



FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS

Alba Bosquet Agudo

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Departament de Medicina i Cirurgia

**FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I
EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS DEL
RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES
MECANISMES MOLECULARS**

Alba Bosquet Agudo

TESI DOCTORAL

Dirigida pel Prof. Lluís Masana i la Dra. Josefa Girona

Programa de Doctorat en BIOMEDICINA

Reus, 2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
UNITAT DE RECERCA EN LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI

C/Sant Llorenç, 21
43201 Reus (Spain)
Tel. +34 977 759 366
Fax +34 977 759 322
luis.masana@urv.cat

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat **“FABP4 en les malalties metabòliques i el càncer: implicació en l’estrès del reticle endoplasmàtic i altres mecanismes moleculars”**, que presenta **Alba Bosquet Agudo** per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta universitat.

Reus, 5 de gener de 2017

Els directors de la tesi doctoral,

Dr. Lluís Masana Marín

Dra. Josefa Girona Tell

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

La tesi doctoral que es presenta ha estat finançada per:

Instituto de Salud Carlos III

Beca Predoctoral de Formació en Investigació i Salut (PFIS, FI12/00421),
associada al projecte PI11/02216 i PI15/00627



Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)



Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades

Metabólicas Asociadas



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Als meus pares,

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

*When you make the finding yourself – even if you’re the last person
on Earth to see the light – you’ll never forget it.*

Carl Sagan

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Agraïments

A punt d'acabar aquesta etapa tan important, arriba el moment de fer balanç. Durant aquests últims quatre anys hi ha hagut moments per tot: he rigut, he plorat, ho he passat molt bé, ho he passat malament, he viscut experiències inoblidables i he après de mil errors. He conegut persones que han arribat per quedar-se i d'altres que han marxat, persones que m'han fet aprendre i créixer, persones que han sigut lliçons de vida. Tots, d'una manera o altra, heu contribuït perquè jo hagi arribat fins aquí, així que una part d'aquesta tesi us correspon.

Vull agrair a tots els companys de la URLA, pels dinars, pels sopars, pels congressos i, en general, per fer millor el dia a dia. Al Dr. Masana (i a les casualitats de la vida) per donar-me l'oportunitat de fer la tesi aquí i formar part d'aquest grup. A la Dra. Girona per haver-me guiat i ajudat sempre que ho he necessitat.

A la Iris. Sense tu, el meu pas per aquí, no hauria sigut el mateix. Som nit i dia (¿me explicas esta contradicción?), però ens complementem a la perfecció. M'has ajudat moltíssim, sempre has tingut paraules de suport i ni que moltes vegades no t'hagi fet cas, mai m'has jutjat. Si us plau, envia'm el *save the date* ASAP...

A la Sandra, trobaré a faltar els nostres dinars romàntics i les interessants i variades converses del despatx, però, sobretot, et trobaré a faltar quan no pugui compartir amb ningú les coses cuquis, nyonyes i fifis que tant ens agraden. *For every girl who dreams big, there's a princess to show her it's possible. Dream big, princess!!*

Al Ricardo, per ajudar-me sempre que ho he necessitat. M'has ensenyat moltes coses de ciència, però si una cosa he après de tu és que en aquesta vida s'ha de ser pragmàtic i relativitzar les coses. Espero saber aplicar el consell.

A la Montse i el Johan per portar gairebé tota la vida al meu costat i recolzar-me sempre. Em falten paraules i pàgines per escriure tot el que us he d'agrair.

A la Sara, per estar en els moments més difícils (i en els bons, per suposat!!) i per ser sempre tan bona amfitriona. Ets única! Al Gabri, per estar sempre tan disposat a ajudar-me i els ànims constants durant aquests últims mesos.

A la meva gran família: yaya, àvia, tiets, cosins, cosinets i padrins. La família no s'escull, però a mi m'ha tocat la millor.

Tampoc em puc oblidar del Kirby i els nous membres peluts de la família: Lilo i Bagheera. No entenen res de ciència, ni tampoc llegiran això, però tots els seus *mimitos* m'han ajudat moltíssim.

A Lara, por hacer de hermana pequeña, de hermana mayor, de mama 2 y, en definitiva, por cuidarme tan bien y compartir tantos momentos conmigo.

Finalment, als meus pares, per demostrar-me dia a dia que pares no hi ha més que uns, que sempre hi són de manera incondicional i que la seva generositat és infinita. No sé què faria sense vosaltres.

A tots vosaltres, gràcies per tot.



Índex

Abrevitures	XVII
Justificació	XIX

Introducció	
1. Obesitat i patologies associades	3
1.1. Resistència a la insulina i diabetis tipus 2	4
1.1.1. Via de senyalització de la insulina	4
1.1.2. Resistència a la insulina	6
1.2. Obesitat i càncer de mama	7
2. Àcids grassos i teixit adipós	9
2.1. Funció i transport dels àcids grassos en l'organisme	10
2.1.1. Proteïnes transportadores de membrana	12
2.1.2. FABPs (<i>Fatty acid binding proteins</i>)	15
2.1.2.1. Família i distribució tissular de les FABPs	16
2.1.2.2. Estructura gènica i evolució molecular	18
2.1.2.3. Tipus de FABPs	19
3. <i>Fatty acid binding protein 4</i> (FABP4)	23
3.1. Localització i regulació	25
3.2. Funcions intracel·lulars de FABP4	26
3.2.1. Estudis <i>in vitro</i>	26
3.2.2. Estudis <i>in vivo</i>	28
3.3. Funcions extracel·lulars de FABP4	30
3.3.1. Secreció de FABP4 circulat	30
3.3.2. FABP4 circulat i patologia metabòlica	31

3.3.3. Efectes perifèrics de FABP4	34
3.4. Inhibidors de FABP4	35
3.4.1. Inhibidors sintètics	35
3.4.1.1. BMS309403	37
3.4.2. Teràpies biològiques	38
3.4.3. Elements dietètics	39
4. Estrès del reticle endoplasmàtic i FABP4	41
4.1. Estrès del RE i resposta a proteïnes mal plegades	42
4.2. Estrès del reticle endoplasmàtic i inflamació	46
4.2.1. Vies implicades en l'estrès del RE i la inflamació	46
4.3. Estrès del RE, resistència a la insulina i malalties metabòliques	49
4.3.1. Estrès del RE en obesitat i diabetis	49
4.3.2. Estrès del RE, AG i FABP4	51
4.3.3. Estratègies terapèutiques contra l'estrès del RE en malalties metabòliques	52
4.4. Estrès del RE i càncer	53
5. Teixit adipós, FABP4 i càncer	55
5.1. Adipòcits i càncer de mama	56
5.2. Adipocines i càncer	58
5.2.1. FABP4 i càncer	59
5.2.2. FABP4 i càncer de mama	60
<u>Hipòtesi i Objectius</u>	65

Resultats	71
Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells. Alba Bosquet, Sandra Guaita-Esteruelas, Paula Saavedra, Ricardo Rodríguez-Calvo, Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana. <i>Atherosclerosis</i> , 2016.	73
FABP4 inhibitor BMS309403 decreases saturated-fatty-acid induced endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle by reducing MAPK activation. Alba Bosquet, Ricardo Rodríguez-Calvo, Sandra Guaita-Esteruelas, Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana. <i>En revisió</i> .	85
Exogenous FABP4 increases breast cancer cell proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins. Sandra Guaita-Esteruelas, Alba Bosquet, Paula Saavedra, Josep Gumà, Josefa Girona, Eric W.-F. Lam, Kepa Amillano, Joan Borràs i Lluís Masana. <i>Molecular Carcinogenesis</i> , 2016.	117
Discussió	131
Conclusions	143
Bibliografia	147

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Abreviatures

HNE: 4-hidroxinonenal	EIF2: <i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i>
AB: Àcids biliars	eNOS: Òxid Nítric Sintasa
ACS: Acetil-CoA sintasa	Endotelial
AG: Àcid Gras	EPA: Àcid eicosapentaenoic
AKT/PKB: <i>Protein kinase B</i>	ER: Receptor d'estrògens
AMPK: <i>AMP-activated protein kinase</i>	ERAD: <i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
AP-1: <i>Activator Protein 1</i>	ERK: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ATF4: <i>Activating Transcription Factor 4</i>	FABP: <i>Fatty Acid Binding Protein</i> , Proteïna d'unió a Àcids Grassos
ATF6: <i>Activating Transcription Factor 6</i>	FABP4, A-FABP, aP2: Proteïna d'unió a àcids grassos adipocitària
BiP/GRP78: <i>Binding immunoglobulin protein o 78 kDa glucose-regulated protein</i>	FASN: <i>Fatty acid synthase</i>
C/EBP: <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>	FATP/SLC27: <i>Fatty Acid Transport Protein o Solute carrier 27</i>
CAA: <i>Cancer-associated adipocyte</i>	GADD34: <i>growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34</i>
CD36: <i>Cluster of Differentiation 36</i>	GLUT4: <i>Glucose Transporter 4</i>
CHOP: <i>C/EBP homologous protein</i>	HDL: <i>High-density lipoprotein</i>
CK1: Citoqueratina 1	HER2: <i>Human epidermal growth factor 2</i>
DHA: Àcid docosahexaenoic	HFD: <i>High Fat Diet</i> , dieta rica en greixos
DT2: Diabetis tipus 2	
EA: Àcid esteàric	
eFABP4: FABP4 exògena	

HSL: Lipasa sensible a hormones	PERK: <i>Protein kinase RNA-like</i>
IKK: <i>Inhibitor of nuclear factor</i>	<i>endoplasmatic reticulum kinase</i>
<i>kappa-B kinase</i>	PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa
IL: Interleucina	PO: Àcid Palmitoleic
IMC: Índex de Massa Corporal	PPAR: Receptor activat per
IRE1α: <i>Inositol requiring 1α</i>	proliferadors del peroxisoma
IRS1: <i>Insulin-receptor substrate 1</i>	PR: Receptor de progesterona
IκB: <i>Inhibitor of kappa-B</i>	PTEN: <i>Phosphatase and tensin</i>
JNK: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>	<i>homolog</i>
KO: <i>Knockout</i>	RE: Reticle endoplasmàtic
LA: Àcid linoleic	RI: Resistència a la insulina
MAPK: <i>Mitogen-Activated Protein</i>	RNA: Àcid ribonucleic
<i>Kinase</i>	ROS: Espècies reactives de
MCP-1/CCL2: <i>Monocyte</i>	l'oxigen
<i>chemoattractant protein-1</i>	SCD1: Estearoil-CoA desaturasa
mRNA: RNA missatger	1
NES: <i>Nuclear export signal,</i>	SERCA: ATPasa del calci del
seqüència d'exportació nuclear	reticle sarcoplasmàtic
NF-κB: <i>Nuclear factor kappa B</i>	SM: Síndrome Metabòlica
NLS: <i>Nuclear signal localization,</i>	TG: Triglicèrids
seqüència de localització nuclear	TNFα: <i>Tumor necrosis factor α</i>
NO: Òxid nítric	TRAF2: <i>Tumor-necrosis factor-α-</i>
NRF2: <i>Nuclear erythroid 2 p45-</i>	<i>receptor-associated factor 2</i>
<i>related factor 2</i>	TUDCA: Àcid
OA: Àcid oleic	tauroursodeoxicòlic
PA: Àcid palmític	UPR: <i>Unfolded protein response</i>
PBA: 4-fenilbutirat	XPB1: <i>X-box binding protein 1</i>

Justificació

El teixit adipós, a part de la seva funció de reserva energètica, es considera un òrgan endocrí que allibera àcids grassos (AG) i adipocines al torrent circulatori. Les persones obeses presenten nivells plasmàtics d'AG elevats, els quals juguen un paper primordial en el desenvolupament de diferents alteracions metabòliques. A la cèl·lula, els AG es troben units a les FABPs (*fatty acid binding protein*), proteïnes especialitzades en el seu transport, entre elles, la FABP4, expressada majoritàriament en teixit adipós. FABP4, tot i que tradicionalment s'ha considerat una proteïna citoplasmàtica, pot ser secretada al plasma. De fet, concentracions circulants de FABP4 elevades correlacionen positivament amb obesitat, resistència a la insulina (RI), diabetis tipus 2 (DT2), síndrome metabòlica (SM) i diferents tipus de càncer. Per tot això, s'ha proposat que FABP4 podria ser un dels factors que traslladarien els senyals del teixit adipós a altres teixits perifèrics. Malgrat tot, no és ben conegut si FABP4 podria tenir un paper causal en aquestes complicacions o si l'increment de les seves concentracions plasmàtiques són una conseqüència d'aquestes. Un dels mecanismes subjacents a aquestes alteracions és l'estrès del reticle endoplasmàtic (RE), el qual ha estat relacionat amb l'activació de les vies de senyalització relacionades amb processos inflamatoris que precedeixen la RI. A més, el teixit adipós, així com les molècules que secreta, exerceixen un *cross-talk* actiu amb les cèl·lules tumorals, contribuint en la progressió del tumor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

1

Obesitat i patologies associades

La prevalença de l'obesitat està augmentant dràsticament, tant en adults com en nens i adolescents, essent un important factor de risc per a la diabetis, les malalties cardiovasculars i el càncer, entre d'altres [1–3]. En el 2014, en tot el món, hi havia més de 2 bilions d'adults amb sobrepès i obesitat (39% i 13% de la població adulta, respectivament). Si la tendència segueix a l'alça, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que en el 2030 un 86.3% de la població adulta presentarà sobrepès o obesitat, suposant una de les majors crisis de salut mundial [4].

