residuos lisina (acK); en blanco, metilación de argininas (meR); en azul, metilación de lisinas (meK); en verde, fosforilación de serinas (PS) y en naranja, ubiquitinización de lisinas (uK).

como represores. Ejemplos de módulos de reconocimiento son el bromodominio, que puede reconocer lisinas acetiladas, y el cromodominio, que puede reconocer lisinas metiladas (Dhalluin *et al.*, 1999; Jacobs and Khorasanizadeh, 2002).

Las modificaciones covalentes que sufren las histonas son: la acetilación de lisinas, la metilación de lisinas y argininas, la fosforilación de treoninas y serinas, la ubiquitinación de lisinas, la sumoilación de lisinas y la ADP-ribosilación del ácido glutámico (Bannister *et al.*, 2002) (figura 3.4).

Las modificaciones más estudiadas y en las que centraremos nuestra atención es la acetilación y la metilación de lisinas.

### ➤ **Acetilación de histonas**

Las acetiltransferasas de histonas (HAT) son las enzimas responsables de añadir un grupo acetil en las colas de las histonas (Roth *et al.*, 2001). La estructura del dominio HAT muestra un núcleo central muy conservado que es importante para la unión del cofactor acetil-coenzima A (acetil-CoA) y dominios N- y C- terminal más divergentes entre especies. Estos últimos son los responsables del reconocimiento y unión al sustrato.

La acetilación de lisinas puede ser revertida por histonas deacetilasas (HDACs), por tanto el estado de acetilación de histonas resultará del balance entre la expresión y la actividad de HAT y HDAC.

En diversos modelos celulares, la acetilación de lisinas se ha asociado con activación transcripcional, especialmente la acetilación en H3K9. Además, la acetilación de histonas tiene varias funciones en la regulación del nucleosoma (Kurdistani *et al.*, 2004), como replicación del DNA (Turner and O'Neill, 1995), el posicionamiento de histonas (Allis *et al.*, 1985; Sobel *et al.*, 1995) y la reparación del DNA (Choy and Kron, 2002; Bird *et al.*, 2002; Qin and Parthun, 2002).

Es importante destacar que además de las histonas, varios componentes de la maquinaria transcripcional básica y muchos factores de transcripción pueden ser acetilados, tales como TFIIE, TFIIF y FoxO1. La acetilación de estos factores pueden, a su vez, regular su actividad (Gu and Roeder, 1997).

### ➤ **Metilación de histonas**

Las histonas pueden ser metiladas tanto en residuos lisina como arginina. Los residuos lisina pueden ser mono di o trimetilados, mientras que las argininas pueden incorporar uno o dos grupos metil (Bannister *et al.*, 2002).

Las proteínas encargadas de añadir hasta tres grupos metil a la lisina son las metiltransferasas de histonas (HMT) (tabla 3.3). Estas proteínas poseen tanto el dominio SET el cual posee la actividad enzimática responsable de la metilación de lisinas como el cofactor S-adenosyl-metionina (SAM) que se une a la superficie cóncava de la enzima, actuando como donante de metilos. Hasta el momento se conocen 24 sitios de metilación de histonas (17 residuos en lisina y 7 en arginina) (ver tabla 3.3). La metilación más estudiada es la de los residuos lisina en el extremo N-terminal de las histonas H3 y H4. La metilación de histonas, como la acetilación, está asociada con ciertos dominios de cromatina, heterocromatina y eucromatina. (Ver cuadro 3.1).

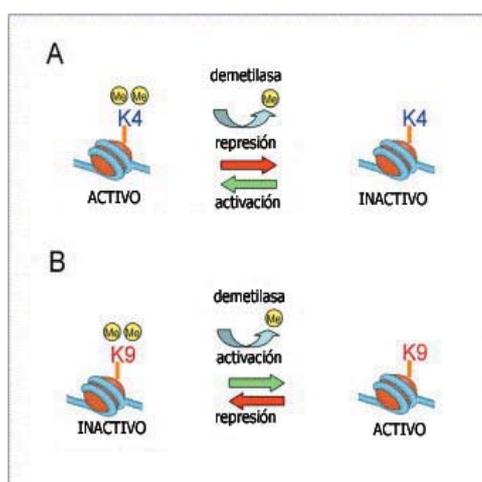
En general las zonas transcripcionalmente inactivas o heterocromatina están enriquecidas con metilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), H3K27, H3K79 y H4K20, mientras que zonas con actividad transcripcional o eucromatina con metilaciones en H3K4, H3K36 y H4K20. Es decir, cuando un gen se expresa, ocurre un aumento de metilación, por ejemplo en H3K4, en las regiones 5' del gen de forma específica, principalmente de trimetilación (Bernstein *et al.*, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 2002).

**Tabla 3.3. Enzimas responsables de metilar y demetilar histonas**

<b>Histona y residuo</b>	<b>Metiltransferasa</b>	<b>Demetilasa/deiminasa</b>	<b>Función</b>
H3R2	CARM1 (Mm,Hs)	-	
	-	PADI4 (Hs)	
H3K4	ySET1 (Sc)	-	Activador/Eucromatina
	SET7/Set9 (Hs)	-	Activador
	MLL (Hs)	-	Activador
	Ash1 (Dm)	-	Activador
	Smyd3 (Hs)	-	Activador
	-	LSD1	Represor
H3R8	PRMT5	-	Represor
	-	PADI4 (Hs)	
H3K9	SUV39h1/SUV39H1 (Mm, Hs)	-	Metilación del DNA/ Represor/Heterocromatina
	Clr4 (Sp)	-	Represor/Heterocromatina
	Dim5 (Nc)	-	Metilación del DNA
	Kryptonite (At)	-	Metilación del DNA
	G9a (Mm, Hs)	-	Represor/Metilación del DNA
	Eu-HMTasa1 (Hs)	-	Represor
	ESET/SETDB1 (Mm, Hs)	-	Represor/Metilación del DNA
	E(z)/EZH2 (Dm, Hs)	-	Represor
	Ash1 (Dm)	-	Activador
	-	LSD1	Activador
H3R17	CARM1 (Mm, Hs)	-	Activador
	-	PADI4 (Hs)	
H3R26	CARM1 (Mm, Hs)	-	
	-	PADI4 (Hs)	
H3K27	E(z)/EZH2 (Dm, Hs)	-	Represor
	Ezh2 (Mm)	-	Inactivación del cromosoma X/ Heterocromatina
H3K36	Set2 (Sc)	-	Activador
	NSD1 (Mm)	-	
	-	JHDM1	
H3K79	Dot1/DOT1L (Sc, Hs)	-	Represor/reparación del DNA
H4R3	PRMT1	-	Activador
	-	PADI4 (Hs)	
H4K20	SET9 (Sp)	-	Reparación del DNA
	Pr-SET7/Set8 (Hs, Dm)	-	Represor
	SUV4-20 (Hs)	-	Heterocromatina
	Ash1 (Dm)	-	Activador
	NSD1 (Mm)	-	
H1H26	EZH2 (Hs)	-	

Las enzimas están ordenadas de acuerdo al residuo de histona que metilan. Entre paréntesis están indicadas las especies a las que pertenecen.

Las proteínas represoras tales como Proteína de la Heterocromatina 1 (HP1) o la proteína Polycomb (PC) de *Drosophila*, poseen un cromodominio que les permite reconocer marcas de metilación represivas apropiadas (H3K9 o H3K27 respectivamente) (Margueron *et al.*, 2005) mientras que la proteína activadora (CHD1) de *Saccharomyces cerevisiae* utiliza su cromodominio para unirse a H3K4. De esta manera dependiendo del residuo que se ha modificado se reclutará una proteína activadora o represora de la transcripción génica.



**Figura 3.6.** LSD1 es capaz de demetilar residuos mono y dimetilados. Dependiendo el residuo que demetile puede actuar como activador o inhibidor. En A, se muestra la acción de LSD1 en la lisina 4 de la histona H3. La demetilación de H3K4 (que es una marca activadora) provoca la inactivación génica. En B, se muestra la acción activadora de LSD1 al demetilar la lisina 9 de la histona H3.

Aunque se ha observado que casi todas las marcas de metilación estudiadas están involucradas en la regulación de la transcripción, recientemente, se ha encontrado que la metilación de histonas es necesaria para el establecimiento de un punto de control o *checkpoint* en respuesta al daño del DNA (Huyen *et al.*, 2004). Otro proceso que está ligado a la metilación de histonas es el silenciamiento génico por medio de RNA de interferencia (RNAi). La disrupción de componentes de la maquinaria de RNAi afecta la metilación en H3K9 y la unión de HP1, por tanto la formación de heterocromatina (Pal-Bhadra *et al.*, 2004).

A diferencia de la acetilación, la metilación de histonas ha sido largo tiempo considerada como un proceso irreversible. Este dogma cambió con el descubrimiento de una enzima con actividad demetilasa específica. La enzima LSD1 (demetilasa específica de lisinas 1) es capaz de demetilar H3K4 y H3K9 mono y di-metiladas mediante una reacción amino oxidasa (Shi *et al.*, 2004). Por lo tanto según el residuo que demetile (H3K9 o H3K4) provocará activación o represión génica (Figura 3.5). Recientemente se han añadido a la lista nuevas enzimas capaces de demetilar lisinas. La JHDM1 (histona demetilasa que contiene el dominio JmjC 1) específicamente demetila H3K36 mono y dimetilada (Tsukada *et al.*, 2006). La JMJD2 o JHDM3 es la primera demetilasa encontrada capaz de actuar sobre H3K9 Y H3K36 trimetilada (Whetstine *et al.*, 2006). La metilación de histonas es, por lo tanto, una marca mucho más dinámica de lo que inicialmente se pensó, y es el resultado del equilibrio entre HMT y HDM.

Se ha demostrado además que la metilación de histonas posee un papel fundamental en la fase de elongación de la RNA pol II. Por ejemplo en levadura, COMPASS que forma parte del complejo Set1, es la enzima que cataliza la metilación de H3K4. Se ha visto que COMPASS

interacciona con la forma de RNA Pol II fosforilada en la serina 5 (Krogan *et al.*, 2003a; Ng *et al.*, 2003). Asimismo, Set2, la HMT encargada de metilar H3K36 se asocia preferentemente con la forma fosforilada en la serina 2 de la RNA Pol II (Li *et al.*, 2002). Además Set2 necesita de la fosforilación del CTD de la RNA Pol II para unirse a esta y metilar H3K36 (Li *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2003b).

La metilación de argininas está ligada a activación o represión transcripcional. En mamíferos, PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*) y CARM1 (*catalized histone asymmetric dimethyl-arginine*) están implicadas en la activación génica, mientras que PRMT5 (*catalized histone symmetric dimethyl-arginine*) está asociada con represión génica. La metilación de argininas también puede ser demetilada mediante una reacción de deiminación, provocando inactivación.

### **Cuadro 3.1. Dominios de la Cromatina**

#### **Eucromatina**

Es la región de la cromatina que se encuentra descondensada. Se cree que representa *loci* transcripcionalmente activos. Los genes de esta región se replican temprano (*early genes*). La cromatina posee histonas hiperacetiladas y están enriquecidas en metilación H3K4, H3K36 y H3K79.

#### **Heterocromatina**

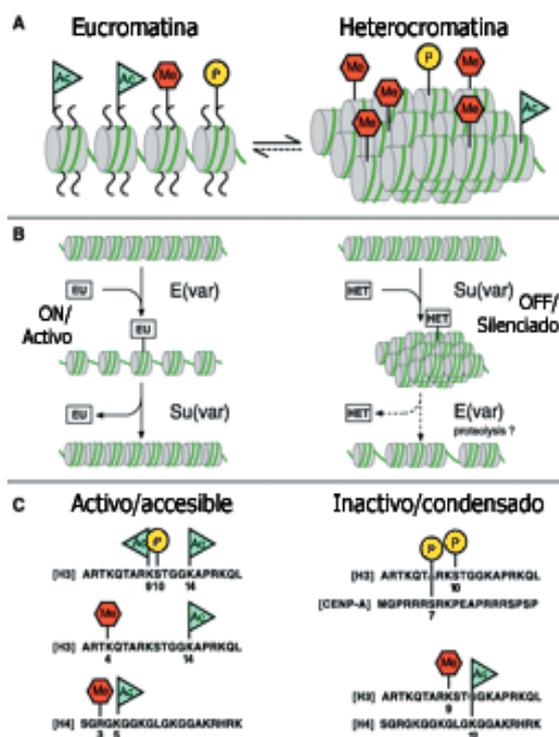
La cromatina en esta región se encuentra altamente compactada con regiones de DNA silenciado. Replica tarde, contiene histonas hipoacetiladas y altos niveles de DNA metilado. La heterocromatina se subclasifica en:

- **Heterocromatina pericéntrica o constitutiva:** se encuentra cercana a los centrómeros y en humanos posee largos bloques de repeticiones alfa satélites. Esta región está enriquecida con trimetil H3K9, monometil H3K27 y trimetil H4K20. Como sugiere el nombre está irreversiblemente silenciada y se mantiene a lo largo de los ciclos de división celular.
- **Heterocromatina facultativa:** Este tipo de cromatina tiene la facultad de convertirse en transcripcionalmente activa de nuevo. Un ejemplo clásico de ésta es el cromosoma X inactivo de mamíferos. En él, la cromatina se caracteriza por la presencia de trimetil H3-K27, dimetil H3-K9 y monometil H4-K20.

#### ➤ **Código de Histonas**

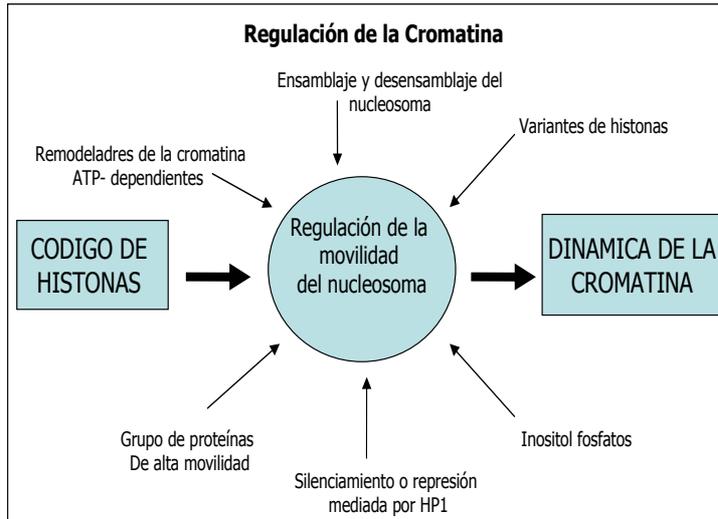
Las distintas modificaciones covalentes de las histonas pueden generar interacciones sinérgicas o antagónicas con proteínas asociadas a la cromatina, dando lugar a transiciones dinámicas entre estados transcripcionales activos e inactivos. La variedad e interdependencia de dichas modificaciones llevó a la definición del **código de histonas** (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000). Esta hipótesis predice que (i) distintas modificaciones en las colas de las histonas puede inducir afinidad hacia ciertas interacciones con proteínas asociadas a la

cromatina, (ii) las modificaciones en la misma o en diferentes colas pueden ser interdependientes y pueden generar varias combinaciones en el nucleosoma y (iii) distintos dominios de eucromatina o heterocromatina son altamente dependientes de la concentración y combinación local de diferentes nucleosomas modificados. Así, este "código del nucleosoma" permite la formación de diferentes estados epigénicos, dando lugar a una "lectura" de información genética distinta, tal como activación génica versus silenciamiento génico o, más globalmente, proliferación celular versus diferenciación celular (Figura 3.6) (revisado en Jenuwein and Allis, 2001).



**Figura 3.6.** Modelo de histonas en dominios de eucromatina o heterocromatina. **A.** Representación esquemática del nucleosoma accesible (eucromatina) o inaccesible (heterocromatina), con acetilación (Ac), metilación (Me) y fosforilación (P) de las colas N-terminal de las histonas. **B.** Modelo genérico de la función antagonista de E(Var) y Su(Var) en la adición de marcas en el templado nucleosomal en eucromatina (EU) o heterocromatina (HET). Su(Var)s puede actuar además eliminando marcas activadoras y E(Var) puede también desestabilizar el estado de heterocromatina. **C.** Ejemplos de posibles combinaciones de modificaciones covalentes en las colas N-terminal de las histonas que representan estados activos o inactivos en la cromatina. Las letras corresponden a los distintos residuos de amino ácidos de la cola de la histona. A: alanina; E: Glutamato; G:Glicina; H:Histidina; K:lisina; L:leucina; M:metionina; P:prolina; Q:Glutamina; R:Arginina; S:Serina y T:Treonina.

Estudios recientes han puesto de manifiesto una serie de modificaciones en la porción globular de las histonas que conforman el nucleosoma, muchas de las cuales ocurren en la interfase DNA-histona. Esto ha llevado al desarrollo de una nueva teoría: el modelo de la regulación de la movilidad del nucleosoma (Figura 3.7). Cosgrove y colaboradores propusieron dividir el modelo del código de histonas en dos grupos: código de histonas clase I y II. Las modificaciones clase I tienen la función de reclutar proteínas estabilizadoras de la cromatina o factores remodeladores ATP dependientes y están localizadas principalmente en las colas de las histonas. Las modificaciones clase II funcionan principalmente por interferencia química e incluyen cualquier factor o modificación que afecte en forma directa o indirecta la afinidad del DNA por el octámero de histonas. Estas están localizadas en la superficie lateral del nucleosoma (revisado en Cosgrove *et al.*, 2004)).



**Figura 3.7.** Regulación de la movilidad del nucleosoma. Este modelo añade múltiples mecanismos al código de histonas. Diferentes factores celulares que pueden afectar la dinámica de la cromatina son señalados en la gráfica. En este modelo la cromatina se regula por factores que establecen un equilibrio entre nucleosomas con alta movilidad versus nucleosomas que poseen baja movilidad.

### 3.2.3. Intercambio de histonas

Además de las modificaciones covalentes de las histonas, la incorporación de variantes de histonas, participa en el apropiado funcionamiento de los diferentes dominios de la cromatina (Cuadro 3.1). El intercambio de histonas podría tener una función dual *in vivo*. Primero puede eliminar todas las marcas epigenéticas de las histonas facilitando así la reprogramación del gen en cuestión. Segundo puede permitir la incorporación de histonas involucradas en funciones específicas en la célula. En las variantes de histonas, la mayoría de las lisinas que pueden metilarse están conservadas. Esto significa que la integridad del programa epigenético no necesita ser perturbado con el cambio de histonas por especies variantes.

### 3.2.4. Los complejos de remodelación ATP-dependientes

Para activar o reprimir la expresión de un gen es necesario que factores de transcripción tanto generales como específicos tengan acceso, reconozcan y puedan unirse a sus secuencias diana en el DNA. Para esto es necesario la acción de una serie de complejos cuya función, dependiente de ATP, es la de dejar al descubierto dichas secuencias desplazando o reposicionando los nucleosomas. Estos desplazamientos ocurren a distancias cortas y sin que los nucleosomas se disocien por completo de sus interacciones con el DNA (Narlikar *et al.*, 2002). SWI/SNF originalmente estudiado en levadura y *Drosophila*, constituye el complejo pionero seguido por NURF, CHRAC y ACF entre otros (Roberts and Orkin, 2004). El complejo Mi-2/NuRD esta compuesto por histonas deacetilasas y proteínas de unión al DNA metilado entre otras, por lo tanto posee tres actividades remodeladoras (Bowen *et al.*, 2004). Los complejos de remodelaje ATP-dependientes son capaces de regular la expresión génica, tanto positiva como negativamente. Además se han demostrado procesos cooperativos entre los complejos de remodelación y las histonas acetiltransferasas sin que exista un orden

predominante en la acción de estas proteínas sobre la región de control (Fry and Peterson, 2002; Roberts and Orkin, 2004).

### **3.3. REGULACIÓN A NIVEL NUCLEAR**

Diferentes técnicas de biología molecular y celular han demostrado que cada cromosoma en interfase ocupa un único y relativamente compacto volumen en el núcleo para formar territorios cromosomales (van Driel *et al.*, 2003). Estos territorios, son estructuras abiertas, con espacios entre ellos o dominios intercromatina (Cmarko *et al.*, 1999), que permiten la difusión de componentes macromoleculares a través del núcleo. Los sitios de transcripción están localizados cerca de la superficie de los dominios de cromatina en dichos espacios intercromosomales (Cmarko *et al.*, 1999; Verschure *et al.*, 1999), formando probablemente asas de cromatina que se extienden por el espacio intercromatina. Así, evidencias claras demuestran que la arquitectura del núcleo está íntimamente relacionada con la función genómica. La posición de un gen dentro del núcleo es importante: algunas áreas son represivas, mientras que otras promueven la transcripción. Existe un modelo que propone que las regiones del genoma que serán transcritas se relocalizarán haciendo un *looping* (por mecanismos aun desconocidos) desde la periferia de los territorios, hacia zonas en contacto con los compartimientos intercromatina donde además se encuentran los factores de transcripción y procesamiento, además de la Pol II (Kosak and Groudine, 2002). Redirigir un gen a la periferia del núcleo celular en levadura causa silenciamiento de dicho gen (Andrulis *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente que las histonas asociadas al genoma en las zonas internas en un territorio se encuentran mayoritariamente desacetiladas, mientras que en las zonas más expuestas y en contacto con las regiones intercromatina se encuentran hiperacetiladas (Kosak and Groudine, 2002).

Un aspecto más reciente que confirma la participación de la dinámica nuclear en la regulación de la expresión génica, son los procesos de relocalización (Francastel *et al.*, 2000), que se refiere al hecho de asociar, tanto regiones de cromatina como factores de transcripción en las zonas de heterocromatina o eucromatina, ocasionando la represión o activación génica, respectivamente. Un ejemplo es que la relocalización o reposicionamiento de genes en la cromatina pericentromérica durante la diferenciación linfocitaria en ratón, se correlaciona con inactivación epigénica de ese loci, sugiriendo que el contacto con la heterocromatina centromérica resulta en un extensión del estado inactivo en trans (Fisher and Merckenschlager, 2002).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





Las señales liberadas por el tejido adiposo son cruciales en el desarrollo de la obesidad y de las enfermedades relacionadas con la misma. La adiponectina es una de las proteínas más específicas del adipocito, y realiza funciones en el control de la homeostasis de la glucosa, de lípidos y en el metabolismo energético. Diversos estudios sugieren un papel importante de esta citoquina en la etiopatogenia y la fisiopatología de la obesidad y en consecuencia, en la resistencia a la insulina y la diabetes.

En base a ello, este trabajo se centró en el análisis de la expresión de los recientemente clonados receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2 en tejido adiposo humano de sujetos normales, obesos y diabéticos, así como en el estudio de los mecanismos epigenéticos que regulan su expresión, y la expresión de adiponectina y otros genes clave en el proceso de diferenciación del adipocito.

Los objetivos concretos que nos planteamos son los siguientes:

1. Establecer la expresión de los receptores de adiponectina en el tejido adiposo humano y su posible regulación en la obesidad y/o diabetes.
  - Analizar la expresión de los receptores de adiponectina en tejido adiposo intra-abdominal en sujetos normales, obesos y diabéticos.
  - Estudiar si existe correlación entre los niveles de expresión de estos receptores en tejido adiposo y los parámetros metabólicos asociados a obesidad y/o diabetes.
2. Entender los cambios epigenéticos que regulan la expresión de adiponectina, sus receptores, adipoR1 y adipoR2 y otros genes clave, como leptina y glut4, durante el desarrollo de la célula adiposa.

- Identificar las modificaciones que sufren las histonas en los promotores de genes clave como adiponectina, leptina, glut4 y otros durante la diferenciación del adipocito.
- Evaluar la correlación entre la expresión de adiponectina y las modificaciones de histonas durante la adipogénesis.
- Estudiar la importancia de las modificaciones de las histonas en la regulación de la expresión de adiponectina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. CULTIVOS CELULARES

Los estudios de esta tesis se han realizado con la línea celular 3T3-L1 de embrión de ratón (*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EEUU*). L1 es una sublínea de 3T3 (Swiss albino) desarrollada mediante el aislamiento de un clon por parte de Green y colaboradores (Green and Kehinde, 1975). Por ser una línea celular de fibroblastos comprometida hacia la línea adipogénica, pueden ser mantenidos como tal, o pueden ser fácilmente estimulados a diferenciarse a adipocitos, en ciertas condiciones de incubación. Por esta razón, esta línea celular es un excelente modelo para estudios relacionados con la adipogénesis.

Las células se mantuvieron en el incubador a 37°C con el 5% de CO<sub>2</sub>, en las condiciones de que se detallan a continuación. Como consideraciones generales cabe destacar que las células han sido cultivadas siempre en superficies de plástico y el medio de cultivo se cambió 3 veces por semana.

La línea celular de fibroblastos 10T/2 fue utilizada como control. Esta línea celular se encuentra en un paso anterior que las 3T3-L1 ya que pueden diferenciarse a osteocitos, condrocitos o adipocitos. Estos fibroblastos se caracterizan por tener áreas extensas de metilación en su DNA, por lo tanto para poder diferenciarse a adipocitos deben tratarse previamente con el agente demetilante 5-azacitidina (Konieczny and Emerson, Jr., 1984).

### 1.1 Medios de cultivos

#### Reactivos:

- Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alta glucosa (4,5 g/l) sin glutamina (Sigma)
- L-glutamina (Biowhitaker)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (BioWhitaker)
- Suero de Ternera (CS) (Invitrogen Corp.)
- Penicilina/estreptomicina (BioWhitaker)
- Albumina (BSA) (Sigma)
- Dexametasona (Sigma)
- 1-metil-3-isobutylxantina (IBMX) (Sigma)
- insulina (Sigma-Aldrich)

Medio de crecimiento para fibroblastos 3T3-L1: Medio DMEM (glucosa 4,5 g/l) suplementado con 10% (v/v) de CS (no inactivado por el calor), 2mM de L-glutamina y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina

Medio de crecimiento para fibroblastos 10T/2: Medio DMEM (glucosa 4,5 g/l) suplementado con 10% (v/v) de FBS (no inactivado por el calor), 2mM de L-glutamina y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina.

Medio de diferenciación 1: Medio DMEM (glucosa 4,5g/l) suplementado con 10% (v/v) FBS (no inactivado por el calor), 2mM de L-glutamina, 1% (v/v) penicilina/estreptomicina, 0,25  $\mu$ M de dexametasona, 0,5 mM de IBMX y 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de insulina.

Medio de diferenciación 2: Medio DMEM (glucosa 4,5 g/l) suplementado con 10% (v/v) FBS (no inactivado por el calor), 2mM de L-glutamina, 1% (v/v) penicilina/estreptomicina y 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de insulina.

Medio de mantenimiento de adipocitos: Medio DMEM (glucosa 4,5 g/l) suplementado con 10% (v/v) de FBS (no inactivado por el calor), 2mM de L-glutamina y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina.

## **1.2. Protocolo de diferenciación de las células 3T3-L1**

Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo con el medio de crecimiento de fibroblastos 3T3 hasta que llegaron a la confluencia. Dos días después de este punto se indujo la diferenciación mediante la sustitución del medio de crecimiento por el medio de diferenciación 1 (Día 0). El día 2 se cambió el medio de diferenciación 1 por el medio de diferenciación 2. El día 5 se sustituyó el medio de diferenciación 2 por el medio de mantenimiento de adipocitos. A partir de este punto se mantuvieron las células con este medio que fue cambiado cada 2 días. Se consideró fenotipo de adipocito maduro a partir del día 5-7 de diferenciación. La incorporación de lípidos fue verificada por tinción con oil red. Las células se utilizaron a lo largo de la diferenciación entre el día 0 y el día 9.

