

TRANSKRIPCIJSKO URAVNAVANJE ADIPOGENEZE IN VLOGA KOAKTIVATORJA PGC-1 α *

Tamara MILOŠEVIČ BERLIČ ^{a)} in Peter DOVČ ^{b)}

^{a)} Krka, d. d., Dunajska 65, SI-1000 Ljubljana, dr., e-pošta: tamara.berlic@krka.biz.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr., e-pošta: peter.dovc@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 10. novembra 2004, sprejeto 03. decembra 2004.

Received November 10, 2004, accepted December 03, 2004.

IZVLEČEK

Adipogeneza je kompleksen proces, na katerega vpliva veliko število genetskih in okoljskih faktorjev. Ker je posledica prekomernega nalaganja maščob debelost, pogosto pa tudi pojav diabetesa tipa 2, postaja proučevanje molekularskih osnov adipogeneze vse bolj pomembno tudi z vidika zdravja človeka. V živalski proizvodnji proces tvorbe maščobnega tkiva pomembno vpliva na kakovost prirasta, preko porabe krme pa na ekonomičnost proizvodnje. Poleg leptina in leptinskega receptorja, ki odločilno uravnata nalaganje maščob, je bil v zadnjem času odkrit tudi mehanizem uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva, ki vključuje adaptivno termogenezo in biosintezo mitohondrijev. Pomembna regulatorja teh procesov sta PPAR γ in njegov koaktivator PGC-1 α . V pričujočem prispevku opisujemo mehanizem uravnavanja adipogeneze in vlogo PPAR γ in PGC-1 α v njem. Prikazana je tudi medvrstna primerjava aminokislinskih zaporedij PGC-1 α in možnosti za razvoj farmacevtskih učinkovin, ki bi vplivale na izražanje PGC-1 α .

Ključne besede: prašiči / adipogeneza / molekularna genetika / transkripcijsko uravnavanje / termogeni koaktivator PGC-1 α

TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF ADIPOGENESIS AND ROLE OF THE COACTIVATOR PGC-1 α †

ABSTRACT

Adipogenesis is a complex proces, depending on numerous genetic and environmental factors. Study of the molecular basis of adipogenesis becomes, due to its central role in obesity and diabetes type-2 in human, more and more important also in human medicine. Adipogenesis is of central importance also for animal production, due to its impact on carcass composition, meat quality and profitability of fattening. In addition to the role of leptin and leptin receptor in adipogenesis, a new regulatory mechanism was recently discovered, which includes adaptive thermogenesis and biosynthesis of mitochondria. Important regulators of these processes are PPAR γ and his co-activator PGC-1 α . In this article we describe the mechanism of adipogenesis regulation and the role of PPAR γ and PGC-1 α in it. The interspecies comparison of PGC-1 α amino sequence and possibilities for development of drugs regulating PGC-1 α are presented.

Key words: pigs / adipogenesis / molecular genetics / transcriptional control / thermogenic coactivator PGC-1 α

* Prispevek je del doktorskega dela Tamare Milošević Berlič z naslovom 'Molekulski mehanizmi uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva pri prašiču (*Sus scrofa*)', mentor prof. dr. Peter Dovč.

† This article is part of a doctoral thesis 'Molecular background of fat tissue formation in pig (*Sus scrofa*)', issued by Tamara Milošević Berlič, supervisor prof. Peter Dovč, Ph.D.

UVOD

Maščobno tkivo je v zadnjih dvajsetih letih postalo predmet intenzivnih raziskav. Raziskave je spodbudila predvsem dostopnost nesmrtnih celičnih linij preadipocitov, ki je omogočila preučevanje lastnosti maščobnih celic (adipocitov) *in vitro* (v kulturi), pa tudi spoznanje, da ima maščobno tkivo odločilno vlogo pri vzdrževanju energetskega ravnovesja v telesu. Na intenzivnost raziskav sta v veliki meri vplivala tudi razširjenost debelosti in diabetesa tipa 2 pri človeku.

Tvorba maščobnega tkiva (adipogeneza) je kompleksen proces, ki ga uravnavajo številni endogeni (genetski, nevroendokrini) in eksogeni (okoljski) dejavniki. Raziskave zadnjih let so usmerjene predvsem v iskanje genetskih dejavnikov, saj nam poznavanje le-teh omogoča boljši vpogled in razumevanje molekulskega ozadja nalaganja maščevja in posledične debelosti.

Na molekularni ravni proces adipogeneze uravnava zapletena mreža celega niza transkripcijskih faktorjev, ki prispevajo k tvorbi in diferenciaciji maščobnih celic (Rosen in sod., 2000). Osrednjo vlogo ima PPAR γ (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), ki sodi v družino jedrnih hormonskih receptorjev (angl. *nuclear hormone receptors*). Ta protein ni pomemben le v adipogenezi, ampak tudi v drugih fizioloških in patoloških procesih v telesu. Uravnava namreč tudi diferenciacijo številnih drugih tipov celic (npr. hepatocitov, miocitov, fibroblastov, keratinocitov), zato so proteini PPAR γ in ligandi, ki te proteine aktivirajo, pomembne terapevtske tarče za zdravljenje mnogih bolezni človeka. Sprememba v sintezi in/ali aktivnosti teh transkripcijskih faktorjev lahko namreč povzroči določene presnovne bolezni, za katere so značilne povečane ali zmanjšane zaloge maščobnega tkiva, zato je poznavanje podrobne strukture PPAR γ in razumevanje mehanizma njegove aktivacije ključno za pridobivanje novih zdravil.

Debelost je problem današnjega časa. Etiopatogeneza debelosti je večvzročna. Med eksogene vzroke spadajo: premalo gibanja, razmeroma lahka dostopnost hrane, stresi in anksiozna stanja. Tudi endogenih oz. genetskih vplivov je več: sestava organizma, energijske potrebe, osnovna presnova in termogeneza, ki jo povzročajo gibanje, uživanje hrane in toplotne spremembe. Pogostnost (incidenca) debelosti še vedno narašča in je v zadnjem času postala velik zdravstveni problem. Tudi število novo odkritih genov in drugih molekularskih označevalcev, ki jih povezujejo z debelostjo pri človeku, je vedno večje (trenutno preko 250). Pri tem je pomembna predvsem identifikacija tistih mutacij in kombinacij genov, ki bistveno prispevajo k dovzetnosti za razvoj debelosti, in okoljskih dejavnikov, ki omogočajo izražanje teh genov (Rankinen in sod., 2002).