L'obesitat es defineix com un augment patològic del greix corporal que redueix la qualitat i l'esperança de vida [5]. El greix, en presència d'un excés calòric, s'emmagatzema en els adipòcits en forma de triglicèrids (TG) [6]. En situació d'obesitat es produeix una sobrecàrrega lipídica en els adipòcits, provocant l'expansió, la hiperplàsia i la hipertròfia dels mateixos [7]. Donat que els adipòcits no poden emmagatzemar correctament l'excés de lípids, aquests s'acumulen en teixits perifèrics, principalment en el fetge i el múscul. Aquesta acumulació pot provocar lipotoxicitat, provocant disfunció cel·lular, així com diferents patologies associades en funció del tipus cel·lular afectat [8]. Així mateix, l'obesitat es caracteritza per un estat d'inflamació crònica de baixa intensitat, la qual provoca la secreció d'AG lliures, adipocines i

citocines proinflamatòries per part de l'adipòcit. Aquestes poden actuar localment, però també a nivell sistèmic (endocrí), conduint a les alteracions que precedeixen el desenvolupament de la RI [9].

1.1. Resistència a la insulina i diabetis tipus 2

La RI es caracteritza per una capacitat disminuïda de la insulina per dur a terme les seves funcions fisiològiques, implicada principalment en la captació de glucosa per part dels teixits diana (múscul, fetge i teixit adipós) [2]. La RI, normalment, precedeix a diferents situacions patològiques, entre elles la DT2 [10].

Des de fa dècades se sap que hi ha una relació causa-efecte entre l'obesitat i la RI, ja que diferents estudis han demostrat que la pèrdua o guany de pes correlaciona estretament amb l'augment o disminució a la sensibilitat a la insulina, respectivament [11,12]. Tot i això, els mecanismes moleculars subjacents no estan del tot esclarits. De fet, estudis recents han indicat que no tots els tipus d'obesitat contribueixen al desenvolupament de RI de la mateixa manera, ja que aquesta depèn més de la localització del greix (essent l'excés de greix visceral el més predisposant) que no pas de l'índex de massa corporal (IMC) [13].

1.1.1. Via de senyalització de la insulina

La insulina és una hormona sintetitzada per les cèl·lules β del pàncrees, formada per dues cadenes polipeptídiques unides per ponts disulfur. El paper principal de la insulina és estimular el transport de la glucosa i la glucòlisi en el teixit adipós i el múscul, estimular la síntesi de glicogen en els teixits diana i prevenir la producció de glucosa en fetge [14]. Pel que fa al metabolisme lipídic i proteic, en el múscul esquelètic activa la lipogènesi i la síntesi de proteïnes, però inhibeix l'oxidació dels AG i la degradació de

proteïnes. En el teixit adipós activa la lipogènesi, l'absorció de TG de la sang i la síntesi de proteïnes i inhibeix la lipòlisi. Finalment, en el fetge activa la lipogènesi i la síntesi de proteïnes i inhibeix l'oxidació d'AG. Per tant, globalment, els efectes de la insulina estimulen la síntesi d'hidrats de carboni, greixos i proteïnes, essent considerada una hormona anabòlica (Figura 1) [15].

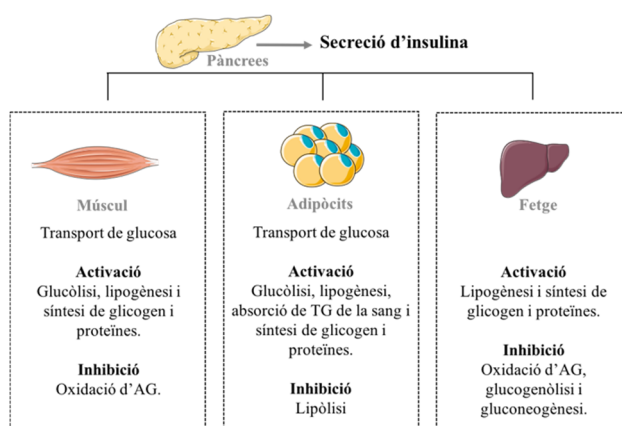


Figura 1. Principals efectes metabòlics de la insulina.

Un cop la insulina és secretada al torrent sanguini, aquesta interacciona amb el seu receptor, induint la fosforilació del residu tirosina del mateix receptor. Després de la trans-autofosforilació es produeix un canvi conformational en el receptor, permetent la fosforilació dels residus de tirosina de les molècules pròximes, com el substrat del receptor de la insulina (IRS). Les tirosines fosforilades d'aquests substrats actuen com a llocs d'ancoratge per a proteïnes que contenen el domini SH2 (*Src-homology-2*), com PI3K (fosfoinositol 3-cinasa) o Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) [16]. PI3K pot activar la proteïna PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), responsable de l'activació d'altres cinases, com AKT (PKB, *protein kinase B*) i PKC (*protein kinase C*), implicades també en la via de senyalització de la insulina i el transport de la glucosa, entre d'altres, promovent la

translocació del transportador de glucosa GLUT4 (*glucose transporter 4*) a la membrana plasmàtica [17].

1.1.2. Resistència a la insulina

En una primera fase, la RI condueix a una hipersecreció d'insulina com a mecanisme compensatori, per tal de mantenir nivells de glucèmia adequats. Ara bé, aquesta situació es va deteriorant progressivament, fins que les cèl·lules no són capaces de mantenir aquesta hipersecreció i comencen a fallar, disminuint la secreció. Per tant, el resultat de la RI és una hiperglucèmia produïda per un defecte en la secreció d'insulina i/o en la seva acció.

En els teixits, en situació de RI, es produeix una disminució en la captació de glucosa, provocada per alteracions en la via de senyalització de la insulina, així com una disminució dels transportadors sensibles a insulina GLUT4. A més, en el teixit adipós la RI promou la lipòlisi, provocant l'alliberament d'alts nivells d'AG lliures a la circulació. En el fetge, la RI redueix la síntesi de glicogen i augmenta la gluconeogènesi. Paradoxalment, la lipogènesi, tot i ser dependent d'insulina, en situació de RI es troba molt elevada, contribuint a la hipertrigliceridèmia [18].

En la patogènesi de la DT2 i la RI poden contribuir diferents factors. Per una banda, algunes molècules implicades en la via de senyalització de la insulina, com IRS, PKB- β o PI3K, s'han trobat alterades en situació de DT2 *in vivo* [19]. A més, i davant la creixent evidència del fet que el teixit adipós actua com un òrgan endocrí, les adipocines i els AG secretats podrien contribuir negativament en la via de senyalització de la insulina [14].

Recentment, diferents estudis també apunten a la implicació de l'estrès del RE en l'aparició de processos inflamatoris que precedeixen a la RI en

casos d'obesitat [20]. El RE és un orgànul cel·lular la funció del qual equival a una fàbrica de proteïnes. De fet, en situació d'obesitat es produeix una desregulació en l'homeòstasi del RE dels adipòcits, alteració coneguda com a estrès del RE [21]. A més, un dels estímuls responsables de l'activació de l'estrès del RE i la inflamació és l'increment dels AG lliures [22].

El coneixement dels factors i els mecanismes moleculars que modulen la RI, poden proporcionar nous objectius per al tractament i la prevenció de la DT2.

1.2. Obesitat i càncer de mama

Recentment, diferents estudis epidemiològics han indicat que l'obesitat i el sobrepès augmenten el risc de desenvolupar diferents tipus de càncer, inclòs el càncer de mama [1,23]. Alguns d'aquests estudis suggereixen que el teixit adipós per ell mateix podria influenciar el creixement i la diferenciació tumoral a través de les adipocines alliberades [24,25]. Ara bé, tot i que els resultats d'aquests estudis són força contundents, els mecanismes moleculars a través dels quals es produeix aquesta comunicació són poc coneguts [26,27].

El càncer de mama és el càncer més freqüent en dones i el segon càncer més comú en el món, després del càncer de pulmó [28]. Clínicament, el càncer de mama es pot classificar en diferents tipus, segons les característiques moleculars del tumor, la seva capacitat proliferativa i el seu estat de diferenciació (Taula 1) [29]. El grup amb receptor d'estrògens (ER) positiu és el més freqüent (subtipus luminal A i luminal B). A més, l'expressió de ER és un bon factor pronòstic, ja que dues tercers parts de les pacients, aproximadament, responen a la teràpia hormonal (moduladors selectius del ER, inhibidors de l'aromatasa, etc.). Els tumors del subtipus positius per

HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) són més agressius que el grup anterior i presenten un excés de la proteïna HER2. El tractament de referència per aquest tipus de tumors és l'ús d'anticossos monoclonals contra HER2, essent el més conegut el trastuzumab [29]. Finalment, el grup basal, també conegut com a triple negatiu, no presenta ER, ni receptors de progesterona ni HER2. És el que presenta pitjor pronòstic i té una major incidència en pacients amb mutacions en el gen *BRCA1* (*breast cancer 1*). Cal destacar que aquest tipus de tractaments dirigits poden ser complementaris a la cirurgia, la radioteràpia i/o la quimioteràpia [30].

Taula 1. Classificació molecular dels diferents tipus de càncer de mama.

Tipus	Característiques moleculars	Capacitat proliferativa	Estat de diferenciació	Pronòstic
Luminal A	[ER+ i/o PR+] HER2-	Baixa	Elevat	Bon pronòstic
Luminal B	[ER+ i/o PR+] HER2+	Elevada	Elevat	Mal pronòstic
HER2 +	[ER-PR-] HER2+	Elevada	Intermedi	Mal pronòstic
Basal (triple -)	[ER-PR-] HER2-	Elevada	Baix	Mal pronòstic

ER: receptor d'estrògens; PR: receptor de progesterona; HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*.

Fins al moment, les evidències que s'han trobat indiquen que aquesta associació positiva entre el càncer de mama i l'obesitat es deu, possiblement, als nivells elevats d'estrògens, la RI i la conseqüent hiperinsulinèmia, així com la hipòxia i la inflamació crònica induïda per l'obesitat [31].

2

Àcids grassos i teixit adipós

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el teixit adipós pot actuar com un òrgan endocrí, alliberant AG lliures i adipocines a la circulació.

Els AG són àcids carboxílics amb una estructura típica $R-COOH$, formats per un grup metil en un extrem, una cadena hidrocarbonada lineal (R) i un terminal carboxílic [32]. Els AG es poden dividir en diferents grups, en funció de la seva estructura, el seu paper fisiològic o l'efecte biològic. Pel que fa a l'estructura química es classifiquen en:

Àcids grassos saturats

Els AG saturats no contenen dobles enllaços en la seva cadena hidrocarbonada i es divideixen en diferents subgrups en funció de la llargada de la cadena. Representen el 30-40% dels AG en l'organisme, essent els més abundants l'àcid palmític (PA) (15-25%) i l'àcid esteàric (EA) (10-20%). Habitualment, una ingesta elevada d'AG saturats s'associa amb conseqüències negatives per a la salut humana, ja que aquesta s'ha correlacionat positivament amb nivells elevats de colesterol i un augment de la taxa de mortalitat per malaltia coronària [33]. Malgrat això, aquests efectes no s'han observat en el cas de l'EA, degut a la seva alta afinitat per l'enzim

estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1). Aquest enzim introdueix insaturacions als AG saturats, fent que l'EA es converteixi en àcid oleic (OA) i presenti un paper antiaterogènic [34,35]. En canvi, el seu potencial protrombòtic està en debat [36].

Àcids grassos insaturats

Els AG insaturats es caracteritzen per la presència d'un (monoinsaturats) o més (poliinsaturats) dobles enllaços en la seva cadena hidrocarbonada. Es poden dividir en tres grups, en funció de la posició del primer doble enllaç comptant des de l'extrem metil [32].

- Omega-3: L'àcid eicosapentaenoic (EPA) (C20:5) i l'àcid docosahexaenoic (DHA) (C22:6) són els AG més importants d'aquest grup. Es troben en productes marins. El consum d'aquests AG es relaciona amb la disminució de malalties cardiovasculars [37,38].
- Omega-6: L'àcid linoleic (LA) (C18:2) és el precursor d'aquest grup i l'àcid poliinsaturat més abundant de la dieta. La majoria d'estudis amb LA i els seus derivats han mostrat una associació, tant directa com indirecta, amb la inflamació i els trastorns metabòlics [39].
- Omega-9: L'OA (C18:1) és un dels AG més abundants de la dieta. Com el seu nom indica, una de les principals fonts d'aquest AG és l'oli d'oliva. Les dietes riques amb OA semblen estar associades amb un benefici en determinades patologies de base inflamatòria [40].

2.1. Funció i transport dels àcids grassos en l'organisme

Els AG de cadena llarga són components essencials de la nostra dieta i una de les principals fonts d'energia per a les cèl·lules. Aquests contribueixen en gran diversitat de processos, com en l'emmagatzematge, la síntesi de la

membrana plasmàtica, l'ancoratge de proteïnes, les modificacions posttraduccionals i la regulació transcripcional de gens implicats en el metabolisme energètic, entre d'altres [41,42].

L'entrada d'AG a la cèl·lula es divideix, resumidament, en tres passos [43]. L'AG es troba fora de la cèl·lula, generalment en forma monomèrica. Quan els AG s'alliberen dels dipòsits del teixit adipós o de la hidròlisi dels triglicèrids (TG) provinents de la dieta a la circulació, aquests s'acoblen a l'albumina. L'AG s'uneix a la capa externa de la membrana plasmàtica (adsorció). Seguidament, els AG es dissocien de l'albumina, produint-se el creuament de la membrana. Finalment, es produeix la desadsorció de l'AG de la part citosòlica de la membrana, essent alliberat a l'interior de la cèl·lula. Cada un d'aquests passos és catalitzat per proteïnes reguladores, com es descriu a continuació [44].