## **1.3. Protocolos experimentales**

### Tratamiento con 5'-metiltiodaenosina (MTA) (Sigma)

Los tratamientos de las células 3T3-L1 se llevaron a cabo suplementando el medio de crecimiento 24 hs antes del inicio de la diferenciación con MTA 1 mM. Una vez comenzada la diferenciación se añadió MTA 0,5 mM a los medios inductores de la adipogénesis. El medio suplementado con el inhibidor fue cambiado cada 24 hs.

## 1.4. Inmunocitoquímica

### Reactivos:

- solución de fijación (etanol 95%, ácido acético 5%)
- tampón fosfato salino (PBS)
- solución de bloqueo (5% BSA-PBS)
- solución de anticuerpos (1% BSA-PBS)
- anticuerpos primarios: anticuerpos policlonales anti acetil H3K9/K14, anti di y trimetil H3K4 (Upstate Biotechnology, Inc, Lake Placid, NY, USA) dilución 1:1000
- anticuerpos secundarios: Cy3-conjugado (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) dilución 1:500.
- medio de montaje Fa Mounting (Disco Laboratories)

### Procedimiento:

Se deben utilizar 5000 células por cada experimento. El primer paso en este protocolo es la fijación de las células al portaobjetos, para lo que se añade solución de fijación durante 1 minuto, se lava con PBS 5 minutos y se le añade la solución de bloqueo para eliminar las uniones inespecíficas. Se hacen dos lavados de 10 minutos con PBS y se incuba con el anticuerpo primario, diluido en la solución de anticuerpo, durante 16-18 horas a 4°C. La incubación se realiza en una cámara húmeda. Después de dos lavados de 10 minutos con PBS se incuba 1 hora con el anticuerpo secundario diluido en la solución de anticuerpo en una cámara húmeda. La diluciones utilizadas fueron 1/500 y 1/250 para el anticuerpo primario y secundario respectivamente. Una vez incubado el anticuerpo secundario, se hacen 2 lavados de 10 minutos con PBS y se procede al montaje para la posterior observación en el microscopio de fluorescencia.

## 2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA

### 2.1 Obtención de RNA

#### 2.1.1. RNA de TAB humano

Para la obtención de RNA a partir de TAB humano nos hemos basado en el protocolo que utiliza una extracción con isotiocianato de guanidina (GIS) y cloroformo (Chomczynski and Sacchi, 1987). Debe tenerse en cuenta que las muestras procedentes de biopsias normalmente se reciben con mucha sangre, por lo tanto deberá procederse un lavado exhaustivo de la misma con abundante suero fisiológico frío.

### Reactivos:

- Isotiocianato de guanidina (Sigma)
- 2-mercaptoetanol (AppliChem)
- Cloroformo (Fluka)

- Acetato de sodio 4M ph 4.6 (Sigma)
- Fenol-Cloroformo (Invitrogen)
- Cloroformo-isoamilalcohol (Fluka)
- Homogeneizador (POLYTRON, suiza)

Procedimiento:

Se utilizan aproximadamente 2 g de TAB humano libre de sangre. Se añaden 12.5 ml de GIS y 90 µl de 2-mercaptoetanol mantenidos a 4°C. Se homogeniza rápidamente y se le agregan 12.5 ml de cloroformo. Después de mezclar vigorosamente durante 20 seg se centrifuga a 1600 rpm durante 15 min a 4°C. Se transfiere la fase acuosa a tubos de polipropileno y se añade 0.65 ml de acetato de sodio, 6.25 ml de fenol y 1.25 ml de cloroformo:isoamilalcohol (49:1). Después de mezclar vigorosamente durante 20 seg, se coloca en hielo y se deja reposar 15 min. Pasado este tiempo se centrifuga a 10000g, 20 min a 4°C. Se vuelve a transferir la fase acuosa a un tubo de polipropileno y para la precipitación de RNA se añade la misma cantidad de isopropanol que de muestra transferida. Se incuba a -20°C durante 1 día. En este paso puede dejarse hasta 1 mes. Para obtener el RNA se centrifuga a 10000g durante 30 min y se descarta el sobrenadante cuidadosamente para no perder el precipitado que no siempre es visible. Se realiza un lavado con 5 ml de etanol al 70%, se centrifuga a 10000g durante 20 min a 4°C. Se deja secar el precipitado y se resuspende en el volumen adecuado de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas.

Es muy importante realizar la extracción con la mayor rapidez posible y mantener todo el material en hielo, para evitar al máximo la actuación de las RNAsas endógenas.

Los materiales a reutilizar, se deben tratar con una solución de NaOH 0.3M durante 10 min y luego aclarar con abundante agua libre de RNAsas.

### **2.1.2. Extracción de RNA de células, preadipocitos y adipocitos primarios**

Reactivos:

- TRIzol® (*Gibco-BRL*)
- Cloroformo (Fluka)
- Isopropanol (Fluka)
- glucógeno (Invitrogen)
- etanol (Panreck)
- Tampón TE

Procedimiento:

Se lavan las células 2 veces con PBS, y se añade 1 ml de TRIzol®. El lisado se incuba 5 min y se añade 0.2 ml de cloroformo. Se mezcla, se deja reposar durante 2-3 min y se centrifuga a 12000g, 15 min a 4°C. Luego de transferir la fase acuosa a un tubo limpio se procede a la precipitación del RNA mediante la adición de 0.5 ml de isopropanol y 1 µg de glucógeno que por un lado actúa como transportador, mejorando la obtención de RNA y por

otro facilita la visualización del precipitado. Se incuba durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000g , 10 min a 4°C. Por último se realiza un lavado con etanol al 70% y se centrifuga a 7500g, 5 min a 4°C. El RNA obtenido se deja secar hasta que se haya evaporado el etanol y el precipitado sea incoloro. Posteriormente se resuspende en el volumen adecuado de H<sub>2</sub>O o tampón TE, que dependerá de el número inicial de células.

## 2.2. Valoración del RNA

En cualquiera de los dos protocolos anteriores, el RNA debe valorarse de dos maneras: midiendo la concentración obtenida en un espectrofotómetro a 260 nm y comprobando la integridad del RNA. Para esto se cargan entre 0.5 a 1 µg de RNA de cada muestra en un gel desnaturizante (formamida/formaldehído) de agarosa 1%.

## 2.3. Retrotranscripción inversa (RT)

Esta reacción consiste en la transformación de moléculas de RNA en moléculas de DNA monocatenaria y complementaria en secuencia (cDNA) y será utilizada, para analizar la expresión de un determinado gen en un tejido específico.

Para llevar a cabo esta reacción utilizamos un Kit comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit*) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### Reactivos:

- *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems)
- Termociclador (PTC-100,MJ Research)

### Procedimiento:

Para la transcripción reversa se utilizan entre 0.5 y 1 µg de RNA. Se debe trabajar en hielo y el material debe estar libre de RNAasas .

#### Mezcla de RT:

2,5 µl 10X Buffer

1 µl 25X dNTPs

2,5 µl 10X RPs

1,2 µl Multiscribe™ reverse transcriptasa

5,3 µl H<sub>2</sub>O (hasta 12,5µl)

#### Mezcla de muestra:

muestra: 1µg

H<sub>2</sub>O: hasta 12,5 µl

Se unen los 12,5 µl de la mezcla de RT, con la muestra que estará en 12,5 µl y se realizan las siguientes incubaciones en el termociclador: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 10 min a 95°C y finalmente a 4°C durante 10 min . El cDNA resultante se mantiene a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

Los *random primers* (RPs) son cebadores de secuencia aleatoria de 6-mer de tamaño, de manera que permiten amplificar toda la población de RNAs presentes en la muestra. También pueden usarse oligo(dT) el cuales permiten pasar a cDNA preferentemente la población de RNA mensajero.

En el caso de que en las PCRs a realizar no se haya tenido en cuenta que los cebadores estén entre dos exones, debe utilizarse un control negativo de la RT, haciendo la misma reacción pero sin enzima. Si se detecta amplificación en la PCR utilizando esta muestra significa que existe contaminación por DNA genómico.

#### **2.4. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)**

En el caso de analizar por PCR la expresión de genes, los cebadores se han diseñado de tal manera que estén entre dos exones, para evitar posibles contaminaciones de DNA genómico, que podría darnos falsas señales de expresión génica.

En casi todos los casos se ha intentado co-amplificar controles internos ( $\beta$ -actina o *tbp*) junto con el gen a analizar. Para esto se ha puesto a punto la reacción de manera tal que el gen de interés y el control presenten cantidades equimolares en la reacción de amplificación. Con el fin de que las PCR sean semi-cuantitativas, todas las PCRs se han realizado al menos en 2 ciclos diferentes, para asegurar que ambos productos se encuentran en la fase exponencial de amplificación,. Cada PCRs se ha hecho por duplicado en al menos 3 experimentos diferentes.

##### Reactivos:

- 10X PCR buffer
- 2mM dNTPs (Attendbio)
- Cebadores o *primers* (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- 5 U/ $\mu$ l Taq polimerasa
- H<sub>2</sub>O estéril
- Termociclador (PTC-100, MJ Research)

##### Procedimiento:

Se debe preparar la mezcla de reacción utilizando una cantidad equivalente de entre 2-5 ng de RNA. Para los genes control se utiliza menos cantidad de cebadores, ya que normalmente poseen mayor efectividad de reacción. Se colocan los tubos en un termociclador y se hace un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, y luego unos 28 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, seguidos de 5 minutos de extensión final a 72°C.

Reacción de PCR utilizando *tbp* como control:

- 1  $\mu$ l muestra
- 2 $\mu$ l 10X PCR tampón

- 2µl 2mM dNTPs
- 2µl cebador 5' (10 pmol/µl) para el gen de interes
- 2µl cebador 3' (10 pmol/µl) para el gen de interes
- 1 µl cebador 5' (10pmol/µl) para el gen tbp control
- 1 µl cebador 3' (10pmol/µl) para el gen tbp control
- 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- 0,2 µl Taq Polimerasa

Volumen final: 20 µl

De los 20 µl de reacción final, retirar 10 µl entre los ciclos (25-28) para analizar la amplificación del producto en fase exponencial. Para amplificar β-actina se utiliza 0,3 µl de cada cebador sense y antisense 10 pmol/µl.

En el caso de PCR de DNA genómico, que se utiliza para analizar la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se incluye en la misma reacción de PCR (*multiplex*), un control positivo y un control negativo. El control positivo nos da la información de cómo ha ido la precipitación, ya que si hay enriquecimiento de β-actina por ejemplo, y no del gen de interés, sabemos que la ChIP ha funcionado bien y el gen de interés no tiene la modificación en cuestión. El control negativo nos da información acerca de cuan específica ha sido la inmunoprecipitación. Por ejemplo, myoD1 que no se encuentra expresado en el adipocito, no debe tener modificaciones que indiquen activación, si la tiene significa que no ha funcionado la ChIP (que es inespecífica), probablemente por una mala sonicación del DNA.

Se ha de tener en cuenta para diseñar los cebadores que la región de interés en este caso es en el promotor, cercano al TIS (sitio de inicio de transcripción), a excepción de los cebadores usados para el análisis de la región codificante y terminal de adiponectina. Los cebadores deben amplificarse con una eficiencia comparable y deben tener diferentes tamaños a modo de poder visualizarse las bandas fácilmente.

En este caso también se ha puesto a punto la reacción con tal de parar la reacción de PCR en fase exponencial.

Reacción de PCR para ChIP:

- 1µl (diluída 1:2, 1:5 o 1:10) de muestra
- 1,5 µl 10X tampón
- 1,5 µl 2mM dNTPs
- 0,3 µl 50mM Mg<sub>2</sub>Cl
- 1µl cebador 5' (10pmol/µl) de gen control positivo
- 1µl cebador 3' (10pmol/µl) de gen control positivo
- 1µl cebador 5' (10pmol/µl) de gen control negativo
- 1µl cebador 3' (10pmol/µl) de gen control negativo
- 1µl cebador 5' (10pmol/µl) de gen de estudio

- 1µl cebador 3' (10pmol/µl) de gen de estudio
- 3,7 µl H<sub>2</sub>O
- 0,1 µl Taq Polimerasa

Para el análisis de los productos de PCR se realizan geles de acrilamida al 12%, los cuales son más sensibles y resolutivos que los geles de agarosa.

### Gel de acrilamida al 12%:

- 2 µl 5X TBE
- 3µl acrilamida/bisacrilamida (37,5:1c) 40% (BioRad)
- 5µl H<sub>2</sub>O
- 42µl APS 10%
- 5,7µl de TEMED

Se corre en TBE 1% a 150 V durante 90 minutos y se revela en H<sub>2</sub>O con bromuro de etidio (2µl de una solución 100mg/ml) durante unos segundos. Realizar la fotografía del gel con diferentes exposiciones.

## **2.5. PCR a tiempo real**

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la cantidad de fluorescencia producida por la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Los sistemas de detección pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes o sondas marcadas con fluorocromos.

### ➤ **Agentes Intercalantes (SYBR green)**

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. Este sistema tiene la ventaja que la optimización de las condiciones de reacción es muy fácil y es más económica. El principal inconveniente es su baja especificidad, ya que se unen indistintamente a producto génico o a dímeros de los cebadores. Para evitar esto se deben controlar muy bien las condiciones de reacción y la elección de los cebadores debe ser muy cuidadosa.

Hemos utilizado sondas SYBR green para cuantificar la expresión de adiponectina y abl1 (control positivo) durante la diferenciación de adipocitos.

### ➤ **Sondas de hibridación específicas**

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis (TaqMan), que son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar especialmente cerca. Durante la amplificación de DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo 5' de la sonda produciéndose la liberación del fluorocromo donador, que al estar espacialmente alejado del aceptor (ahora que se ha hidrolizado), la fluorescencia emitida es captada por el lector.

Utilizamos sondas TaqMan para la cuantificación de adiponectina, adipoR1 y adipoR2 en el primer trabajo. Los cebadores y sondas fueron de Applied Biosystems.

#### **Procedimiento para SYBR green:**

##### Mezcla de reacción:

- 10µl de SYBR green Real Time PCR tampón 2X (BioRad)
- 0,2-0,6µl de cebador 5'
- 0,2-0,6µl de cebador 3'
- 2-5 ng de muestra
- H<sub>2</sub>O destilada hasta volumen final de 20µl

La cantidad de cebador utilizada dependerá de la cantidad de uniones inespecíficas cebador-cebador (dímeros) que se formen en la reacción.

La temperatura de lectura se establecerá realizando una *melting curve*, que consiste en una vez terminada la reacción, ir subiendo la temperatura progresivamente y detectar la pérdida de fluorescencia por desnaturalización del producto. Si solo hay un producto se obtiene un único pico. Si existen dímeros de cebadores o productos inespecíficos, se obtendrá más de un pico. La temperatura óptima para cada primer es aquella en la que se obtenga un solo pico.

#### **Procedimiento para sondas TaqMan:**

Cuando se compra la sonda y los cebadores por separado debe optimizarse la concentración de cada uno en la mezcla de reacción. Primero se deja constante la concentración de sonda y variable la de cebadores. Una vez establecida la concentración idónea de cebadores, se procede a optimizar la concentración de sonda dejando constante la concentración de cebadores y variando la de sonda. Se utilizará la concentración de primers y sonda que genere mayor respuesta (fluorescencia).

En el primer trabajo se utilizaron sondas TaqMan MGB (FAM *dye-labelled*) (*assay on demand* de Applied biosystems) la cual ha sido optimizada previamente por el proveedor. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado en el ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

- *adiponectina*: Hs00605917\_ml
- *adipoR1*: Hs00360422\_ml
- *adipoR2*: Hs00226105\_ml
- *tbp*: Hs00427620\_ml (control endógeno)

Mezcla de reacción:

- 10 µl de *Taqman Universal Master Mix* x2X
- 1µl de mezcla de cebadores y sonda TaqMan MGB 20X
- 9 µl de muestra diluída

Condiciones de PCR: 95° durante 10 minutos (desnaturalización inicial), y 40 ciclos de 95° durante 15 segundos, 60° durante 1 minuto, y 72° durante 1 minuto.

### **3. VALORACIÓN DE PROTEINAS.**

#### **3.1. Obtención de Histonas de muestras celulares para analisis mediante Western Blot**

La preparación de histonas totales del núcleo se realiza normalmente por extracción ácida diluida o mediante una solución de alta concentración de sales. La extracción ácida libera inmediatamente las histonas del DNA y la fracción de proteínas no-histonas, mientras que la disociación de la cromatina en soluciones salinas requiere mayor purificación.

#### **Extracción ácida de Histonas**

Reactivos:

- Tampón de lisis para histonas: 10mM HEPES, pH 7,9; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM KCl. Añadir justo antes de usar 0.5mM DTT, 1.5mM PMSF e inhibidor de proteasas 50X (Sigma).
- HCl 200mM (Sigma)
- Ácido acético 0.1M (Sigma)
- Columnas de diálisis (Pierce)

Procedimiento:

A partir de una placa de 100mm, se raspan las células y se lavan 2 veces con PBS frío. Luego de una centrifugación de 30 segundos a máxima velocidad, se resuspende el precipitado en 1ml de tampón de lisis para histonas. Se añade HCl hasta una concentración final de 0.2mM

y se incuba durante 30 minutos en hielo. Una vez centrifugadas las muestras a 11000g durante 10 minutos a 4°C, se recupera el sobrenadante con la fracción de proteínas solubles en ácido, que contiene las histonas. Para eliminar el ácido de la muestra se deben seguir varios pasos de diálisis: 2 diálisis en ácido acético de 1 y 2 horas cada uno y 3 diálisis en H<sub>2</sub>O de 1, 3 y toda la noche respectivamente.

Una vez terminadas las diálisis se procede a cuantificar las proteínas obtenidas. Las muestras se guardan a -80°C.

Para verificar la integridad de las histonas deben correrse en un gel de acrilamida/poliacrilamida al 16%, en tampón tris-tricina, como se explicará más adelante.

### **3.2. Obtención de extractos nucleares**

Este protocolo está basado en el método de Schreider, que es el método de referencia. El primer paso del protocolo permite obtener la fracción citoplasmática y el segundo paso la fracción nuclear. Se debe trabajar siempre en hielo y con las soluciones frías, ya que las proteínas son muy sensibles a la degradación. Además debe añadirse a las soluciones, inhibidores de proteasas en el momento de su uso.

#### Reactivos:

-Tampón A (hipotónico): 10mM HEPES, pH 7,9; 10mM KCl; 0.1mM EDTA, pH 8,0; 0.1mM EGTA, pH 8,0; H<sub>2</sub>O hasta completar 100ml.

-Tampón C (hipertónico): 20mM HEPES, pH 7,9; 0.4M NaCl; 1mM EDT, pH 8,0; 0.1mM EGTA, pH 8,0; 20%Glicerol; H<sub>2</sub>O hasta completar 100ml

Añadir a ambos tampones en el momento de utilizar: DTT hasta 1mM

PMSF hasta 1mM

50X cocktail inhibidor de proteasa  
(Roche)

-NP40 1%

#### Procedimiento:

En primer lugar se deben preparar los tampones finales con la adición de DTT y PMSF y colocarlos en hielo. Una vez obtenido el precipitado celular ya sea de células en cultivo o primarias, se les añade 400 µl de tampón A, que al ser hipotónico permite que las células se hinchen y se rompan liberando los núcleos. Incubar en hielo durante 15 minutos. A continuación añadir 25 µl de NP40 al 1% y mezclar vigorosamente durante 10 segundos para romper la membrana celular. Centrifugar a máxima velocidad en una microfuga durante 30 segundos y separar el sobrenadante, el cual contiene la fracción citoplasmática. Al precipitado resultante se lo resuspende en 50 µl de tampón C, se mezcla vigorosamente durante 10 segundos y se deja en hielo durante 15 minutos. En este paso se rompe la membrana nuclear.

Luego de centrifugar durante 30 segundos a máxima velocidad se obtienen los extractos nucleares al recuperar el sobrenadante. Guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Es importante tener en cuenta que la cantidad de tampón A y C a añadir, depende del precipitado celular inicial, si el precipitado es muy grande, conviene ajustar las cantidades de manera proporcional.

### **3.3. Cuantificación de proteínas.**

Para la valoración de proteínas de las muestras se ha utilizado el método colorimétrico de Bradford. El reactivo de Bradford reacciona con los residuos aromáticos de las proteínas, formando un complejo que se puede cuantificar en el espectrofotómetro. Se determina la absorbancia a 595 nm de diferentes muestras y se calcula la concentración respecto a un estándar de concentración conocida.

#### Reactivos:

BSA 1mg/ml.

Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, 500-0006)

#### Procedimiento

1. Se contruye una curva estándar entre 0 y 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a partir de BSA 1 mg/ml.
2. Se pone entre 1-5  $\mu\text{l}$  de cada muestra y se añaden 200  $\mu\text{l}$  de Bio-Rad a todos los tubos.
3. Se incuba a temperatura ambiente de 20 a 60 minutos
4. Se lee a 595 nm, leyendo previamente el blanco.
5. Se obtiene la recta estándar y de ella se extrapola la concentración de las muestras.

### **3.4. Western Blot**

Esta técnica consiste en la detección indirecta de proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa obtenida por transferencia de un gel de poliacrilamida y utilizando anticuerpos contra las proteínas. El complejo antígeno-anticuerpo formado puede ser detectado gracias a un segundo anticuerpo unido a la enzima peroxidasa que reacciona con un substrato produciendo una reacción quimioluminiscente.

Las histonas, por sus propiedades tanto físico-químicas como de tamaño, requieren para su mejor detección y determinación, el uso de tampones de Tris/Tricina a un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del 16 %

#### Reactivos:

El gel consta de dos partes: un gel separador (que puede variar entre 7,5% y 15% dependiendo de el tamaño de la proteína a analizar) y un gel concentrador o *stacking*.

Geles

	<u>Separador</u>	<u>Stacking</u>
40%acril/0.8%bis	2.4 ml	0.4 ml
3 M Tris-HCl, pH 8.45/ 0.3 % SDS	2 ml	1 ml
H <sub>2</sub> O	1 ml	2.74 ml
Glicerol	0.634 ml	-
APS 10 %	10 µl	8.3 µl
TEMED	2µl	1.7 µl

-Tampón del cátodo: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricina, 0.1 % SDS

-Tampón del ánodo: 0.2 M Tris-HCl pH 8.9

-Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 128 mM Glicina, 0.1 % SDS, 20% metanol

-Tampón de carga (6X)

Procedimiento:

Una vez preparadas las muestras con el tampón de carga (6X), se desnaturalizan (20-40µg de proteína) a 95°C durante 5 minutos. Se montan los geles en una cubeta mini-protean (Bio-Rad) con los tampones correspondientes al cátodo y al ánodo en el caso de histonas. Se corre a 60 V durante 30 min y luego a 120-150 V durante 1 hora (el tiempo depende del tamaño de la proteína) Una vez se han separado las proteínas en el gel de poliacrilamida, se monta el sistema de transferencia (Bio-Rad) y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm ( Protran ) a 4°C y 100V durante 1 hora. Se desmonta el sistema de transferencia y se bloquea la membrana 1 hora con leche descremada al 3% disuelta en PBS. Incubar el anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo se hacen 2 lavados de 10 minutos con PBS y posteriormente se incuba el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente, se hacen 2 lavados nuevamente de 15 minutos con PBS y se revela con quimioluminiscencia: se incuba la membrana durante 1 minuto con el reactivo ECL y se detecta la quimioluminiscencia mediante el software LAS3000, exponiendo a diferentes tiempos.

**3.5. Inmumoprecipitación de cromatina (ChIP)**

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se ha convertido en la última década, en el mejor método para el estudio del acceso o unión de factores de transcripción a sus promotores diana en el contexto natural de cromatina, así como también las diferentes modificaciones postranscripcionales que sufren las histonas en promotores o sitios de interés.

Esta técnica se basa en fijar reversiblemente con formaldehído las células o tejido de interés para provocar un entrecruzamiento proteína-proteína o proteína-DNA que están interactuando o muy próximas (en una distancia máxima de 2 Å). Una vez fijado se generan fragmentos pequeños de DNA, normalmente mediante sonicación, aunque pueden usarse también enzimas de restricción. Con un anticuerpo específico se inmunoprecipita el complejo proteína-DNA, y de esta manera puede purificarse luego de revertir la unión a la proteína, el DNA precipitado que estará muy enriquecido. Las secuencias de interés pueden analizarse fácilmente mediante PCR usando cebadores específicos.

Reactivos:

- Formaldehído (Sigma)
  - Tampón de dilución de formaldehído: 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 50 mM HEPES pH 8.0
  - 1.25 M glicina
  - Tampón de lavado 1: 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25 % Tritón
  - Tampón de lavado 2: 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA , 0.5 mM EGTA, 0.2 M NaCl
  - Tampón de lisis SDS: 1% SDS , 10mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1. Se añade 1 mM PMSF e inhibidor de proteasas antes de usar.
  - Tampón de dilución ChIP: 0.01% SDS, 1.1 % Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris pH 8.1, 167 mM NaCl. Se añade 1 mM PMSF e inhibidor de proteasas antes de usar
  - Proteína A-Sefarosa/ DNA de esperma de salmón.
- Se pesan 0.15 g de proteína A (CL-4B Amersham Biocience) y se hidratan previamente con 0.6 ml de H<sub>2</sub>O, luego se realizan 3 lavados de 10 minutos en rotación con 0,6 ml de H<sub>2</sub>O y un último lavado con 0,6 ml de TE. Finalmente se resuspende con 0,3 ml de TE y se suplementa con 20 µg/µl de esperma de salmón sonicado y 50 µg/µl de BSA
- Tampón de lavado bajo en sales: 0,1% SDS, 1 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH8.1, 150 mM NaCl
  - Tampón de lavado alto en sales: 0.1 % SDS, 1 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH8.1, 500 mM NaCl
  - Tampón de lavado de LiCl: 0.25 M LiCl., 1 % NP 40, 1 % deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1
  - Tampón TE: 10 mM Tris, pH 8.1, 1 mM EDTA, pH 8,1
- Tampón de elución : 0.1 % SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>
- 5 M NaCl
  - 0.5 M EDTA, pH 8.0
  - 1 M Tris-HCl, pH 6.5
  - 10 mg/ml Proteinasa K (Roche)

Procedimiento:**A. Fijación y fragmentación del DNA**

En el caso de células 3T3-L1 (2 placas de 100mm) y preadipocitos primarios (partiendo de 1 gr de tejido adiposo de ratón), se fijan las células durante 10 min con 1% de formaldehído. La reacción se para con el agregado de glicina 0,125 M, que actúa mediante el aporte de grupos amina. Este paso no es absolutamente necesario, ya que puede eliminarse directamente el formaldehído aspirando el medio y procediendo con los lavados. Luego de dos lavados con PBS se obtienen núcleos añadiendo consecutivamente 1 ml de los tampones de lavado 1 y 2 e incubando en rotación durante 10 min cada uno. El lisado obtenido después de una centrifugación de 60 seg a 12000g, es disuelto en el tampón de lisis SDS (aproximadamente 400 $\mu$ l, pero depende del precipitado obtenido) mantenido a temperatura ambiente. Después de una incubación de 10 min se sonica unas 8 veces a un 50 % de la potencia del sonicador. La sonicación es un paso crítico en esta técnica ya que el éxito de la misma depende de la generación de fragmentos de DNA de entre 500 y 1000 pb. Una vez se ha sonicado la solución de cromatina se centrifuga a 12000g durante 1h para eliminar los detritos. En este paso puede dejarse la cromatina obtenida a 4°C durante una semana o continuar con la inmunoprecipitación.