Zaradi izjemne podobnosti v fiziologiji in presnovi lipidov so prašiči odlični model za preučevanje debelosti, diabetesa in številnih drugih presnovnih bolezni človeka (Fajas in sod., 1998; Sundvold in sod., 2001). Z razumevanjem molekulskega ozadja nalaganja maščobe lahko bistveno prispevamo k zmanjšanju nastanka debelosti in zmanjšanju tveganja za razvoj z debelostjo povezanih bolezni. To znanje je pomembno tudi pri reji domačih živali, saj prekomerno nalaganje maščevja pri prašiču vpliva tako na gospodarnost reje kot na kakovost prašičjega mesa.

Tvorba maščobnega tkiva (adipogeneza)

Sesalci imajo dve vrsti maščobnega tkiva, belo (angl. *white adipose tissue*, WAT) in rjavo (angl. *brown adipose tissue*, BAT), ki se razlikujeta po presnovnih značilnostih. Rjavi in beli adipociti imajo različno vlogo pri vzdrževanju energetskega ravnovesja. Funkcija belih adipocitov je shranjevanje energije v obliki trigliceridov, funkcija rjavih pa poraba metaboličnih hraniv, pri čemer se sprošča toplota. Motnje v tem stanju dinamičnega ravnotežja med vnosom in porabo energije vodijo v povečanje ali zmanjšanje količine belega maščevja, npr. pri debelosti

oz. lipodistrofičnih sindromih (podhranjenost, nervozna anoreksija). V fiziološkem smislu je vloga rjavega maščevja adaptacija na mraz in zaščita pred debelostjo.

Maso maščobnega tkiva v osnovi določa število adipocitov in ravnotežje med vnosom in porabo energije. Pri vzpostavljanju energetskega ravnovesja v telesu imajo pomembno vlogo geni, ki uravnavajo presnovo maščob in razgradnjo hranilnih snovi. Nalaganje maščevja je kvantitativna poligenetska lastnost, kar pomeni, da je izražanje take lastnosti v večini primerov pod vplivom velikega števila genov. Prispevek posameznih genov k izoblikovanju lastnosti je lahko zelo različen – z delovanjem nekaterih genov lahko pojasnimo velik del fenotipske variance (Weller in sod., 1990).

Masa maščobnega tkiva se lahko spremeni zaradi spremembe v številu, velikosti ali volumnu adipocitov. Povečano število celic je rezultat neprekinjene stimulacije procesa celične diferenciacije, zmanjšano število pa je posledica apoptoze in dediferenciacije adipocitov. Zanimivo je, da proces diferenciacije mezenhimskih zarodnih celic v adipocite poteka celo življenje (Fajas in sod., 1998).

Molekulsko uravnavanje adipogeneze

Diferenciacija celic je odraz sprememb v izražanju genov. Morfološke spremembe, ki spremljajo adipogenezo (npr. sprememba oblike celic, kopičenje maščobe), so posledica aktiviranja genov in sprememb v sintezi in delovanju adipogenih transkripcijskih faktorjev. Ti transkripcijski faktorji skupaj stimulirajo izražanje genov, specifičnih za adipocite, kar vodi v značilen fenotip zrelih adipocitov.

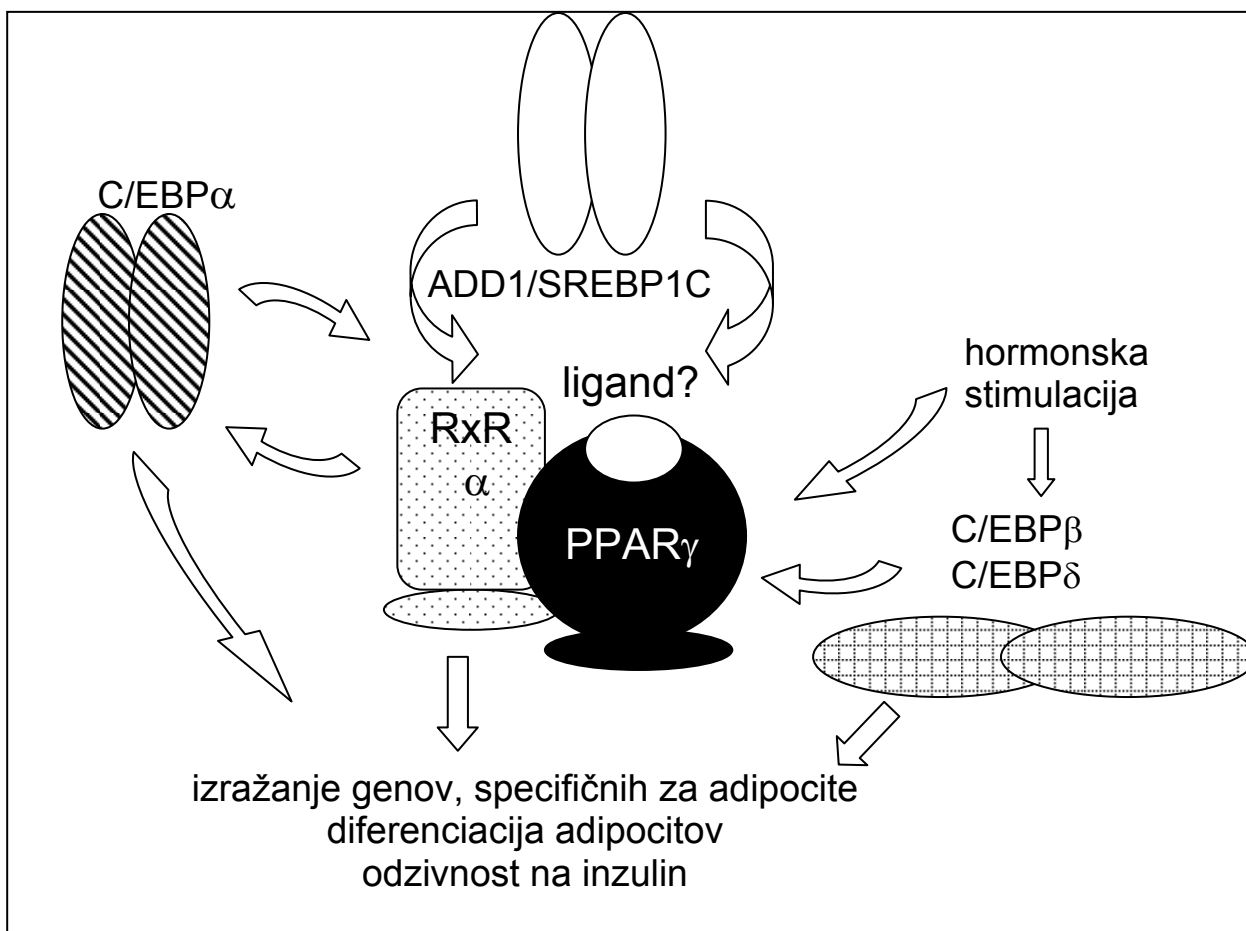
Pomembna stopnja v diferenciaciji adipocitov je prekinitev rasti celic. Na tej stopnji se, po stimulaciji z ustreznimi hormoni, preadipociti začnejo diferencirati v adipocite. Proces uravnavajo medsebojno odvisni adipogeni transkripcijski faktorji PPAR γ (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), C/EBP (angl. *CCAAT/ enhancer-binding protein*) in ADD/SREBP1 (angl. *adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1*).