El mecanisme mitjançant el qual els AG travessen la membrana plasmàtica s'ha debatut durant diversos anys. Inicialment, i donat que els AG són lipofílics, es va proposar que aquests travessaven la bicapa lipídica per difusió passiva (mecanisme *flip-flop*) sense la participació de mediadors proteics. En canvi, posteriorment, es va veure que gairebé el 90% dels AG travessen la membrana a través d'un transport associat a proteïnes, sobretot en teixits amb un alt metabolisme en greixos i emmagatzematge de lípids, com el múscul esquelètic, el teixit adipós, el fetge o el cor. Actualment, ambdós mecanismes estan àmpliament acceptats. Així mateix, també s'ha vist que en alguns teixits i tipus cel·lulars els AG poden senyalitzar a través de receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) [45,46] o *toll-like receptors* (TLR) [47,48], tot i que majoritàriament aquests han de ser internalitzats per poder exercir la seva funció. Una vegada en el citoplasma, els AG s'uneixen a la proteïna d'unió d'AG citoplasmàtica FABPc (*Fatty Acid Binding Protein*

Cytoplasmatic) o a la proteïna d'unió a acil-CoA (ACBP). El transport d'AG de la circulació a les cèl·lules es troba il·lustrat en la Figura 2 [42].

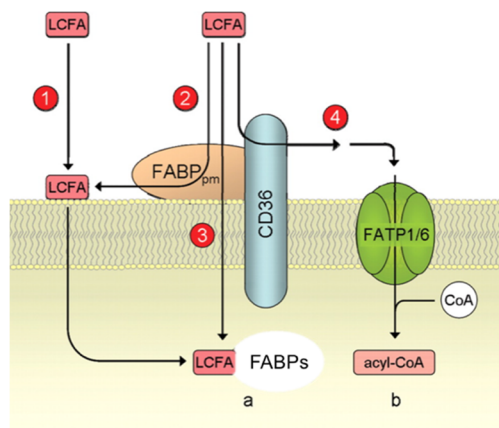


Figura 2. Mecanisme de captació dels àcids grassos lliures. Els AG de cadena llarga (LCFA) viatgen en circulació com a AG lliures (FFA) units a l'albumina o com a TG en les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). El creuament de la membrana es produeix per proteïnes transportadores de membrana o per difusió passiva (mecanisme *flip-flop*). Un cop a l'interior de la cèl·lula s'uneixen a proteïnes d'unió a AG intracel·lulars. Font: Schwenk, R *et al.*, *Cardiovascular Research* (2008).

2.1.1. Proteïnes transportadores de membrana

Com s'ha comentat anteriorment, en el transport facilitat dels AG participen tot un seguit de proteïnes transportadores, les quals es descriuen a continuació.

FABP_{pm} (Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein)

Va ser la primera proteïna transportadora d'AG identificada [49]. És idèntica a la isoforma mitocondrial de l'enzim aspartat aminotransferasa (mAspAT) i presenta alta afinitat pels AG de cadena llarga. Es localitza als

mitocondris de diferents teixits, incloent-hi múscul esquelètic i cèl·lules endotelials [50].

CD36 (Cluster of Differentiation 36)

CD36, també conegut com a translocasa d'AG (FAT, *fatty acid translocase*), és un receptor transmembrana que pertany a la família de receptors *scavenger* classe B. Inicialment es va descriure com glicoproteïna IV [51]. Té un pes molecular de 53 kDa i està format per dos dominis transmembrana, dos dominis citoplasmàtics molt curts i un domini extracel·lular gran, en forma de *loop*, extensament glucosilat [52]. S'expressa en diferents tipus cel·lulars de mamífer, com monòcits i macròfags, plaquetes, adipòcits, hepatòcits, cèl·lules endotelials, miòcits i cèl·lules epitelials de mama, ronyó i intestí [53]. CD36 és una proteïna multifuncional, ja que pot unir diferents lligands i està implicada en diferents processos biològics, com la internalització de cèl·lules apoptòtiques, l'adhesió, l'angiogènesi, la modulació de la inflamació i el transport de lípids i AG. [54].

La sobreexpressió específica de CD36 en múscul augmenta l'oxidació d'AG i redueix els nivells circulants de TG, AG i la deposició de greix [55]. Els ratolins *knockout* (KO) per CD36 presenten nivells elevats de colesterol, TG i AG, hipoglucèmia en dejú, així com una captació disminuïda d'AG de cadena llarga per part dels adipòcits [56]. Així mateix, models de rata SHR (*spontaneously hypertensive rat*) amb CD36 mutat presenten un transport defectuós d'AG de cadena llarga i RI [57]. Malgrat aquestes evidències, els mecanismes a través dels quals CD36, un receptor amb poca presència intracel·lular, sense activitat quinasa ni fosfatasa i sense relació directa amb GTPases (guanosina trifosfatasa), pot activar diferents cascades de senyalització romanen desconeguts [53].

FATP (Fatty acid transport protein)

Les proteïnes transportadores d'AG FATP, també conegudes com a SLC27 (*solute carrier 27*), formen una família de sis proteïnes altament conservades (FATP1-6), caracteritzades per una expressió diferencial dependent de teixit (Taula 2). Presenten un pes molecular de 70-80 kDa, amb un extrem N-terminal extracel·lular/luminal i un domini C-terminal citosòlic [58].

Taula 2. Distribució tissular de les FATPs.

	FATP1	FATP2	FATP3	FATP4	FATP5	FATP6
Pulmó	+	-	++	±	-	-
Intestí prim	-	±	-	++	-	-
Cor	++	-	-	+	-	++
Fetge	-	++	++	+	++	-
Múscul	++	-	-	+	-	-
Pàncrees	+	+	+	-	-	nd
Cervell	+	-	-	+	-	-
T. adipós	+	±	-	±	-	-
Ronyó	+	++	-	+	-	-

Adaptat de Doege H. and Stahl A. *Physiology* (2006).

FATP1 va ser la primera isoforma en ser identificada i, per tant, la més estudiada. S'expressa, principalment en teixit adipós, múscul esquelètic i cor. En resposta a insulina, FATP1 es transloca a la membrana plasmàtica, incrementant la captació d'AG [41]. En canvi, la manca d'aquesta proteïna redueix el contingut de TG en múscul, prevé la RI induïda per una dieta alta en greixos i mitiga la síntesi de TG estimulada per insulina, sense alterar la captació basal d'AG [59][60]. FATP2 s'expressa principalment en fetge i ronyó. La principal diferència respecte a les altres FATPs és que pot actuar tant com a transportador d'AG, així com presentar activitat acetil-CoA

sintasa (ACS) [41]. En teixits de ratolins KO per a FATP2 s'observa una disminució de l'activitat ACS dels AG de cadena llarga, així com una disminució de la β -oxidació [61]. FATP3 s'expressa principalment en pulmó i fetge [58]. La funció d'aquesta proteïna es coneix poc [62]. FATP4 és l'única isoforma expressada en els enteròcits i es localitza específicament en la part apical de les cèl·lules epitelials de l'intestí prim [63]. Està implicada en l'absorció dels lípids de la dieta [42], de fet, en enteròcits aïllats de ratolins heterozigots per FATP4 s'observa una disminució del 40% en la captació d'AG de cadena llarga [64]. FATP5 s'expressa exclusivament en el fetge. Està implicada en el metabolisme lipídic, ja que la captació d'AG de cadena llarga disminueix en hepatòcits primaris aïllats de ratolins KO per FABP5 [65]. A més, en presència de dieta grassa, els ratolins KO baixen de pes i presenten millor sensibilitat a la insulina. També és l'única isoforma amb activitat àcid biliar-CoA sintetasa (BACS) [66]. Finalment, FATP6 s'expressa en el cor [67], on és la principal isoforma, i en la pell [68]. Es coneix poc sobre la seva funció. En cèl·lules en les quals es sobreexpressa FATP6, augmenta la captació d'AG de cadena llarga així com l'activitat ACS [67].

2.1.2. FABPs (Fatty acid binding proteins)

Un cop a l'interior de la cèl·lula, els AG s'uneixen a xaperones lipídiques intracel·lulars, també conegudes com a proteïnes d'unió a AG (*fatty acid binding protein*, FABP). Les FABPs són proteïnes citoplasmàtiques petites (14-15 kDa) que uneixen reversiblement lligands hidrofòbics amb alta afinitat, com AG de cadena llarga saturats i insaturats, eicosanoides i altres lípids. Es troben altament conservades evolutivament entre les espècies [69]. La funció principal de les FABPs és accelerar la captació dels AG, coordinant la resposta lipídica de les cèl·lules i transportant els AG a enzims i compartiments cel·lulars específics: als mitocondris i peroxisomes per a

l'oxidació, al RE per a la reesterificació, als *lipid droplets* per a l'emmagatzematge o al nucli per a la regulació de l'expressió gènica (Figura 3) [43,69,70]. Recentment s'ha vist que estan altament lligades a la regulació de vies de senyalització cel·lular relacionades amb processos inflamatoris i metabòlics, essent potencials dianes terapèutiques per al tractament de malalties associades, com l'obesitat, la diabetis o l'arteriosclerosi [71–73].

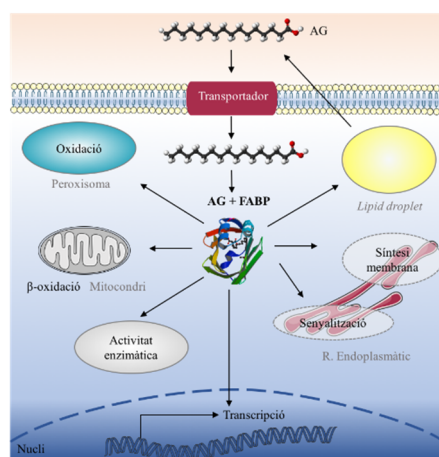


Figura 3. Funcions principals de les FABPs a la cèl·lula. Les FABPs transporten les molècules lipídiques als diferents compartiments cel·lulars. Adaptat de Furuhashi M. *et al. Nat. Rev. Drug Discov.* (2008).

2.1.2.1. Família i distribució tissular de les FABPs

Des del descobriment de les FABPs l'any 1972 [74], fins al moment, en mamífers s'han descobert 10 formes diferents. Inicialment, les FABPs es van anomenar en funció del teixit on s'expressaven majoritàriament o en aquell on van ser descobertes. Posteriorment, i donat que la majoria de FABPs s'expressen en més d'un teixit, es va introduir la nomenclatura numèrica, ja que l'anterior podia resultar confusa [75,76]. Així doncs, la família de les FABPs conté els següents membres: FABP1 (fetge), FABP2 (intestí), FABP3 (cor), FABP4 (adipòcit), FABP5 (epidermis), FABP6 (íleon), FABP7 (cervell),

FABP8 (mielina) i FABP9 (testicle). Recentment, s’ha identificat una nova isoforma, FABP12, tot i que a hores d’ara es desconeixen les propietats funcionals d’aquesta proteïna. Cal destacar que les FABPs són especialment abundants en aquells teixits implicats activament en el metabolisme lipídic i que presenten alta captació d’AG (Taula 3) [77].

Taula 3. Família de proteïnes transportadores d’AG (FABPs)

Gen	Teixit de referència	Noms alternatius	Expressió	Localització cromosòmica		
				<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Fabp1</i>	Fetge	L-FABP	Fetge, intestí, pàncreas, ronyó, pulmó, estómac	2p11	6 C1	4q32
<i>Fabp2</i>	Intestí	I-FABP	Intestí, fetge	4q28-q31	3 G1	2q42
<i>Fabp3</i>	Cor	H-FABP, MDGI	Cor, múscul esquelètic, cervell, ronyó, pulmó, estómac, testicle, aorta, glàndula adrenal, placenta, ovari, teixit adipós marró	1p32-33	4 D2.2	5q36
<i>Fabp4</i>	Adipós	A-FABP, AP2	Adipòcit, macròfag, cèl·lula dendrítica	8q21	3 A1	2q23
<i>Fabp5</i>	Epidermis	E-FABP, PA-FABP, mal1	Pell, llengua, adipòcit, macròfag, cèl·lula dendrítica, glàndula mamària, cervell, intestí, ronyó, fetge, pulmó, cor, múscul esquelètic, retina, melsa.	8q21.13	3 A1-3	2
<i>Fabp6</i>	Íleum	II-FABP, I-BABP	Íleum, ovari, glàndula adrenal, placenta	5q33.3-q34	11 B1.1	10q21
<i>Fabp7</i>	Cervell	B-FABP, MRG	Cervell, cèl·lula glial, retina, glàndula mamària	6q22-q23	10 B4	20q11
<i>Fabp8</i>	Mielina	M-FABP, PMP2	Sistema nerviós perifèric, cèl·lula de Schwann	8q21.3-q22.1	3 A1	2q23
<i>Fabp9</i>	Testicle	T-FABP	Testicle, glàndula salival, glàndula mamària	8q21.13	3 A2	2q23

Adaptat de Furuhashi M. *et al. Nat. Rev. Drug Discov.* (2008)

2.1.2.2. Estructura gènica i evolució molecular

Els gens que codifiquen per a la majoria de les FABPs han estat ben identificats i caracteritzats. Tots ells presenten una estructura gènica molt semblant, formada per 4 exons i 3 introns [78]. Tot i així, pel que fa a l'estructura primària de les proteïnes, la seqüència d'aminoàcids de les diferents isoformes només té una homologia d'entre el 15-70% [79–81].