**B. Inmunoprecipitación (IP)**

El sobrenadante obtenido se diluye 10 veces en el buffer de dilución ChIP. El volumen de dilución se ajusta de acuerdo al número inicial de células. Para cada IP se utilizan 0,5 ml de solución de cromatina. El *input* se prepara a partir de 0,4 ml de solución. Se realiza un bloqueo con 60  $\mu$ l de Proteína A/seferosa por cada 1 ml de cromatina durante 30 min aproximadamente. Si se desea realizar un bloqueo más exhaustivo se puede añadir a la muestra el mismo volumen de suero preinmune (PI) que se utilizará durante la IP en el tubo control al mismo tiempo que la Proteína A. Luego de una centrifugación a máxima velocidad, se transfiere el sobrenadante a tubos limpios y se añade el volumen necesario del anticuerpo correspondiente. A una de las alícuotas se le agrega la misma cantidad de suero PI y se incuban de 8-12 horas en rotación a 4°C. En lugar de suero PI puede emplearse un anticuerpo contra alguna proteína que no se espere encontrar unida al DNA (una hormona, un enzima citosólico, etc), o bien no añadir ningún anticuerpo, pero tratarla como todas las otras muestras que sí llevan anticuerpo. Este control es necesario para detectar precipitaciones inespecíficas de DNA. Para precipitar las proteínas, arrastrando al DNA asociado a ellas, se le agrega 30 ml de proteína A a cada IP y se incuba en rotación durante 4 h a 4°C.

Una vez precipitadas las proteínas se procede a eluir el complejo proteína-DNA luego de los lavados consecutivos con 1 ml de los tampones bajo en sal, alto en sal y de CILi, y 3 lavados

con 1 ml de TE cada uno. Se llevan a cabo 2 eluciones consecutivas de 15 min cada una, a temperatura ambiente añadiendo cada vez 200  $\mu$ l de Tampón de elución.

### **C. Reversión de la fijación y análisis de las muestras**

A los 400  $\mu$ l resultantes de la elución y al *input*, que es el DNA previo a la precipitación, se le añaden 16  $\mu$ l de NaCl 5 M, durante 5 horas a 65°C para revertir la unión de las proteínas al DNA. Las proteínas son eliminadas añadiendo 16  $\mu$ l de Tris-HCl 1M pH 6.5, 8  $\mu$ l de EDTA 0,5 M pH 8 y 1,6 ml de proteinasa K 10 mg/ml durante 1 h a 37°C. Se recupera el DNA mediante su extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol. El volumen de resuspensión de la muestra dependerá del número inicial de células y la eficiencia de la IP. Es aconsejable resuspender en un volumen pequeño (20-30  $\mu$ l) y probar la amplificación por PCR de la muestra sin diluir, así como a varias diluciones. En general el DNA *input* deberá diluirse un mínimo de 100 veces más que las muestras.

El análisis de las muestras se lleva a cabo por PCR (ver sección 2.4) empleando cebadores de los promotores o regiones de DNA de interés. Es adecuado co-amplificar junto con la región de interés controles negativos (secuencias de promotores a las que no se espera que el factor se halle unido) y positivos (secuencias de promotores a las que si se espera unión del factor). Las condiciones de dilución de las muestras así como el número de ciclos han de ajustarse para cada caso particular. Es aconsejable utilizar el menor número de ciclos posible.

Para hacer **ChIP de adipocitos** se incubaron las células una vez fijadas con el tampón de lisis de adipocitos durante 1 h a temperatura ambiente. Se centrifuga a máxima velocidad durante 10 min y al precipitado resultante se le añade el tampón de lisis SDS y se procede con el protocolo normal.

## **4. PRUEBAS FUNCIONALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS.**

### **4.1. PRUEBAS FUNCIONALES**

#### **Parámetros de la homeostasis de glucosa.**

Los métodos de referencia para medir la sensibilidad y la secreción de insulina son el clamp euglicémico hiperinsulinémico y el clamp hiperglicémico respectivamente. Su metodología es complicada y no pueden ser utilizados por grandes poblaciones con fines epidemiológicos o en la infancia. El modelo mínimo de Bergman, es una aproximación más sencilla en su desarrollo, que aunque no deja de tener dificultades, es un buen método de elección.

Modelo mínimo de Bergman: es el método más generalizado para la cuantificación de la respuesta rápida de la insulina a la glucosa endovenosa. Los valores consecutivos de glucosa e insulina son introducidos en un modelo matemático (modelo mínimo) que se ajusta a un

modelo no lineal que minimiza la suma de las diferencias al cuadrado. La SI es calculada a partir del cociente entre glucosa e insulina. Se obtiene una pendiente de desaparición de glucosa (K) que nos sirve para conocer la sensibilidad a la insulina.

En nuestro trabajo, se utilizó el modelo mínimo para medir la sensibilidad a la insulina (SI), la respuesta aguda de la insulina a la glucosa (AIRg) y el índice de disposición (DI).

Para tal fin se sometió a los pacientes a una prueba de tolerancia intravenosa a la glucosa (IVGTT).

#### Procedimiento

El protocolo experimental para la IVGTT comienza entre las 8:00 y las 8:30 de la mañana luego de un ayuno de toda la noche. Se inserta una aguja (de mariposa) en la vena antecubital y se obtienen muestras basales de sangre en los tiempos -30, -10, -5 y 0, momento en el cual se inyecta 300 mg de glucosa por Kg de peso corporal, en 1 minuto a partir del tiempo 0. Una dosis de insulina (Actrapid, 0.03 U/Kg, Novo Nordisk, Denmark) es administrada a los 20 minutos. Las muestras de sangre adicionales (un total de 30 muestras) se extraen de la vena antecubital contralateral hasta el tiempo 180 minutos. Posteriormente se mide glucosa e insulina y se introducen los datos en el programa de modelos mínimos.

## **4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS**

A continuación se enumeran las técnicas utilizadas para la medición de los parámetros metabólicos:

Los niveles de colesterol y los triglicéridos fueron medidos por métodos enzimáticos, en un analizador DAX 72 (*Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA*).

Los niveles plasmáticos de los ácidos grasos libres (FFA) fueron determinados con un *kit* enzimático colorimétrico (*Wako Pure Chemicals, Richmond VA, USA*)

La apolipoproteína B se determinó por un ensayo inmunoturbidimétrico (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

La concentración de ácido úrico fue medida en un analizador Vitros 250 (Ortho-Clinica Diagnostics, Rochester, NY, USA).

La HbA1c fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, HA 8121, Menarini Diagnostics, Firenze, Italia)

La alanina amino transferasa sérica (ALT) fue medida por el método de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

La glucosa plasmática se midió con el método de la glucosa oxidasa (Bayer Diagnostics, Mucnich, Alemania).

La insulina, la leptina y la adiponectina fueron medidas con ensayos de radioinmunoensayo comerciales.

-Insulina: método: IRMA

casa comercial: Megdenix Diagnostics, Fleunues, Bélgica

límite de detección (sensibilidad):

coeficiente de variación intra e intra ensayo < 5 y 7 % respectivamente

-Leptina: método: RIA

casa comercial: Linco Research, St Charles, MO, USA

límite de detección

coeficiente de variación intra e interensayo < 8 y 5 % respectivamente

-Adiponectina: método: RIA

casa comercial: Linco Research, St Charles, MO, USA

límite de detección:

coeficiente de variación intra e interensayo < 8 y 5 % respectivamente

## **RESULTADOS**





**Primer trabajo. Expresión de los receptores de adiponectina en el tejido adiposo intra-abdominal y su asociación con factores de riesgo metabólicos y cardiovasculares en obesidad y diabetes.**

La adiponectina es una adipocitoquina sintetizada y secretada exclusivamente por el tejido adiposo. Actúa en diversos órganos y tiene propiedades anti-diabéticas y anti-aterogénicas, además de ser una de las hormonas con mayores propiedades sensibilizadoras de la insulina. La adiponectina ejerce sus efectos en el metabolismo de la glucosa y los lípidos a través sus receptores, adipoR1 y adipoR2, los cuales se encuentran mayormente expresados en músculo esquelético e hígado respectivamente. La expresión de adiponectina está disminuída en todos los procesos relacionados con resistencia a la insulina y se ha visto que la expresión de adipoR1 y adipoR2 y/o la capacidad de unión a adiponectina está disminuida en músculo e hígado de ratones obesos. Aunque existen estudios de estos receptores en distintos modelos de ratones y en músculo esquelético de humanos, nada se sabe del papel de adipoR1 y adipoR2 en el tejido adiposo humano. En este estudio se investigó la presencia de adipoR1 y adipoR2 en el tejido adiposo intra-abdominal (IAAT) en pacientes obesos y diabéticos con respecto a sujetos control y su asociación con la expresión de adiponectina y con los componentes del síndrome metabólico y/u otros factores metabólicos asociados con enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD). Los resultados del estudio se detallan a continuación:

1. Los receptores de adiponectina se expresan en tejido adiposo intra-abdominal humano y la expresión génica de adipoR2 pero no de adipoR1 está disminuída en pacientes obesos y en pacientes diabéticos obesos.

En primer lugar se analizó la expresión génica de adipoR1 y adipoR2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real en IAAT de pacientes delgados (LND) y obesos con (OD) o sin diabetes tipo 2 (OND). Los resultados revelaron que ni la obesidad ni la diabetes se asociaron con cambios en la expresión de adipoR1 de IAAT, mientras la expresión de adipoR2 en IAAT disminuyó un 39,5% en OND y un 52,7% en OD cuando se los comparó

con sujetos delgados. Pero no se encontraron diferencias significativas entre pacientes OND y OD.

## 2. Estudio de la correlación entre la expresión génica de adipoR1 y adipoR2 y las características metabólicas de los pacientes.

Una vez establecida la expresión génica de los receptores de adiponectina en IAAT de pacientes delgados y obesos con o sin diabetes tipo 2, se estudió la correlación entre las características metabólicas de estos pacientes y la expresión de dichos receptores. Luego de un análisis detallado de diversos parámetros metabólicos se encontró que la expresión de adipoR1 y adiponectina se encontraron asociadas positivamente en pacientes delgados ( $r=0.943$ ,  $p<0.005$ ) y en pacientes obesos no diabéticos ( $r=0.74$ ,  $p<0.01$ ), mientras que se encontró una correlación positiva entre la expresión de adipoR2 y adiponectina sólo en presencia de diabetes ( $r=0.883$ ,  $p<0.002$ ). En relación con otros componentes de síndrome metabólico se encontró que la expresión de adipoR1 en IAAT se asoció con la concentración plasmática de ácidos grasos libres (FFA) ( $r=0.76$ ,  $p<0.04$ ) y la expresión de adipoR2 en IAAT se correlacionó inversamente con los niveles plasmáticos de triglicéridos ( $r=-0.76$ ,  $p<0.04$ ) y la apolipoproteína B ( $r=-0.74$ ,  $p<0.05$ ).

En conjunto estos datos demuestran que la expresión de adipoR1 en IAAT no estuvo alterada en obesidad ni diabetes y se correlacionó con los niveles plasmáticos de FFA. La expresión de adipoR2 en IAAT se encontró disminuida en obesidad y diabetes y se asoció con componentes metabólicos implicados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en la obesidad.

# Intra-abdominal Fat Adiponectin Receptors Expression and Cardiovascular Metabolic Risk Factors in Obesity and Diabetes

Rosa Morínigo<sup>1</sup>; Melina Musri<sup>2</sup>; Josep Vidal<sup>1</sup>; Roser Casamitjana<sup>3</sup>; Salvadora Delgado<sup>1</sup>; Antonio M Lacy<sup>1</sup>; Carmen Ayuso<sup>4</sup>; Ramon Gomis<sup>2</sup>; Helena Corominola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Obesity Unit, Hospital Clinic Universitari, Barcelona; <sup>2</sup>Endocrinology and Nutrition Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic Universitari, Barcelona; <sup>3</sup>Hormonal Unit, Hospital Clínic Universitari, Barcelona; <sup>4</sup>Radiology Department, Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain

**Background:** The effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism are mediated by the adiponectin receptors, adipoR1 and adipoR2, which are mainly in liver and muscle. We investigated the presence of adiponectin receptors in intra-abdominal adipose tissue (IAAT) in obesity and diabetes and their association with adiponectin expression and components of the metabolic syndrome and/or other metabolic factors associated with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD).

**Methods:** AdipoR1 and adipoR2 gene expression was measured by quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction in IAAT from lean and obese patients with or without diabetes type 2. Correlation between metabolic characteristics of obese patients and expression of these receptors was studied.

**Results:** Neither obesity nor diabetes were associated with changes in IAAT-adipoR1 expression. In contrast, IAAT-adipoR2 was decreased by 39.5% in obese non-diabetics and by 52.7% in obese diabetics when compared to lean subjects. AdipoR1 and adiponectin expression was associated in lean ( $r=0.943$ ,  $P<0.005$ ) and obese non-diabetic patients ( $r=0.74$ ,  $P<0.01$ ), whereas a positive correlation between adipoR2 and adiponectin expression was only found in the presence of diabetes ( $r=0.883$ ,  $P<0.002$ ). AdipoR1 expression was associated with plasma free fatty acids (FFA) concentration ( $r=0.76$ ,  $P<0.04$ ), and adipoR2 inversely correlated with plasma levels of triglycerides ( $r=-0.76$ ,  $P<0.04$ ) and apolipoprotein B ( $r=-0.74$ ,  $P<0.05$ ).

**Conclusion:** AdipoR1 expression in IAAT was not altered by obesity and/or diabetes and was related to plasma levels of FFA. IAAT-adipoR2 expression was reduced in obesity and diabetes and associated with components of metabolic processes leading to cardiovascular disease in obesity.

**Key words:** Obesity, morbid obesity, gastric bypass, adipoR1, adipoR2, adiponectin, adipose tissue, metabolic syndrome, metabolic risk factors, cardiovascular disease

## Abbreviations:

ASCVD = atherosclerotic cardiovascular disease  
IAAT = intra-abdominal adipose tissue  
FFA = free fatty acids  
MS = metabolic syndrome  
LND = lean non-diabetic  
OND = obese non-diabetic  
OD = obese diabetic  
OGTT = oral glucose tolerance test

## Introduction

The metabolic syndrome (MS) and atherogenic dyslipidemia are a constellation of interrelated risk factors of metabolic origin, that appear to directly promote the development of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD).<sup>1</sup> The plasma concentration of the adipose tissue derived hormone *adiponectin*, has been shown to be decreased in subjects presenting either any of the individual components of the MS or with established ASCVD<sup>2,3</sup> and to be

Reprint requests to: Helena Corominola, Endocrinology and Nutrition Unit, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain. Fax: +34-934516638; e-mail: hcoromin@yahoo.com

increased following bariatric surgery.<sup>4</sup> The effects of adiponectin on insulin action and fatty acid metabolism are mediated by its receptors, adipoR1 and adipoR2, with adipoR1 being most abundantly expressed in skeletal muscle and adipoR2 being predominantly expressed in the liver.<sup>5</sup> Studies in non-diabetic subjects have revealed that expression of adipoR1 in skeletal muscle correlates with *in vivo* measurements of insulin sensitivity. Likewise, studies in healthy overweight non-diabetic Mexican Americans with a strong family history of type 2 diabetes, showed a strong relationship between the expression of adiponectin receptors and insulin sensitivity in skeletal muscle.<sup>6</sup> Finally, in the Amish population, polymorphisms for both adipoR1 and adipoR2 have been associated with type 2 diabetes.<sup>7</sup>

AdipoR1 and adipoR2 expression have recently been reported to be expressed also in subcutaneous adipose tissue.<sup>8</sup> Moreover, it has been shown that insulin sensitization by rosiglitazone affects adipoR1 expression not only in human skeletal muscle but also in adipose tissue from obese type 2 diabetic patients.<sup>9</sup> However, despite the evidences suggesting a relationship between adiponectin receptors and the components of the MS, data on expression of adiponectin receptors in the intra-abdominal fat, the major determinant for the MS,<sup>10</sup> are lacking.

We hypothesized that changes in the expression of adiponectin receptors in intra-abdominal adipose tissue might be associated with the cluster of cardiovascular risk factors that participate in ASCVD. Hence, we determined the expression of adiponectin receptors in intra-abdominal human adipose tissue in obesity and diabetes and their association with adiponectin expression. We also aimed to correlate the expression of adiponectin receptors in this fat compartment with parameters of MS and other metabolic risk factors.

## Materials and Methods

### Subjects and Clinical Characteristics

Human intra-abdominal adipose tissue (IAAT) samples from nine lean individuals without diabetes (LND), 17 obese non-diabetic (OND) and nine obese diabetic patients (OD) were obtained either from cadaveric organ donors or from subjects undergoing standardized laparoscopic Roux-en-Y

gastric bypass (RYGBP) for morbid obesity.<sup>11</sup> Body weight was measured in light clothing and without shoes to the nearest 0.1 kg. Height was measured to the nearest 0.5 cm. Body mass index (BMI) was calculated as kg/m<sup>2</sup>. Obesity was defined as a BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, and the presence of type 2 diabetes was determined according to the new World Health Organization criteria<sup>12</sup> (fasting plasma glucose  $> 126$  mg/dl and a 2-h glucose tolerance test  $\geq 200$  mg/dl). The study was approved by the ethics committee. BMI characteristics of the donors were as follows: LND:  $23.5 \pm 1.11$  kg/m<sup>2</sup>, OND:  $44.57 \pm 9.5$  kg/m<sup>2</sup> and OD:  $43.26 \pm 9.6$  kg/m<sup>2</sup>.

### Abdominal Body Fat Distribution

Computed tomography (CT) scans were obtained with a helical CT scanner (Somatom Plus 4, Siemens, Germany). Patients were placed in the scanner with their arms up. An initial lateral localizer of the abdomen was acquired. Patients were asked to hold their breath during image acquisition. The scout image was used as a reference to localize the fourth lumbar vertebra. A single 10-mm slice was obtained in every case with a standard protocol through the middle of L4, including all soft tissue of the patient in the CT field of view. The two regions of interest: intra-abdominal area and the extra-abdominal area, were manually selected with an electronic pencil. Then, a particular CT software was used to measure the pixels included in each area, with attenuation values ranging between -150 and -50 Hounsfield Units, which correspond to adipose tissue. The visceral and the subcutaneous areas of adipose tissue were measured in cm<sup>2</sup>.

### Biochemical and Hormonal Parameters

Blood samples were obtained after an overnight fast from the 17 obese subjects prior to RYGBP surgery. Enzymatic methods were used to measure cholesterol and triglyceride levels in a DAX 72 analyzer (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Plasma FFA concentrations were determined with an enzymatic colorimetric kit (Wako Pure Chemicals, Richmond, VA, USA) according to the manufacturer's instructions. Apolipoprotein B was determined by a commercial immunoturbidimetric assay (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). The uric acid concentrations

were measured in a Vitros 250 analyzer (Ortho-Clinica Diagnostics, Rochester, NY, USA) using a dry chemistry method. Leptin and adiponectin concentrations were assessed by a commercial radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO, USA). For adiponectin measurement, samples were diluted 500 times before the assay. The intra- and interassay coefficients of variation for leptin and adiponectin measurement were <8% and 5%, respectively. Urinary albumin concentration was determined by nephelometry using a Behring nephelometer analyzer (Behringwerke, Marburg, Germany). Plasma glucose was measured using a glucose oxidase method (Bayer Diagnostics, Munich, Germany). HbA1c was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, HA 8121, Menarini Diagnostics, Firenze, Italy) (normal range 3.4-5.5%). Insulin levels were measured by monoclonal immunoradiometric assay (IRMA, Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The intra-assay and interassay coefficient of variation were <5 and <7%, respectively. Serum alanine aminotransferase (ALT) determination was performed by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) reference method, performed at 37°C.

Glucose homeostasis parameters (insulin sensitivity (SI), acute insulin response to glucose (AIRg), and the disposition index (DI)) were evaluated with the Minimal Model,<sup>13</sup> based on an intravenous glucose tolerance test (IVGTT). For the IVGTT, a dose of 0.3 g of glucose per kg body weight was intravenously administered over a 60-second period to overnight-fasted patients. Subsequently, the plasma glucose and insulin concentrations were determined in frequently (30 times) collected blood samples over a period of 180 minutes.

### Analysis of AdipoR1, AdipoR2 and Adiponectin Gene Expression

Total RNA from IAAT was extracted with guanidinium isothiocyanate-phenol chloroform extraction,<sup>14</sup> and TaqMan real time PCR was used to quantify mRNA expression. The quality of the RNA was verified by ethidium bromide staining of rRNA bands on a minigel. First strand cDNA synthesis was performed using 2 µg of each RNA sample primed with oligodT with 200 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Expression patterns of

adiponectin, adipoR1 and adipoR2 were analyzed with an ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequence detector and software system. TaqMan MGB probes (FAM dye-labelled) and primers for adiponectin (Hs00605917\_m1), adipoR1 (Hs00360422\_m1), adipoR2 (Hs00226105\_m1) and TATA box binding protein (TBP, Hs00427620\_m1) as endogenous control were ordered from Applied Biosystems assays-on-demand (20x assay mixes). Real-time PCR was performed with 9 µl of diluted cDNA, 10 µl of TaqMan 2x Universal PCR master mixture (Applied Biosystems), and 1 µl of 20x assay-on-demand mixes of primers and TaqMan MGB probes. The PCR was performed in optical 96-well microtitre plates (Applied Biosystems). After an initial denaturation step at 95°C for 10 min, the cDNA products were amplified with 40 PCR cycles consisting of a denaturation step at 95°C for 15 s and an extension step at 60°C for 1 min. All samples were analyzed in triplicate, and the mean value was used to calculate mRNA levels. For data analysis, the relative quantification method was used to determine gene expression and to compare the amounts of mRNA of each gene in adipose tissue of LND, OND and OD patients, normalized to the TATA Box binding protein (TBP) reference gene, used as an internal standard.

### Statistical Analysis

All data are expressed as means ± SEM. Statistical analyses were carried out using SPSS 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney *U*. Correlation between adiponectin receptors expression and physiological parameters of the patients were analyzed using Spearman rank correlation coefficients. Differences were considered statistically significant if the *P*-value was ≤0.05.

## Results

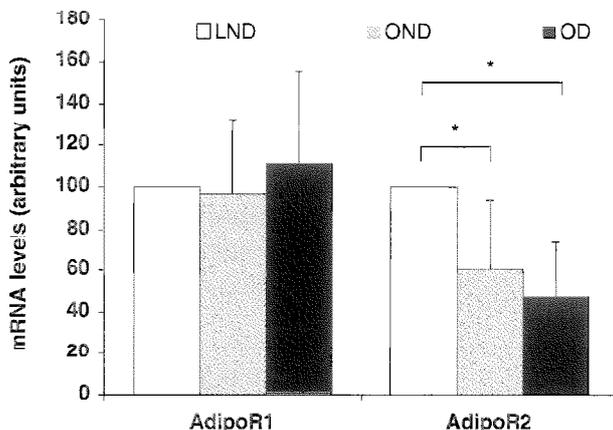
### AdipoR1 and AdipoR2 Expression in Human Obesity and Diabetes

Real-time PCR analysis showed that both receptors were expressed in IAAT. Neither the presence of obesity or diabetes was associated with significant changes in adipoR1 mRNA levels in IAAT (Figure 1).

In sharp contrast, IAAT-adipoR2 expression levels were decreased by 39.5% in OND and by 52.7% in OD patients when compared to LND controls ( $P<0.05$ ), but no differences were found when OND and OD subjects were compared (Figure 1). Likewise, IAAT-adipoR1 correlation with IAAT-adiponectin expression was statistically significant in LND ( $r=0.943$ ,  $P<0.005$ ) and in the OND ( $r=0.74$ ,  $P<0.01$ ), but not in OD subjects ( $r=0.314$ ,  $P=0.54$ ). On the other hand, whereas no statistically significant association between adipoR2 and adiponectin expression was found in LND ( $r=0.429$ ,  $P<0.397$ ) and OND ( $r=0.486$ ,  $P<0.066$ ), a positive correlation was found in OD ( $r=0.883$ ,  $P<0.002$ ).

### Adiponectin Receptors and Metabolic Risk Factors

Association of adiponectin receptors expression and parameters of the metabolic syndrome and/or metabolic risk factors was studied by correlation analysis in the subset of 17 obese patients classified as non-diabetic or diabetic, as assessed by an OGTT, who underwent RYGBP. The clinical and metabolic characteristics of these patients are presented in Table 1. OND and OD individuals differed mainly in several components of the MS, such as the waist circumference, fasting plasma



**Figure 1.** AdipoR1 and adipoR2 mRNA expression in intra-abdominal adipose tissue of lean non-diabetic (LND), obese non-diabetic (OND) and obese diabetic (OD) subjects measured by real-time RT-PCR. The amounts of mRNA of each gene were normalized to the TATA Box binding protein (TBP) reference gene and the results converted to a percentage. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $P\leq 0.05$ .

glucose, uric acid, microalbuminuria and systolic blood pressure. As expected, although insulin sensitivity was comparable between the two groups, they differed in their insulin secretion capacity determined either by the acute insulin response to glucose (AIRg) or when the  $\beta$ -cell function accounted for the prevailing insulin sensitivity (disposition index, DI). As shown in Table 2, after adjustment of all parameters by age, sex and BMI, IAAT-adipoR1 expression correlated with FFA ( $r=0.76$ ,  $P<0.04$ ) and IAAT-adiponectin expression ( $r=0.84$ ,  $P<0.01$ ). IAAT-adipoR2 expression was negatively correlated with plasma levels of triglycerides ( $r=-0.76$ ,  $P<0.04$ ) and apolipoprotein B ( $r=-0.74$ ,  $P<0.05$ ). IAAT-adiponectin mRNA levels positively correlated with FFA ( $r=0.93$ ,  $P<0.00$ ) and IAAT-adipoR1 expression ( $r=0.84$ ,  $P<0.01$ ).

### Discussion

To our knowledge this is the first study determining whether the expression of adipoR1 and adipoR2 is altered in intra-abdominal adipose tissue of obese patients with or without diabetes. AdipoR1 and adipoR2 mediate physiological actions of adiponectin, and are involved in glucose and lipid metabolism.<sup>15</sup> Recently, it has been shown that both receptors are expressed in human subcutaneous adipose tissue and are regulated by rosiglitazone in type 2 diabetic patients.<sup>9</sup> However, no previous studies have evaluated the expression of these adiponectin receptors in IAAT.