Ključno vlogo ima PPAR γ

Ključno vlogo pri uravnavanju adipogeneze ima transkripcijski faktor PPAR γ . Je pglavitni koordinator diferenciacije adipocitov – aktivirani PPAR γ namreč sproži izhod iz celičnega cikla. PPAR γ se veže na promotorje genov, specifičnih za maščobne celice, in aktivira njihovo izražanje. Zato, da se lahko veže na DNA in aktivira transkripcijo, se mora povezati z jedrnim receptorjem RXR (angl. *retinoid receptor X*) v heterodimer. Heterodimeri PPAR γ /RXR se vežejo na specifične PPAR-odzivne elemente (angl. *PPAR response elements*, PPRE) v ciljnih genih (Spiegelman in sod., 2000). Dodatni adipogeni učinek PPAR γ je tudi zmanjšanje izražanja leptina (hormona, ki ga izločajo maščobne celice), kar povzroči povečan vnos energije v adipocite (Fajas in sod., 1998).

Pri uravnavanju aktivnosti PPAR γ imajo osrednjo vlogo proteini C/EBP. Rezultati številnih poskusov kažejo na zaporedno aktivacijo celega niza transkripcijskih faktorjev, vpletenih v adipogenezo (slika 1). Najprej se pojavita proteina C/EBP β in C/EBP δ , sledi PPAR γ , ki nadalje aktivira C/EBP α . C/EBP α vzajemno vzdržuje raven PPAR γ (pozitivna kontrola) in na ta način ohranja diferencirano stanje. Aktivacijo PPAR γ lahko s produkcijo endogenega liganda za PPAR γ sproži tudi ADD1/SREBP1C. Vsi omenjeni faktorji prispevajo k izražanju genov, ki so značilni za dokončno diferenciran fenotip maščobnih celic.

Na pomen PPAR γ v patologiji debelosti kaže tudi polimorfizem v genu *PPAR γ* , ki je povezan z nižjimi koncentracijami leptina pri debelih ljudeh v primerjavi s kontrolno skupino, ki ima normalno obliko PPAR γ .



Slika 1. Transkripcijsko uravnavanje adipogeneze – zaporedna aktivacija številnih družin transkripcijskih faktorjev (prirejeno po Rosen in sod., 2000).

Figure 1. Transcriptional control of adipogenesis – sequential activation of several transcriptional factors (adapted from Rosen *et al.*, 2000).

V maščobnem tkivu prašiča sta prisotni dve izoformi proteina PPAR γ ($\gamma 1$ in $\gamma 2$), prevladuje pa PPAR $\gamma 1$. Zanimivo je, da PPAR $\gamma 1$ prevladuje tudi v podkožnem maščevju človeka, medtem ko je za uravnavanje adipogeneze pri glodalcih pomembnejša izoforma PPAR $\gamma 2$ (Tontonoz in sod., 1994).

Houseknecht in sodelavci (1998) so klonirali cDNA za PPAR γ prašiča in preiskovali uravnavanje izražanja gena *PPAR γ* v podkožnem maščobnem tkivu prašiča. Ugotovili so, da gen *PPAR γ* prašiča nosi zapis za 1,8 kb dolgo molekulo mRNA in da je na ravni aminokislinskega zaporedja 99, 96 oz. 97-odstotno identičen s PPAR γ človeka, miši oz. krave. Z analizo northern so potrdili, da se mRNA za PPAR γ v skeletni mišici ne izraža, medtem ko so z analizo western potrdili visoko raven proteina PPAR γ v maščobnem tkivu prašiča v primerjavi z drugimi tkivi. Zmanjševanje kalorične vrednosti obrokov in stradanje prašičev sta povzročila znatno znižanje vsebnosti proteina PPAR $\gamma 2$ v podkožnem tkivu, ne pa tudi PPAR $\gamma 1$, v primerjavi s kontrolno skupino prašičev, hranjenih *ad libitum*. Mehanizem diferencialnega uravnavanja izražanja *PPAR $\gamma 2$* in *PPAR $\gamma 1$* še ni povsem jasen. Na osnovi teh rezultatov so Houseknecht in sodelavci (1998) skleпали, da na izražanje *PPAR γ* med drugim vplivata tudi vrsta in kalorična vrednost hrane oz. endokrini dejavniki (hormoni).

Na aktivnost PPAR γ vplivajo tudi transkripcijski koaktivatorji

Aktivacija transkripcije z jedrnimi receptorji vključuje delovanje mnogih dejavnikov, ki tvorijo komplekse, sestavljene iz več proteinov. Ti delujejo zaporedno (tj. ob različnem času) in/ali v kombinaciji in s tem poskrbijo za dodatno raven uravnavanja transkripcije.