En funció de l'anàlisi evolutiu i la seqüència d'aminoàcids, les FABPs es poden dividir en tres grups. Aquests grups reflecteixen l'especificitat del tipus de lligand que uneix cadascuna de les isoformes [43,81].

Grup 1: FABP1 i FABP6. Uneixen AG i altres lligands com colesterol, sals biliars i el grup hemo.

Grup 2: FABP3, FABP4, FABP5, FABP7, FABP8 i FABP9. Uneixen AG, retinoides i eicosanoides.

Grup 3: FABP2. Només uneix AG, però amb una conformació diferent de les altres FABPs (doblegat i no en forma de U) [82,83].

A diferència de l'estructura primària, l'estructura terciària és molt similar (**Figura 4**). Aquesta consisteix en 10 cadenes β antiparal·leles i dues α -hèlixs curtes. Les deu cadenes s'agrupen en dues fulles β de 5 cadenes cadascuna, les quals s'enfronten amb una orientació quasi perpendicular formant una cavitat central. Tot i que la cavitat central és 2-3 vegades més gran que el volum d'un AG, aquesta només pot unir un AG, excepte FABP1 que pot unir dos AG alhora [69,77]. Així mateix, també es creu que la proteïna ha de fer un canvi conformacional transitori perquè l'AG pugui entrar/sortir de la cavitat, ja que aquesta és bastant inaccessible (hipòtesi del portal) [84].

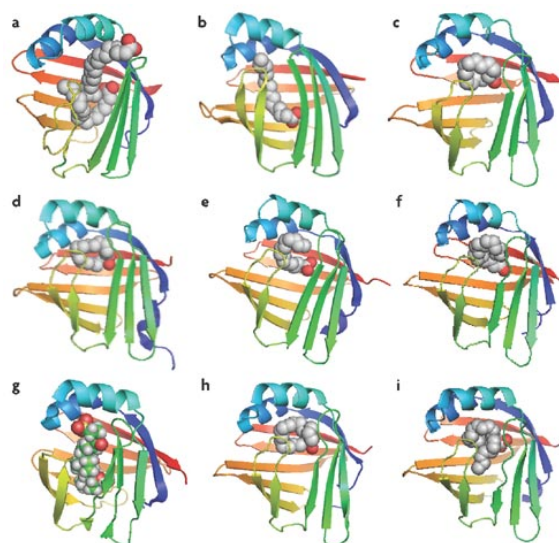


Figura 4. Estructures cristal·lines de les FABPs. a) FABP1 o hepàtica; b) FABP2 o intestinal; c) FABP3 o cardíaca; d) FABP4 o adipocitària; e) FABP5 o epidèrmica; f) FABP6 o ileal; g) FABP7 o del cervell; h) FABP8 o de mielina; i) FABP9 o testicular. Font: Furuhashi M. *et al. Nat. Rev. Drug Discov.* (2008)

2.1.2.3. Tipus de FABPs

FABP1

S'expressa principalment en fetge (representa el 5% del total de proteïnes citosòliques), però també en intestí, pàncrees, ronyó, pulmó i estómac [43]. La principal diferència respecte a les altres FABPs, com s'ha comentat anteriorment, és que pot unir dos lligands simultàniament [69,77]. Ratolins KO per FABP1 presenten un pes normal, així com nivells plasmàtics de TG i AG. En canvi, aquests animals presenten una disminució en la captació d'AG [85,86].

FABP2

S'expressa en l'intestí, majoritàriament en la secció distal. En l'intestí prim s'expressen dues FABPs més, FABP1 (regió proximal) i FABP6 (regió distal de l'intestí prim) [71]. Ratolins KO per FABP2 són viables i no tenen afectada la captació d'AG, ja que possiblement aquesta es produeix a través de FABP1 i FABP6 [87]. Tot i això, s'ha trobat un polimorfisme de FABP2 en humans que s'associa amb RI [88].

FABP3

S'ha aïllat de diversos teixits com el cor, el múscul esquelètic, el cervell, els pulmons, els testicles, l'artèria aorta, la glàndula suprarenal i mamària, la placenta, els ovaris i el teixit adipós marró. Els nivells de FABP3 es troben regulats per l'exercici físic, els agonistes del receptor activat per proliferadors del peroxisoma (PPAR) α i la testosterona, i oscil·len segons el cicle circadià. És essencial per a la β -oxidació en els cardiomiòcits i modula la captació d'AG en múscul esquelètic [71]. En ratolins deficients per FABP3 s'observa una inhibició en la captació d'AG, així com concentracions elevades d'AG lliures en plasma. Quan no hi ha suficient aportació d'AG, el metabolisme de cor i múscul passa a oxidar la glucosa, presentant tolerància reduïda a l'activitat física [89].

FABP4

S'expressa principalment en adipòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques. Representa, aproximadament, l'1% de les proteïnes citosòliques totals del teixit adipós [90]. Curiosament, la FABP4 ha estat recentment identificada com una nova adipocina que pot ser alliberada a la circulació, correlacionant amb diferents alteracions del metabolisme [90]. En el següent capítol es detallaran en profunditat les característiques de FABP4.

FABP5

S'expressa principalment en les cèl·lules epidèrmiques de la pell. També en altres teixits com la llengua, el teixit adipós, els macròfags, les cèl·lules dendrítiques, la glàndula mamària, el cervell, el ronyó, el fetge i els pulmons, entre d'altres. És difícil determinar la funcionalitat exacta de FABP5, a part del seu paper genèric com a transportador d'AG, ja que en tots aquests teixits s'expressen altres isoformes de FABPs. Es considera que pot tenir un paper complementari al de FABP4 en teixit adipós i macròfags. [91,92].

FABP6

S'expressa en l'íleum (part distal de l'intestí prim) i, en menor mesura, en l'ovari, la placenta i la glàndula adrenal. L'íleum juga un paper molt important en la circulació enterohepàtica dels àcids biliars (AB). Tot i que la contribució de FABP5 no és massa clara, presenta una afinitat molt alta pels AB. També uneix AG, però amb menor afinitat [92].

FABP7

Es troba present en el cervell, la cèl·lula glial, la retina i la glàndula mamària. S'expressa en diferents regions del cervell dels ratolins en l'estadi embrionàric i la seva expressió va disminuint durant el procés de diferenciació. Presenta una gran afinitat pels AG n-3 poliinsaturats, com el DHA, el qual és un important nutrient per al sistema nerviós i és considerat el seu principal lligand [93]. En condicions patològiques, FABP7 es troba sobreexpressada en pacients amb síndrome de Down [94] i esquizofrènia [95].

FABP8

És una de les proteïnes principals de la mielina del sistema nerviós perifèric. Les seves funcions es desconeixen. S'ha hipotetitzat que pot estabilitzar les membranes de mielina, aportant AG de cadena llarga i contribuint a la biogènesi de la membrana, ja que aquesta està formada per un 75-80% de lípids [92].

FABP9

FABP9 és un altre membre poc conegut de la família de les FABPs que s'expressa durant l'espermatogènesi, així com en els testicles. Se sap que la composició d'AG de l'esperma està relacionada amb la fertilitat, de manera que una de les possibles funcions de FABP9 és la de protegir els AG de l'esperma contra l'oxidació [96].

FABP12

FABP12 és l'últim i nou membre de les FABPs que ha estat identificat en humans, rata i ratolí. S'expressa en gran quantitat en la retina i els testicles, i en menor mesura en el còrtex cerebral, ronyó i epidídim de rata i ratolí [97]. Com s'ha comentat anteriorment, fins aleshores no es té informació sobre les propietats funcionals d'aquesta proteïna .

fabp10 i fabp11 són gens paral·lels de FABP1 i FABP3, respectivament, tot i que només s'expressen en el genoma d'ocells i peixos.

3

Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4)

Coneguda com a FABP4 o FABP adipocitària (A-FABP), es va detectar per primera vegada en adipòcits madurs i teixit adipós [98]. També s'anomena P2 adipocitària (aP2) degut a la seva gran similitud amb la seqüència de la proteïna P2 de mielina [99]. Els nivells de FABP4 augmenten significativament durant la diferenciació dels adipòcits. Per aquest motiu, s'utilitza freqüentment com a marcador de diferenciació [100]. Tot i expressar-se majoritàriament en els adipòcits, FABP4 també s'expressa en altres cèl·lules o teixits (**Figura 5**).

Macròfags: regula les mateixes funcions biològiques que en els adipòcits [101].

Cèl·lules endotelials: nivells elevats de FABP4 estan implicats en la disfunció endotelial, a través d'una disminució de la producció d'eNOS (òxid nítric sintasa endotelial) i NO (òxid nítric) [102].

Cèl·lules dendrítiques: FABP4 regula la via de senyalització de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) i l'activació (*priming*) de les cèl·lules T, les

quals poden contribuir en el desenvolupament de l'arteriosclerosi [103].

Placa d'ateroma: s'ha descrit que les plaques expressen nivells elevats de FABP4, tant en humans com en models murins [104].

Cèl·lules epitelials bronquials: FABP4 regula la resposta inflamatòria al·lèrgica de les vies respiratòries a través de les citocines interleucina 4 (IL4) i IL12, crucials per al desenvolupament de l'asma. En canvi, ratolins deficientes per FABP4 estan protegits contra l'asma [105].

Ovaris: FABP4 s'ha detectat en cèl·lules granuloses dels fol·licles antrals atrèsics d'ovari de ratolí [106]. A més, s'ha associat amb la síndrome d'ovari poliquístic (PCOS), el qual coexisteix freqüentment amb RI [107].

Tumors: s'ha detectat en tumors de mama [108], bufeta [109], pròstata [109], així com en lipoblastoma i liposarcoma [110], glioblastoma [111], carcinomes urotelials [112], entre d'altres.

Múscul esquelètic: recentment s'ha vist que s'expressa en les fibres musculars, però en menor mesura que la FABP3, la FABP dominant en múscul (ràtio mRNA FABP3: FABP4 és de 10:1) [113].

Plasma: Si bé és una proteïna majoritàriament intracel·lular, es detecta una fracció soluble en plasma. En plasma humà, en condicions fisiològiques, les concentracions de FABP4 oscil·len entre els 10 i els 60 ng/ml, concentracions comparables a altres adipocines [114].

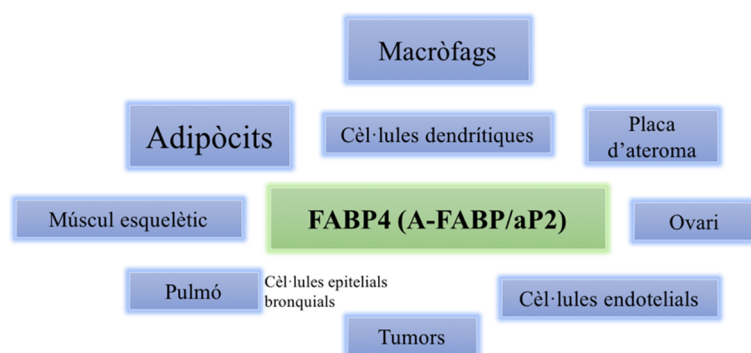


Figura 5. Expressió de FABP4. FABP4 (A-FABP/aP2) no només està present en adipòcits i macròfags, sinó que també s'expressa en altres teixits i tipus cel·lulars sota condicions fisiològiques i patofisiològiques. Aquesta pot contribuir en diferents aspectes de les malalties metabòliques i cardiovasculars, així com en malalties respiratòries i oncològiques.

3.1. Localització i regulació

El gen *FABP4*, en humans, es localitza en el cromosoma 8q21 i codifica per un polipèptid de 132 aminoàcids i un pes molecular de 14,6 kDa (*GenBank accession number* NM_024406) [92]. Està regulat transcripcionalment per diferents elements. Per una banda, té elements reguladors positius (AP-1, *activator protein 1*) i negatius (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*), amb una seqüència d'unió, *upstream* d'aquests elements, a C/EBP (CCAAT/*enhancer-binding protein*). A més, presenta cinc elements reguladors adipocitaris (d'ARE1 a ARE5). Finalment, també conté diferents elements de resposta als proliferadors del peroxisoma (PPRE), que fa que es reguli transcripcionalment per agonistes de PPAR γ , AG, dexametasona i insulina [92].

Els principals dominis funcionals de FABP4, així com els residus aminoacídics crítics, es troben representats en la Figura 6. Aquests inclouen la seqüència de senyalització de localització nuclear (*nuclear signal localization*,

NLS) i el seu lloc de regulació, la seqüència d'exportació nuclear (*nuclear export signal*, NES) i un lloc d'unió de la lipasa sensible a hormones (HSL). Cal destacar que tant la NLS com la NES no són identificables en l'estructura primària de la proteïna. En canvi, aquestes seqüències sí que es troben presents en l'estructura tridimensional [90].

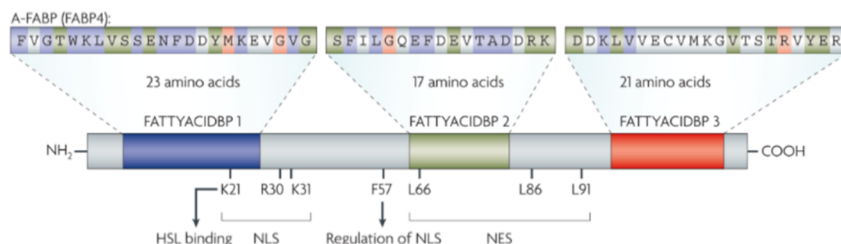


Figura 6. Distribució dels dominis funcionals de FABP4.