The mechanisms underlying the putative involvement of adipoR1 and adipoR2 in the pathophysiology of type 2 diabetes is under debate. It has been postulated that genetic variations of these receptors might confer susceptibility to develop this disease.<sup>7</sup> In fact, polymorphisms for AdipoR1 have been related to high liver fat and insulin resistance in humans.<sup>16</sup> On the other hand, an association between AdipoR1 expression in skeletal muscle and insulin secretion and a strong correlation between decreased expression of this receptor and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with a familial history of diabetes have been reported.<sup>6,7</sup> Surprisingly, in our study neither obesity nor dia-

**Table 1. Clinical and metabolic characteristics of the cohort of 17 obese patients undergoing bariatric surgery**

	Obese non- diabetic	Obese diabetic	P
Age (years)	44 ± 2.87	52.50 ± 3.35	0.08
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	49.37 ± 2.37	49.40 ± 2.29	0.84
Weight (kg)	125.50 ± 5.67	140.31 ± 11.50	0.29
Waist circumference (cm)	135 ± 3.87	148.40 ± 3.90	0.05*
Daily energy intake (Kcal/day)	1447.55 ± 82.87	1523.33 ± 57.31	0.19
Glucose (mg/dl)	96.24 ± 3.48	156.78 ± 20.18	0.00*
HbA1c (%)	4.83 ± 0.12	7.25 ± 0.63	0.00*
Insulin (mU/L)	20.15 ± 3.06	20.70 ± 2.32	0.76
Cholesterol (mg/dl)	207.63 ± 13.28	220.33 ± 14.04	0.45
HDL cholesterol (mg/dl)	45.63 ± 1.93	48.83 ± 4.93	0.72
LDL cholesterol (mg/dl)	207.63 ± 13.28	131 ± 14.21	0.92
ApoA1 (mg/dl)	112.27 ± 3.91	117.83 ± 8.51	0.45
ApoB (mg/dl)	112.54 ± 11.62	135.83 ± 8.97	0.24
Triglycerides (mg/dl)	120.72 ± 6.31	202.16 ± 35.80	0.10
Free fatty acids (μmol/L)	707.36 ± 105.58	885.36 ± 123.96	0.22
Uric acid (mg/dl)	6.19 ± 0.27	7.80 ± 0.60	0.02*
Plasma leptin (mg/L)	54.11 ± 7.09	38.06 ± 4.62	0.15
Serum adiponectin (mg/L)	10.00 ± 1.23	9.49 ± 1.12	0.96
Microalbuminuria (μg/min)	63.61 ± 50.48	325.55 ± 170.41	0.03*
Systolic blood pressure (mmHg)	133.64 ± 5.92	147.50 ± 4.79	0.05*
Diastolic blood pressure (mmHg)	78.64 ± 3.57	85.00 ± 2.22	0.10
Intra-Abdominal Fat (cm <sup>2</sup> )	200.42 ± 29.61	354.22 ± 34.09	0.00*
Subcutaneous abdominal fat (cm <sup>2</sup> )	636.45 ± 90.08	514.10 ± 57.66	0.07
Subcutaneous vs Intra-Abdominal Fat	0.41 ± 0.10	0.72 ± 0.10	0.02*
AIRG (mU.L <sup>-1</sup> .min)	606.24 ± 122.78	97.91 ± 14.47	0.02*
SI (mU.L <sup>-1</sup> .min)	1.28 ± 0.22	1.56 ± 0.61	0.48
DI	793.61 ± 223.23	150.57 ± 57.98	0.04*
AdipoR1 mRNA levels (AU)	1.27 ± 0.18	1.37 ± 0.21	0.54
AdipoR2 mRNA levels (AU)	0.96 ± 0.14	0.88 ± 0.12	0.92
Adiponectin mRNA levels (AU)	0.95 ± 0.18	0.97 ± 0.27	0.91

Gene expression of adiponectin and AdipoR1 and AdipoR2 was indicated as arbitrary units (AU). Values are expressed as means ± SEM. \*P ≤ 0.05.

betes appeared to be associated with an altered expression of adipoR1 in IAAT. However, that an alteration in adipoR1 is involved in the pathophysiology of type 2 diabetes is suggested by the lack of a significant correlation between this adiponectin receptor and adiponectin expression in obese diabetic patients, at variance to what was observed in lean control and obese non-diabetic subjects. Finally, our data suggest that FFA may play a function in the regulation of adipoR1 and adiponectin expression in IAAT. In that respect, our data support previous reports on a direct effect of fatty acids on adipoR1 and adiponectin expression.<sup>17,18</sup> It has been postulated that FFAs may acutely regulate serum adiponectin to limit FFA clearance from the circula-

tion.<sup>18</sup> Thereby, we hypothesize an important effect of FFAs or related metabolic variables in the regulation of IAAT-adipoR1 and adiponectin expression and the involvement of this receptor in the activation of fatty acid utilization and oxidation.

A more relevant role for adipoR2 than for adipoR1 to increase susceptibility to type 2 diabetes has recently been described.<sup>7</sup> We found that obesity but not diabetes is associated with decreased adipoR2 mRNA levels in IAAT. Since adipoR2 is involved in reduction of lipid accumulation,<sup>5</sup> we hypothesize that a dysregulation of this receptor in obesity might lead to a reduced action of adiponectin, contributing to the accumulation of fat, such as in hypoadiponectinemia, in insulin resistance, and in the meta-

**Table 2. Correlations with adipoR1, adipoR2 and adiponectin mRNA expression levels after adjustment for age, sex and BMI**

	AdipoR1 mRNA		AdipoR2 mRNA		Adiponectin mRNA	
	r	P	r	P	r	P
Glucose (mg/dl)	0.51	0.24	-0.27	0.54	0.28	0.53
HbA1c (%)	0.47	0.28	-0.34	0.44	0.29	0.51
Insulin (mU/L)	0.16	0.72	0.17	0.70	-0.04	0.93
Cholesterol (mg/dl)	-0.57	0.17	-0.59	0.16	-0.47	0.27
HDL cholesterol (mg/dl)	-0.15	0.74	0.07	0.87	-0.43	0.32
LDL cholesterol (mg/dl)	-0.53	0.21	-0.49	0.26	-0.43	0.33
ApoA1 (mg/dl)	-0.33	0.46	0.31	0.49	-0.63	0.12
ApoB (mg/dl)	-0.30	0.50	-0.74	0.05*	-0.14	0.74
Triglycerides (mg/dl)	0.03	0.94	-0.76	0.04*	0.35	0.43
Free fatty acids (μmol/L)	0.76	0.04*	-0.09	0.83	0.93	0.00*
Uric acid (mg/dl)	-0.39	0.37	0.40	0.37	-0.34	0.44
Plasma leptin (mg/L)	-0.63	0.12	0.09	0.84	-0.55	0.19
Serum adiponectin (mg/L)	-0.06	0.88	-0.23	0.60	-0.01	0.97
Microalbuminuria (μg/min)	-0.32	0.48	0.61	0.13	-0.52	0.22
Systolic blood pressure (mmHg)	-0.07	0.86	-0.53	0.22	-0.05	0.90
Diastolic blood pressure (mmHg)	0.59	0.16	0.58	0.16	0.52	0.23
Circumference abdominal (cm <sup>2</sup> )	0.42	0.33	0.47	0.28	0.38	0.40
Subcutaneous abdominal fat (cm <sup>2</sup> )	0.46	0.29	0.15	0.73	0.69	0.08
Intra-Abdominal Fat (cm <sup>2</sup> )	-0.08	0.86	0.56	0.18	-0.50	0.24
Subcutaneous vs Intra-Abdominal Fat	-0.33	0.46	0.07	0.87	-0.66	0.10
AIRG (mU.L <sup>-1</sup> .min)	0.42	0.33	0.41	0.35	0.23	0.61
SI (mU.L <sup>-1</sup> .min)	0.03	0.93	-0.81	0.02*	0.10	0.81
DI	-0.40	0.36	-0.74	0.05*	-0.32	0.47

Values are expressed as means ± SEM. \*P≤0.05.

bolic syndrome and/or arteriosclerosis. Importantly, in our cohort the expression of adipoR2 correlated with plasma levels of triglycerides and apolipoprotein B. Hence, alterations in this adiponectin receptor may contribute to an elevated risk for atherogenic dyslipidemia and may be associated with ASCVD in obese patients. Moreover, the positive correlation between adipoR2 and adiponectin expression that we found in diabetes supports that these alterations in adipoR2 might occur in concordance with those observed in adiponectin in the diabetic state.

In summary, our study demonstrated that adipoR1 expression in intra-abdominal adipose tissue was not altered by obesity and/or diabetes and suggests a regulation of adipoR1 and adiponectin expression by FFA that needs to be further investigated. Obesity and diabetes lead to a decreased expression of adipoR2 in intra-abdominal adipose tissue, pointing out the involvement of adipoR2 in the development of ASCVD.

This work was supported by grants SAF2003-06018 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain), Fundació la Marató de TV3 and Fundación Lilly. The research group was supported by Redes C03/08, G03/212 and PIO20483 from the Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain).

## References

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
2. Hotta K, Funahashi T, Arita Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1595-99.
3. Adameczak M, Wiecek A, Funahashi T et al. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension *Am J Hypertens*

- 2003; 16: 72-5.
4. Ballantyne GH, Gumbs A, Modlin IM. Changes in insulin resistance following bariatric surgery and the adipoinular axis: role of the adipocytokines, leptin, adiponectin and resistin. *Obes Surg* 2005; 15: 692-9.
  5. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26: 439-51.
  6. Civitarese AE, Jenkinson PC, Richardson D. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 816-20.
  7. Damcott CM, Ott SH, Pollin TI et al. Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. *Diabetes* 2005; 54: 2245-50.
  8. Hammarstedt A, Sopasakis VR, Gogg S et al. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia* 2005; 48: 96-104.
  9. Tan GD, Debard C, Funahashi T et al. Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia* 2005; 48: 1585-89.
  10. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53: 2087-94.
  11. Buchwald H, Williams SE. Bariatric surgery worldwide 2003. *Obes Surg* 2004; 14: 1157-64.
  12. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97.
  13. Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR et al. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979; 236: E667-77.
  14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
  15. Staiger H, Kaltenbach S, Staiger K et al. Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53: 2195-201.
  16. Stefan N, Machicao F, Staiger H et al. Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia* 2005; 48: 2282-91.
  17. Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL et al. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1118-22.
  18. Bernstein EL, Koutkia P, Ljungquist K et al. Acute regulation of adiponectin by free fatty acids. *Metabolism* 2004; 53: 790-3.

*(Received December 30, 2005; accepted February 8, 2006)*





**Segundo trabajo. La dimetilación de la histona H3 en la lisina 4 marca la competencia transcripcional del promotor de adiponectina en preadipocitos.**

La diferenciación de adipocitos es un proceso que está altamente regulado tanto a nivel hormonal como transcripcional y supone una serie de cambios de expresión génica que determinan cambios en la morfología, dando lugar al fenotipo de adipocito maduro. A nivel transcripcional, una cascada secuencial de factores de transcripción específicos junto con correguladores con actividad modificadora de la cromatina son los responsables de la diferenciación del adipocito. Se ha demostrado claramente que la acetilación de histonas juega un papel clave en el desarrollo de la célula adiposa, como lo demuestra el hecho de que la inhibición de HDAC en células 3T3-L1 provoca un aumento de la adipogénesis.

Dada la importancia de la expresión de adiponectina y sus receptores, así como también de otras adipocitoquinas secretadas por el adipocito maduro en la patogenia de la obesidad y la diabetes, entender los mecanismos epigenéticos de la activación transcripcional en la diferenciación fue el objetivo de nuestro segundo estudio. Para esto examinamos las modificaciones pos-transcripcionales de la histona H3 en los promotores de genes adipogénicos claves tanto de expresión temprana como tardía durante todo el proceso de la adipogénesis.

Los resultados obtenidos se enumeran a continuación:

1. La dimetilación en H3K4 está presente en los promotores de genes adipogénicos en células indiferenciadas 3T3-L1 y en preadipocitos primarios de ratón y se encuentra asociada con ocupación de RNA pol II, a pesar de que estos genes aun no se expresan.

Mediante el uso de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), realizados en células 3T3-L1 en diversos días durante el proceso de diferenciación adipocitaria, demostramos que los promotores de adiponectina, glut4, gpd1 y leptina están enriquecidos en dimetilación de H3-K4 en el día 0 de diferenciación (D0), cuando ninguno de estos genes está aún expresado. Un estudio detallado del locus de adiponectina reveló que la dimetilación de H3K4 en estas células indiferenciadas está limitada en la región promotora, donde se encontró además asociada con ocupación de la RNA pol II. El inicio de la transcripción de adiponectina,

coincide con la hiperacetilación de H3 (D3-4) y con la trimetilación de H3K4 en la región promotora de la misma (D2-3). Este mismo patrón de modificación de histonas se observó en células primarias de ratón, que presentaban una elevada dimetilación en el promotor de adiponectina en preadipocitos primarios en los que no se detecta aún la expresión de adiponectina. En adipocitos primarios de ratón, donde la adiponectina se expresa activamente, se encontró acetilación en H3 y di y trimetilación en H3K4 en su promotor. En la línea celular de fibroblastos de ratón 10T/2, que aún no está comprometida hacia la línea adipogénica, no se observó enriquecimiento ni de acetilación ni de metilación en el promotor de adiponectina, así como tampoco ocupación por la RNA pol II.

## 2. Las modificaciones estudiadas en la histona H3 se extienden por el gen de adiponectina.

Una vez establecidas las modificaciones asociadas en el promotor de genes claves en la adipogénesis, nos centramos en el estudio del gen de adiponectina. El análisis por ChIP de las modificaciones de las histonas en las regiones codificante y terminal del gen de adiponectina reveló que cuando adiponectina comienza a expresarse, ocurre una extensión de la dimetilación hacia la región codificante, coincidiendo con la unión de la PolII en esta región (D3). En la región codificante, la acetilación de H3 y la trimetilación de H3K4 se detectaron en células en estadios más avanzados de diferenciación, cuando la transcripción de adiponectina alcanza su máximo pico (D5-7).

## 3. En el promotor de adiponectina la acetilación de la histona H3 y la trimetilación en H3K4 se correlacionaron con los niveles de expresión génica. En la región codificante existe muy buena correlación entre acetilación en H3 y dimetilación en H3K4 y los niveles de expresión génica.

Una vez obtenidos los patrones de modificación de histonas del gen de adiponectina durante la adipogénesis, se analizó la expresión génica del gen de adiponectina mediante el uso de PCR a tiempo real en los mismos días de diferenciación analizados por ChIP. Los resultados demuestran que la acetilación en H3 y la trimetilación en H3K4 en la región promotora de adiponectina tuvieron una muy buena correlación con su expresión génica ( $r=0.902$ ,  $p<0.0005$  y  $r=0.901$ ,  $p<0.0005$  respectivamente), mientras en la región codificante hubo una muy buena correlación de la expresión génica con la acetilación en H3 y la dimetilación en H3K4 ( $r=0.976$ ,  $p<0.0005$  y  $r=0.869$ ,  $p<0.0005$  respectivamente).

## 4. La dimetilación en H3K4 global, sufre un significativo cambio de patrón de distribución en el núcleo celular a lo largo de la adipogénesis.

Los niveles globales de las modificaciones fueron estudiados por el análisis mediante western blot. La acetilación en H3 y la trimetilación en H3K4 aumentan a lo largo de la diferenciación, mientras que la dimetilación en H3K4 disminuye levemente. El análisis de la distribución nuclear de las modificaciones mediante inmunocitoquímica revelaron un cambio de

la distribución de la dimetilación en H3K4 desde el borde nuclear en preadipocitos hacia la región central en adipocitos.

5. La presencia de dimetilación en H3K4 es necesaria para la expresión del gen de adiponectina y para la correcta diferenciación adipocitaria.

Para estudiar la importancia de la metilación en H3K4 se utilizó el inhibidor de metilación metiltioadenosina en la diferenciación de adipocitos. La inhibición parcial de la dimetilación en H3K4 mediante el tratamiento con el inhibidor resultó en una disminución de la expresión de apM1, así como también en una disminución en la adipogénesis, detectada por una disminución en la incorporación de lípidos.

En conjunto estos estudios indican que la dimetilación en H3K4 y la ocupación de pol II en el promotor de genes adipogénicos claves son marcas distinguibles de células que han "elegido" la determinación hacia el estado adipogénico.



# Histone H3 Lysine 4 Dimethylation Signals the Transcriptional Competence of the Adiponectin Promoter in Preadipocytes<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, February 9, 2006, and in revised form, March 27, 2006. Published, JBC Papers in Press, April 13, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601295200

Melina M. Musri<sup>†</sup>, Helena Corominola<sup>‡</sup>, Roser Casamitjana<sup>§</sup>, Ramon Gomis<sup>†1</sup>, and Marcelina Párrizas<sup>†1,2</sup>

From the <sup>†</sup>Endocrinology and Nutrition Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain and <sup>§</sup>Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain

Adipogenesis is regulated by a coordinated cascade of sequence-specific transcription factors and coregulators with chromatin-modifying activities that are between them responsible for the establishment of the gene expression pattern of mature adipocytes. Here we examine the histone H3 post-translational modifications occurring at the promoters of key adipogenic genes during adipocyte differentiation. We show that the promoters of *apM1*, *glut4*, *gpd1*, and *leptin* are enriched in dimethylated histone H3 Lys<sup>4</sup> (H3-K4) in 3T3-L1 fibroblasts, where none of these genes are yet expressed. A detailed study of the *apM1* locus shows that H3-K4 dimethylation is restricted to the promoter region in undifferentiated cells and associates with RNA polymerase II (pol II) loading. The beginning of *apM1* transcription at the early stages of adipogenesis coincides with promoter H3 hyperacetylation and H3-K4 trimethylation. At the coding region, H3 acetylation and dimethylation, as well as pol II binding, are found in cells at later stages of differentiation, when *apM1* transcription reaches its maximal peak. This same pattern of histone modifications is detected in mouse primary preadipocytes and adipocytes but not in a related fibroblast cell line that is not committed to an adipocyte fate. Inhibition of H3-K4 methylation by treatment of 3T3-L1 cells with methylthioadenosine results in decreased *apM1* gene expression as well as decreased adipogenesis. Taken together, our data indicate that H3-K4 dimethylation and pol II binding to the promoter of key adipogenic genes are distinguishing marks of cells that have undergone determination to a preadipocyte stage.

The influence exerted by the post-translational modifications of histones over the regulation of gene expression has been extensively studied in the past few years. Numerous studies have shown a clear link between the pattern of histone modifications found at promoter regions and gene transcription, thus leading to the statement of the histone code hypothesis (1), which postulates that the pattern of histone post-translational modifications in a locus considerably extends the amount of information conveyed by the genomic code. Histone H3 and H4 hyper-

acetylation in promoter regions is closely correlated with gene activation in organisms ranging from yeast to mammals, and transcriptionally active euchromatin regions are highly enriched in acetylated histones (1–5). Unlike acetylation, histone H3 methylation can be equally associated with either transcriptional activation or repression. Methylation of the lysine residue Lys<sup>4</sup> of histone H3 (H3-K4)<sup>3</sup> correlates with activation of gene expression in most systems (2, 4–7), whereas H3 Lys<sup>9</sup> (H3-K9) methylation is involved in the establishment and maintenance of silent heterochromatin regions (8). Moreover, lysine residues can be mono-, di-, or trimethylated *in vivo*, thus providing a further layer of complexity and exponentially increasing functional diversity (9, 10). The recent identification of LSD1, the first histone demethylase to be characterized, which shows specificity for the mono- or dimethylated lysine 4 residue of histone H3 (11), suggests that methylation is subjected to dynamic regulation by a higher turnover rate than initially thought. Therefore, histone methylation may play a role in acute regulation of gene expression, just like histone acetylation does. Histone acetylation and methylation can also be detected at the coding regions of genes, in some cases correlating with elongation by RNA polymerase II (Pol II) (7, 12–16). Thus, epigenetics has become a factor that cannot be overlooked when unraveling the regulation of gene transcription in cells, either acutely during interphase or programmatically throughout complex processes of development and differentiation.

Adipogenesis, or the development of adipocytes from undifferentiated precursor cells, is a complex process that has been extensively studied at the hormonal and transcriptional levels. Mouse 3T3-L1 fibroblasts provide an *in vitro* model that recapitulates faithfully the main steps of the *in vivo* differentiation process (17). A well established hormonal stimulation initiates differentiation in these cells by activating a cascade of transcription factors that culminates with activation of CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  and PPAR $\gamma$  (17). These two factors are the main regulators of adipocyte gene expression and are between them responsible for the transcription in differentiated cells of many genes, including the adipokine *apM1* (adiponectin) (18, 19) and the glucose transporter *glut4* (20, 21).

Interestingly, a number of reports have also demonstrated a role during adipogenesis for coregulators with chromatin-modifying activities. Thus, induction of high level PPAR $\gamma$  expression in fibroblasts requires recruitment of SWI/SNF to its hyperacetylated promoter (22). PPAR $\gamma$ , in its turn, recruits to its target promoters the histone acetyltransferases

<sup>\*</sup> This work was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) Grant SAF2003-06018. The research group was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain) Grants Redes CO3/08 and G03/212 and Generalitat de Catalunya Grant SGR-2005. 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.

<sup>[5]</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1 and Fig. 1.

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

<sup>2</sup> Recipient of a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). To whom correspondence should be addressed: Hospital Clínic, Villarroel 170, Esc. 9, Pl. 5, Barcelona 08036, Spain. E-mail: mparrizas@ambtu.bcn.es.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: H3-K4, histone H3 lysine 4; H3-K9, histone H3 lysine 9; H3-K9/K14, histone H3 lysine 9/14; Pol II, RNA polymerase II; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; IBMX, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine; MTA, 5'-methylthioadenosine; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CREB, cAMP-response element-binding protein; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; PIPES, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; D0–D9, day 1–9, respectively; AdoMet, S-adenosyl-L-methione.

CREB-binding protein and p300, and this interaction is essential for adipocyte differentiation (23, 24). On the other hand, the retinoblastoma protein RB is associated with the histone deacetylase HDAC3 and blocks adipogenesis in cycling fibroblasts by binding to PPAR $\gamma$ , thus resulting in recruitment of deacetylase activity to the target promoters of the factor (25) and inhibition of adipogenic gene expression. In accordance with these results, histone deacetylase inhibitors have been recently shown to facilitate adipogenesis from undifferentiated fibroblasts (25, 26), whereas HDAC1 overexpression blocks adipogenesis (26, 27). Taken together, all of these data indicate that the post-translational modification of histones participates in the regulation of gene expression during the differentiation process of adipocytes.

In the present study, we examine the pattern of histone H3 acetylation and methylation found across the adiponectin locus throughout adipocyte differentiation. We describe a role for histone H3-K4 dimethylation in recruiting Pol II and marking the adiponectin gene as "poised" for transcription in undifferentiated fibroblasts that do not yet express it. Decrease of the H3-K4 methylation mark at the *apM1* promoter by incubation of the cells in the presence of an inhibitor of methyltransferase activity results in decreased expression of the gene and reduced adipogenesis. The same pattern can be extended to other adipogenic genes such as *glut4* or *gpd1* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Differentiation**—Mouse 3T3-L1 and 10T1/2 fibroblasts were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma). Differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes was induced by treatment of 48 h postconfluent cells (designated D0) with an adipogenic mixture consisting of 1  $\mu$ g/ml insulin, 1  $\mu$ M dexamethasone, and 0.5 mM IBMX (all reagents from Sigma) in the presence of 10% fetal calf serum. The differentiation medium was withdrawn 2 days later (D2) and replaced with medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1  $\mu$ g/ml insulin. After 3 more days in insulin-containing medium (D5), the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum.

In order to inhibit AdoMet-dependent methyltransferase activity during differentiation, 1 mM 5'-methylthioadenosine (MTA) was added to 3T3-L1 fibroblasts 24 h after reaching confluence (D1) and maintained for 24 h more (thus reaching D0). The medium was then changed to fresh medium containing insulin, dexamethasone, and IBMX as described above but supplemented in this case with 0.5 mM MTA. For the rest of the differentiation process, the medium was replaced every 24 h in order to add fresh MTA.

**Isolation of Mouse Preadipocytes and Adipocytes**—Isolated epididymal fat tissue obtained from 6-week-old male C57BL/6J mice was rinsed briefly with PBS and minced with a razor blade in collagenase solution (0.2 mg/ml collagenase A in 100 mM HEPES, 120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 4.9 mM glucose, pH 7.4). The mixture was then allowed to digest for 30 min at 37 °C with gentle shaking. The resulting cell suspension was allowed to settle for 5 min to separate into a supernatant containing adipocytes and an inferior layer composed mainly of preadipocytes. The adipocyte-containing supernatant was recovered by pipetting, and the infranatant was filtered through a 60- $\mu$ m cell strainer (BD Biosciences) to obtain the preadipocytes.

**Oil Red O Staining**—To assess the progression of cytoplasmic fat accumulation, intracellular triglyceride was stained by Oil Red O (Sigma). Briefly, growing cells were washed gently with PBS and stained with Oil Red O solution (0.36% Oil Red O in 60% isopropyl alcohol) for 1 h at 37 °C. Excess stain was removed with 60% isopropyl alcohol, and

cells were washed with water before being photographed under a light microscope.

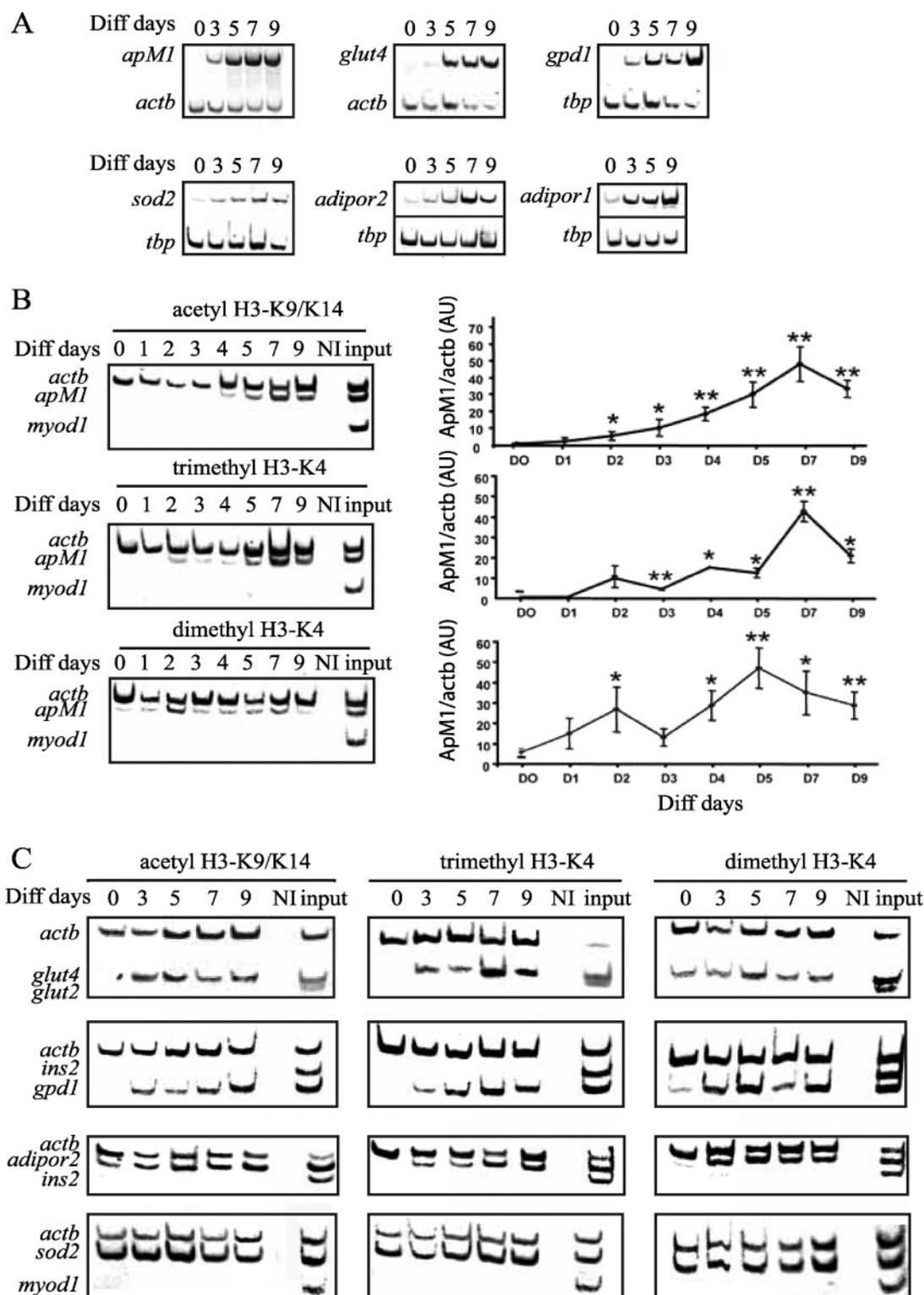
**RNA Isolation, Semiquantitative RT-PCR and Real Time RT-PCR**—Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. Random-primed cDNA synthesis was performed at 37 °C starting with 1  $\mu$ g of RNA, using the high capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Adiponectin gene expression was measured by real time PCR in an ABI Prism 7900HT real time PCR system using the DNA double strand-specific SYBR green I dye for detection (Applied Biosystems). Results were normalized to *abl1* expression levels. Expression levels of the other genes studied were measured by semiquantitative RT-PCR. Gene products of interest were co-amplified with an internal control gene ( $\beta$ -actin or *tbp* (TATA-box-binding protein)) at a low cycle number to ensure that the two products were in the exponential phase of amplification. Amplification products were resolved on ethidium bromide-stained acrylamide gels, and low exposure images were analyzed using Image J software (28). Primers were designed to span an intron using Primerselect 4.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI) software. The primer sequences used are listed on supplemental Table 1.