Da bi transkripcijski faktorji aktivirali izražanje tarčnih genov, morajo najprej razrahljati strukturo kromatina in zbrati elemente bazalnega transkripcijskega aparata. To opravijo proteini, imenovani koaktivatorji, ki v osnovi predstavljajo 'most' med jedrnimi receptorji in transkripcijskim aparatom. Koaktivatorski proteini olajšajo komunikacijo med jedrnimi receptorji, bazalnim transkripcijskim aparatom in kromatinskim okoljem in na ta način posredno olajšajo transkripcijo. Ti proteini torej niso neposredno vezani na DNA, ampak nanjo delujejo preko jedrnih receptorjev. Na aktivnost bazalnega transkripcijskega aparata vplivajo tudi neposredno preko interakcij s proteini.

Za koaktivatorje jedrnih receptorjev so značilni visoko ohranjeni amfipatični motivi LXXLL (v katerih L predstavlja levcin, X pa katerokoli aminokislino), ki so pomembni pri interakcijah med koaktivatorji in jedrnimi receptorji. Ti motivi uravnavajo tudi interakcije med posameznimi koaktivatorji, za katere je značilna velika kombinatorska fleksibilnost. Poleg omenjenih so pomembna še druga aminokislinska zaporedja, ki prispevajo k specifičnosti vezave na PPAR γ (Rosenfeld in Glass, 2001).

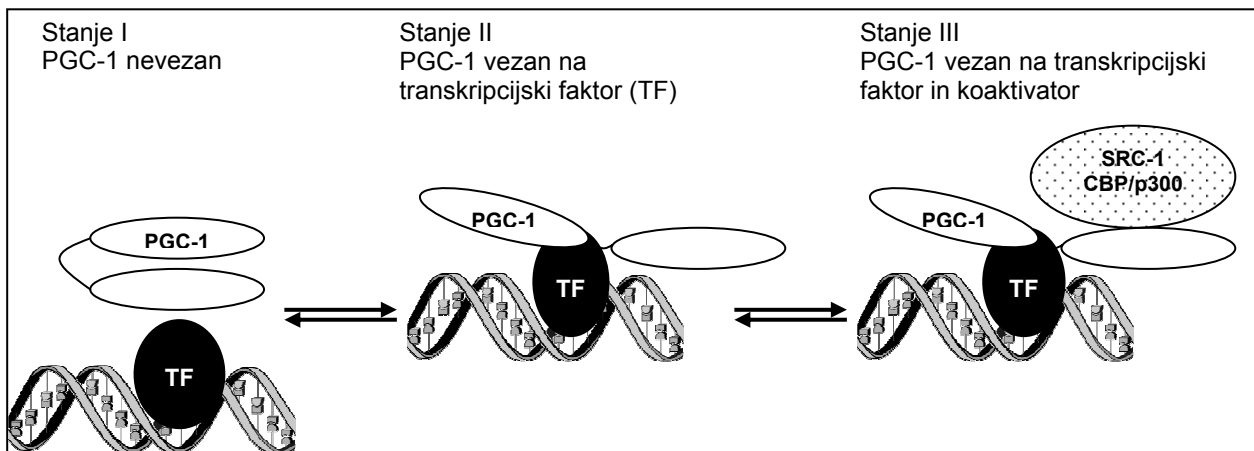
Termogeni koaktivator PGC-1 α

Koaktivatorji jedrnih receptorjev so precej raznolika skupina proteinov – uravnavajo lahko zelo specifične celične procese. Pri uravnavanju presnove in porabi energije ima ključno vlogo koaktivator PGC-1 α (angl. *PPAR γ coactivator-1 α*), ki sproži biogenezo (tj. povečanje števila) mitohondrijev in podvajanje mtDNA ter uravnava adaptivno termogenezo in β -oksidacijo maščobnih kislin (Knutti in Kralli, 2001; Wu in sod., 1999; Lin in sod., 2002; Lehman in sod., 2000). PGC-1 α uravnava tudi determinacijo tipa mišičnih vlaken (Lin in sod., 2002) in glukoneogenezo (tj. encimsko sintezo glukoze), ki poteka v jetrih in je pomembna komponenta v patogenezi diabetesa tipa 2 (Herzig in sod., 2001).

Koaktivator PGC-1 α poveča učinkovitost aktivacije transkripcije s PPAR γ . Veže se na PPAR γ in številne druge jedrne receptorje in ima pomembno vlogo pri zbiranju drugih koaktivatorjev in njihovi vezavi na PPAR γ . PGC-1 α je namreč istočasno v interakciji s številnimi transkripcijskimi faktorji, zbranimi na promotorju določenega gena, ki kumulativno učinkujejo na transkripcijsko aktivnost gena. Vezava koaktivatorja povzroči alosterično spremembo v transkripcijskem faktorju, ki temu omogoča vezavo na številna različna vezna mesta na DNA. Z vezavo na heterodimer PPAR γ /RXR pa PGC-1 α ovira tudi vezavo korepresorjev in na ta način aktivira transkripcijo ciljnih genov (Puigserver in sod., 1998).

Transkripcijski koaktivatorji niso stalno aktivni proteini, ki jih je treba le primerno 'namestiti' na genomsko DNA, da začnejo aktivirati gene. Raziskave Puigserverja in sodelavcev (1999) kažejo, da vezava transkripcijskih faktorjev aktivira PGC-1 α . Neaktivno stanje koaktivatorja vzdržuje represor, medtem ko fosforilacija PGC-1 α z MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*) sprosti represor in s tem poveča aktivnost PGC-1 α (Knutti in sod., 2001). Znano je, da koaktivator PGC-1 α obstaja v treh stanjih, ki se razlikujejo po transkripcijski aktivnosti. PGC-1 α , ki ni vezan na noben transkripcijski faktor, ima šibko transkripcijsko aktivnost in minimalno sposobnost vezave kompleksa SRC-1 in CBP/p300. Z vezavo na transkripcijski faktor se PGC-1 α aktivira in konformacijsko spremeni, kar omogoči vezavo drugih kofaktorjev, ki aktivirajo transkripcijo tega lokusa (Puigserver in sod., 1999). Transkripcijski faktor nato zbere koaktivatorski kompleks, ki se delno veže tudi na PGC-1 α , in vzdržuje kromatin v 'odprti'

konfiguraciji. Transkripcijski faktorji aktivirajo PGC-1 α tudi tako, da odmaknejo represorje, ki vzdržujejo neaktivno stanje PGC-1 α (Knutti in sod., 2001). Model tri-stopenjske aktivacije PGC-1 α je prikazan na sliki 2.