3.2. Funcions intracel·lulars de FABP4

3.2.1. Estudis *in vitro*

Una part dels estudis *in vitro* de les FABPs, i en concret de FABP4, s'han centrat en estudiar l'afinitat d'unió als diferents lligands. Com s'ha comentat anteriorment, una de les funcions de FABP4, i de les FABPs en general, és facilitar el transport dels AG als diferents compartiments cel·lulars (*Veure Figura 3*). L'anàlisi de l'estructura cristal·lina de FABP4 va demostrar que aquesta s'uneix a AG saturats i insaturats en la mateixa conformació i afinitat, tot i que la capacitat de FABP4 de transferir els AG a la membrana augmenta en funció de la llargada de la cadena de l'AG independentment del nombre de saturacions [115].

FABP4 pot regular la velocitat de lipòlisi de l'adipòcit, a través de la interacció amb HSL. Específicament, FABP4 interacciona amb aquesta hormona en els dominis D17, D18, K21 i R30, localitzats al domini helicoïdal [116]. Curiosament, l'activació d'HSL per FABP4 depèn de la unió als AG, ja

que en absència d'AG no es produeix aquesta interacció [117]. De fet, adipòcits KO per FABP4 presenten una lipòlisi disminuïda [116,118]. En l'estudi de Grimsrud *et al.* van observar que la FABP4 es troba carbonilada per la unió a molècules lípidiques modificades, com el 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producte final de l'oxidació de l'àcid araquidònic o el LA. El 4-HNE imita la conformació en la qual la proteïna es troba unida a l'AG, disminuint l'afinitat d'unió entre FABP4-AG [5]. La modificació de FABP4 per 4-HNE, com a conseqüència de l'obesitat, podria contribuir en el desenvolupament de la RI, a causa d'una alteració en l'activitat d'HSL [119]. Per tant, modificacions en l'estructura de FABP4 que afecten la interacció amb els AG delimiten la regulació de l'HSL i la lipòlisi.

D'altra banda, la unió de FABP4 a l'AG provoca un canvi conformacional en l'estructura de FABP4, quedant exposat el residu Tyr19 i sent fosforilat per l'acció de la tirosina cinasa de la insulina. La fosforilació bloqueja l'alliberament de l'AG ja unit a FABP4, fet relacionat amb l'acció antilipolítica de la insulina [120].

FABP4, en determinats casos, pot actuar com a regulador transcripcional, translocant-se al nucli per tal de regular la funció de determinats factors de transcripció, concretament de PPAR γ [121]. Tot i que FABP4 pot unir diferents tipus de lligands, només es mobilitza al nucli en resposta a lligands activadors de PPAR γ . Quan els lligands no són agonistes de PPAR γ , com l'OA o l'EA, la NLS no és estable [90,122]. Un cop activat, PPAR γ regula la diferenciació de l'adipòcit, la sensibilitat a la insulina i la funció dels macròfags [123,124].

D'aquesta manera, FABP4 pot regular la diferenciació de monòcit a macròfag, regulant les mateixes funcions biològiques que en els adipòcits: acumulació de lípids, secreció de citocines i expressió de gens involucrats en

el metabolisme lipídic i la inflamació. En els macròfags, FABP4 augmenta l'acumulació d'èsters de colesterol i la formació de cèl·lules escumoses, ja que indueix la resposta proinflamatòria a través de l'activació de les vies de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*)-AP1 i IKK (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*)-NF-κB [125,126]. En canvi, la deficiència de FABP4 en macròfags s'acompanya d'un increment de l'eflux de colesterol i una disminució de la inflamació. Per tant, l'expressió de FABP4 en macròfags té un paper important en la formació de la cèl·lula escumosa i la inflamació, processos clau en el desenvolupament de la placa d'ateroma [127].

3.2.2. Estudis *in vivo*

La utilització d'animals modificats genèticament, que confereixen un guany o pèrdua de funció de FABP4, han permès caracteritzar la funció d'aquesta molècula [71].

Un dels primers models de ratolins generats va ser el KO per FABP4 (*Fabp4*^{-/-}) [128]. Inicialment, la informació aportada per aquest model va ser limitada, ja que no presentava cap fenotip destacable sota condicions estàndard de laboratori, possiblement degut a una sobrerregulació compensatòria de FABP5 en teixit adipós [128]. En canvi, en situació d'obesitat, induïda per la dieta o per modificacions genètiques, la deficiència de FABP4 protegeix enfront de la RI i la hiperglucèmia, ja que l'efecte regulador de FABP5 no és suficient per emmascarar la deficiència de FABP4 [129].

Els ratolins *Fabp4*^{-/-} presenten la lipòlisi reduïda, ja que, probablement, FABP4 modula l'acció d'HSL [130,131], i la lipogènesi augmentada, així com la secreció d'insulina mitigada en resposta a estímuls β-adrenèrgics. Això suggereix que FABP4 o un senyal lipídic regulat per aquesta poden estar

implicats en la modulació de la secreció d'insulina [118,132]. La formació del teixit adipós no es veu afectada en els ratolins, tot i que FABP4 es troba augmentada en el procés de diferenciació dels adipòcits [133].

Per tal d'entendre el paper de FABP4 en absència de la funció compensatòria de FABP5, es van obtenir ratolins doble KO (*Fabp4-5^{-/-}*) [133]. Els ratolins *Fabp5^{-/-}*, per ells mateixos, estan moderadament protegits contra l'obesitat i la RI induïda per la dieta. Així mateix, la sobreexpressió de FABP5 disminueix la tolerància a la glucosa [134]. Per tant, els ratolins *Fabp4-5^{-/-}* presenten sensibilitat a la insulina augmentada i un millor control de l'homeòstasi de la glucosa, respecte els models KO per FABP4 o FABP5. A més, aquests animals estan protegits contra l'esteatosi hepàtica induïda per una dieta rica en greixos (HFD, *high fat diet*) [133] i presenten la lipogènesi *de novo* augmentada. En conseqüència, aquests animals presenten un increment dels nivells de palmitoleat (PO) circulant, fet relacionat amb la supressió de l'expressió de *Scd1* en fetge i un augment de la sensibilitat a la insulina [135]. En macròfags deficients per FABP4 també s'observa un augment en la lipogènesi *de novo*, provocant un increment dels nivells de PO circulant [136].

En el model de ratolí *ob/ob* (deficient en leptina), la deficiència combinada de FABP4 i FABP5 no redueix l'obesitat, però sí que millora la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina. Així mateix, tenen una expressió baixa de *Scd1* i estan protegits contra el desenvolupament del fetge gras [137].

En la següent taula (Taula 3) es resumeixen els principals trets característics que presenten els models transgènics comentats anteriorment.

Taula 3. Característiques del models de ratolí *knockout* per FABP4 i FABP5.

	Dieta	Pes	Glu.	Ins.	FFA	TG	Col.	Sens. Ins.
<i>Fabp4</i> ^{-/-}	STD	=	=	=	↑	↑	=	=
	HFD	↑	↓	↓	↑	↓	=	↑↑
<i>Fabp4-5</i> ^{-/-}	STD	↓	↓	=	↑	=	=	↑
	HFD	↓	↓	↓	↑	=	=	↑↑↑
<i>Fabp4-5</i> ^{-/-} <i>ob/ob</i>	STD	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑↑↑

FABP4: FABP adipocitària, A-FABP; FABP5: FABP epidèrmica, E-FABP. Glu: glucosa; Ins: insulina; FFA: àcids grassos lliures (*free fatty acid*); TG: triglicèrids; Col: colesterol; Sens. Ins: sensibilitat a la insulina. (↑) Augment, (↓) disminució o (=) no modificació *vs.* grup control. Adaptat de Furuhashi *et al.* *Nature Reviews* (2008).

3.3. Funcions extracel·lulars de FABP4

3.3.1. Secreció de FABP4 circulant

Tot i que FABP4, tradicionalment, s’ha descrit com una proteïna citosòlica, recentment s’ha proposat com una nova adipocina, juntament amb la leptina i l’adiponectina, entre d’altres, les quals també es produeixen i s’alliberen des dels adipòcits [138].

La primera evidència de FABP4 com a proteïna circulant es va publicar l’any 2006 [114]. Des d’aleshores, s’han realitzat múltiples estudis per tal d’investigar la regulació i el valor predictiu de FABP4 circulant. Tot i això, els mecanismes a través dels quals FABP4 arriba a la circulació no estan clars. FABP4 no presenta en l’extrem N-terminal la seqüència de senyalització de secreció necessària per ser alliberada per la via clàssica (via dependent de RE-

Golgi) [139]. Per aquest motiu, inicialment es va pensar que la FABP4 present en el plasma provenia de cèl·lules mortes com, per exemple, dels adipòcits [140]. Aquesta teoria estaria relacionada amb el fet que FABP4 circulant correlaciona positivament amb mesures d'adipositat, com l'IMC o el percentatge de greix corporal [114]. En canvi, posteriorment, es van trobar evidències que suggerien un mecanisme de secreció regulat en absència de dany cel·lular. Mentre que en els lisats cel·lulars d'adipòcits 3T3-L1 hi havia FABP4 i β -tubulina, en el medi extracel·lular només hi havia presència de FABP4 [114]. Estudis més recents han evidenciat que la FABP4 se secreta activament per una via no clàssica dependent de calci [141] en resposta a l'activitat lipolítica i la disponibilitat d'AG lliures [142,143]. En l'estudi de Schlottmann *et al.* van demostrar que en adipòcits diferenciats humans, tot i bloquejar la via secretora clàssica, la secreció de FABP4 no es trobava afectada. Així mateix, la secreció de FABP4 augmentava significativament després del tractament amb ionomicina, un ionòfor que augmenta els nivells de calci intracel·lular [141]. En un altre estudi, Ertunc *et al.* van demostrar que l'activitat lipasa d'ATGL (*adipose triglyceride lipase*) i, en menor mesura, d'HSL estaven involucrades en la secreció de FABP4, ja que la delecció genètica o la inhibició química d'aquests enzims disminuïa dràsticament la secreció de FABP4 en els adipòcits [143]. L'estimulació lipolítica també indueix la relocalització de FABP4 en cossos multivesiculars. Un cop secretada, la majoria de FABP4 és detectada de forma lliure en circulació, tot i que una petita fracció roman en vesícules [143]. Per tant, això confirma que la secreció de FABP4 es troba regulada per una via no clàssica.

3.3.2. FABP4 circulant i patologia metabòlica

Des de la seva detecció en plasma, s'ha observat que els nivells circulants de FABP4 estan significativament elevats en presència de sobrepès

o obesitat respecte al normopès, tant en població adulta com infantil [114]. Estudis d'intervenció en població infantil [144] i adulta [145] amb obesitat han demostrat que un canvi en el pes corporal produeix variacions en els nivells de FABP4 circulant. Per tant, actuacions sobre la dieta [146,147], l'activitat física [146,148] o, en el cas d'obesitat mòrbida, la cirurgia bariàtrica [149], són determinants per disminuir els nivells circulants de FABP4.

Els nivells circulants de FABP4 presenten dimorfisme sexual, ja que són més elevats en dones que en homes [150]. Aquesta diferència entre gèneres podria ser conseqüència de la diferent distribució de greix corporal existent entre els dos sexes. Les dones presenten més volum de greix subcutani que els homes, que en posseeixen més de visceral (abdominal). Aquest fet reflectiria l'expressió diferencial de FABP4 existent entre les diferents localitzacions del teixit adipós: l'expressió de FABP4 és més elevada en el teixit adipós subcutani, mentre que al teixit adipós visceral, l'expressió majoritària és la de FABP5 [151]. Aquesta expressió diferencial es relaciona amb diferents estats de lipòlisi basal [152].

A més de l'obesitat i la distribució del greix corporal, diferents estudis transversals han demostrat que la FABP4 circulant s'associa de forma positiva i independent amb altres marcadors de síndrome metabòlica (SM) i altres variables relacionades amb obesitat, com són la RI, la DT2, la disfunció cardíaca, la hipertensió i l'arteriosclerosi.

La SM és considerada el principal factor de risc per al desenvolupament de DT2 i malaltia cardiovascular. Aquesta es defineix com un clúster d'anormalitats metabòliques, les quals inclouen: (1) **Obesitat abdominal**: perímetre abdominal >88 cm en dones i >102 cm en homes. (2) **Nivells de TG**: ≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l). (3) **Colesterol HDL (*high-density lipoprotein*)**: <50 mg/dl (1.29 mmol/l) en dones i < 40 mg/dl (1.03 mmol/l) en

homes. (4) **Hiperglicèmia**: Nivells de glucosa ≥ 110 mg/dl. (5) **Hipertensió arterial**: pressió arterial $\geq 130/85$ mmHg. El criteri diagnòstic de la SM consisteix a presentar 3 o més dels components anteriors [153].

Xu *et al.* van trobar que els nivells de FABP4 augmentaven amb el nombre de components de la SM, tant en homes com en dones, en una població d'individus no diabètics [114,154]. En estudis realitzats pel nostre grup, en població general amb DT2 [155] i amb VIH (virus de la immunodeficiència humana) [156] es va observar una associació positiva entre els nivells de FABP4 i el nombre de components de la SM, confirmant els resultats de Xu *et al.* [114,154].

FABP4 també s'associa amb la dislipèmia aterogènica. En pacients amb DT2, nivells circulants de FABP4 elevats s'associen positivament amb els nivells de TG i inversament amb el colesterol HDL i ApoA1 (*Apolipoprotein A1*), independentment de l'obesitat i la RI [157]. Aquests nivells elevats de FABP4 circulant també es relacionen amb un empitjorament de la disfunció endotelial, un factor clau en el desenvolupament de l'arteriosclerosi [158], així com amb una elevada taxa de mortalitat per malalties cardiovasculars en homes amb DT2 [159]. Pel que fa al grup de població amb hiperlipèmia familiar combinada (HFC), el qual també presenta característiques clíniques de dislipèmia aterogènica, té nivells de FABP4 circulant elevats respecte la població sana [160].