**Chromatin Immunoprecipitation Assays (ChIP)**—ChIPs were performed and analyzed as described (29, 30) with a few modifications. Briefly, in the case of 3T3-L1 cells and primary preadipocytes, cells fixed for 10 min with 1% formaldehyde were lysed with SDS (1% SDS, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0). In the case of primary adipocytes, nuclei were prepared prior to SDS lysis by incubating the fixed cells in an adipocyte lysis buffer (5 mM PIPES, 80 mM KCl, and 0.5% Igepal, pH 7.9) for 1 h at room temperature. DNA was sonicated to obtain 500–1000-bp fragments with a Branson 150 sonifier at 50% maximal power for six pulses of 30 s. The antibodies used were anti-acetyl-H3-K9/K14, anti-dimethyl-H3-K4, anti-trimethyl-H3-K4 (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY), and anti-Pol II C-terminal domain (Abcam, Cambridge, UK). Protein A-Sepharose blocked with bovine serum albumin and salmon sperm DNA was used to immunoprecipitate the complexes, except in the case of the Pol II ChIPs that were recovered using pan-mouse IgG-Dynabeads (DynaL Biotech).

ChIPs were analyzed by co-amplification of the PCR product of interest with both a positive control (the housekeeping  $\beta$ -actin or *pgk1* (phosphoglycerate kinase 1) promoters) and a negative control (*ins2* (insulin II), *glut2*, or *myod1*, all of them genes that are expressed in neither fibroblasts nor adipocytes). Multiplex PCR conditions were adjusted to ensure nonsaturation kinetics and similar amplification efficiencies for all amplicons within a reaction. Primers were designed to amplify segments located in a region of  $\sim$ 100 bp from the transcription initiation site of selected genes for analysis of promoter regions. In the case of *apM1*, primers were also designed within an exon and in the 3'-untranslated region zone for analysis of the coding and terminal regions, respectively. Primer sequences are listed in supplemental Table 1. Amplification products were run in a 12% acrylamide gel and stained with ethidium bromide, and low exposure images were analyzed using Image J software. Each PCR was performed at least twice with samples resulting from three independent ChIP experiments.

**Acid Extraction of Histones and Western Blotting**—3T3-L1 cells at different days of the differentiation process were scraped into ice-cold PBS, pelleted, and resuspended in 1 ml of lysis buffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, and 1.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.9). Hydrochloric acid was added to a final concentration of 0.2 N, and samples were incubated on ice for 30 min. The clarified lysates containing acid-soluble proteins were dialyzed sequentially against 0.1 N acetic acid and H<sub>2</sub>O. Protein concentration was determined with the  $\mu$ BCA protein assay (Pierce) using bovine serum

## H3-K4 Dimethylation in Adipogenesis



**FIGURE 1. H3-K4 dimethylation is the first modification detected in the promoter regions of adipogenic genes during adipocyte differentiation.** *A*, expression of *apM1*, *glut4*, *gpd1*, *adipor1*, *adipor2*, and *sod2* increases during adipogenesis, as detected by RT-PCR. The genes of interest were co-amplified with either *tbp* or *actb* as housekeeping controls, except for *adipor1* and *adipor2*. *B*, to assess the histone modifications present at the *apM1* promoter, ChIP assays were performed using 3T3-L1 cells at different stages of adipogenesis. Samples were immunoprecipitated with anti-acetylated (K9/K14) (top), anti-trimethylated (K4) (middle) and anti-dimethylated (K4) (bottom) histone H3 antibodies. A representative experiment for each antibody immunoprecipitation is shown at the left. The right panels show the densitometric analysis of the data of three independent experiments performed in duplicate. The intensity of the *apM1* band (in arbitrary units) was corrected by the intensity of its corresponding *actb* band for each individual amplification, and the resulting ratio was multiplied by 100 to obtain percentage values. *C*, histone modifications detected at the promoter regions of *glut4* and *gpd1* display the same pattern as in the *apM1* promoter, whereas the promoters of *adipor2* and *sod2* are already acetylated at D0. In each case, the gene of interest was co-amplified with both a positive (*actb*) and a negative (*myod1*, *glut2*, or *ins2*) control to assess the specificity of the amplification. The nonimmune (NI) lane shows the result of a control immunoprecipitation using nonimmune rabbit serum. The input lane illustrates the amplification rates of the three products when they are present at equimolar concentrations in a DNA sample prior to immunoprecipitation. \*,  $p < 0.005$ ; \*\*,  $p < 0.0005$ . Diff days, differentiation days; NI, nonimmune.

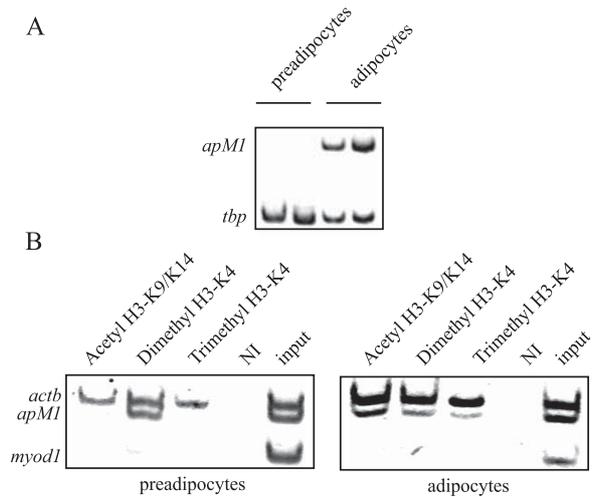
albumin as a standard. Equal amounts of protein were resolved by 16% SDS-PAGE using the Tris-Tricine buffer system and transferred to a 0.2- $\mu$ m nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). The primary antibodies were diluted 1:2,000 in PBS supplemented with 1% nonfat milk and visualized by blotting with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Chemiluminescence was detected using the ECL reagents (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), in a LAS3000 Lumi-Imager (Fuji Photo Film Inc., Valhalla, NY).

**Immunocytochemistry**—Undifferentiated 3T3-L1 cells were plated on 4-well LabTek chambers (Nunc, Roskilde, Denmark) the day before staining. Differentiated 3T3-L1 adipocytes growing in 6-well dishes were trypsinized, and 5,000 cells were placed onto glass slides using a cytospin centrifuge. Cells were fixed in 9:1 ethanol/acetic acid for 1 min, rinsed with PBS, and blocked with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature. Primary antibodies (diluted 1:1,000) were incubated overnight at 4 °C in a wet chamber. Slides were then washed with PBS and incubated with the fluorescence-conjugated secondary antibody (Cy3-conjugated anti-rabbit from Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) at a final dilution of 1:500 in PBS for 1 h at room temperature. After being washed in PBS, the preparations were mounted and coverslipped using FA mounting fluid (Difco). Images were collected using a Leica DC-300F fluorescence microscope and processed using Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA).

**Statistical Analyses**—Statistical significance of the changes of histone modifications detected at the *apM1* promoter throughout adipogenesis was assessed by two-tailed Student's *t* test using the mean  $\pm$  S.D. calculated from six independent determinations performed for each differentiation day and obtained from three separate experiments performed in duplicate. Correlation coefficients that assess the linear association between transcriptional activity and promoter acetylation or methylation were computed between the log-transformed real time RT-PCR values for the *apM1* RNA at different days of the differentiation process and the log-transformed densitometric analysis of each modification at the same day, referred to the level of that same modification found at the *actb* ( $\beta$ -actin) promoter, which was co-amplified and used as an endogenous control for immunoprecipitation efficiency.

## RESULTS

**Dimethylation of Histone H3-K4 Is the First Modification Observed at the Promoters of Adipogenic Genes during Adipocyte Differentiation**—The mouse 3T3-L1 cell line is frequently used as a model to study adipocyte differentiation. The striking morphological and transcriptomic changes taking place during this process have been extensively detailed (31, 32), but the role of histone post-translational modifications has not yet been thoroughly established. We focused our attention on a set of genes that are activated throughout adipogenesis. The adipokines *apM1* and leptin, the glucose transporter *glut4*, and the enzyme *gpd1* were not expressed in undifferentiated 3T3-L1 fibroblasts; transcription of these genes started during the early stages of adipogenesis, slowly rising and reaching a peak in mature adipocytes (Fig. 1A). The adiponectin receptors *adipor1* and *adipor2* and the enzyme *sod2* (superoxide dismutase, mitochondrial), on the other hand, were already expressed in 3T3-L1 fibroblasts, although at low levels; transcription of these genes increased steadily throughout adipogenesis (Fig. 1A). We studied the presence of histone H3-K9/K14 acetylation, usually considered to be a mark for transcriptional activation (1, 33), at the promoter region of the *apM1* gene in 3T3-L1 cells at different days of the differentiation process by means of ChIP assays. Interestingly, H3-K9/K14 acetylation was not detected in undifferentiated fibroblasts, slowly rising and reaching a



**FIGURE 2. The same pattern of histone modifications is detected in primary preadipocytes and adipocytes.** A, expression of *apM1* in primary preadipocytes and adipocytes obtained from epididymal white fat of male C57BL/6J mice. B, ChIP analysis of histone acetylation and methylation at the *apM1* promoter region in primary preadipocytes and adipocytes. A representative experiment is shown. The *apM1* promoter is dimethylated in preadipocytes (left) but is acetylated and di- and trimethylated in mature adipocytes obtained from the same mice (right). NI, nonimmune.

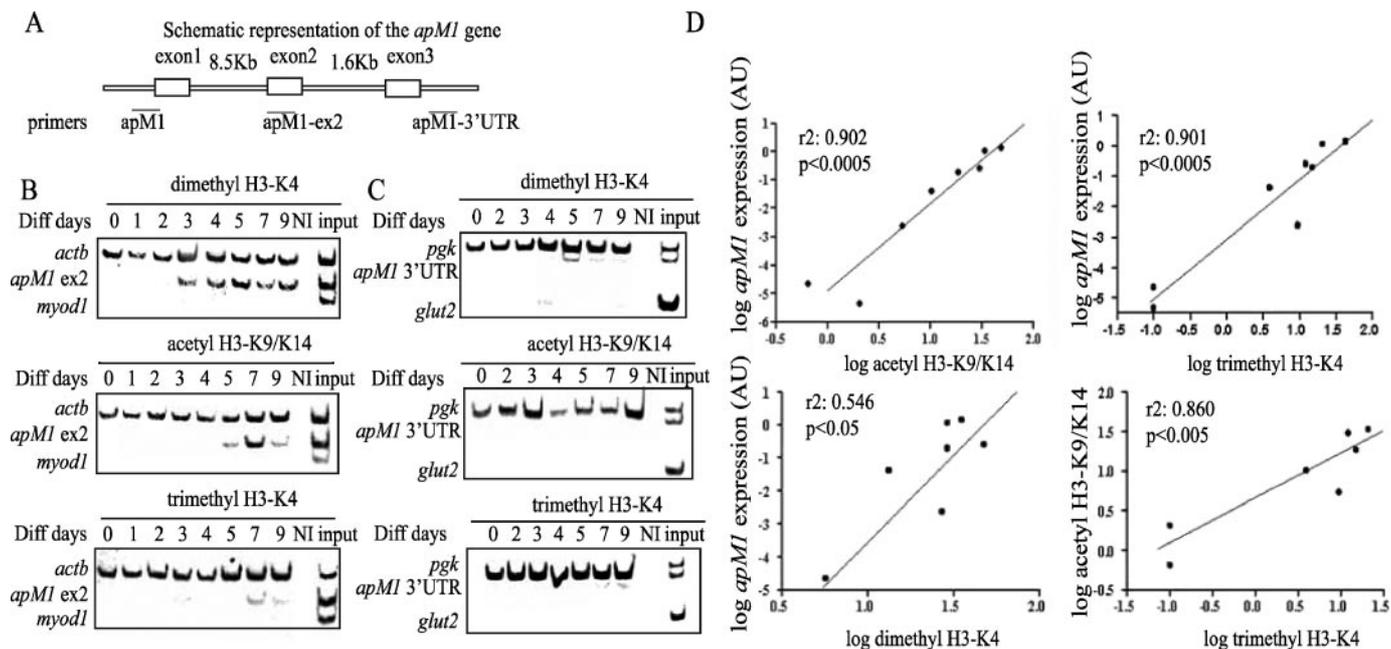
peak in mature adipocytes (Fig. 1B, top). This pattern closely mirrors the expression profile of the *apM1* gene.

Another histone modification linked to transcriptional activation, H3-K4 trimethylation, followed a pattern similar to that of acetylation, with trimethylation slightly preceding the appearance of acetylation on the same region (Fig. 1B, middle). In contrast, H3-K4 dimethylation was already detected in undifferentiated 3T3-L1 cells and increased throughout adipogenesis, following a biphasic pattern (Fig. 1B, bottom). A similar study of the promoters of *glut4*, *gpd1*, and leptin shows that this temporal sequence of events is conserved in those other genes, with H3-K4 dimethylation the only mark detected in 3T3-L1 fibroblasts (Fig. 1C and supplemental Fig. 1). On the other hand, the promoter regions of *adipor1*, *adipor2*, and *sod2*, which were already expressed in 3T3-L1 fibroblasts, were associated with hyperacetylated histone H3 in addition to dimethylated H3-K4 in undifferentiated cells. Moreover, H3-K4 trimethylation was also detected at the promoters of *sod2* and *adipor1* but not *adipor2* in 3T3-L1 fibroblasts. However, the levels of histone acetylation and di- and trimethylation of these promoters increased slightly in mature adipocytes, coinciding with the maximal transcription of the genes, particularly in the case of *adipor1* and *adipor2* (Fig. 1C and supplemental Fig. 1).

To strengthen the link between active transcription and histone acetylation and methylation, we examined the promoter of *pref1* (preadipocyte factor-1), a gene that is expressed in undifferentiated 3T3-L1 cells but whose expression decreases throughout adipogenesis and is finally silenced in mature adipocytes (34). At the promoter of *pref1*, all of these histone modifications associated with transcription were detected in undifferentiated fibroblasts but steadily decreased as adipogenesis progressed and transcription of the gene was silenced. In mature adipocytes, only low levels of H3-K4 dimethylation could be detected at the silenced *pref1* promoter, as a lingering mark of past transcriptional events on that locus (supplemental Fig. 1).

To check if this recurring pattern is a peculiarity of this cell line or if it is also found *in vivo*, we isolated primary mouse preadipocytes and adipocytes. *apM1* was not expressed in preadipocytes but was highly expressed in mature mouse adipocytes (Fig. 2A). Supporting our findings with 3T3-L1 cells, the promoter region of the gene was already

## H3-K4 Dimethylation in Adipogenesis



**FIGURE 3. Histone modifications spread through the coding region of the *apM1* locus correlating with the beginning of transcription.** *A*, schematic representation of the *apM1* locus showing the situation of the primers used to analyze the ChIP assays (not to scale). *B* and *C*, histone modifications in the coding and terminal region of the *apM1* locus in 3T3-L1 cells at different stages of differentiation were detected by ChIP assays. 3T3-L1 cells at the indicated stages of differentiation were immunoprecipitated with anti-dimethylated (*top*), anti-acetylated (*middle*), and anti-trimethylated (*bottom*) histone H3. The presence of each modification at the coding (*B*) and 3'-untranslated (*C*) regions was examined using the specific primers depicted in *A*. *D*, correlations between H3 histone acetylation, di- and trimethylation, and *apM1* gene expression as measured by real time PCR throughout adipogenesis. Histone H3 acetylation and H3-K4 trimethylation but not H3-K4 dimethylation at the *apM1* promoter show significant correlation with RNA expression. *Diff days*, differentiation days; *NI*, nonimmune.

dimethylated in preadipocytes, whereas the three histone modifications studied were detected at the same region in differentiated adipocytes (Fig. 2*B*).

As another control, we used the fibroblast cell line 10T1/2, which can also be differentiated into adipocytes by hormonal stimulation but only after prior treatment of the cells with the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine (35). Surprisingly, in parental 10T1/2 cells not treated with 5-azacytidine, none of the histone modifications studied were detected in the *apM1* promoter (see Fig. 5*B*), and hormonal stimulation with insulin, dexamethasone, and IBMX did not alter this situation (data not shown). Taken together, these data suggest that histone H3-K4 dimethylation at the promoter regions of adipogenic genes in 3T3-L1 fibroblasts or primary preadipocytes acts as an epigenetic mark that indicates that genes that are not yet expressed are transcriptionally competent, ready to be expressed later on during the differentiation process. 10T1/2 fibroblasts, which are not primed for adipocyte differentiation, do not present this epigenetic mark in those same genes.

**Histone Modifications Spread through the *apM1* Locus, Correlating with the Beginning of Gene Transcription**—A host of previous studies have shown elevated levels of histone H3 hyperacetylation and K4 methylation localized to the 5'-proximal regions of transcriptionally active genes (2, 7, 36). The presence of the same modifications downstream of the transcription initiation site, on the other hand, is not as preminent (12, 37, 38). We designed primers located in the coding region (exon 2) and the 3'-untranslated region of the *apM1* locus to examine those regions for the presence of histone modifications (Fig. 3*A*). The first modification found at the coding region was again H3-K4 dimethylation (at D3; Fig. 3*B*, *top*), followed by H3 acetylation (at D5; Fig. 3*B*, *middle*). H3-K4 trimethylation was delayed in this region, being only barely detectable in fully differentiated adipocytes at D7 (Fig. 3*B*, *bottom*), concurring with the maximal peak of gene expression. At the

3'-terminal region of the *apM1* locus, we were only able to detect low levels of H3-K4 dimethylation transiently at D5 (Fig. 3*C*).

We correlated the expression level of *apM1* as measured by real time RT-PCR with the densitometric analysis of histone modifications detected at the *apM1* promoter and referred to the levels of the same modification detected at the  $\beta$ -actin promoter, which we used as an endogenous control for immunoprecipitation efficiency. A high correlation was found between gene expression and both H3-K9/K14 acetylation and H3-K4 trimethylation at the promoter region (Fig. 3*D*). In fact, these two modifications are also closely correlated between them. H3-K4 dimethylation at the promoter was detected well in advance of the beginning of transcription, and thus it is not surprising that it does not correlate well with gene expression (Fig. 3*D*).

The global levels of the three histone modifications studied were examined by Western blotting using acid extracts of 3T3-L1 cells at different stages of the differentiation process and by immunocytochemical staining of undifferentiated fibroblasts and differentiated cells (D5). H3 acetylation and H3-K4 trimethylation increased from fibroblasts to adipocytes, whereas H3-K4 dimethylation slightly decreased (Fig. 4*A*). The increase of H3 acetylation and H3-K4 trimethylation is also evident by immunocytochemical staining (Fig. 4*B*), but the most striking feature is the change of the distribution pattern of H3-K4 dimethylation during differentiation. Dimethylated H3-K4 was found strongly enriched along the nuclear border in undifferentiated 3T3-L1 fibroblasts but was dramatically rearranged in mature adipocytes (Fig. 4*B*, *lower panels*).

**RNA Polymerase II Contacts the *apM1* Promoter in Undifferentiated 3T3-L1 Cells**—To investigate the recruitment of Pol II to the *apM1* promoter region, we performed chromatin immunoprecipitations using an anti-Pol II antibody directed against the unmodified C-terminal domain. We observed that Pol II was already bound to the *apM1*

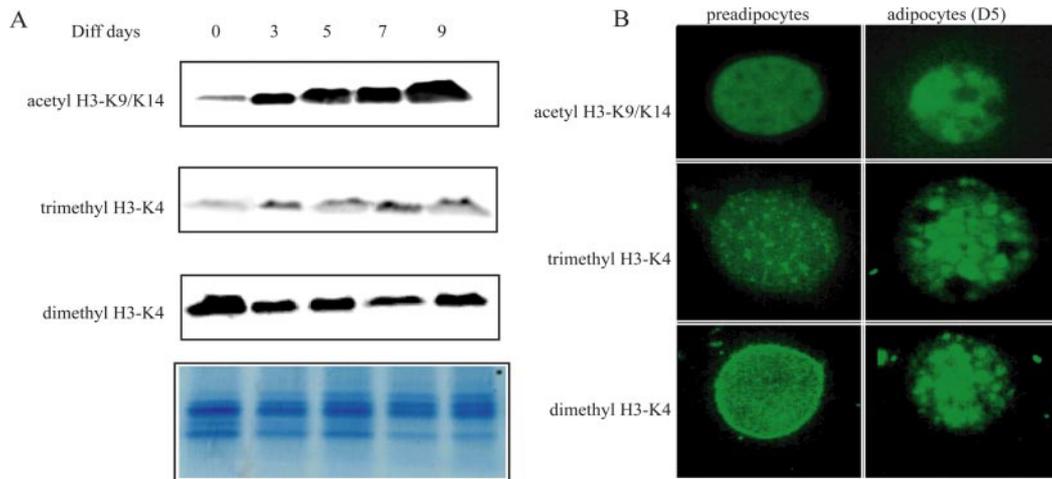


FIGURE 4. **Global H3 acetylation and H3-K4 di- and trimethylation changes during adipocyte differentiation.** *A*, Western blot analysis of total levels of acetylated and di- and trimethylated histone H3 in histone preparations obtained from 3T3-L1 cells at the indicated stages of adipogenesis. Coomassie Blue staining of a gel run in parallel with the same samples is shown as a loading control. *B*, immunocytochemical staining, showing the distribution pattern of acetylated and di- and trimethylated histone H3 in the nuclei of 3T3-L1 fibroblasts (*left*) and differentiated adipocytes (*right*). The main features to be observed are a significant increase in histone H3-K4 trimethylation and a striking change of pattern of H3-K4 dimethylation (magnification,  $\times 1000$ ). *Diff days*, differentiation days.

promoter in fibroblasts at D0 (Fig. 5A), although adiponectin was not yet expressed. The extent of the binding increased throughout adipogenesis, being easily detected in fully differentiated adipocytes (from D7 onward), when *apM1* transcription reached its maximal level.

In 10T1/2 fibroblasts on the other hand, Pol II was not detected at the *apM1* promoter region (Fig. 5B), and incubation of these cells with insulin, dexamethasone, and IBMX did not alter this situation (data not shown). These results indicate that the presence of dimethylated histone H3-K4 at the promoter region of the *apM1* gene is associated with binding to the same region of an as yet inactive Pol II enzyme, prior to the start of transcription. These two events were observed in 3T3-L1 cells, which were already primed for differentiation, but not in a related fibroblast cell line which was not able to differentiate in response to hormonal stimulation. In the coding region of adiponectin, Pol II was detectable from D3/D4, coinciding with the start of high level transcription and the appearance of histone H3-K4 dimethylation in this region (Fig. 5C).

**The Presence of H3-K4 Dimethylation at the Promoter Region Is Necessary for the Expression of *apM1* in 3T3-L1 Cells**—To check if the presence of H3-K4 dimethylation at the promoter regions of adipogenic genes is necessary for their later expression, we treated differentiating 3T3-L1 cells with MTA, an inhibitor of AdoMet-dependent methyltransferases that has been shown to inhibit histone H3-K4 methylation (36). We treated postconfluent 3T3-L1 fibroblasts 24 h before the stimuli of differentiation with 1 mM MTA to inhibit histone methylation prior to the start of adipogenesis. From D0 onward, 0.5 mM MTA was added to the cells along with the adipogenic mixture, with medium being replaced every 24 h in order to add fresh inhibitor. Immunocytochemical analysis of 3T3-L1 cells differentiated in the absence or presence of MTA shows that H3-K4 dimethylation is decreased by D5 of the differentiation process (Fig. 6A).

ChIP analysis of the *apM1* promoter region at D4 shows a partial decrease of H3-K4 dimethylation (Fig. 6B). In order to investigate how inhibition of histone methylation affects *apM1* expression, we performed semiquantitative RT-PCR. *apM1* RNA was significantly decreased by D3, D4, and D5 of the differentiation process (Fig. 6C). The RNA levels of other adipogenic marker genes such as *glut4* and *aP2* were also decreased (data not shown). We could not detect a significant decrease in the RNA and protein level of transcription factor PPAR $\gamma$  (data not shown), which has been shown to regulate expression of *apM1* (18), thus suggesting that reduced *apM1* expression is not secondary to decreased PPAR $\gamma$ .