Slika 2. Model tri-stopenjske aktivacije PGC-1 α (prirejeno po Puigserver in sod., 1999).
Figure 2. PGC-1 α is present in three different states (adapted from Puigserver *et al.*, 1999).

Uravnavanje aktivnosti PGC-1 α poteka na več ravneh. S podhladitvijo organizma, stradanjem in fizično aktivnostjo se sinteza PGC-1 α poveča, medtem ko je za vzdrževanje bazalne ravni PGC-1 α potreben leptin (Kakuma in sod., 2000). Nadalje se raven PGC-1 α uravnava s specifičnim izražanjem v tkivih, ki imajo velike zahteve po energiji (kot npr. rjavo maščevje, srce, ledvica, možgani) ali pomembno vlogo v adaptivni termogenezi (Wu in sod., 1999; Larrouy in sod., 1999; Esterbauer in sod., 1999).

PGC-1 α so prvotno izolirali iz knjižnice cDNA rjavega maščevja miške (Puigserver in sod., 1998). V začetku so menili, da izolirani protein nima bližnjih homologov, saj s pregledovanjem podatkovnih zbirk niso našli strukturno sorodnih proteinov. Pred kratkim pa so iz knjižnice cDNA rjavega maščevja miši klonirali nov koaktivator, ki je homologen PGC-1 α , in ga poimenovali PGC-1 β (Lin in sod., 2002). PGC-1 α in PGC-1 β se izražata v istih tkivih, predvsem v rjavem maščevju in v srcu, vendar uravnavanje njunih mRNA med izpostavljenostjo mrazu in med diferenciacijo rjavih maščobnih celic poteka različno. Od do sedaj znanih koaktivatorjev se PGC-1 α razlikuje tudi po tem, da je njegova sinteza tkivno-specifična in odvisna od fiziološkega stanja živali. Dokazano je, da izpostavitve mrazu in delovanje β -adrenergičnih agonistov inducira izražanje PGC-1 α (Puigserver in sod., 1998).

Poleg PGC-1 α miši so bili izolirani in karakterizirani tudi PGC-1 α človeka (Esterbauer in sod., 1999; Larrouy in sod., 1999), podgane (Goto in sod., 2000) in prašiča (Milošević Berlič, 2002; Milošević Berlič in sod., v tisku). Gen PGC-1 α obsega ~67 kb v genomu človeka. Pri vseh omenjenih vrstah je sestavljen iz 13 eksonov, ki kodirajo 91-kDa protein, katerega aminokislinsko zaporedje je 95-odstotno identično s prašičjim in 94-odstotno identično z mišjim ortologom. Visok odstotek identičnosti aminokislinskih zaporedij PGC-1 α med različnimi živalskimi vrstami kaže na evlucijski pomen tega gena. Tudi primerjava kodogenega zaporedja prašičjega PGC-1 α s homolognimi regijami pri drugih vrstah (slika 3) kaže na visoko evlucijsko ohranjenost domen, ki predstavljajo potencialna vezna mesta za transkripcijske faktorje. Med njimi sta pomembni predvsem dve: domena, ki veže jedrne receptorje in domena, ki je v interakciji s PPAR γ .

prašič	1	MAWDMCNQDS--VWTDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD	58
človek	1	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD	60
miš	1	MAWDMCSQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD	58
		*****.*** **.*	
prašič	59	QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPVEDGLPSFDALTDGDVTT	118
človek	61	QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPVEDGLPSFDALTDGDVTT	120
miš	59	QSEIISNQYNNEPANIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPVEDGLPSFDALTDGAVTT	118
		*****.*	
prašič	119	NEASPSMPDGTTPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN	177
človek	121	NEASPSMPDGTTPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN	179
miš	119	NEASPSMPDGTTPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAANHHRIRTN	178
		*****.*	
prašič	178	PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTNDPPHTKPTETRNSSRDKCTSK	237
človek	180	PAIVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTNDPPHTKPTENRNSSRDKCTSK	239
miš	179	PAIVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTNDPPHTKPTENRNSSRDKCSK	238
		**.*	
prašič	238	KKHTQSQSQHLQAKPTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPT	297
človek	240	KKHTQSQSQHLQAKPTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPT	299
miš	239	KKHTQPQSQAQAKPTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPT	298
		**.*	
prašič	298	PPHKANQDNFRASPKLKPCCTVPPPSKTRYSESSGTHGNNSTKKGPEQSELYAQLS	357
človek	300	PPHKANQDNFRASPKLKSCCTVPPPSKPRYSESSGTHGNNSTKKGPEQSELYAQLS	359
miš	299	PPHKANQDNPFKASPKLKPCCTVPPPTKRARYSESSGTHGNNSTKKGPEQSELYAQLS	358
		*****.*	
prašič	358	KTSALGGGHEERKARRPSLRLFGDHDYQCSINSKAEILINISQELHDSRQLDSKDAASDW	417
človek	360	KSSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYQCSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDVSSDW	419
miš	359	KSSGLSRGHEERKTKRPSLRLFGDHDYQCSLNSKTDILINISQELQDSRQLDFKDACSDW	418
		**.*	
prašič	418	QRQMCSSDSDQCYLTETSEASRQVSPGSARKQLQDQEIRAEINLKHFGHPSQAVFDDEAD	477
človek	420	QGQICSSDSDQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAEINLKHFGHPSQAVFDDEAD	479
miš	419	QGHICSSDSDQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAEINLKHFGHPCQAVFDKSD	478
		.	
prašič	478	KTSELRDSDFSNEQFSKLPFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLNSPWDGTQSYSLFDVSPS	537
človek	480	KTGELRSDSDFSNEQFSKLPFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFNVS	539
miš	479	KTSELRDGDSDFSNEQFSKLPVFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQPYSLFDVSPS	538
		**.*	
prašič	538	CSSFNSPCRDSDVSPPKSLFSQRPQMRSRSRFSQHRSCSRSPYSRSRSPGSRSSRS	597
človek	540	CSSFNSPCRDSDVSPPKSLFSQRPQMRSRSRFSRHRSCSRSPYSRSRSPGSRSSRS	599
miš	539	CSSFNSPCRDSDVSPPKSLFSQRPQMRSRSRFSRHRSCSRSPYSRSRSPGSRSSRS	598
		*****.*	
prašič	598	CYYESGHCRRHTRHNSPLCARSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKRREYRREYKRES	657
človek	600	CYYESSHYRHRHTRHNSPLVRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKRREYRREYKRES	659
miš	599	CYYESSHYRHRHTRHNSPLVRSRSPYSRRPRYDSYEAHERLKRDEYRREYKRES	658
		**.*	
prašič	658	<u>ERAKQRE</u> <u>RQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELDRFEVFGIEIECTVNLRDDGDSYGF</u>	717
človek	660	<u>ERAKQRE</u> <u>RQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELDRFEVFGIEIECTVNLRDDGDSYGF</u>	719
miš	659	<u>ERAKQRE</u> <u>RQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELDRFEVFGIEIECTVNLRDDGDSYGF</u>	718
		*****.*	
prašič	718	ITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFPASTKSK	777
človek	720	ITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFPASTKSK	779
miš	719	ITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDTNSDDFPASTKSK	778
		*****.*	
prašič	778	YDSLDFDSLKEAQRSLRR	796
človek	780	YDSLDFDSLKEAQRSLRR	798
miš	779	YDSLDFDSLKEAQRSLRR	797