Altres estudis han observat nivells circulants de FABP4 elevats en la síndrome d'apnea obstructiva del son [161] i en càncer de mama [162].

Finalment, dues anàlisis genètiques independents han mostrat que persones amb una variant genètica al promotor de FABP4 (-87T>C; rs77878271), la qual provoca una disminució dels nivells de FABP4, estan

protegides contra la DT2 i les malalties cardiovasculars [163,164]. Tanmateix, en un estudi del nostre grup, es va analitzar l'impacte de diferents polimorfismes de *FABP4* sobre la concentració plasmàtica de FABP4, així com l'associació amb l'obesitat, la DT2 i el gruix de l'íntima-mitja carotídia (cIMT). Cap de les variants genètiques estudiades s'ha associat amb la concentració de FABP4 [165]. Per tant, les concentracions circulants de FABP4 poden estar determinades per variants genètiques [163,164] i per condicions adquirides, com la massa grassa i la disfunció del teixit adipós [165].

3.3.3. Efectes perifèrics de FABP4

Fins al moment existeixen diferents publicacions que han evidenciat un efecte directe de FABP4 sobre diferents teixits perifèrics. Estudis del nostre grup van demostrar que la FABP4 exògena induïa la proliferació i la migració de cèl·lules muscular llises en artèries coronàries [166], i també inhibia l'expressió d'eNOS en cèl·lules endotelials [167], contribuint en la disfunció de l'endoteli. Aquests efectes podrien ser deguts a la interacció amb citoqueratina 1 (CK1) a la membrana de les cèl·lules endotelials. A més, FABP4 travessa la membrana plasmàtica per entrar al citoplasma i al nucli. La inhibició farmacològica amb l'inhibidor de FABP4 BMS309403 disminueix la formació dels complexos FABP4–CK1, suggerint que aquesta interacció amb la membrana està mediada per AG [168].

Lamounier-Zepter *et al.* també van observar que la FABP4 suprimia la contracció dels cardiomiòcits *in vitro* [169]. L'activitat de FABP4 sobre la funció dels cardiomiòcits es potenciava en presència d'eicosanoides, recolzant el fet que els lligands de FABP4 poden modular la seva funció [169]. Així mateix, com ja s'ha comentat anteriorment, FABP4 i, en general, les FABPs regulen la producció de lípids, els quals tenen efectes sobre els

cardiomiòcits. Per tant, és molt probable que les FABPs exerceixin efectes directes i indirectes sobre les funcions cardíques [170].

Aquestes evidències, juntament amb el fet comentat anteriorment que FABP4 circulant interactua amb cèl·lules perifèriques i produeix canvis biològics a través de la unió a la membrana i internalització, suggereixen un paper causal de la FABP4 en diferents processos patològics. Per tant, FABP4 no només és un potent biomarcador, sinó que també juga un paper molt important com adipocina, contribuint en el desenvolupament de la SM i les malalties cardiovasculars. Això implica que la inhibició o neutralització de FABP4 pot suposar una estratègia terapèutica efectiva contra el tractament d'aquestes malalties (Figura 7).

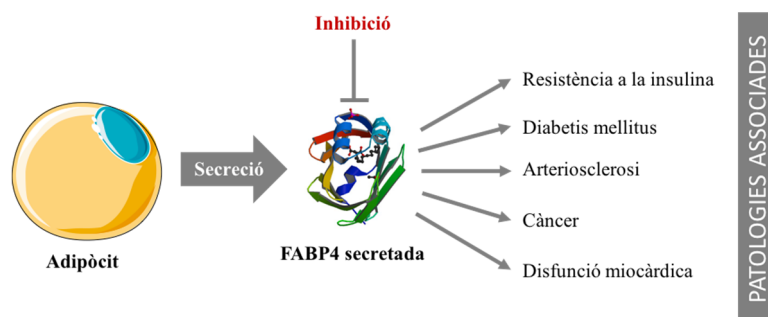


Figura 7. Accions de FABP4 circulant. FABP4 és secretada pels adipòcits i pot contribuir al desenvolupament de diferents patologies metabòliques i cardiovasculars. La inhibició de FABP4 pot suposar una possible estratègia terapèutica contra aquestes malalties.

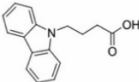
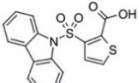
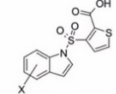
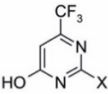
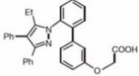
3.4. Inhibidors de FABP4

3.4.1. Inhibidors sintètics

Donades les evidències que recolzen que la pèrdua de funció de FABP4 confereix efectes protectors enfront d'alteracions metabòliques, en els darrers

anys s’han dut a terme diverses estratègies de rastreig amb la finalitat de trobar i desenvolupar petites molècules inhibidores de FABP4 com a agents terapèutics [171,172]. La inhibició farmacològica de FABP4 té com a objectiu prevenir i tractar aquelles alteracions metabòliques relacionades amb aquesta molècula, com l’obesitat, la RI, la DT2 i l’arteriosclerosi, entre d’altres. Aquests estudis cerquen molècules que interaccionen amb FABP4 de manera similar a com ho realitzaria un AG, evitant la unió i la interacció amb altres proteïnes com, per exemple, l’HSL. Alguns dels components actius que s’han descobert recentment es troben representats en la **Taula 4**. Tot i això, l’inhibidor més potent desenvolupat fins al moment és el BMS309403 [173,174].

Taula 4. Inhibidors sintètics de FABP4.

Estructura	Nom Compost	Grup X	IC ₅₀ (µM)				Ref
			FABP4	FABP3	FABP5	FABP2	
	1	-	0.57	<0.6	6.7	>100	[107]
	2	-	1.1	9.9	9.1	42	[107]
	3a	3-Me	1.5	-	-	-	[107]
	3b	6-Me	1.3	-	-	-	
	3c	5-Br	1.3	9.8	14	3.9	
	4a		1	-	-	-	[108]
	4b		0.6	17	-	-	
	4c		3.9	>100	-	-	
	4d		2.9	>100	-	-	
	4e		4.0	>100	-	-	
	4f		24	>100	-	-	
	5 (BMS309403)	-	<2*	250*	350*	-	[42] [109]

*Pel compost 5, els valors són per la K_i (nM)². FABP4: FABP adipocitària, A-FABP; FABP3: FABP de cor, H-FABP; FABP5: FABP epidèrmica, E-FABP; FABP2: FABP intestinal, I-FABP. Adaptat de Furuhashi *et al. Nature Reviews* (2008).

3.4.1.1. BMS309403

El BMS309403 (azol bifenil aromàtic) és un inhibidor molt potent i selectiu de FABP4, dissenyat racionalment [72]. Aquest interactua amb la cavitat d'unió d'AG localitzada a l'interior de la proteïna, inhibint competitivament la unió dels AG (Figura 8). També inhibeix la FABP3 (cardíaca, muscular) i la FABP5 (epidèrmica), però amb menor eficiència. La constant d'inhibició (K_i) del BMS309403 per FABP4 és de <2nM, mentre que per FABP3 i FABP5 és de 250 nM i 350 nM, respectivament. L'alta afinitat i selectivitat del BMS309403 per la FABP4 es deu a interaccions específiques d'aquesta molècula amb residus clau de la cavitat de FABP4, com Ser53, Arg106, Arg126 i Tyr128 [175].

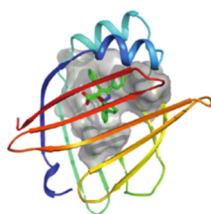


Figura 8. Estructura cristal·lina del BMS309403 unit a la FABP4 humana. L'inhibidor ocupa la cavitat interna de la proteïna. La zona marcada en gris és on es produeix la interacció. Font: Furuhashi *et al. Nature Reviews* (2008).

² **IC50 (concentració inhibidora mitjana):** concentració d'un fàrmac requerida per aconseguir una inhibició d'una funció biològica en particular del 50% *in vitro*. **K_i (contant d'inhibició):** Afinitat d'unió de l'inhibidor.

En cèl·lules THP-1 van demostrar que el BMS309403 disminuïa la transformació dels macròfags a cèl·lules escumoses. A més, el tractament amb BMS309403 augmentava l'eflux del colesterol, lligat a un increment dels nivells d'ABCA1 (*ATP-Binding Cassette transporter*, transportador dependent de la unió d'ATP), un mediador crític implicat en l'homeòstasi del colesterol [72]. En miotubs C2C12, el BMS309403 va augmentar la captació de glucosa, com a conseqüència de l'activació d'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) [176]. El BMS309403 també va millorar la funció endotelial, augmentant la fosforilació d'eNOS, la producció de NO i la relaxació dependent d'endoteli [102].

L'inhibidor de FABP4 millora el metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina en models genètics de ratolí d'obesitat i diabetis. En aquests models, l'expressió de marcadors inflamatoris associats a l'obesitat, així com la infiltració de greix en el fetge, es troben disminuïts [72]. A més, atenua l'activació de JNK, crucial en la resposta inflamatòria i en la inhibició de l'acció de la insulina [177].

3.4.2. Teràpies biològiques

En els últims anys, s'han desenvolupat estratègies de teràpia gènica, dirigides a silenciar aquesta molècula. Won *et al.* van dissenyar un RNA d'interferència dirigit contra la FABP4 del teixit adipós. Aquesta aproximació va aconseguir reduir el pes corporal (>20%) dels ratolins obesos i va millorar el metabolisme sistèmic [178]. Més recentment, Burak *et al.* van produir i avaluar diferents anticossos monoclonals anti-FABP4. Van identificar un potencial candidat, el CA33, el qual disminuïa els nivells de glucosa en dejú, millorava el metabolisme de la glucosa, augmentava la sensibilitat a la insulina sistèmica i reduïa l'esteatosi hepàtica en dos models independents d'obesitat (genètica i induïda per la dieta) [179].

3.4.3. Elements dietètics

A part dels inhibidors sintètics, Qin *et al.* van determinar que l'extracte de canyella podria constituir un inhibidor natural de FABP4. En un estudi amb rates, aquest extracte reduïa els nivells plasmàtics de FABP4 i millorava la sensibilitat a la insulina sistèmica i la dislipèmia, potenciant de la via de senyalització de la insulina [180]. En un altre estudi més recent, es va veure que el cafè reduïa l'acumulació de lípids durant la diferenciació adipocitària, reduïa l'expressió de PPAR γ i d'altres marcadors de diferenciació, com la FABP4, l'adiponectina, GLUT4 o la LPL (*lipoprotein lipase*) en cèl·lules 3T3-L1 [181].

Tot i que els estudis realitzats en animals d'experimentació han estat molt eficaços i prometedors, fins al moment l'ús d'aquests inhibidors no s'ha pogut traslladar a l'ús clínic. La realització d'estudis que permetin avaluar si la inhibició química de FABP4 (o qualsevol altres tipus de neutralització) es poden utilitzar de manera segura en humans és necessària. Així mateix, es necessiten més evidències sobre la seva eficàcia en el tractament de malalties metabòliques i cardiovasculars, així com en altres malalties, com pot ser l'asma o el càncer.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

4

Estrès del reticle endoplasmàtic i FABP4

El RE és un orgànul cel·lular present en les cèl·lules eucariotes. Està format per una estructura membranosa ramificada formada per túbuls i sacs aplanats, interconnectats entre ells a través del lumen del RE. Les funcions principals del RE són la síntesi, el plegament i la maduració estructural de les proteïnes [182]. Altres funcions del RE són l'emmagatzematge de calci i la biosíntesi de lípids [183]. De fet, molts enzims i proteïnes reguladores que intervenen en el metabolisme de lípids resideixen en el RE [184].

Les proteïnes són sintetitzades als ribosomes i, a través d'una seqüència de senyalització a l'extrem N-terminal, són dirigides al lumen del RE, on es produeix el plegament tridimensional i les corresponents modificacions postraduccionals, com glucosilacions o formació de ponts disulfur [185]. Aquests processos són catalitzats per múltiples enzims, com

xaperones³, glucosidases i oxidoreductases [186,187]. La cèl·lula ha d'invertir gran quantitat d'energia en mantenir les condicions òptimes en el RE (nivells elevats de calci i potencial redox que mantingui un entorn oxidant) per tal d'assegurar la maduració i el bon plegament de les proteïnes [187,188]. Malgrat això, la taxa d'èxit del plegament és inferior al 20%. Les proteïnes que estan desplegadas o mal plegades, a través d'un mecanisme anomenat ERAD (*ER-associated degradation*), són trasllades al citosol, on són ubiquitinades i degradades pel proteosoma 26S. Així doncs, el RE exerceix un estricte control de qualitat sobre les proteïnes fabricades per la via secretora [189].