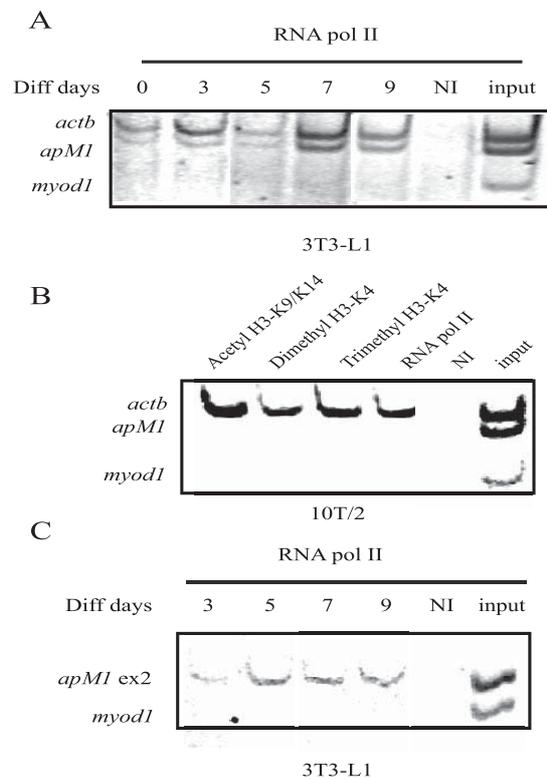
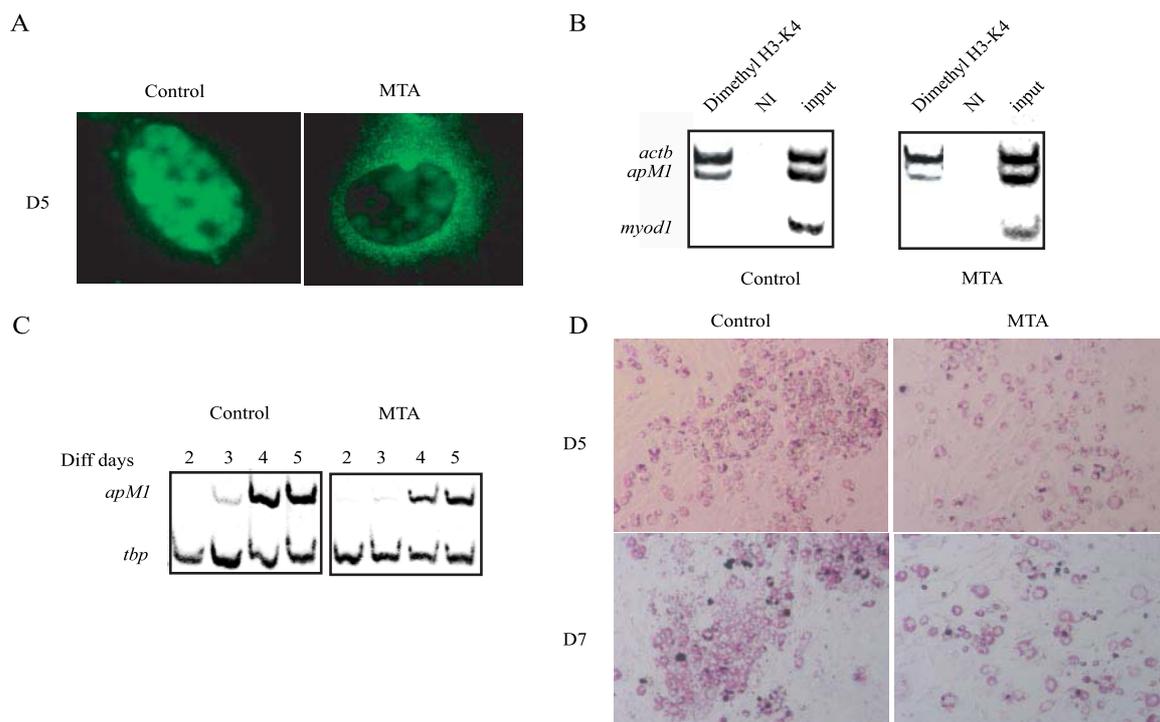


FIGURE 5. **RNA polymerase II is already bound to the *apM1* promoter in undifferentiated fibroblasts 3T3-L1.** *A*, occupancy of Pol II was assessed by ChIP in 3T3-L1 cells at different stages of adipogenesis. *apM1* promoter was co-amplified with the promoter regions of the highly expressed *actb* gene as a positive control and the silent *myod1* gene as a negative control. Pol II contacts the *apM1* promoter already in undifferentiated 3T3-L1, but the rate of occupancy increases in later stages of adipogenesis, coinciding with elevated transcription levels. *B*, ChIP assays performed using 10T1/2 fibroblasts show that the *apM1* promoter in those cells is neither acetylated nor di- or trimethylated. Pol II is not detected in the *apM1* promoter in 10T1/2 cells. *C*, ChIP assay showing recruitment of Pol II to the coding region of the *apM1* gene at different days during the differentiation process. In this region, Pol II was not detected at D0, D3 being the earliest time point tried at which we were able to detect it. *myod1* is co-amplified as a negative control for non-specifically precipitated DNA. *Diff days*, differentiation days; *NI*, nonimmune.

Oil red staining showed a significant decrease of fat accumulation in the cytoplasm of cells differentiated in the presence of MTA both by D5 and D7 of the differentiation process (Fig. 6D), thus suggesting an important role for histone methylation in the regulation of adipogenesis.

## H3-K4 Dimethylation in Adipogenesis



**FIGURE 6. H3-K4 dimethylation is necessary for the expression of *apM1*.** 3T3-L1 cells were incubated in the absence or presence of 1 mM MTA 24 h before the induction of differentiation. Throughout the differentiation process, the inhibitor was added every 24 h at 0.5 mM final concentration. *A*, immunocytochemical analysis of 3T3-L1 cells at the D5 of differentiation in the absence (*left*) or presence (*right*) of the methyltransferase inhibitor MTA. A decrease of global histone H3-K4 dimethylation is observed. *B*, histone H3-K4 dimethylation at the *apM1* promoters was assessed by ChIP at D4 of adipogenesis in cells differentiated in the absence or presence of the methyltransferase inhibitor. The *apM1/actb* ratio was decreased in a  $34.5 \pm 2.1\%$  in MTA-treated cells as compared with control cells. *C*, expression of *apM1* at different times during the adipocyte differentiation process in 3T3-L1 incubated in the absence or presence of MTA at the concentrations indicated above. *apM1* RNA (corrected by *tbp* levels) was decreased by  $56 \pm 1.4\%$  in MTA-treated cells at D4 as compared with the control cells. *D*, Oil Red O staining of differentiating adipocytes maintained with or without MTA treatment shows differences in the fat storage (magnification,  $\times 200$ ). *Ni*, nonimmune.

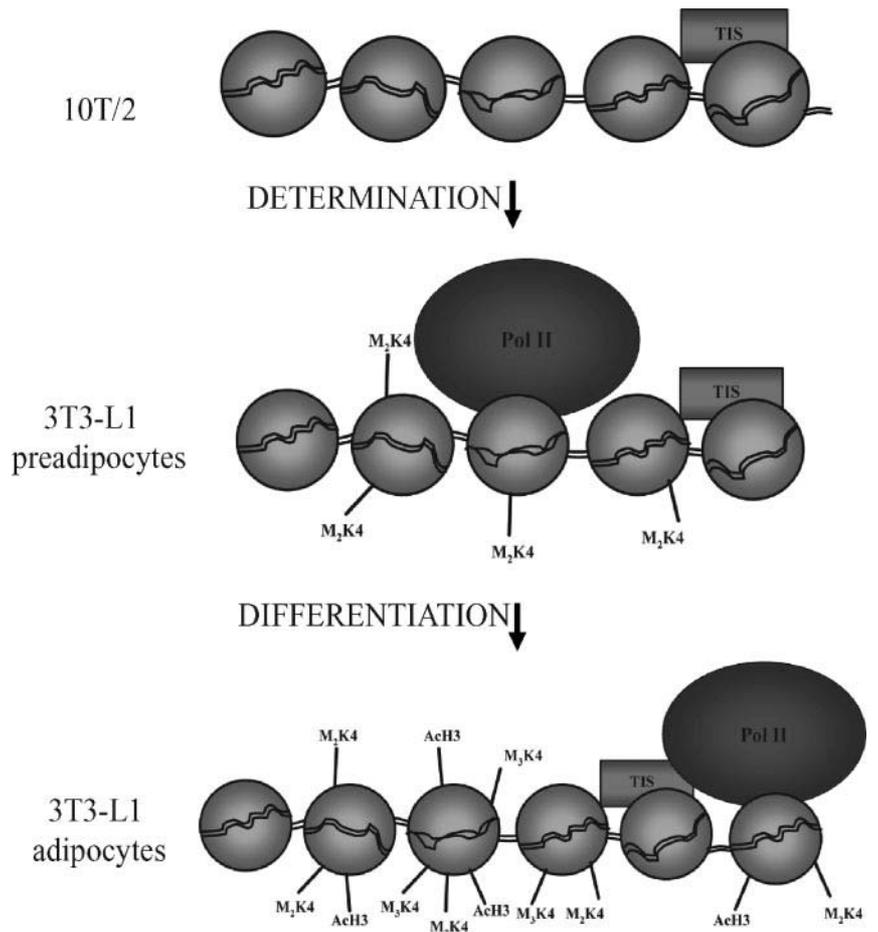
## DISCUSSION

Recent studies have shown that the post-translational modifications of histones play a key role in regulating the programmatically determined gene expression patterns arising during differentiation of several cell types. In the  $\beta$ -globin locus, which has become a paradigm for the study of chromatin modifications during development, H3 acetylation and H3-K4 methylation closely correlate with gene activity throughout development (39). Increased histone hyperacetylation has been detected in the promoters of several cytokines during T-cell differentiation (40) and in the promoters of myogenic genes during muscle differentiation (41). We study here the pattern of two key histone post-translational modifications, H3-K9/K14 acetylation and H3-K4 di- and trimethylation, in several adipogenic genes throughout adipocyte differentiation. We focused most of our work on the *apM1* gene, which can be considered a prototype for adipogenic genes, since it is expressed exclusively in adipocytes (42) and its expression is controlled by master adipocyte regulators PPAR $\gamma$  and CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (18, 19). Adiponectin transcription is turned on 2 days after the initiation of adipocyte differentiation and maintained at a high level in mature adipocytes. Adiponectin gene expression is decreased in a variety of disorders associated with insulin resistance, such as cardiovascular disease, obesity, and diabetes mellitus (42, 43). We show here that the promoters of *apM1* and other key adipogenic genes, such as *glut4*, leptin, or *gpdl*, are not associated with histone H3 hyperacetylation but are enriched in histone H3-K4 dimethylation in primary preadipocytes and 3T3-L1 undifferentiated fibroblasts, which do not yet express these genes. This signal is exclusive to adipogenic promoters, since it was not detected in other silent genes, such as *glut2*, *ins2*, or *myod1*. This epigenetic mark labels the adipogenic genes as competent for transcription and is associated with loading of Pol II to the same DNA regions. This scenario is similar to that

described for the  $\beta$ -globin locus, where significant levels of H3-K4 methylation were found in the promoters of inactive genes, signaling the open state of the chromatin at those regions (7). Interestingly, H3-K4 dimethylation exhibited a characteristic distribution along the nuclear border when examined by immunocytochemical staining in 3T3-L1 fibroblasts. The region along the nuclear envelope is occupied by middle to late replicating chromatin in 3T3-L1 cells, mostly including silent genes (44). A recent report has shown that the neurogenic gene *mash1* is located in the peripheral nuclear region in ES cells, where it is not expressed but relocates toward the interior of the nucleoplasm in differentiated neurons, at the time that its transcription is up-regulated (45). We observed a striking rearrangement of the dimethyl-H3-K4-enriched chromatin in differentiated 3T3-L1 adipocytes. The enrichment along the nuclear border disappeared, and H3-K4 dimethylation was then mainly found in the central region of the nucleus. Our data suggest that adipogenic genes are regulated by changes in chromatin structure and location, just as has been shown for *mash1*, but further experiments are needed to ascertain that.

It is noteworthy that 10T1/2 fibroblasts do not display H3-K4 dimethylation at the promoter region of the adipogenic genes studied. Pluripotential 10T1/2 cells can give rise to several specialized cell types, including adipocytes, but only after prior treatment with the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine (35). Unipotential 3T3-L1 fibroblasts, on the other hand, have undergone determination and can only be maintained as preadipocytes or be differentiated into adipocytes. Our data suggest that H3-K4 dimethylation is a distinguishing mark of cells that have undergone determination to a preadipocyte stage. Interestingly, mouse primary preadipocytes display high levels of

## H3-K4 Dimethylation in Adipogenesis



**FIGURE 7. Model showing the histone modifications and Pol II binding found at the adiponectin promoter at different states of activation.** Shortly, in pluripotential cells such as 10T1/2 that have not yet compromised to an adipogenic fate, neither H3-K9/K14 acetylation nor H3-K4 di- or trimethylation is detected at the *apM1* promoter. In 3T3-L1 fibroblasts, which have undergone determination, the still silent promoter is associated with H3-K4 dimethylation and bound Pol II. In fully differentiated 3T3-L1 adipocytes, finally, the *apM1* promoter becomes acetylated and trimethylated at the same time that Pol II and histone acetylation and methylation spread to the coding region. *TIS*, transcription initiation site.

H3-K4 dimethylation at the *apM1* promoter, thus indicating that these cells have already been committed to an adipogenic fate.

Histone H3 acetylation is frequently associated with gene activity (2, 4, 5). Several studies have demonstrated a positive effect of inhibiting histone deacetylase activity on adipogenesis (25–27). A recent report contradicted those results by describing an inhibitory rather than stimulatory effect of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on adipogenesis, thus arguing for a positive role of Class I histone deacetylases on adipocyte differentiation (46). In our study, the promoters of *apM1*, leptin, *glut4*, and *gpd1* are not acetylated in 3T3-L1 fibroblasts, which do not express these genes. However, *sod2*, *adipor1*, and *adipor2*, which are already expressed in undifferentiated cells, display detectable levels of H3-K9/K14 acetylation. H3 hyperacetylation increased throughout adipogenesis in the *apM1* promoter and spread to the coding region, and global H3-K9/K14 acetylation also increased. On the other hand, the promoter of *pref1*, a gene that follows an inverse pattern of transcriptional activity, being highly expressed in undifferentiated cells but progressively silenced throughout adipogenesis (34), was strongly acetylated and methylated in fibroblasts, but the modifications decreased in parallel to gene silencing. These results indicate that histone deacetylase activity at particular loci is also necessary for the correct regulation of transcription during adipogenesis.

We found a significant correlation between both acetylation and H3-K4 trimethylation at the *apM1* promoter region and gene expression. In fact, both post-translational modifications were closely correlated between them. These results agree with previous data showing that all “positive” histone modification marks are likely to be present at the same chromatin regions (4, 38). Promoter H3-K4

dimethylation, on the other hand, did not correlate with expression. These results are in agreement with previous data showing a global correlation between gene expression and promoter H3 and H4 acetylation, but not H3-K4 dimethylation, in yeasts (47). However, in our case, we are referring to different transcriptional states of the same gene rather than to the total transcripts of a cell at a given time. We could not find significant levels of H3-K4 trimethylation outside the promoter region of the *apM1* gene, although high levels of acetylation and dimethylation were easily detected. Previous studies have shown that H3-K4 trimethylation is associated with promoter clearance by Pol II (14–16). Untargeted action of Set1 is proposed to account for genome-wide H3-K4 dimethylation levels in yeast (15). However, we could not find H3-K4 methylation at the promoters of a number of silent genes, such as *ins2*, or for that matter, on the coding region of *apM1* in 3T3-L1 fibroblasts. Thus, if untargeted histone methyltransferase action is in fact the reason behind H3-K4 dimethylation at the coding region of *apM1*, some structural modification must have taken place at that chromatin region upon induction of differentiation to account for its accessibility to methyltransferases in differentiated adipocytes but not fibroblasts.

To study the role of H3-K4 dimethylation on *apM1* expression, we differentiated 3T3-L1 cells in the presence of MTA, a known inhibitor of AdoMet-dependent methyltransferases, that has previously been shown to inhibit H3-K4 methylation (36). Accordingly, by D5 of the differentiation process, we observed a marked decrease of global H3-K4 dimethylation in cells treated with the inhibitor. At the *apM1* promoter, we were only able to detect a partial decrease of dimethylation, which may reflect the low turnover rate of this epigenetic mark. The expres-

## H3-K4 Dimethylation in Adipogenesis

sion of the gene was also partially decreased in cells differentiated in the presence of the inhibitor. Moreover, we observed a significant inhibition of differentiation in cells maintained in the presence of MTA. We could not detect decreased levels of PPAR $\gamma$  RNA or protein (data not shown), thus indicating that reduced *apM1* expression and reduced adipogenesis are not secondary to decreased expression of the factor, considered to be the master regulator of adipogenesis. However, more experiments are needed to discern whether binding of PPAR $\gamma$  to the *apM1* promoter is impaired in the absence of H3-K4 dimethylation.

A previous study found a 50% decrease of H3-K4 methylation at the *nos3* promoter after 48-h incubation of endothelial cells in the presence of 3 mM MTA (36), which correlated with decreased expression of the *nos3* gene. Similarly, at the inducible collagenase promoter, which has been shown to be rapidly dimethylated at H3-K4 following mitogen stimulation (48), preincubation with 2 mM MTA blocked the induction of the gene. Our results are in accordance with these data and argue for a positive role of H3-K4 dimethylation in regulating transcription of adipogenic genes and ultimately, the differentiation process. However, we must take into account that MTA is a generic inhibitor of AdoMet-dependent methylation and has been shown to partially decrease DNA methylation (49) and affect arginine methylation (50). Thus, although our data suggest that AdoMet-dependent methylation is required for proper adipocyte differentiation, further studies are needed to determine which other targets aside from H3-K4 methylation may be involved in the process.

In conclusion (Fig. 7), our results show that H3-K4 dimethylation and Pol II recruitment at the promoters of key adipogenic genes are distinguishing marks of cells that have undergone determination and have compromised with an adipocyte cell fate. These marks are absent from the same promoter regions in pluripotential cells, such as the 10T1/2 cell line, which represent a previous step in the differentiation process from totipotential cells to differentiated adipocytes. In differentiated adipocytes, on the other hand, active transcription is accompanied by promoter H3 acetylation and H3-K4 trimethylation as well as the spreading of these modifications toward the coding region. More studies are needed to determine which transcription factors and coregulators are involved in the establishment and maintenance of this modified chromatin state throughout adipogenesis. Unraveling the molecular mechanisms underlying the establishment of the transcriptional pattern of mature adipocytes will undoubtedly help us to develop novel therapeutic approaches for the treatment of obesity-related diseases.

*Acknowledgment*—We thank Dr. F. Felipe for providing a protocol for the isolation of primary preadipocytes and adipocytes. We are grateful to Dr. C. Cardalda for critical reading of the manuscript.

### REFERENCES

- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001) *Science* **293**, 1074–1080
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D. K., and Young, R. A. (2005) *Cell* **122**, 517–527
- Kurdستاني, S. K., Tavazoie, S., and Grunstein, M. (2004) *Cell* **117**, 721–733
- Schubeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J., Bell, S. P., and Groudine, M. (2004) *Genes Dev.* **18**, 1263–1271
- Myers, F. A., Evans, D. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20197–20205
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002) *Nature* **419**, 407–411
- Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 73–77
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001) *Nature* **410**, 116–120
- Waterborg, J. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4918–4921
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J., and Jenuwein, T. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 2117–2124
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) *Cell* **119**, 941–953
- Talasz, H., Lindner, H. H., Sarg, B., and Helliger, W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 38814–38822
- Kristjuhan, A., and Svejstrup, J. Q. (2004) *EMBO J.* **23**, 4243–4252
- Krogan, N. J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Ryan, O. W., Golshani, A., Johnston, M., Greenblatt, J. F., and Shilatifard, A. (2003) *Mol. Cell* **11**, 721–729
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K. (2003) *Mol. Cell* **11**, 709–719
- Guenther, M. G., Jenner, R. G., Chevalier, B., Nakamura, T., Croce, C. M., Canaani, E., and Young, R. A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8603–8608
- Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2000) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 145–171
- Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Makishima, M., and Shimomura, I. (2003) *Diabetes* **52**, 1655–1663
- Qiao, L., Maclean, P. S., Schaack, J., Orlicky, D. J., Darimont, C., Pagliassotti, M., Friedman, J. E., and Shao, J. (2005) *Diabetes* **54**, 1744–1754
- Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 22–32
- Hemati, N., Ross, S. E., Erickson, R. L., Groblewski, G. E., and MacDougald, O. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25913–25919
- Salma, N., Xiao, H., Mueller, E., and Imbalzano, A. N. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 4651–4663
- Chen, S., Johnson, B. A., Li, Y., Aster, S., McKeever, B., Mosley, R., Moller, D. E., and Zhou, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3733–3736
- Takahashi, N., Kawada, T., Yamamoto, T., Goto, T., Taimatsu, A., Aoki, N., Kawasaki, H., Taira, K., Yokoyama, K., Kamei, Y., and Fushiki, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16906–16912
- Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M. B., Miard, S., and Auwerx, J. (2002) *Dev. Cell* **3**, 903–910
- Wiper-Bergeron, N., Wu, D., Pope, L., Schild-Poulter, C., and Hache, R. J. (2003) *EMBO J.* **22**, 2135–2145
- Yoo, E. J., Chung, J. J., Choe, S. S., Kim, K. H., and Kim, J. B. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6608–6615
- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., and Ram, S. J. (2004) *Biophotonics International* **11**, 36–42
- Parrizas, M., Maestro, M. A., Boj, S. F., Paniagua, A., Casamitjana, R., Gomis, R., Rivera, F., and Ferrer, J. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 3234–3243
- Parrizas, M., Boj, S. F., Luco, R. F., Maestro, M. A., and Ferrer, J. (2003) *Methods Mol. Med.* **83**, 61–71
- Sadowski, H. B., Wheeler, T. T., and Young, D. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4722–4731
- Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., and Friedman, J. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34167–34174
- Roh, T. Y., Cuddapah, S., and Zhao, K. (2005) *Genes Dev.* **19**, 542–552
- Smas, C. M., and Sul, H. S. (1993) *Cell* **73**, 725–734
- Taylor, S. M., and Jones, P. A. (1979) *Cell* **17**, 771–779
- Fish, J. E., Matouk, C. C., Rachlis, A., Lin, S., Tai, S. C., D'Abreo, C., and Marsden, P. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24824–24838
- Kristjuhan, A., Walker, J., Suka, N., Grunstein, M., Roberts, D., Cairns, B. R., and Svejstrup, J. Q. (2002) *Mol. Cell* **10**, 925–933
- Miao, F., and Natarajan, R. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 4650–4661
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D., and Felsenfeld, G. (2001) *Science* **293**, 2453–2455
- Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., and Rao, A. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 643–651
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (2002) *Mol. Cell Biol.* **22**, 7302–7312
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005) *Endocr. Rev.* **26**, 439–451
- Yu, J. G., Javorschi, S., Hevener, A. L., Kruszynska, Y. T., Norman, R. A., Sinha, M., and Olefsky, J. M. (2002) *Diabetes* **51**, 2968–2974
- Dimitrova, D. S., and Berezney, R. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 4037–4051
- Williams, R. R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 132–140
- Lagace, D. C., and Nachtigal, M. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 18851–18860
- Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T., and Schreiber, S. L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8695–8700
- Martens, J. H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., and Zantema, A. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 1808–1816
- Woodcock, D. M., Adams, J. K., Allan, R. G., and Cooper, I. A. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 489–499
- Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., and David, M. (2001) *Cell* **104**, 731–741



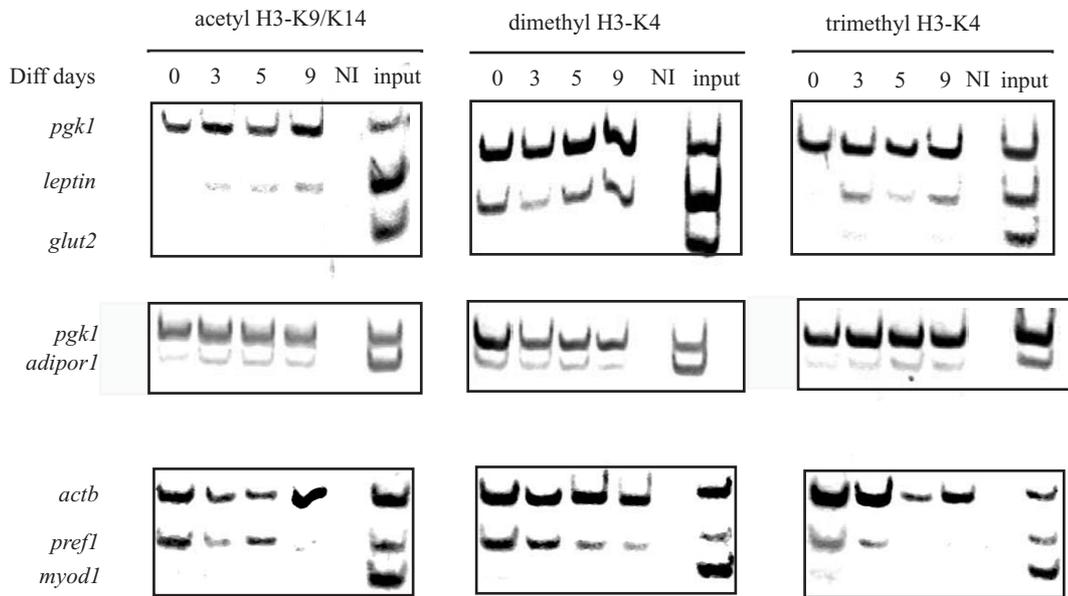
Supplementary Table 1. Sequences of the primers used for the analysis of chIP experiments, real-time PCR and end-point RT-PCR.

Supplementary Fig.1. Histone H3 acetylation and H3-K4 trimethylation correlate with transcription in 3T3-L1 cells throughout adipogenesis. Histone modifications detected at the promoter regions of leptin, *adipor1* and *pref1*. Leptin is not expressed in 3T3-L1 fibroblasts but its expression starts during adipogenesis and is maximal in fully differentiated adipocytes. *Adipor1* is already expressed in undifferentiated fibroblasts and its expression increases steadily throughout adipogenesis. *Pref1*, finally, is strongly expressed in 3T3-L1 fibroblasts but its expression decreases upon the start of the differentiation process and is silenced in mature adipocytes.

Gene	GenBank	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	size (bp)
<b>ChIP</b>				
<b>actb</b>	NM_011909	CGTAGAGGCACAAAAGAACAT	TACGCGCCCCTACAGAAC	297
<b>adipor1</b>	NM_028320	GCCAGGGCTACACGGAGAAT	CCCTACACTGGCGGACTGC	259
<b>adipor2</b>	NM_197985	TTAGTTCCCCTAGGCTCGCC	GCACGCACATCTGACCACAT	251
<b>apM1TIS</b>	NM_009605	TACAGCCCCTCTTCATTCTTA	GCTTTGGCCATTCTCTACC	257
<b>apM1Ex2</b>	NM_009605	TATGTTTCTCTTCCCCGCTGT	TTTGCCCTTTATGTGTTTGTT	231
<b>apM13'utr</b>	NM_009605	GGGGGTCTTTGCAGGGTGAGT	ACGGAGAAAACAAAAATAGGAT	246
<b>glut2</b>	NM_031197	CACTCTGGCTGGTCAGCTATTCAT	TAGATTCCCAACCTCCTCAAAACC	147
<b>glut4</b>	NM_009204	CCTGGCCAATGGGTGTTGTGAA	GGCGGGTCTGGTGGGACTCA	167
<b>gpd1</b>	NM_010271	TCCACCTGTCTGTCCCCTTTAC	AGAGCCGACAATGCAGACTTTC	199
<b>ins2</b>	NM_008387	AGGGCCCCTTGTTAAGACTCTAA	ACTGGGTCCCCACTACCTTTAT	226
<b>leptin</b>	NM_008493	TCATACCAAGCGCCCCCAAACCT	CATGCCTGCCTGCCCTCTTA	202
<b>myoD1</b>	NM_010866	CATTGTCCCGTAGCCTTGAG	GCCACACGCGGTAGCACTTG	201
<b>pgk</b>	NM_008828	CCGGGCCTTTCGACCTCACG	AAAAGCAAACCTCAGACACAG	279
<b>pref1</b>	NM_010052	CCCCAGGGACAGGCAGTAAGGT	ACACATGGCGCGGGTCAGAAG	230
<b>sod2</b>	NM_013671	CAAGCACGCGCCTCTACCAA	CGCCGCCCGACACAACATTATT	254
<b>Real Time</b>				
<b>abl1</b>	NM_009594	CTCACCTCGTTACCTCCAAAGG	TCAAGGTCGCTGGCAGTGT	69
<b>apM1</b>	NM_009605	CAGTGGATCTGACGACACCAA	TGGGCAGGATTAAGAGGAACA	75
<b>RT-PCR</b>				
<b>actb</b>	NM_011909	GATCTGGCACCACACCTTCTACAA	CGTCACCGGAGTCCATCACAA	210
<b>adipoR1</b>	NM_028320	CCCGCGGCCCCAGCAGAG	AGAGCACCGCGCCAGGAAGAACA	675
<b>adipoR2</b>	NM_197985	GGGGGTGAGAGCAGGAGTGTTTCGT	CTCCCTCCCTGCCCTATGTCTTA	945
<b>apM1</b>	NM_009605	CTGCCAGTCATGCCGAAGAT	TTGCCAGTGCTGCCGTCATAA	419
<b>glut4</b>	NM_009204	ACCGGCAGCCTCTTATCATC	GCCAGGGCCAATCTCAA	350
<b>gpd1</b>	NM_010271	AAGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGCAGAAGGGGCGGAGATGA	366
<b>sod2</b>	NM_013671	CGCGGCCTACGTGAACAAT	CCCCAGCAGCGGAATAAG	379
<b>tbp</b>	NM_013684	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG	ATGATGACTGCAGCAAATCGC	190

**Supplementary Table 1.** Primers used in the different studies.

# Supplementary Figure 1





## **DISCUSIÓN**





Los efectos metabólicos de la obesidad han hecho de esta enfermedad altamente prevalente uno de los más comunes factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares así como también de la diabetes mellitus, la hipertensión, la hiperlipidemia, y el síndrome metabólico. Dados estos hallazgos clínicos, en los últimos años se ha estudiado intensamente el tejido adiposo, el cual se reveló como un activo órgano endocrino ocupando una posición privilegiada en la regulación del metabolismo energético. El mayor componente del tejido adiposo blanco es el adipocito, el cual es el responsable de sintetizar y secretar al torrente sanguíneo una gran variedad de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas. El exceso de tejido adiposo provoca una alteración en la función del adipocito, que incluye por un lado, un aumento en la secreción de  $TNF\alpha$ , IL-6 y PAI-1, que provocan un deterioro en la sensibilidad a la insulina, y por otro lado una disminución en la secreción de adiponectina, que aumenta la sensibilidad a la insulina. La adiponectina se encuentra disminuida en la resistencia a la insulina, existiendo datos que sugieren que participa en la patogenia de la misma. AdipoR1 y adipoR2 son los receptores que median las acciones fisiológicas de adiponectina. Se ha demostrado que adipoR1 en músculo interactúa con el receptor de insulina, aumentando la transducción de señal del mismo, siendo este uno de los mecanismos propuestos por los que adiponectina mejoría la sensibilidad a la insulina. Además el aumento de captación de glucosa mediado por la adiponectina está facilitado por un aumento de GLUT-4, contribuyendo aun más a la sensibilidad a la insulina.