Slika 3. Aminokislinsko zaporedje prašičjega PGC-1 α v primerjavi z zaporedjem človeškega (AAD51615) in mišjega (AAC13554) homologa. Zvezdice predstavljajo identične amino kisline, dvopičja in pike pa polimorfna mesta. Delecije amino kislin so predstavljene s črticami. Motiv LXXLL (ak 142-146), tri mesta za fosforilacijo s proteinsko kinazo A (ak 237-240, 372-375 in 652-657) ter interaktivna domena PPAR (ak 291-337) so označene z okvirji. Dve SR-bogati domeni (ak 564-597 in 619-631) in domena, ki veže RNA (RRM) (ak 675-751) so podčrtane. Zaporedje bipartitnega signala za nuklearno lokalizacijo (ak 649-666) in tetrapeptidni motiv DHDY (ak 380-383) sta poudarjena.

Figure 3. The deduced amino acid sequence of the porcine PGC-1 α is compared with human (AAD51615) and mouse (AAC13554) sequences. Asterisks represent identical amino acids, while colons and dots indicate polymorphic sites. Deletions of amino acids are shown by dashes. An LXXLL motif (aa 142-146), three consensus sites for phosphorylation by protein kinase A (aa 237-240, 372-375 and 652-657), PPAR interactive domain (aa 291-337) are boxed. Two SR-rich domains (aa 564-597 and 619-631), and an RNA binding domain (RRM) (aa 675-751) are underlined. A consensus sequence of bipartite nuclear localization signal (aa 649-666) and a tetrapeptide motif DHDY (aa 380-383) are shown in boldface type.

Prisotnost številnih domen na PGC-1 α , ki omogočajo vezavo različnih proteinov, ki se vežejo na DNA, odpira možnosti za usmerjanje delovanja PGC-1 α na promotorje izbranih tarčnih genov in za razvoj zdravih učinkovin, ki bi selektivno delovale na posamezne skupine tarčnih genov.

Adaptivna termogeneza

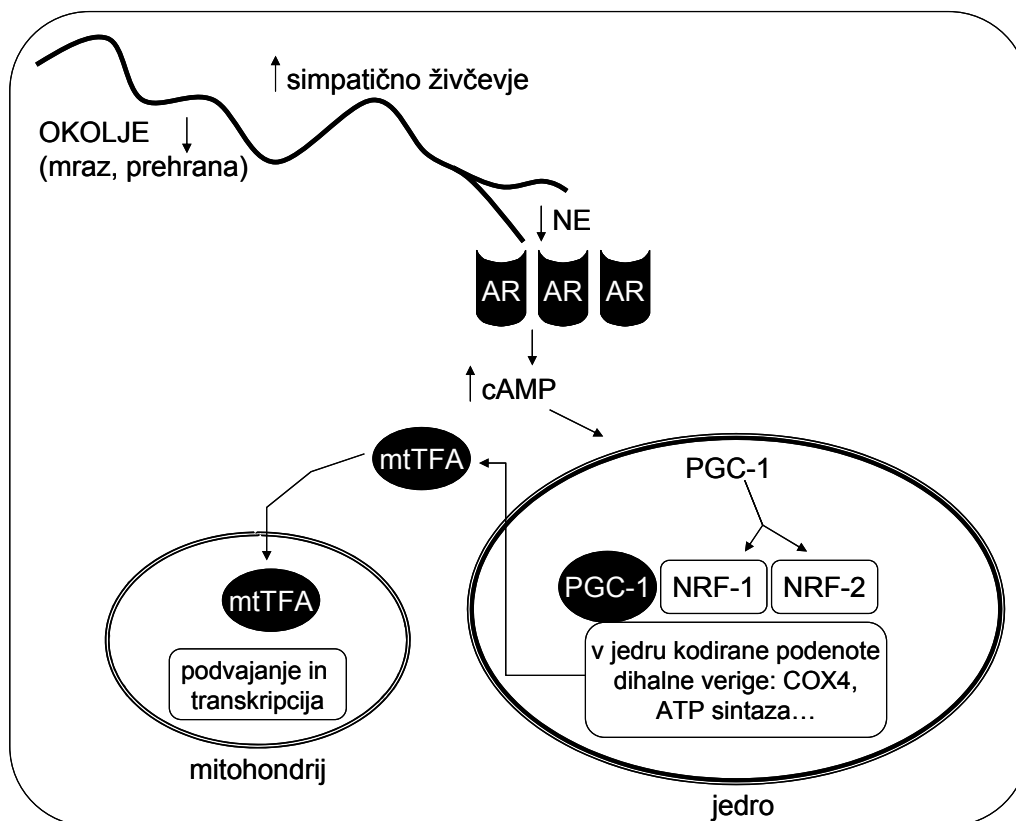
Debelost je kronična presnovna bolezen, ki je posledica porušenega ravnotežja med vnosom in porabo energije. Energija se v organizmu porablja na različne načine, med drugim z bazalnim metabolizmom, s fizično aktivnostjo in z adaptivno oz. netresavo termogenezo.