4.1. Estrès del RE i resposta a proteïnes mal plegades

Diferents estímuls, com la hipòxia, l'estrès oxidatiu, mutacions puntuals en les proteïnes secretades, alguns lípids o patògens, entre d'altres, són capaços d'alterar l'homeòstasi del RE. Això afecta la capacitat de plegament de les proteïnes, provocant una acumulació de proteïnes mal plegades que resulten perjudicials per a la supervivència de la cèl·lula. A la incapacitat de la cèl·lula per plegar i secretar proteïnes eficientment se la denomina estrès del RE [190]. En resposta a l'estrès del RE, el RE activa unes vies de senyalització conegudes com a resposta a proteïnes mal plegades (UPR, *unfolded protein response*). L'objectiu de la UPR és (1) augmentar l'expressió de xaperones del RE per millorar la capacitat de plegament, (2) disminuir la síntesi de proteïnes per reduir l'influx de proteïnes naixents i (3)

³ *Xaperona*: proteïna present en tots els tipus cel·lulars, la qual s'uneix a proteïnes acabades de formar per ajudar en el plegament, l'assemblatge i el transport cel·lular d'aquestes.

degradar les proteïnes mal plegades a través del mecanisme ERAD [191]. Si l'estrès del RE és molt sever o crònic, s'indueixen vies de senyalització de mort cel·lular programada. En aquests casos, l'apoptosi associada a l'estrès del RE crònic pot contribuir a processos fisiopatològics involucrats en diferents malalties, com la DT2, l'arteriosclerosi o la malaltia renal [192,193].

La UPR està formada per tres sensors proteics ubicats a la membrana del RE: IRE1 (*inositol- requiring kinase 1*), PERK (*pancreatic ER eIF2a kinase*) i ATF6 (*activating transcription factor 6*). Aquestes proteïnes estan regulades negativament per la xaperona BiP (*immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*), també coneguda com a GRP78 (78 kDa *Glucose-regulated protein*). En canvi, en situació d'estrès del RE, BiP es dissocia de les proteïnes transmembrana i s'uneix a les proteïnes mal plegades, desencadenant la UPR (Figura 9) [194,195].

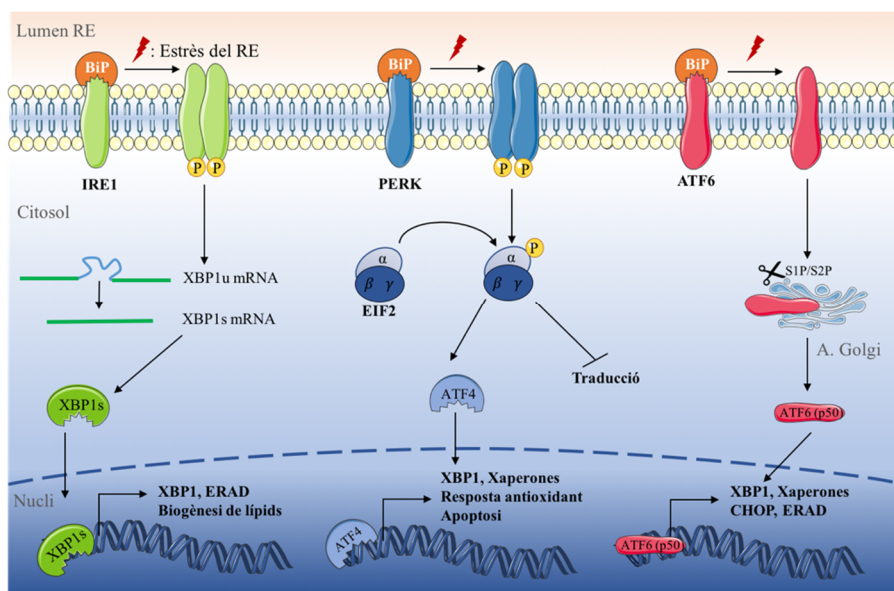


Figura 9. Vies de senyalització implicades en la resposta a proteïnes mal plegades (UPR).

IRE1

IRE1 regula la via de senyalització més conservada de la UPR. IRE1 és una proteïna transmembrana formada per un domini luminal, sensor del plegament de les proteïnes, i un domini citoplasmàtic, que presenta activitat serina/treonina cinasa i activitat endoribonucleasa (RNasa). En mamífers hi ha dos gens *IRE1*, *IRE1α* i *IRE1β*, els quals difereixen en els patrons d'expressió. Mentre que *IRE1α* s'expressa ubiquament, *IRE1β* només s'expressa en l'epiteli intestinal [196]. En condicions d'estrès del RE, *IRE1α* es dissocia de BiP, formant homodímers i oligòmers. L'activació d' *IRE1α* provoca la seva trans-autofosforilació en el residu serina 724 i l'activació de les activitats cinasa i RNasa [197]. L'activació del domini RNasa fa que es produeixi l'*splicing* alternatiu del gen que codifica per a la proteïna XBP1 (*X-box DNA-binding protein 1*), provocant l'eliminació d'una seqüència de 26 nucleòtids del mRNA d'XBP1. A diferència de la proteïna XBP1 no processada (XBP1u, *unspliced* XBP1), que es degrada ràpidament, la proteïna processada (XBP1s, *spliced* XBP1) és un potent factor de transcripció que es transloca al nucli i augmenta la transcripció de xaperones, així com de gens relacionats amb la biogènesi del RE, l'ERAD, el metabolisme lipídic i la inflamació [198].

PERK

PERK és una proteïna transmembrana amb un domini luminal que actua com a sensor del plegament de les proteïnes, i un domini citosòlic amb activitat cinasa. De la mateixa manera que *IRE1α*, en presència de proteïnes mal plegades en el RE, es produeix l'homodimerització i la trans-autofosforilació d'un gran nombre de residus del domini cinasa de PERK [199]. En conseqüència, PERK fosforila la serina 51 de la subunitat α del factor d'iniciació de la traducció eucariòtica 2 α (EIF2 α , *eukaryotic translational*

initiation factor 2 α), inhibint l'activitat d'eIF2 α i disminuint la velocitat de traducció de les proteïnes. D'aquesta manera es dona més temps a la cèl·lula per restablir el plegament correcte de les proteïnes presents al lumen del RE. D'altra banda, la fosforilació d'EIF2 α indueix la traducció del factor de transcripció ATF4 (*activating transcription factor 4*), el qual augmenta la transcripció de gens relacionats amb el metabolisme dels aminoàcids, el plegament de proteïnes, l'equilibri redox i l'autofàgia. Una altra diana d'ATF4 és el factor proapoptòtic CHOP (*C/EBP-homologous protein*), el qual activa altres gens, com GADD34 (*growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34*) [200]. Aquest gen regula negativament la via d'eIF2 α , ja que s'uneix amb la proteïna fosfatasa 1 (PP1), desfosforilant eIF2 α i evitant la repressió traduccional de la cèl·lula [201]. Malgrat que una pausa temporal en la traducció de les proteïnes pot ser beneficiosa per a les cèl·lules sota condicions d'estrès del RE, un bloqueig perllongat de la traducció compromet la supervivència cel·lular [202,203].

ATF6

ATF6, a diferència de IRE1 i PERK, està formada per un domini luminal, que actua com a sensor de les alteracions del RE, i un domini citoplasmàtic amb un factor de transcripció bZIP (*basic leucine zipper-containing*). En els mamífers hi ha dos gens *ATF6*, *ATF6 α* i *ATF6 β* , tot i que només *ATF6 α* senyalitza per a gens implicats en la UPR. Un cop *ATF6 α* s'allibera de la xaperona BiP, aquesta es transloca a l'aparell de Golgi, on és seqüencialment tallada per les proteases S1P i S2P (*Site-1* i *Site-2 proteases*). El procés seqüencial de proteòlisi, conegut com a proteòlisi intramembranal regulada (RIP, *regulated intramembranal proteolysis*), condueix a l'alliberació del fragment citosòlic d'*ATF6 α* , el qual migra al nucli, on actua com un potent factor de transcripció regulant l'expressió de xaperones lípidiques, com *BiP*

o *GRP94*, i gens relacionats amb el mecanisme ERAD. *ATF6α* és imprescindible per a l'òptim plegament, modificació i secreció de les proteïnes en resposta a l'estrès del RE [204].

4.2. Estrès del reticle endoplasmàtic i inflamació

El vincle entre l'estrès del RE i la inflamació és un potencial contribuïdor en la patogènesi i/o la progressió de diferents malalties relacionades amb el metabolisme [205]. En condicions normals, les proteïnes són processades a través del RE. Tanmateix, les pertorbacions que es produeixen en l'homeòstasi del RE impactaran directament en la viabilitat i funcionalitat cel·lular, de manera que qualsevol canvi en el trànsit de proteïnes pot conduir a l'activació crònica i severa de la UPR induïda per l'estrès del RE. Aquesta activació crònica, a la llarga, pot causar inflamació i mort cel·lular [206].

4.2.1. Vies implicades en l'estrès del RE i la inflamació

Diferents estudis suggereixen que les tres vies principals de la UPR i la inflamació estan interconnectades entre elles a través de diversos mecanismes, els quals veurem a continuació (**Figura 10**) [205].

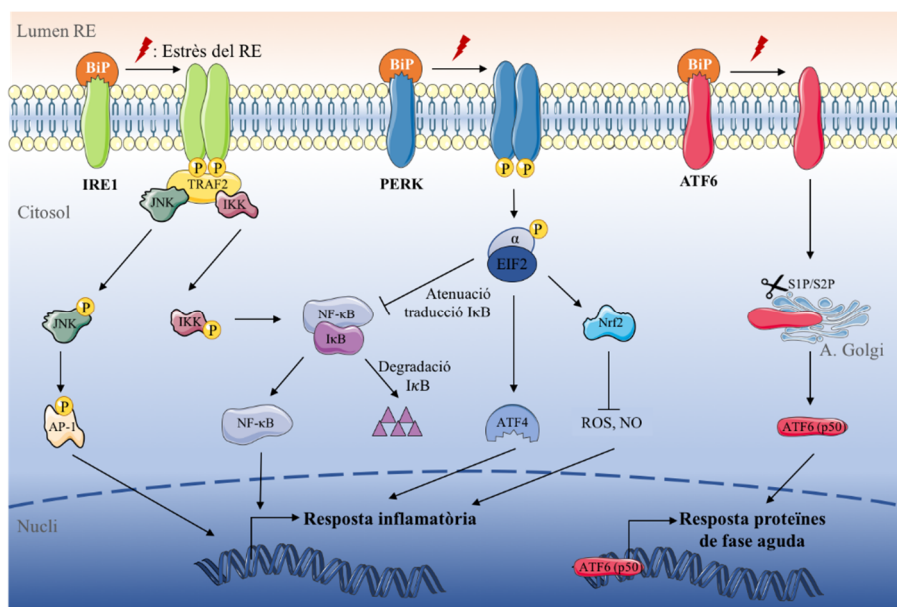


Figura 10. Vies de senyalització implicades en l'activació de la resposta inflamatòria induïda per l'estrès del RE.

Acumulació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS)

L'estrès crònic de RE i la UPR provoquen l'acumulació de ROS en la cèl·lula [207]. Això és degut a un increment de les xaperones Ero1p (*ER oxidoreductin 1*) i PDI (*protein disulphide isomerase*), les quals es produeixen en resposta a l'activació de la UPR i amb l'objectiu d'augmentar el plegament proteic. Aquestes xaperones utilitzen reaccions d'oxidació/reducció per a la formació dels ponts disulfur, utilitzant l'oxigen molecular com a receptor final de l'electró i, en conseqüència, provocant una acumulació d'oxigen molecular reduït. La UPR, a través de PERK-NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), pot activar un mecanisme antioxidant per neutralitzar l'augment d'aquestes espècies tòxiques. Ara bé, malgrat aquesta mesura protectora, una activació prolongada de la UPR produeix nivells elevats de ROS, els quals també provoquen una resposta inflamatòria [208].

Activació d'AP-1

AP-1 és un altre factor de transcripció que pot activar la resposta inflamatòria. En situació d'estrès del RE, l'activació d'aquest factor de transcripció únicament es produeix per la via d'IRE1. El complex IRE1 α -TRAF2 (*tumor-necrosis factor- α -receptor-associated factor 2*) activa la proteïna cinasa JNK, conduint, alhora, a l'activació d'AP-1. AP-1 és un dímer format per monòmers de proteïnes de diferents famílies (JUN, FOS, ATF i MAF), les quals interaccionen entre elles per formar diferents combinacions d'homo/hetero-dímers d'AP-1. En funció de la combinació d'AP-1, aquest regularà uns gens o altres, com TNF (*factor de necrosi tumoral*), KFG (*keratinocyte growth factor*), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-8 (*interleucina 8*), així com determinats receptors de citocines [209]. En fibroblasts embrionaris de ratolí amb manca d'IRE α , l'activació de JNK, així com l'estrès del RE, es trobaven disminuïts [210]. Estudis recents també han suggerit que les altres dues vies de les (*mitogen-activated protein kinase*) poden activar-se en resposta a l'estrès del RE, bé promovent la UPR (p38) o, al contrari, promovent l'adaptació i la supervivència a l'estrès del RE (ERK1/2), tot i que els mecanismes concrets es desconeixen [211].

Activació de NF- κ B

NF- κ B és un factor de transcripció dimèric format per membres de la família Rel [p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) i p100/52 (NF- κ B2)], els quals es combinen entre ells per formar homo o heterodímers. En el citoplasma, NF- κ B es manté en una forma inactiva, ja que es troba unit a la proteïna I κ B, un inhibidor específic de NF- κ B. Diferents estímuls fan que s'activi el complex proteic IKK (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*), el qual fosforila i ubiquitina I κ B, essent degradada pel proteosoma. La degradació d'I κ B allibera NF- κ B, permetent la seva translocació nuclear

[212]. Malgrat que les tres vies de la UPR poden activar NF- κ B, aquestes ho fan per mecanismes diferents. Per una banda, la trans-autofosforilació d'IRE1 α indueix un canvi conformacional en el seu domini citosòlic, que fa que pugui interaccionar amb la proteïna TRAF2 [210]. Aquest complex activa IKK, provocant la degradació d'I κ B, alliberant NF- κ B i produint-se la seva translocació a nucli [213]. D'altra banda, la via de PERK-eIF2 α activa NF- κ B a través de la inhibició de la traducció. Això provoca una disminució dels nivells de proteïna d'I κ B (que té una vida mitjana curta) i, en conseqüència, es produeix un augment de la ràtio NF- κ B/ I κ B [214]. Finalment, ATF6 també pot activar NF- κ B a través de la fosforilació d'AKT [215]. Els gens transcrits per NF- κ B inclouen aquells que codifiquen per a citocines proinflamatòries, així com per a enzims implicats en la immunomodulació, l'apoptosi, la proliferació, la diferenciació i el desenvolupament. En fibroblasts embrionaris de ratolí amb manca d'IRE1 α es va observar una disminució en l'activació de NF- κ B induïda per estrès del RE, així com en la producció de TNF α [213].