Probablemente, la regulación de la acción de la adiponectina, al menos en parte, puede ocurrir mediante la regulación de la expresión de sus receptores. Recientemente, se ha descrito que ambos receptores están expresados en tejido adiposo subcutáneo humano y que están regulados por rosiglitazona (Tan *et al.*, 2005), aunque no existen datos previos sobre la expresión de estos receptores en tejido adiposo intra-abdominal (IAAT).

Los mecanismos implicados en la posible participación de adipoR1 y adipoR2 en la patofisiología de la diabetes tipo 2 está en debate. Se ha postulado que variaciones genéticas de estos receptores pueden conferir cierta susceptibilidad a desarrollar dicha enfermedad (Damcott *et al.*, 2005; Siitonen *et al.*, 2006; Vaxillaire *et al.*, 2006). De hecho, se han encontrado polimorfismos en adipoR1 en humanos con hígado graso y resistencia a la insulina

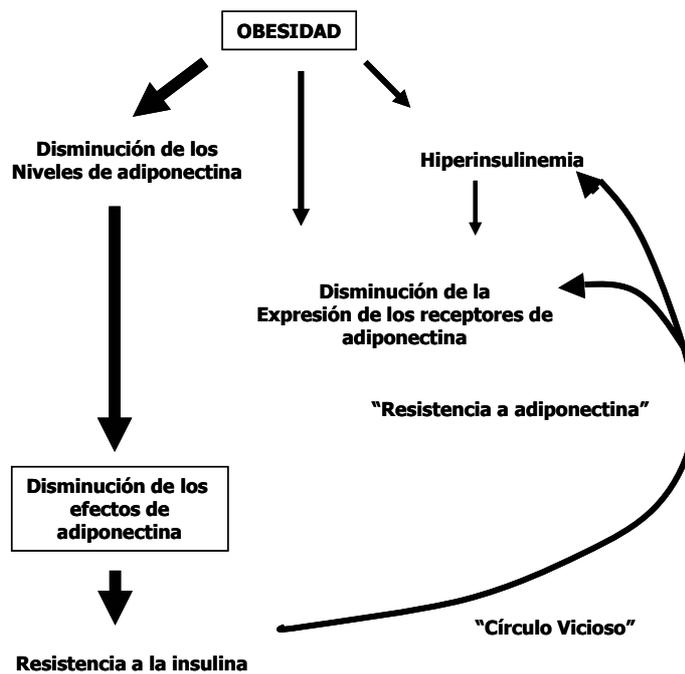
(Stefan *et al.*, 2005). Otros estudios en humanos han descrito una asociación entre la expresión de adipoR1 en músculo esquelético y la secreción de insulina y han encontrado una fuerte correlación positiva entre los niveles de ambos receptores y la sensibilidad a la insulina en Americanos Mexicanos con historia familiar con diabetes (Civitarese *et al.*, 2004). Un trabajo reciente ha demostrado que existe una disminución de la expresión de adipoR1 en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos con respecto a sujetos normales, y que la pérdida de peso conlleva a un aumento de un 80% de la expresión de este receptor (Rasmussen *et al.*, 2006). Sorprendentemente, en nuestro estudio ni la obesidad ni la diabetes están asociados con niveles alterados de expresión de adipoR1 en IAAT. Probablemente la diferencia obtenida entre nuestro estudio y el de Rasmussen pueda ser debida a que existen grandes diferencias de expresión génica entre los dos tipos de tejido adiposo. Nuestros datos sugieren que los FFA pueden tener un papel en la regulación de la expresión de adipoR1 y adiponectina, confirmando previos estudios que atribuyen un efecto directo de los FFA en la expresión de adipoR1 y adiponectina (Kharroubi *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2004). En concordancia con esto, se ha postulado que los FFA pueden regular en forma aguda la adiponectina sérica para limitar el aclaramiento de los FFA de la circulación (Bernstein *et al.*, 2004). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que existe un efecto importante de los FFA o de alguna variable metabólica relacionada, en la regulación de la expresión de adipoR1 y adiponectina en IAAT y que este receptor está implicado en la activación de la utilización de los ácidos grasos.

Recientemente se ha descrito un papel más importante para adipoR2 que para adipoR1 en el aumento de la susceptibilidad a diabetes tipo 2 (Damcott *et al.*, 2005). En nuestro estudio encontramos que la obesidad, pero no la diabetes está asociada con una disminución en la expresión génica de adipoR2 en IAAT. Como AdipoR2 está implicado en la reducción de la acumulación de lípidos, a partir de nuestros datos, puede desprenderse que la disminución de este receptor en la obesidad conduce a una menor acción de adiponectina, contribuyendo a la acumulación de grasa. En nuestro estudio, encontramos una alta correlación entre la expresión de adipoR2 y los niveles plasmáticos de triglicéridos y de apolipoproteína B. De esta manera, las alteraciones en adipoR2 pueden contribuir a un elevado riesgo para desarrollar dislipemia aterogénica y puede estar asociado con la enfermedad arteriosclerótica cardiovascular (ASCVD) en pacientes obesos. Además, la correlación positiva encontrada entre adiponectina y este receptor, sugiere que las alteraciones en adipoR2 se correlacionan con las observadas en adiponectina en la diabetes. Recientemente, se ha publicado un estudio que relaciona las variantes genéticas de este receptor con parámetros metabólicos, y encontraron que adipoR2 juega un papel muy importante en el metabolismo de triglicéridos/VLDL (Broedl *et al.*, 2006), lo que apoyaría nuestros datos.

En resumen, en el primer trabajo demostramos que la expresión de adipoR1 en IAAT no está alterada en la obesidad ni en la diabetes y sugiere que los FFA regulan la expresión de adiponectina y de adipoR1, aunque se necesitan más estudios para confirmarlo. En obesidad y diabetes existe una disminución en la expresión génica de adipoR2 en IAAT, datos que merecen

ser mejor estudiados ya que esta disminución podría sugerir una importante implicación de adipoR2 con el desarrollo de ASCVD.

En la obesidad, ocurre una disminución de la expresión tanto de adiponectina como de los receptores de adiponectina y/o una disminución en la señalización postreceptores. Esto provoca una disminución en la sensibilidad a la insulina que causa una hiperinsulinemia, que a la vez produce la disminución de la expresión de los receptores de adiponectina. Este círculo, como se ha mencionado, es comúnmente llamado "el círculo vicioso" (Kadowaki and Yamauchi, 2005) (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** El círculo vicioso de adiponectina y sus receptores. Los niveles de adiponectina disminuyen en la obesidad, lo cual podría jugar un papel clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Los niveles de los receptores también disminuyen en la obesidad, provocando una menor sensibilidad a la adiponectina que conducen finalmente a hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, que provocan a su vez una disminución de adiponectina y sus receptores (Kadowaki and Yamauchi, 2005) .

Así, las señales provenientes del adipocito son claves en la regulación del metabolismo y el desequilibrio en la secreción de las mismas juegan un papel fundamental en la etiopatogénia y la fisiopatología de enfermedades relacionadas con alteraciones en la masa del tejido adiposo. Este desequilibrio en la secreción de los productos del adipocito viene dado por una alteración en la expresión de los genes del mismo. Por lo tanto, entender la regulación de la expresión génica del adipocito podría ayudar a esclarecer los mecanismos moleculares que intervienen en estos procesos. A partir de aquí, se establecen una serie de preguntas: ¿cuáles son los mecanismos por los cuales se establece el patrón de expresión génica en el adipocito maduro? ¿cuáles son los procesos moleculares que regulan la expresión de adiponectina y otras hormonas adipogénicas?. En este sentido cabe recordar que el patrón de expresión del adipocito comienza a establecerse en las primeras fases de la adipogénesis. De esta manera, en el segundo trabajo, con el propósito de entender las bases de la regulación epigenética en la

adipogénesis, se estudió el patrón de modificaciones de las histonas de genes adipogénicos clave, centrándonos especialmente en la adiponectina.

Las modificaciones pos-traduccionales de las histonas han sido ampliamente estudiadas, y ha quedado demostrado que las histonas juegan un papel clave en la regulación del patrón de expresión génica que se establece durante el proceso de diferenciación de muchos tipos celulares. Un buen ejemplo de ello es el locus de la  $\beta$ -globina, uno de los genes que se han convertido en un paradigma para el estudio de las modificaciones covalentes de las histonas, de forma que la acetilación en la histona H3 y la metilación en H3K4 se correlacionan altamente con la actividad génica durante el desarrollo (Litt *et al.*, 2001). Asimismo, se detectó en los promotores de varias citoquinas un aumento en la hiperacetilación de histonas durante la diferenciación de células T (Avni *et al.*, 2002), y en los promotores de genes miogénicos en la diferenciación de células musculares (Zhang *et al.*, 2002). En este trabajo, se estudiaron dos modificaciones covalentes de las histonas, la acetilación de la histona H3 y la di y trimetilación en H3K4, en diversos promotores de genes adipogénicos claves durante el proceso de diferenciación del adipocito, centrándonos especialmente en el gen de adiponectina. El gen de la adiponectina es un marcador de expresión tardía del proceso de diferenciación, ya que comienza a detectarse entre el día 2 o 3 de diferenciación y mantiene altos niveles en el adipocito maduro. Demostramos que en fibroblastos indiferenciados 3T3-L1 y en preadipocitos primarios, los promotores de adiponectina y otros genes adipogénicos claves que aún no se expresan como *glut4*, *leptina* o *gpd1*, se asocian con hipoacetilación de la histona H3 y enriquecimiento de dimetilación en H3K4. Esta "señal" se encontró exclusivamente en promotores de genes adipogénicos y no fue detectada en otros genes que están silenciados tales como *glut2*, *ins2* o *myod1*, que no son expresados por estos tipos celulares. La dimetilación en H3K4 actúa por lo tanto, como una "marca epigenética" que señala la competencia transcripcional para genes adipogénicos en células que expresarán estos genes bajo ciertas condiciones y está asociada además con unión de la RNA pol II en la misma región de DNA. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en el mencionado gen de  $\beta$ -globina, donde se encontraron niveles significativos de metilación en H3K4 en los promotores de genes inactivos, señalizando un estado abierto o permisible de la cromatina en estas regiones (Schneider *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en fibroblastos 10T/2 no se detecta dimetilación en H3K4 en los promotores de estos mismos genes. Las células 10T/2 son pluri o multipotenciales, ya que pueden dar lugar a varios tipos celulares especializados, entre ellos a adipocitos, tras un tratamiento con el inhibidor de metilación de DNA, (5-azacitidina)(Taylor and Jones, 1979), mientras que las células 3T3-L1 ya están determinadas hacia la línea adipogénica. Nuestros datos sugieren que la dimetilación en H3K4 es una marca distinguible de células que están determinadas hacia el estado adipogénico. Corroborando esta hipótesis, se encontraron altos niveles de dimetilación en H3K4 en el promotor de adiponectina en preadipocitos primarios de

ratón, cuando aún ésta no se expresa, indicando que estas células ya están determinadas hacia el estado adipogénico.

Mediante el análisis por tinciones de inmucitoquímica en fibroblastos 3T3-L1 se observó que la dimetilación en H3K4 exhibe una distribución característica alrededor del borde nuclear. Esta región, coincide con cromatina de replicación media y tardía en células 3T3-L1 y con genes silenciados (Dimitrova and Berezney, 2002). Sorprendentemente, en adipocitos, se observó una notable reorganización de la dimetilación en H3K4, hallándose mayormente en la región central del núcleo. Un estudio reciente demostró que el gen neurogénico *mash1* está localizado en la región nuclear periférica, cuando no se expresa, pero se relocaliza hacia el interior del núcleo en neuronas diferenciadas (Williams *et al.*, 2006). En conjunto, nuestros datos sugieren que los genes adipogénicos, además de estar "marcados" para la competencia transcripcional en preadipocitos, están regulados por cambios en la estructura y localización de la cromatina, aunque es necesario realizar más estudios para demostrar esta hipótesis.

La acetilación en H3 se ha asociado frecuentemente con la actividad génica (Schubeler *et al.*, 2004; Pokholok *et al.*, 2005). Varios estudios han demostrado que el tratamiento con inhibidores de las histonas deacetilasas durante la adipogénesis genera un efecto positivo o un aumento de la misma (Fajas *et al.*, 2002a; Wiper-Bergeron *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2006). Un estudio reciente contradice estos resultados, ya que describe una inhibición en la adipogénesis mediante el tratamiento con el inhibidor ácido valproico (Lagace and Nachtigal, 2004). En nuestro estudio, los promotores de adiponectina, *glut4*, leptina y *gpd1*, no se encontraron acetilados en H3 en fibroblastos 3T3-L1, donde aun no se expresan. Sin embargo *sod2*, y los receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, que se expresan en niveles bajos en células indiferenciadas, mostraron altos niveles de acetilación en H3K9/K14 durante todo el proceso de diferenciación. La hiperacetilación aumentó significativamente en los promotores de adiponectina, leptina, *glut4* y *gpd1*, y en adiponectina se extendió hacia la región codificante. La acetilación global también aumentó a lo largo de la adipogénesis. En cambio en el promotor de *pref1*, un gen que sigue un patrón de expresión génica inverso a los anteriores, (presenta altos niveles al inicio de la adipogénesis y disminuye a lo largo de la diferenciación) se detectaron elevados niveles de acetilación y dimetilación en fibroblastos indiferenciados 3T3-L1 y ambas modificaciones disminuyeron en el promotor progresivamente a lo largo de la diferenciación de manera paralela con su silenciamiento génico. La única modificación que se mantuvo detectable en adipocitos maduros fue la dimetilación en H3K4, señalando probablemente, que este gen estuvo activo en un pasado.

En acuerdo con estudios previos, encontramos una alta correlación entre acetilación y trimetilación en H3K4 en el promotor de adiponectina y sus niveles de expresión génica a lo largo de la adipogénesis, así como una buena correlación entre estas dos marcas epigenéticas. No se encontró correlación entre dimetilación en H3K4 en el promotor de adiponectina y su expresión génica, tal como se había descrito en levadura, donde existía una alta correlación

entre expresión génica y acetilación en H3 y H4 pero no con dimetilación en H3K4 (Bernstein *et al.*, 2002).

Para estudiar la importancia de la dimetilación en H3K4 en la expresión de adiponectina durante el proceso de diferenciación, añadimos un inhibidor de metiltransferasas (MTA), que se ha demostrado que inhibe la metilación en H3K4 (Fish *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2003). En estas condiciones, encontramos una marcada disminución global de la dimetilación en H3K4 en células tratadas con el inhibidor respecto a células control, mientras que la dimetilación en H3K4 en el promotor de adiponectina fue parcial, lo cual podría reflejar un bajo recambio de esta marca epigenética. La disminución en la dimetilación coincidió con una disminución parcial de la expresión génica de adiponectina. Además, en células tratadas con MTA observamos una inhibición significativa de la diferenciación adipocitaria, que no fue secundaria a una disminución del RNA o proteína de PPAR $\gamma$ . Aunque son necesarios más estudios para dilucidar si en ausencia de dimetilación en H3K4 la unión de PPAR $\gamma$  al promotor de adiponectina esta alterada.

En resumen, el segundo trabajo de esta tesis, muestra que la dimetilación en H3K4 y el reclutamiento de la RNA polII en los promotores de genes adipogénicos claves son marcas distinguibles de células que están determinadas y se han comprometido hacia la línea celular adipogénica. Estas mismas marcas, están ausentes en las mismas regiones de los promotores, en células pluripotenciales que representan un paso previo en el proceso de diferenciación desde células totipotenciales a adipocitos maduros y en los promotores de genes que se encuentran silenciados y no se expresan en células determinadas hacia la línea adipogénica (3T3-L1). En adipocitos diferenciados, la transcripción activa de estos genes es acompañada por hiperacetilación en H3, di y trimetilación en H3K4, así como también la extensión de estas modificaciones hacia las regiones codificantes del gen. La dimetilación en H3K4 es necesaria para la expresión génica de adiponectina, así como también para el desarrollo de una normal diferenciación adipocitaria. No obstante, son necesarios más estudios para dilucidar cuales son los factores de transcripción y cofactores necesarios en el establecimiento de dicho patrón.

# **RESUMEN Y CONCLUSIONES**



En resumen, a partir de nuestro estudio, hemos obtenido los siguientes resultados:

La expresión de adipoR1 en tejido adiposo intraabdominal no se encuentra alterada ni en situaciones de obesidad ni en diabetes, aunque existe correlación entre la expresión del mismo con los niveles de FFA, lo que sugiere una regulación de adipoR1 y adiponectina por FFA que necesita ser estudiada con mayor profundidad. Por otra parte, la expresión de adipoR2 en el tejido adiposo intraabdominal está disminuida significativamente en situaciones de obesidad y diabetes, y se correlaciona inversamente con los niveles plasmáticos de triglicéridos y apolipoproteína B.

La expresión génica de adiponectina en adipocitos durante la adipogénesis se correlaciona con la acetilación de la histona H3 y la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 en el promotor de la misma, siendo ambas señales detectables al mismo tiempo que el RNA del gen. Sin embargo, sorprendentemente, el promotor de adiponectina presenta ya en fibroblastos 3T3-L1 y en preadipocitos primarios de ratón dimetilación en la lisina 4 de la histona H3, mucho antes de su expresión. Esta señal es compartida por otros genes adipogénicos tardíos como leptina y glut4, asociándose además con ocupación de la RNA polimerasa II. Esta marca epigenética no se encontró en fibroblastos 10T1/2, que representan un paso previo en la diferenciación desde células pluripotenciales indicando que se trata de una señal exclusiva de células que están comprometidas a diferenciarse a adipocitos. Además se encontró un importante cambio en la localización de la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 dentro del territorio nuclear, coincidiendo con la activación de los genes marcadores adipogénicos. Y por último, mediante el uso de inhibidores pudo constatararse que la expresión del gen de adiponectina, así como también la adipogénesis disminuye al disminuir la dimetilación en la lisina 4 de la histona H3. En conjunto estos datos sugieren un importante papel de estas marcas epigenéticas en la regulación de la expresión de la adiponectina y la correcta diferenciación de la célula adiposa.



A partir de los resultados de este proyecto de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. El receptor de adiponectina adipoR1 en tejido adiposo intraabdominal no está regulado de manera diferencial en sujetos obesos ni diabéticos, lo que sugiere que este receptor no está implicado en la etiopatogénia y fisiopatología de estas enfermedades.
2. La expresión del receptor de adiponectina adipoR2 en tejido adiposo intraabdominal se encuentra alterada en la obesidad sugiriendo que puede tener un papel clave en el desarrollo de ésta enfermedad, y en consecuencia de la resistencia a la insulina y la diabetes.
3. La dimetilación en la lisina 4 de la histona H3 en la región promotora de genes marcadores adipogénicos como adiponectina, leptina y *glut4*, señala la competencia transcripcional de los mismos en células comprometidas al estado adipogénico.
4. Esta señal es exclusiva de células comprometidas hacia el estado adipogénico, ya que fue encontrada en preadipocitos primarios de ratón, pero no en células pluripotenciales 10T1/2.
5. La disminución de la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 con inhibidores conlleva una disminución de la expresión de adiponectina y de la adipogénesis, lo que sugiere un papel clave de esta marca epigenética en la regulación de la diferenciación de los adipocitos. Estos resultados demuestran que la manipulación de las señales epigenéticas podrían proporcionar nuevas dianas en el desarrollo de estrategias terapéuticas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad.



## **BIBLIOGRAFÍA**





(1988). Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. The WHO MONICA Project. *World Health Stat. Q.* *41*, 115-140.

(1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* *854*, 1-452.

Adamczak, M., Wiecek, A., Funahashi, T., Chudek, J., Kokot, F., and Matsuzawa, Y. (2003). Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* *16*, 72-75.

Allis, C.D., Chicoine, L.G., Richman, R., and Schulman, I.G. (1985). Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* *82*, 8048-8052.

Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C., and Sternglanz, R. (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature.* *394*, 592-595.

Aranceta, J., Perez, R.C., Serra, M.L., Ribas, L., Quiles, I.J., Vioque, J., and Foz, M. (1998). [Prevalence of obesity in Spain: the SEEDO'97 study. Spanish Collaborative Group for the Study of Obesity]. *Med. Clin. (Barc.)* *111*, 441-445.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., and Rao, A. (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immunol.* *3*, 643-651.

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Marchand-Brustel, Y., and Lewin, M.J. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature.* *394*, 790-793.

Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* *109*, 801-806.

Bastard, J.P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., and Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 3338-3342.

Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., and Schreiber, S.L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 8695-8700.

Bernstein, E.L., Koutkia, P., Ljungquist, K., Breu, J., Canavan, B., and Grinspoon, S. (2004). Acute regulation of adiponectin by free fatty acids. *Metabolism.* *53*, 790-793.

- Bird,A.W., Yu,D.Y., Pray-Grant,M.G., Qiu,Q., Harmon,K.E., Megee,P.C., Grant,P.A., Smith,M.M., and Christman,M.F. (2002). Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*. *419*, 411-415.
- Blackwood,E.M. and Kadonaga,J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*. *5373*, 60-63
- Bluher,M., Bullen,J.W., Jr., Lee,J.H., Kralisch,S., Fasshauer,M., Kloting,N., Niebauer,J., Schon,M.R., Williams,C.J., and Mantzoros,C.S. (2006). Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: Associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *6*, 2310-2316.
- Bluher,M., Fasshauer,M., Kralisch,S., Schon,M.R., Krohn,K., and Paschke,R. (2005). Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *329*, 1127-1132.
- Boden,G., Cheung,P., Mozzoli,M., and Fried,S.K. (2003). Effect of thiazolidinediones on glucose and fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. *52*, 753-759.
- Bouchard,C., Tremblay,A., Despres,J.P., Nadeau,A., Lupien,P.J., Theriault,G., Dussault,J., Moorjani,S., Pinault,S., and Fournier,G. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. *N. Engl. J. Med.* *322*, 1477-1482.
- Bowen,N.J., Fujita,N., Kajita,M., and Wade,P.A. (2004). Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim. Biophys. Acta*. *1677*, 52-57.
- Brand,A.H., Breeden,L., Abraham,J., Sternglanz,R., and Nasmyth,K. (1985). Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*. *91*, 41-48.
- Bray,G.A. (1992). Obesity increases risk for diabetes. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *16 Suppl 4*, S13-S17.
- Broedl,U.C., Lehrke,M., Fleischer-Brielmaier,E., Tietz,A.B., Nagel,J.M., Goke,B., Lohse,P., and Parhofer,K.G. (2006). Genetic variants of adiponectin receptor 2 are associated with increased adiponectin levels and decreased triglyceride/VLDL levels in patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc. Diabetol.* *5*, 11.
- Bulger,M. and Groudine,M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* *19*, 2465-77.
- Butler,J.E. and Kadonaga,J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* *20*, 2583-92.
- Cao,Z., Umek,R.M., and McKnight,S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* *5*, 1538-1552.
- Chandran,M., Phillips,S.A., Ciaraldi,T., and Henry,R.R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. *26*, 2442-2450.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.
- Choy,J.S. and Kron,S.J. (2002). NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8215-8225.
- Cinti,S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc. Nutr. Soc.* *60*, 319-328.

- Civitarese,A.E., Jenkinson,C.P., Richardson,D., Bajaj,M., Cusi,K., Kashyap,S., Berria,R., Belfort,R., DeFronzo,R.A., Mandarino,L.J., and Ravussin,E. (2004). Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. *47*, 816-820.
- Classon,M., Kennedy,B.K., Mulloy,R., and Harlow,E. (2000). Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10826-10831.
- Cmarko,D., Verschure,P.J., Martin,T.E., Dahmus,M.E., Krause,S., Fu,X.D., van Driel,R., and Fakan,S. (1999). Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell*. *10*, 211-223.
- Combs,T.P., Pajvani,U.B., Berg,A.H., Lin,Y., Jelicks,L.A., Laplante,M., Nawrocki,A.R., Rajala,M.W., Parlow,A.F., Cheeseboro,L., Ding,Y.Y., Russell,R.G., Lindemann,D., Hartley,A., Baker,G.R., Obici,S., Deshaies,Y., Ludgate,M., Rossetti,L., and Scherer,P.E. (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*. *145*, 367-383.
- Cook,K.S., Groves,D.L., Min,H.Y., and Spiegelman,B.M. (1985). A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 6480-6484.
- Cosgrove,M.S., Boeke,J.D., and Wolberger,C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 1037-1043.
- Damcott,C.M., Ott,S.H., Pollin,T.I., Reinhart,L.J., Wang,J., O'connell,J.R., Mitchell,B.D., and Shuldiner,A.R. (2005). Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. *Diabetes*. *54*, 2245-2250.
- Darimont,C. and Mace,K. (2003). immortalization of human preadipocytes. *Biochimie*. *85*, 1231-1233.
- Debard,C., Laville,M., Berbe,V., Loizon,E., Guillet,C., Morio-Liondore,B., Boirie,Y., and Vidal,H. (2004). Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. *47*, 917-925.
- Dhalluin,C., Carlson,J.E., Zeng,L., He,C., Aggarwal,A.K., and Zhou,M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. *399*, 491-496.
- Diez,J.J. and Iglesias,P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* *148*, 293-300.
- Dimitrova,D.S. and Berezney,R. (2002). The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J. Cell Sci.* *115*, 4037-4051.
- Eden,S., Hashimshony,T., Keshet,I., Cedar,H., and Thorne,A.W. (1998). DNA methylation models histone acetylation. *Nature*. *394*, 842.
- El Haschimi,K., Pierroz,D.D., Hileman,S.M., Bjorbaek,C., and Flier,J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* *105*, 1827-1832.
- Elias,C.F., Aschkenasi,C., Lee,C., Kelly,J., Ahima,R.S., Bjorbaek,C., Flier,J.S., Saper,C.B., and Elmquist,J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. *23*, 775-786.

- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., and Bahouth, S.W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. *145*, 2273-2282.
- Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M.B., Miard, S., and Auwerx, J. (2002a). The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev. Cell*. *3*, 903-910.
- Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., Sardet, C., Lees, J.A., and Auwerx, J. (2002b). E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev. Cell*. *3*, 39-49.
- Fasshauer, M., Klein, J., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., and Paschke, R. (2004). Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*. *558*, 27-32.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001). Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. *288*, 1027-1031.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448-453.
- Ferguson-Smith, A.C. and Surani, M.A. (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*. *293*, 1086-1089.
- Fernandez-Real, J.M. and Ricart, W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr. Rev*. *24*, 278-301.
- Ferrannini, E., Galvan, A.Q., Gastaldelli, A., Camastra, S., Sironi, A.M., Toschi, E., Baldi, S., Frascerra, S., Monzani, F., Antonelli, A., Nannipieri, M., Mari, A., Seghieri, G., and Natali, A. (1999). Insulin: new roles for an ancient hormone. *Eur. J. Clin. Invest*. *29*, 842-852.
- Fish, J.E., Matouk, C.C., Rachlis, A., Lin, S., Tai, S.C., D'Abreo, C., and Marsden, P.A. (2005). The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J. Biol. Chem*. *280*, 24824-24838.
- Fisher, A.G. and Merckenschlager, M. (2002). Gene silencing, cell fate and nuclear organisation. *Curr. Opin. Genet. Dev*. *12*, 193-197.
- Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., and Johnson, C.L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*. *288*, 1723-1727.
- Flier, J.S., Cook, K.S., Usher, P., and Spiegelman, B.M. (1987). Severely impaired adipin expression in genetic and acquired obesity. *Science*. *237*, 405-408.
- Fonseca, V. (2003). Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am. J. Med*. *115 Suppl 8A:42S-48S*, 42S-48S.
- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I., and Groudine, M. (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. *1*, 137-143.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B.B., and Flier, J.S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med*. *1*, 1311-1314.
- Friedman, J.M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature*. *404*, 632-634.
- Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. *395*, 763-770.

- Fruhbeck,G., Aguado,M., and Martinez,J.A. (1997). In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *240*, 590-594.
- Fruhbeck,G., Gomez-Ambrosi,J., Muruzabal,F.J., and Burrell,M.A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* *280*, E827-E847.
- Fry,C.J. and Peterson,C.L. (2002). Transcription. Unlocking the gates to gene expression. *Science.* *295*, 1847-1848.
- Fu,M., Rao,M., Bouras,T., Wang,C., Wu,K., Zhang,X., Li,Z., Yao,T.P., and Pestell,R.G. (2005). Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J. Biol. Chem.* *280*, 16934-16941.
- Gallagher,D., Heymsfield,S.B., Heo,M., Jebb,S.A., Murgatroyd,P.R., and Sakamoto,Y. (2000). Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am. J. Clin. Nutr.* *72*, 694-701.
- Green,H. and Kehinde,O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.* *5*, 19-27.
- Green,H. and Kehinde,O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* *7*, 105-113.
- Gregoire,F.M., Smas,C.M., and Sul,H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* *78*, 783-809.
- Gruenbaum,Y., Stein,R., Cedar,H., and Razin,A. (1981). Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* *124*, 67-71.
- Gu,W. and Roeder,R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* *90*, 595-606.
- Guerre-Millo,M., Rouault,C., Poulain,P., Andre,J., Poitout,V., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., Fruchart,J.C., Reach,G., and Staels,B. (2001). PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* *50*, 2809-2814.
- Gustafson,B., Jack,M.M., Cushman,S.W., and Smith,U. (2003). Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 933-939.
- Halaas,J.L., Gajiwala,K.S., Maffei,M., Cohen,S.L., Chait,B.T., Rabinowitz,D., Lallone,R.L., Burley,S.K., and Friedman,J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* *269*, 543-546.
- Hamilton,B.S., Paglia,D., Kwan,A.Y., and Deitel,M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat. Med.* *1*, 953-956.
- Haugen,F., Jorgensen,A., Drevon,C.A., and Trayhurn,P. (2001). Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* *507*, 105-108.
- Hauer,H., Entenmann,G., Wabitsch,M., Gaillard,D., Ailhaud,G., Negrel,R., and Pfeiffer,E.F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J. Clin. Invest.* *84*, 1663-1670.
- Hileman,S.M., Pierroz,D.D., and Flier,J.S. (2000). Leptin, nutrition, and reproduction: timing is everything. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 804-807.

- Hotamisligil,G.S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *27 Suppl 3,* S53-S55.
- Hotamisligil,G.S., Arner,P., Caro,J.F., Atkinson,R.L., and Spiegelman,B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *95,* 2409-2415.
- Hotamisligil,G.S., Shargill,N.S., and Spiegelman,B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* *259,* 87-91.
- Hotta,K., Funahashi,T., Arita,Y., Takahashi,M., Matsuda,M., Okamoto,Y., Iwahashi,H., Kuriyama,H., Ouchi,N., Maeda,K., Nishida,M., Kihara,S., Sakai,N., Nakajima,T., Hasegawa,K., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Nakamura,T., Yamashita,S., Hanafusa,T., and Matsuzawa,Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20,* 1595-1599.
- Hotta,K., Funahashi,T., Bodkin,N.L., Ortmeyer,H.K., Arita,Y., Hansen,B.C., and Matsuzawa,Y. (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* *50,* 1126-1133.
- Hu,E., Liang,P., and Spiegelman,B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* *271,* 10697-10703.
- Huyen,Y., Zgheib,O., Ditullio,R.A., Jr., Gorgoulis,V.G., Zacharatos,P., Petty,T.J., Sheston,E.A., Mellert,H.S., Stavridi,E.S., and Halazonetis,T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature.* *432,* 406-411.
- Jacobs,S.A. and Khorasanizadeh,S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science.* *295,* 2080-2083.
- Janke,J., Engeli,S., Gorzelnjak,K., Luft,F.C., and Sharma,A.M. (2002). Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes. Res.* *10,* 1-5.
- Janssen,I., Heymsfield,S.B., Allison,D.B., Kotler,D.P., and Ross,R. (2002). Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *Am. J. Clin. Nutr.* *75,* 683-688.
- Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293,* 1074-1080.
- Juan,C.C., Au,L.C., Fang,V.S., Kang,S.F., Ko,Y.H., Kuo,S.F., Hsu,Y.P., Kwok,C.F., and Ho,L.T. (2001). Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *289,* 1328-1333.
- Kadonaga,J.T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell.* *116,* 247-257.
- Kadowaki,T. and Yamauchi,T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* *26,* 439-451.
- Kern,P.A., Ranganathan,S., Li,C., Wood,L., and Ranganathan,G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* *280,* E745-E751.
- Keshet,I., Lieman-Hurwitz,J., and Cedar,H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell.* *44,* 535-543.

- Keys,A., Fidanza,F., Karvonen,M.J., Kimura,N., and Taylor,H.L. (1972). Indices of relative weight and obesity. *J. Chronic. Dis.* *25*, 329-343.
- Kharroubi,I., Rasschaert,J., Eizirik,D.L., and Cnop,M. (2003). Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1118-1122.
- Kim,J.B. and Spiegelman,B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* *10*, 1096-1107.
- Kishida,K., Nagaretani,H., Kondo,H., Kobayashi,H., Tanaka,S., Maeda,N., Nagasawa,A., Hibuse,T., Ohashi,K., Kumada,M., Nishizawa,H., Okamoto,Y., Ouchi,N., Maeda,K., Kihara,S., Funahashi,T., and Matsuzawa,Y. (2003). Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 286-292.
- Konieczny,S.F. and Emerson,C.P., Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell.* *38*, 791-800.
- Kopelman,P.G. (1984). Clinical complications of obesity. *Clin. Endocrinol. Metab.* *13*, 613-634.
- Kopelman,P.G. (1992). Sleep apnoea and hypoventilation in obesity. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *16 Suppl 2*, S37-S42.
- Kopelman,P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature.* *404*, 635-643.
- Kosak,S.T. and Groudine,M. (2002). The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription. *Dev. Cell.* *2*, 690-692.
- Krogan,N.J., Dover,J., Wood,A., Schneider,J., Heidt,J., Boateng,M.A., Dean,K., Ryan,O.W., Golshani,A., Johnston,M., Greenblatt,J.F., and Shilatifard,A. (2003a). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol. Cell.* *11*, 721-729.
- Krogan,N.J., Kim,M., Tong,A., Golshani,A., Cagney,G., Canadien,V., Richards,D.P., Beattie,B.K., Emili,A., Boone,C., Shilatifard,A., Buratowski,S., and Greenblatt,J. (2003b). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* *23*, 4207-4218.
- Kubota,N., Terauchi,Y., Miki,H., Tamemoto,H., Yamauchi,T., Komeda,K., Satoh,S., Nakano,R., Ishii,C., Sugiyama,T., Eto,K., Tsubamoto,Y., Okuno,A., Murakami,K., Sekihara,H., Hasegawa,G., Naito,M., Toyoshima,Y., Tanaka,S., Shiota,K., Kitamura,T., Fujita,T., Ezaki,O., Aizawa,S., Kadowaki,T., and . (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell.* *4*, 597-609.
- Kubota,N., Terauchi,Y., Yamauchi,T., Kubota,T., Moroi,M., Matsui,J., Eto,K., Yamashita,T., Kamon,J., Satoh,H., Yano,W., Froguel,P., Nagai,R., Kimura,S., Kadowaki,T., and Noda,T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* *277*, 25863-25866.
- Kuczmarski,R.J., Flegal,K.M., Campbell,S.M., and Johnson,C.L. (1994). Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA.* *272*, 205-211.
- Kuo,M.H. and Allis,C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods.* *19*, 425-433.
- Kurdistani,S.K., Tavazoie,S., and Grunstein,M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell.* *117*, 721-733.

Lagace,D.C. and Nachtigal,M.W. (2004). Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 18851-18860.

Lefebvre,A.M., Laville,M., Vega,N., Riou,J.P., van Gaal,L., Auwerx,J., and Vidal,H. (1998). Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes.* *47*, 98-103.

Lehmann,J.M., Moore,L.B., Smith-Oliver,T.A., Wilkison,W.O., Willson,T.M., and Kliewer,S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* *270*, 12953-12956.

Lemon,B. and Tjian,R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *14*, 2551-2569.

Li,B., Howe,L., Anderson,S., Yates,J.R., III, and Workman,J.L. (2003). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *278*, 8897-8903.

Li,E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. rev. Genet.* *3*, 662-673.

Li,J., Moazed,D., and Gygi,S.P. (2002). Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J. Biol. Chem.* *277*, 49383-49388.

Li,Q., Peterson,K.R., Fang,X., and Stamatoyannopoulos,G. (2002). Locus control regions. *Blood.* *100*, 3077-3086.

Li,Z.H., Lu,Z.D., Kirkland,J.L., and Gregerman,R.I. (1989). Preadipocyte stimulating factor in rat serum: evidence for a discrete 63 kDa protein that promotes cell differentiation of rat preadipocytes in primary cultures. *J. Cell Physiol.* *141*, 543-557.

Lin,F.T. and Lane,M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8757-8761.

Litt,M.D., Simpson,M., Gaszner,M., Allis,C.D., and Felsenfeld,G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* *293*, 2453-2455.

Lord,G.M., Matarese,G., Howard,J.K., Baker,R.J., Bloom,S.R., and Lechler,R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* *394*, 897-901.

MacDougald,O.A. and Lane,M.D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* *64*:345-73., 345-373.

Maeda,K., Okubo,K., Shimomura,I., Funahashi,T., Matsuzawa,Y., and Matsubara,K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *221*, 286-289.

Maeda,N., Shimomura,I., Kishida,K., Nishizawa,H., Matsuda,M., Nagaretani,H., Furuyama,N., Kondo,H., Takahashi,M., Arita,Y., Komuro,R., Ouchi,N., Kihara,S., Tochino,Y., Okutomi,K., Horie,M., Takeda,S., Aoyama,T., Funahashi,T., and Matsuzawa,Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* *8*, 731-737.

Maeda,N., Takahashi,M., Funahashi,T., Kihara,S., Nishizawa,H., Kishida,K., Nagaretani,H., Matsuda,M., Komuro,R., Ouchi,N., Kuriyama,H., Hotta,K., Nakamura,T., Shimomura,I., and

- Matsuzawa, Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. *50*, 2094-2099.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., and . (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* *1*, 1155-1161.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., and Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *26*, 1407-1433.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 163-176.
- Martens, J.H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., and Zantema, A. (2003). Cascade of distinct histone modifications during collagenase gene activation. *Mol. Cell Biol.* *23*, 1808-1816.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., and Nakao, K. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* *3*, 1029-1033
- McGinnis, J.M. and Foege, W.H. (1993). Actual causes of death in the United States. *JAMA.* *270*, 2207-2212.
- Miles, P.D., Barak, Y., He, W., Evans, R.M., and Olefsky, J.M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J. Clin. Invest.* *105*, 287-292.
- Moore, G.B., Chapman, H., Holder, J.C., Lister, C.A., Piercy, V., Smith, S.A., and Clapham, J.C. (2001). Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 735-741.
- Morrison, R.F. and Farmer, S.R. (1999). Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *274*, 17088-17097.
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Latruffe, N. (1998). 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.
- Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., III, Arden, K.C., and Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell.* *4*, 119-129.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem. (Tokyo).* *120*, 803-812.
- Napolitano, A., Lowell, B.B., Damm, D., Leibel, R.L., Ravussin, E., Jimerson, D.C., Lesem, M.D., Van Dyke, D.C., Daly, P.A., Chatis, P., and . (1994). Concentrations of adipin in blood and rates of adipin secretion by adipose tissue in humans with normal, elevated and diminished adipose tissue mass. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *18*, 213-218.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* *108*, 475-487.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell.* *11*, 709-719.

- Ogbourne,S. and Antalis,T.M. (1998).Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* *331*,1-14.
- Pal-Bhadra,M., Leibovitch,B.A., Gandhi,S.G., Rao,M., Bhadra,U., Birchler,J.A., and Elgin,S.C. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science.* *303*, 669-672.
- Park,S.K., Oh,S.Y., Lee,M.Y., Yoon,S., Kim,K.S., and Kim,J.W. (2004). CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor- $\kappa$ B regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes.* *53*, 2757-2766.
- Park,Y. and Kuroda,M.I. (2001). Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *293*, 1083-1085.
- Pokholok,D.K., Harbison,C.T., Levine,S., Cole,M., Hannett,N.M., Lee,T.I., Bell,G.W., Walker,K., Rolfe,P.A., Herbolsheimer,E., Zeitlinger,J., Lewitter,F., Gifford,D.K., and Young,R.A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell.* *122*, 517-527.
- Pouliot,M.C., Despres,J.P., Lemieux,S., Moorjani,S., Bouchard,C., Tremblay,A., Nadeau,A., and Lupien,P.J. (1994). Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am. J. Cardiol.* *73*, 460-468.
- Qin,S. and Parthun,M.R. (2002). Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8353-8365.
- Rasmussen,M.S., Lihn,A.S., Pedersen,S.B., Bruun,J.M., Rasmussen,M., and Richelsen,B. (2006). Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity. (Silver. Spring).* *14*, 28-35.
- Razin,S.V., Farrell,C.M., and Recillas-Targa,F. (2003). Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. *Int. Rev Cytol.* *226*, 63-125.
- Recillas-Targa,F. (2002). DNA methylation, chromatin boundaries, and mechanisms of genomic imprinting. *Arch. Med. Res.* *33*, 428-438.
- Recillas-Targa,F. and Razin,S.V. (2001). Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *11*, 227-242.
- Reinberg,D., Orphanides,G., Ebright,R., Akoulitchev,S., Carcamo,J., Cho,H., Cortes,P., Drapkin,R., Flores,O., Ha,I., Inostroza,J.A., Kim,S., Kim,T.K., Kumar,P., Lagrange,T., LeRoy,G., Lu,H., Ma,D.M., Maldonado,E., Merino,A., Mermelstein,F., Olave,I., Sheldon,M., Shiekhattar,R., and Zawel,L. (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold. Spring Harb.Symp. Quant. Biol.* *63*, 83-103.
- Rentsch,J., Levens,N., and Chiesi,M. (1995). Recombinant ob-gene product reduces food intake in fasted mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *214*, 131-136.
- Richon,V.M., Lyle,R.E., and McGehee,R.E., Jr. (1997). Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *272*, 10117-10124.
- Rieusset,J., Touri,F., Michalik,L., Escher,P., Desvergne,B., Niesor,E., and Wahli,W. (2002). A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2628-2644.

- Roberts,C.W. and Orkin,S.H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* *4*, 133-142.
- Rosen,E.D., Hsu,C.H., Wang,X., Sakai,S., Freeman,M.W., Gonzalez,F.J., and Spiegelman,B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* *16*, 22-26.
- Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 81-120.
- Ruan,H. and Lodish,H.F. (2003). Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 447-455.
- Ruan,H., Miles,P.D., Ladd,C.M., Ross,K., Golub,T.R., Olefsky,J.M., and Lodish,H.F. (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes.* *51*, 3176-3188.
- Salma,N., Xiao,H., Mueller,E., and Imbalzano,A.N. (2004). Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* *24*, 4651-4663.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C., Schreiber,S.L., Mellor,J., and Kouzarides,T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Sarraf,S.A. and Stancheva,I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell.* *15*, 595-605.
- Savage,D.B., Sewter,C.P., Klenk,E.S., Segal,D.G., Vidal-Puig,A., Considine,R.V., and O'Rahilly,S. (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* *50*, 2199-2202.
- Schneider,R., Bannister,A.J., Myers,F.A., Thorne,A.W., Crane-Robinson,C., and Kouzarides,T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* *6*, 73-77.
- Schoonjans,K., Peinado-Onsurbe,J., Lefebvre,A.M., Heyman,R.A., Briggs,M., Deeb,S., Staels,B., and Auwerx,J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* *15*, 5336-5348.
- Schubeler,D., MacAlpine,D.M., Scalzo,D., Wirbelauer,C., Kooperberg,C., van Leeuwen,F., Gottschling,D.E., O'Neill,L.P., Turner,B.M., Delrow,J., Bell,S.P., and Groudine,M. (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* *18*, 1263-1271.
- Semple,R.K., Chatterjee,V.K., and O'Rahilly,S. (2006). PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* *116*, 581-589.
- Seo,J.B., Moon,H.M., Noh,M.J., Lee,Y.S., Jeong,H.W., Yoo,E.J., Kim,W.S., Park,J., Youn,B.S., Kim,J.W., Park,S.D., and Kim,J.B. (2004). Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *J. Biol. Chem.* *279*, 22108-22117.
- Shao,D. and Lazar,M.A. (1997). Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *272*, 21473-21478.

Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A., and Shi,Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. *119*, 941-953.

Shimomura,I., Funahashi,T., Takahashi,M., Maeda,K., Kotani,K., Nakamura,T., Yamashita,S., Miura,M., Fukuda,Y., Takemura,K., Tokunaga,K., and Matsuzawa,Y. (1996). Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat. Med.* *2*, 800-803.

Siitonen,N., Pulkkinen,L., Mager,U., Lindstrom,J., Eriksson,J.G., Valle,T.T., Hamalainen,H., Ilanne-Parikka,P., Keinanen-Kiukaanniemi,S., Tuomilehto,J., Laakso,M., and Uusitupa,M. (2006). Association of sequence variations in the gene encoding adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) with body size and insulin levels. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia*. *49*, 1785-1805.

Smale,S.T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* *15*, 2503-2508.

Smas,C.M. and Sul,H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. *73*, 725-734.

Smas,C.M. and Sul,H.S. (1996). Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *20 Suppl 3*, S65-S72.

Smyth,M.J., Sparks,R.L., and Wharton,W. (1993). Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* *106*, 1-9.

Sobel,R.E., Cook,R.G., Perry,C.A., Annunziato,A.T., and Allis,C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 1237-1241.

Staiger,H., Kaltenbach,S., Staiger,K., Stefan,N., Fritsche,A., Guirguis,A., Peterfi,C., Weisser,M., Machicao,F., Stumvoll,M., and Haring,H.U. (2004). Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *Diabetes*. *53*, 2195-2201.

Stefan,N., Machicao,F., Staiger,H., Machann,J., Schick,F., Tschritter,O., Spieth,C., Weigert,C., Fritsche,A., Stumvoll,M., and Haring,H.U. (2005). Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia*. *48*, 2282-2291.

Steppan,C.M., Bailey,S.T., Bhat,S., Brown,E.J., Banerjee,R.R., Wright,C.M., Patel,H.R., Ahima,R.S., and Lazar,M.A. (2001a). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. *409*, 307-312.

Steppan,C.M., Brown,E.J., Wright,C.M., Bhat,S., Banerjee,R.R., Dai,C.Y., Enders,G.H., Silberg,D.G., Wen,X., Wu,G.D., and Lazar,M.A. (2001b). A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 502-506.

Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*. *403*, 41-45.

Stunkard,A.J., Foch,T.T., and Hrubec,Z. (1986a). A twin study of human obesity. *JAMA*. *256*, 51-54.

Stunkard,A.J., Sorensen,T.I., Hanis,C., Teasdale,T.W., Chakraborty,R., Schull,W.J., and Schulsinger,F. (1986b). An adoption study of human obesity. *N. Engl. J. Med.* *314*, 193-198.

- Takahashi,N., Kawada,T., Yamamoto,T., Goto,T., Taimatsu,A., Aoki,N., Kawasaki,H., Taira,K., Yokoyama,K.K., Kamei,Y., and Fushiki,T. (2002). Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* *277*, 16906-16912.
- Tan,G.D., Debard,C., Funahashi,T., Humphreys,S.M., Matsuzawa,Y., Frayn,K.N., Karpe,F., and Vidal,H. (2005). Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia.* *48*, 1585-1589.
- Tate,P.H. and Bird,A.P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *3*, 226-231.
- Tartaglia,L.A., Dembski,M., Weng,X., Deng,N., Culpepper,J., Devos,R., Richards,G.J., Campfield,L.A., Clark,F.T., Deeds,J., Muir,C., Sanker,S., Moriarty,A., Moore,K.J., Smutko,J.S., Mays,G.G., Wool,E.A., Monroe,C.A., and Tepper,R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* *83*, 1263-1271.
- Taylor,S.M. and Jones,P.A. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.* *17*, 771-779.
- Tontonoz,P., Hu,E., and Spiegelman,B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* *79*, 1147-1156.
- Troiano,R.P. and Flegal,K.M. (1998). Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics.* *101*, 497-504.
- Tsuchida,A., Yamauchi,T., Takekawa,S., Hada,Y., Ito,Y., Maki,T., and Kadowaki,T. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes.* *54*, 3358-3370.
- Tsukada,Y., Fang,J., Erdjument-Bromage,H., Warren,M.E., Borchers,C.H., Tempst,P., and Zhang,Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* *439*, 811-816.
- Turner,B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* *22*, 836-845.
- Turner,B.M. and O'Neill,L.P. (1995). Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Semin. Cell. Biol.* *6*, 229-236.
- Uysal,K.T., Wiesbrock,S.M., Marino,M.W., and Hotamisligil,G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* *389*, 610-614.
- van Driel,R., Fransz,P.F., and Verschure,P.J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell. Sci.* *116*, 4067-4075.
- Vaxillaire,M., Dechaume,A., Vasseur-Delannoy,V., Lahmidi,S., Vatin,V., Lepretre,F., Boutin,P., Hercberg,S., Charpentier,G., Dina,C., and Froguel,P. (2006). Genetic analysis of ADIPOR1 and ADIPOR2 candidate polymorphisms for type 2 diabetes in the Caucasian population. *Diabetes.* *55*, 856-861.
- Ventre,J., Doebber,T., Wu,M., MacNaul,K., Stevens,K., Pasparakis,M., Kollias,G., and Moller,D.E. (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes.* *46*, 1526-1531.
- Verschure,P.J., van,D.K., I, Manders,E.M., and van Driel,R. (1999). Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* *147*, 13-24.

- Wang,J., Liu,R., Hawkins,M., Barzilai,N., and Rossetti,L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. *393*, 684-688.
- Way,J.M., Gorgun,C.Z., Tong,Q., Uysal,K.T., Brown,K.K., Harrington,W.W., Oliver,W.R., Jr., Willson,T.M., Kliewer,S.A., and Hotamisligil,G.S. (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* *276*, 25651-25653.
- Werner,T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm. Genome*. *10*, 168-175.
- Weyer,C., Funahashi,T., Tanaka,S., Hotta,K., Matsuzawa,Y., Pratley,R.E., and Tataranni,P.A. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 1930-1935.
- Whetstine,J.R., Nottke,A., Lan,F., Huarte,M., Smolnikov,S., Chen,Z., Spooner,E., Li,E., Zhang,G., Colaiacovo,M., and Shi,Y. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*. *125*, 467-481.
- Williams,R.R., Azuara,V., Perry,P., Sauer,S., Dvorkina,M., Jorgensen,H., Roix,J., McQueen,P., Misteli,T., Merckenschlager,M., and Fisher,A.G. (2006). Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J. Cell Sci.* *119*, 132-140.
- Wiper-Bergeron,N., Wu,D., Pope,L., Schild-Poulter,C., and Hache,R.J. (2003). Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J.* *22*, 2135-2145.
- Wolffe,A.P. and Matzke,M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*. *286*, 481-486.
- Yamauchi,T., Kamon,J., Ito,Y., Tsuchida,A., Yokomizo,T., Kita,S., Sugiyama,T., Miyagishi,M., Hara,K., Tsunoda,M., Murakami,K., Ohteki,T., Uchida,S., Takekawa,S., Waki,H., Tsuno,N.H., Shibata,Y., Terauchi,Y., Froguel,P., Tobe,K., Koyasu,S., Taira,K., Kitamura,T., Shimizu,T., Nagai,R., and Kadowaki,T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. *423*, 762-769.
- Yamauchi,T., Kamon,J., Waki,H., Terauchi,Y., Kubota,N., Hara,K., Mori,Y., Ide,T., Murakami,K., Tsuboyama-Kasaoka,N., Ezaki,O., Akanuma,Y., Gavrilova,O., Vinson,C., Reitman,M.L., Kagechika,H., Shudo,K., Yoda,M., Nakano,Y., Tobe,K., Nagai,R., Kimura,S., Tomita,M., Froguel,P., and Kadowaki,T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* *7*, 941-946.
- Yasruel,Z., Cianflone,K., Sniderman,A.D., Rosenbloom,M., Walsh,M., and Rodriguez,M.A. (1991). Effect of acylation stimulating protein on the triacylglycerol synthetic pathway of human adipose tissue. *Lipids*. *26*, 495-499.
- Yeh,W.C., Cao,Z., Classon,M., and McKnight,S.L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* *9*, 168-181.
- Yoo,E.J., Chung,J.J., Choe,S.S., Kim,K.H., and Kim,J.B. (2006). The down-regulation of HDACs during adipogenesis differentiation. *J. Biol. Chem.* ..
- Zhang,B., Berger,J., Zhou,G., Elbrecht,A., Biswas,S., White-Carrington,S., Szalkowski,D., and Moller,D.E. (1996). Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* *271*, 31771-31774.

Zhang,C.L., McKinsey,T.A., and Olson,E.N. (2002). Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 7302-7312.

Zuo,Y., Qiang,L., and Farmer,S.R. (2006). Activation of C/EBPalpha expression by C/EBPbeta during adipogenesis requires a PPARgamma-associated repression of HDAC1 at the C/EBPalpha gene promoter. *J. Biol. Chem.* *281*, 7960-7967.

Zurita,M. and Merino,C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet.* *19*, 578-584.