Adaptivna termogeneza je fiziološki proces, kjer se energija sprošča v obliki toplote. Porabo energije sprožijo spremenjene razmere v okolju, predvsem stres zaradi izpostavitve mrazu in prekomerno hranjenje (t.i. z dieto sprožena termogeneza). S podhladitvijo organizma se zaradi hipertrofije rjavega maščobnega tkiva, biogeneze mitohondrijev in povečane sinteze in aktivacije razklopnega proteina UCP-1 (angl. *uncoupling protein-1*) poveča oddajanje energije v obliki toplote (Puigserver in sod., 1998). Do energetskih izgub pride zaradi razklopa sinteze ATP in zgorevanja kisika ter uhajanja protonov skozi notranjo membrano mitohondrijev. Zaradi prekinitve vezave fosfata v oksidativni fosforilaciji teče dihalna veriga v prazno in prosta energija reakcije se sprosti v obliki toplote.

Proces adaptivne termogeneze uravnavajo možgani (slika 4), ki zaznajo podhladitev organizma in sprožijo aktivacijo simpatičnega živčevja, sproščanje norepinefrina in posledično aktivacijo β -adrenergičnih receptorjev na površini celic. V celicah rjavega maščevja se poveča koncentracija cAMP, sekundarnega prenašalca, ki aktivira lipolizo (tj. razgradnjo lipidov) in stimulira aktivacijo transkripcije *UCP-1*, hipertrofijo rjavega maščobnega tkiva in biogenezo mitohondrijev (Lowell in Spiegelman, 2000). Hkrati se poveča tudi koncentracija termogenega koaktivatorja PGC-1 α , ki uravnava biogenezo mitohondrijev. PGC-1 α prek indukcije proteina NRF-1 (angl. *nuclear respiratory factor-1*) aktivira sintezo encimov dihalne verige in mitohondrijskega transkripcijskega faktorja A (mtTFA), ki pa je ključen za aktivacijo transkripcije in podvajanje mtDNA (Puigserver in sod., 1998; Wu in sod., 1999). Zaradi možne vloge adaptivne termogeneze tako v patogenezi kot pri zdravljenju debelosti pri človeku, je zanimanje za ta proces precejšnje.

Vlogo PGC-1 α v adaptivni termogenezi kaže predvsem njegova povezava s ključnimi tkivi in hormoni, vključenimi v ta tkivno-specifični proces. Splošno sprejeto mnenje je, da imata pomembno vlogo predvsem skeletno mišičje in rjavo maščevje – s podhladitvijo organizma se namreč v skeletnem mišičju in rjavem maščevju, ne pa tudi v drugih tkivih, sproži izražanje *PGC-1 α* (Puigserver in sod., 1998). Pri majhnih sesalcih, kot so npr. miši in podgane, poteka adaptivna termogeneza v glavnem v mitohondrijih rjavih maščobnih celic in skeletnega mišičja, medtem ko ima pri večjih živalih in človeku osnovno vlogo v termogenezi skeletno mišičje (Wu in sod., 1999). Znanih je veliko genov, ki so neposredno udeleženi v adaptivni termogenezi, transkripcijsko uravnavanje tega procesa pa do danes še ni docela znano. Obetaven pristop k rešitvi tega vprašanja je preučevanje diferenciacije in izražanja genov v celicah rjavega maščevja.

Vlogo rjavega maščevja v obrambi organizma pred debelostjo so razjasnili z odstranitvijo tega tkiva pri miškah; miške brez rjavega maščevja so zelo debele in slabo odzivne na inzulin (angl. *insulin resistance*), poleg tega pa so zanje značilne tudi druge bolezenske spremembe, povezane z debelostjo (Lowell in sod., 1993; Lowell, 1998). Analiza vloge rjavega maščevja pri človeku in drugih velikih sesalcih je bolj kompleksna. Odrasli ljudje namreč nimajo definiranih področij rjavega maščobnega tkiva, pač pa so celice rjavega maščevja razpršene med celicami belega maščobnega tkiva (Krief in sod., 1993).



Slika 4. Uravnavanje biogeneze mitohondrijev s termogenim koaktivatorjem PGC-1 α (prirejeno po Wu in sod., 1999).

Figure 4. Pathway of mitochondrial biogenesis through PGC-1 α (adapted from Wu *et al.*, 1999).

ZAKLJUČEK

V zadnjih letih smo bili priča izjemnemu porastu znanja o molekularnih mehanizmih uravnavanja adipogeneze. Ta odkritja so vodila do novih vprašanj – zanimiva je predvsem vloga maščob v hrani, ki lahko služijo kot ligandi za PPAR γ . Na osnovi novejših rezultatov je realno pričakovanje, da bomo na to in podobna vprašanja kmalu znali odgovoriti.

Molekularni mehanizmi, povezani s porabo energije in termogenezo pri prašiču, so podobni molekularnim mehanizmom pri človeku. Poznavanje teh presnovnih poti nudi obetavne možnosti za zdravljenje debelosti in diabetesa.

Genetske raziskave adipogeneze so nujne za identifikacijo kombinacij genov in mutacij v kodogenih regijah teh genov, ki povečajo dovzetnost za debelost. Razumevanje procesa diferenciacije adipocitov nam omogoča razvoj strategij za spreminjanje aktivnosti transkripcijskih faktorjev s farmacevtskimi učinkovinami, zato so proteini iz družine PPAR vse bolj zanimivi za farmacevtsko industrijo. Glavni razlog je njihova vloga v presnovi maščob, in potencialna vloga v procesih, ki vodijo do ateroskleroze, vnetij, raka in motenj plodnosti. Sintetični ligandi za PPAR, vključno s fibrati in tiazolidindioni (TZD), so se pokazali kot zelo učinkoviti za zdravljenje diabetesa.

Farmakološki pristop k povečevanju količine ali aktivnosti PGC-1 α bi bil sprejemljiv, če ne bi imel neželenih učinkov. Za razvoj uspešnih aplikacij je potrebno še podrobnejše znanje o delovanju PGC-1 α , ki v glavnem temelji na fizioloških raziskavah v celičnih kulturah. Novejše raziskave na transgenih miših so pokazale, da ima lahko čezmerno izražanje PGC-1 α neželene učinke (pri transgenih miših so namreč opazili kardiomiopatije) in da je ustrezno uravnavanje

izražanja PGC-1 α ključno za nemoten razvoj. Nadaljnji študij živalskih modelov z izničnim genom za PGC-1 α ali s specifičnimi aleli PGC-1 α bo omogočil oceno pozitivnih in negativnih učinkov, ki jih povzroča spremenjena raven izražanja PGC-1 α .

CONCLUSION

As outlined above, recent years have witnessed a phenomenal increase in knowledge regarding the molecular control of adipogenesis. These findings now lead to next level of questions. Of particular interest is the role of dietary fats to serve as precursors to PPAR γ ligands. Based upon recent progress, it is likely that answers to these questions will be forthcoming.

Molecular mechanisms related to energy expenditure and thermogenesis in pigs are similar with the molecular mechanisms in humans. These pathways can be used as novel therapeutic approaches for the treatment of obesity and diabetes.

Genetic approaches are critical in identifying the combination of genes and mutations that predispose to obesity. Knowledge of adipocyte differentiation process (adipogenesis) permits us to devise strategies to modulate the activity of transcription factors by drugs. PPARs are now attracting the attention of pharmaceutical industry. They play a key role in lipid metabolism and have potential roles in atherosclerosis, inflammation, cancer and infertility. Synthetic PPAR ligands including fibrates and thiazolidinediones (TZDs), have proven effective in the treatment of diabetes.

Pharmacological strategies to increase the amount or activity of PGC-1 α could also be useful, if this can be done without deleterious effect. Of course, the likelihood of success depends upon better understanding of the function of PGC-1 α . Physiological roles of PGC-1 α in energy homeostasis have been tested for the most part in cell culture systems. Recent studies with transgenic mice have shown, that too much PGC-1 α can be undesirable (transgenic mice develop cardiomyopathy) and that appropriate regulation of this coactivator is important. Future studies in animal models with loss of PGC-1 α function and/or specific alleles of PGC-1 α will be necessary to elucidate beneficial and adverse effects of PGC-1 α .

VIRI

- Esterbauer, H./ Oberkofler, H./ Krempler, F./ Patsch, W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 62(1999), 98–102.
- Fajas, L./ Fruchart, J.C./ Auwerx, J. Transcriptional control of the adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 10(1998), 165–173.
- Goto, M./ Terada, S./ Kato, M./ Katoh, M./ Yokozeki, T./ Tabata, I./ Shimokawa, T. cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle swimming-exercised rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(2000), 350–354.
- Herzig, S./ Long, F./ Jhala, U.S./ Hedrick, S./ Quinn, R./ Bauer, A./ Rudolph, D./ Schutz, G./ Yoon, C./ Puigserver, P./ Spiegelman, B./ Montminy, M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(2001), 179–183.
- Houseknecht, K.L./ Bidwell, C.A./ Portocarrero, C.P./ Spurlock, M.E. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Gene*, 225(1998), 89–96.
- Kakuma, T./ Wang, Z.W./ Pan, W./ Unger, R.H./ Zhou, Y.T. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinol.*, 141(2000)12, 4576–4582.
- Knutti, D./ Kralli, A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 12, 8(2001), 360–365.
- Knutti, D./ Kressler, D./ Kralli, A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(2001)17, 9713–9718.

- Krief, S./ Lonngqvist, F./ Raimbault, S./ Baude, B./ Van Spronsen, A./ Arner, P./ Strosberg, A.D./ Ricquier, D./ Emorine, L.J. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.*, 91(1993), 344–349.
- Larrouy, D./ Vidal, H./ Andreelli, F./ Laville, M./ Langin, D. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPAR-gamma coactivator-1. *Int. J. Obesity*, 23(1999), 1327–1332.
- Lehman, J.J./ Barger, P.M./ Kovacs, A./ Saffitz, J.E./ Medeiros, D.M./ Kelly, D.P. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.*, 106(2000)7, 847–856.
- Lin, J./ Puigserver, P./ Donovan, J./ Tarr, P./ Spiegelman, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcriptional coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.*, 277(2002)3, 1645–1648.
- Lowell, B.B. Adaptive thermogenesis. Turning on the heat. *Curr. Biol.*, 8(1998)15, R517–R520.
- Lowell, B.B./ Spiegelman, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(2000), 652–660.
- Lowell, B.B./ Susulic, S./ Hamann, A./ Lawitts, J.A./ Himms-Hagen, J./ Boyer, B.B./ Kozak, L.P./ Flier, J.S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366(1993), 740–742.
- Milošević Berlič, T./ Kokalj-Vokac, N./ Anderson, S.I./ Archibald, A.L./ Dovc, P. Porcine Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1 (*PPARGC1*) gene: cDNA sequence, chromosomal localization and polymorphisms. *Anim. Genet.* In press.
- Milošević Berlič, T. Molekulski mehanizmi uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva pri prašiču (*Sus scrofa*). Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinani podiplomski študij biotehnologije, 2002.
- Puigserver, P./ Adelmant, G./ Wu, Z./ Fan, M./ Xu, J./ O'Malley, B./ Spiegelman, B.M. Activation of PPAR-gamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286(1999), 1368–1371.
- Puigserver, P./ Wu, Z./ Park, C.W./ Graves, R./ Wright, M./ Spiegelman, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(1998), 829–839.
- Rankinen, T./ Perusse, L./ Weisnagel, S.J./ Snyder, E.E./ Chagnon, Y.C./ Bouchard, C. The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. *Obesity Research*, 10(2002)3, 196–225.
- Rosen, E.D./ Walkey, C.J./ Puigserver, P./ Spiegelman, B.M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.*, 14(2000), 1293–1307.
- Rosenfeld, M.G./ Glass, C.K. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.*, 276(2001)40, 36965–36868.
- Spiegelman, B.M./ Puigserver, P./ Wu, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR γ and PGC-1. *Int. J. Obesity*, 24(2000)4, S8–S10.
- Sundvold, H./ Grindflek, E./ Lien S. Tissue distribution of porcine proxisome proliferator-activatd receptor α : detection of alternatively spliced mRNA. *Gene*, 273(2001), 105–113.
- Tontonoz, P./ Hu, E./ Spiegelman, B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(1994), 1147–1156.
- Weller, J.I./ Kashi, Y./ Soller, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73(1990)9, 2525–2537.
- Wu, Z./ Puigserver, P./ Andersson, U./ Zhang, C./ Adelmant, G./ Mootha, V./ Troy, A./ Cinti, S./ Lowell, B.B./ Scarpulla, R.C./ Spiegelman, B.M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1999), 115–124.