4.3. Estrès del RE, resistència a la insulina i malalties metabòliques

4.3.1. Estrès del RE en obesitat i diabetis

Com ja s'ha comentat, l'obesitat s'associa al desenvolupament de la DT2, tot i que els mecanismes moleculars subjacents no són del tot coneguts. La principal característica de la DT2 és la disminució de l'acció de la insulina en els teixits diana, definida com a RI [2]. Un dels possibles mecanismes que poden contribuir al desenvolupament de la RI en pacients amb obesitat són els processos inflamatoris [21]. De fet, diferents estudis apunten a l'estrès del RE com a responsable de l'aparició de processos inflamatoris que precedeixen a la RI en casos d'obesitat [20].

En condicions normals, els receptors d'insulina activats fosforilen els residus de tirosina de les molècules de senyalització pròximes, com IRS1, les quals transmetran els efectes de la insulina interaccionant amb altres molècules citosòliques. Ara bé, en situació de RI, s'ha vist que JNK pot induir la fosforilació dels residus de serina de IRS1, inhibint la fosforilació dels residus de tirosina [177,216]. En el fetge i el teixit adipós de ratolins obesos, les vies de PERK i IRE1 α es troben activades. Donat que IRE1 α , en presència d'estrès del RE, pot reclutar TRAF2 i desencadenar l'activació de JNK [210], s'ha proposat que el vincle entre l'estrès del RE i la RI perifèrica podria ser a través d'IRE1 α . En reforç d'aquesta hipòtesi, ratolins alimentats amb una HFD i un únic al·lel d'*Xbp1* (*Xbp1*^{+/-}) tenien una activació augmentada de PERK, IRE1 α i JNK, així com una desregulació en la fosforilació de IRS1 i RI [217]. Donat que IRE1 α i PERK també poden conduir a l'activació de NF- κ B, es necessiten més estudis per esclarir la implicació d'aquestes vies en l'activació coordinada de la inflamació i la RI, estretament associades amb la DT2 i l'obesitat (Figura 11).

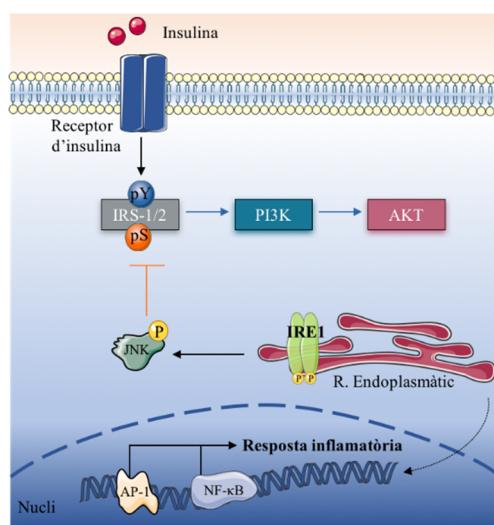


Figura 11. Estrès del RE, resposta inflamatòria i resistència a la insulina.

4.3.2. Estrès del RE, AG i FABP4

Una altra de les característiques de l'obesitat i la DT2 és la presència de nivells elevats d'AG lliures en circulació. De fet, diferents estudis han suggerit una activació de l'estrès del RE dependent d'AG [22,218]. A més, pacients amb DT2 presenten nivells elevats dels marcadors d'estrès del RE [219].

Els AG saturats, com el PA i l'EA, s'han descrit com a inductors de l'estrès del RE en diferents tipus cel·lulars i, a més, poden modular els senyals de supervivència o apoptosi en la cèl·lula [218,220–222]. En canvi, diferents evidències suggereixen que els àcids grassos insaturats poden prevenir l'estrès del RE induït per AG saturats en cèl·lules de ronyó [223], múscul esquelètic [224] i macròfags [225], entre d'altres. Tot i així, hi ha certa controvèrsia respecte als efectes que exerceixen els AG insaturats, ja que altres estudis han demostrat que el LA incrementa l'estrès del RE i l'apoptosi en cèl·lules de fetge [226,227].

Respecte a la implicació de FABP4 en l'estrès del RE, hi ha pocs estudis que han investigat la seva relació, de fet, els resultats obtinguts són contradictoris. Per una banda, Erbay *et al.* van demostrar que FABP4 conduïa a l'activació de l'estrès del RE induït per PA en macròfags, mentre que en cèl·lules deficientes per FABP4 l'estrès del RE es trobava alleujat [136]. En cèl·lules mesangials de ronyó, exposades a PA i OA, FABP4 activa l'estrès del RE. En canvi, la inhibició de FABP4 disminueix l'estrès del RE i l'apoptosi induïda per AG en aquestes cèl·lules [228]. Contràriament, en adipòcits, FABP4 presenta un efecte protector, ja que protegeix contra l'estrès oxidatiu i l'estrès del RE [229]. Per tant, és necessari realitzar més estudis per determinar la implicació de FABP4 en l'estrès del RE i la seva associació amb la DT2.

4.3.3. Estratègies terapèutiques contra l'estrès del RE en malalties metabòliques

Donat que l'estrès del RE contribueix al desenvolupament de diferents malalties metabòliques, estudis recents han proposat el plegament de les proteïnes i la UPR com a una possible aproximació terapèutica. Fins al moment, s'han provat diferents tipus d'estratègies que poden atenuar l'estrès del RE [230,231].

L'administració de PBA (4-fenilbutirat) i TUDCA (àcid tauroursodeoxicòlic), dues xaperones químiques, milloren la sensibilitat a la insulina i disminueixen l'esteatosi hepàtica en models murins d'obesitat i DT2 [232]. En humans, el PBA prevé la RI induïda per lípids i restableix la funcionalitat de les cèl·lules β [233]. El TUDCA, en pacients obesos, millora la sensibilitat a la insulina en múscul i fetge, tot i que no redueix l'estrès del RE [234].

La sobreexpressió de BiP en cèl·lules β del pàncrees protegeix contra l'obesitat induïda per una HFD, la intolerància a la glucosa, la hiperinsulinèmia i la RI [235]. Donat que la hiperactivació de la via de PERK-EIF2 α -CHOP pot contribuir a la mort de les cèl·lules β , a la RI i a l'esteatosi hepàtica, la supressió ben controlada d'aquesta via pot presentar avantatges terapèutics. Guanabenz és un agonista del receptor adrenèrgic $\alpha 2$ utilitzat pel tractament de la hipertensió. Aquest s'uneix selectivament a GADD34 i inhibeix la desforforilació d'eIF2 α , exercint un efecte protector contra l'estrès del RE [236]. Una altra opció són els inhibidors específics de PERK, com el GSK2606414 [237]. Un altre objectiu interessant és la inhibició de CHOP, el principal component proapoptòtic induït per l'estrès del RE. Els inhibidors de la MAPK p38 inhibeixen la fosforilació de CHOP, crítica per poder actuar com a factor de transcripció [238]. Ara bé, la manca d'inhibidors específics de

CHOP impedeixen centrar-se en aquesta línia. D'altra banda, la inhibició de l'activitat cinasa d'IRE1 α , però no de l'activitat RNAsa, pot ser una estratègia terapèutica viable per reduir la RI induïda per estrès del RE. Això evitaria la trans-autofosforilació d'IRE1 α , però mantindria l'activitat RNAsa, produint-se l'splicing d'XBP-1 (factor de transcripció prosupervivència) sense estrès del RE [239].

Finalment, donat que la concentració de calci en el RE és crucial per al correcte plegament de les proteïnes, els reguladors de l'homeòstasi del calci podrien ser una eina terapèutica prometedora. En ratolins obesos, alteracions en la composició lipídica del fetge, inhibeixen l'ATPasa del Ca²⁺ del reticle sarcoplasmàtic (SERCA), induint estrès del RE i alterant l'homeòstasi de la glucosa en fetge [240]. En canvi, la sobreexpressió de la SERCA millora el metabolisme de la glucosa [241].

Per tant, tot i que la inhibició farmacològica de l'estrès RE pot tenir gran interès en el tractament de diferents malalties metabòliques, és important destacar que depenent de la via afectada, la inhibició podrà agreujar o millorar la patologia en qüestió.

4.4. Estrès del RE i càncer

La primera vegada que es va proposar una relació directa entre l'estrès del RE i el càncer va ser l'any 2004 [242]. A partir d'aquest moment, diferents estudis han confirmat que la transformació maligna i l'ambient tumoral indueixen estrès del RE, ja que s'observa una activació sostinguda de les tres vies de la UPR en diferents tipus de tumors primaris, incloent-hi el glioblastoma, el mieloma múltiple i els carcinomes de mama, estómac, esòfag i fetge [243,244]. La hipòxia, una característica comuna en els tumors sòlids, és un potent activador de PERK i ATF4 [245]. Així mateix, BiP també s'ha

trobat sobreexpressada en càncer i els seus nivells correlacionen amb la progressió de la malaltia [246]. Tot i això, els mecanismes concrets a través dels quals la UPR promou el creixement tumoral romanen en investigació. La major part d'evidències provenen d'estudis realitzats en ratolins. En cèl·lules de fibrosarcoma humà i fibroblasts transformats de ratolí, la delecció de BiP i PERK, respectivament, disminueix la capacitat de les cèl·lules de créixer com a tumor en ratolins *nude*⁴ [247,248]. De manera similar, el silenciament d'XBP1 també dificulta el creixement de tumors trasplantables en ratolins *nude* [249]. Hi ha evidències que suggereixen que la inhibició del proteosoma amb el bortezomib, un fàrmac aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) per al tractament del mieloma, condueix a la mort de les cèl·lules canceroses a través de la ERAD i l'apoptosi induïda per estrès del RE [250,251]. També s'han provat inhibidors farmacològics d'IRE1 α , els quals presenten activitat antimieloma [252]. Per tant, aquestes observacions suggereixen la possibilitat d'interferir en la UPR com a possible tractament contra el càncer, tot i que, de moment, l'especificitat d'aquests agents farmacològics no és del tot clara.

⁴ *Ratolí nude*: tipus de ratolí transgènic amb un sistema immunitari defectuós a causa de la manca de tim. S'utilitzen freqüentment en la investigació del càncer perquè no rebutgen trasplantaments de tumors o cèl·lules d'altres espècies.

5

Teixit adipós, FABP4 i càncer

El paper del teixit adipós i, en concret, dels adipòcits en la iniciació i progressió del tumor és una àrea d'investigació relativament nova. Tot i que tradicionalment el teixit adipós es va considerar un lloc d'emmagatzematge d'energia, actualment s'ha descrit que és un òrgan endocrí capaç de regular l'energia i l'homeòstasi metabòlica sistèmica. Així, la relació entre el teixit adipós i el càncer s'ha basat, principalment, en dues observacions clau: (1) Els estudis epidemiològics que han demostrat una associació directa entre l'obesitat i alguns tipus de càncer [26,27]. (2) El paper del teixit adipós com a un component important en el microambient tumoral, el qual promou el creixement tumoral [253].

La supervivència de les cèl·lules tumorals depèn, críticament, de les seves interaccions amb les cèl·lules no malignes de l'estroma tumoral que les envolten. Aquestes cèl·lules inclouen fibroblasts, cèl·lules endotelials i perícits, les quals estan localitzades en una única matriu extracel·lular [254]. La contribució de l'estroma en la supervivència de les cèl·lules tumorals ha estat estudiada àmpliament. Inicialment, l'enfocament de les investigacions es va centrar en els fibroblasts i els macròfags associats al càncer, les funcions dels quals estan ben establertes en la progressió tumoral [255,256]. Ara bé, els

adipòcits són un altre component molt important de l'estroma tumoral [31]. Per aquest motiu, l'any 2010 es va descriure el concepte d'adipòcit associat a càncer (CAA, *cancer-associated adipocyte*). Els CAA són adipòcits que han patit alteracions morfològiques i funcionals considerables [257]. Des d'aleshores, diferents estudis, els quals es comentaran a continuació, han evidenciat que els CAA promouen la progressió tumoral, bé a través de les adipocines alliberades o per contacte directe.

5.1. Adipòcits i càncer de mama

Diferents tipus de tumors, entre ells, el càncer de mama, creixen al voltant del teixit adipós. En estudis realitzats en adipòcits (3T3-L1) s'ha observat que aquests promouen el creixement, la proliferació i la supervivència en línies cel·lulars de càncer de mama humanes. En l'estudi de Santander *et al.* el medi condicionat dels adipòcits 3T3-L1 diferenciats iniciava un programa transcripcional que induïa la invasió de les cèl·lules de càncer de mama a través de l'activació d'AP-1 i la proliferació a través de NF- κ B i la ciclina D1. Cal destacar que els adipòcits com els fibroblasts també augmentaven la supervivència de les línies cel·lulars de càncer de mama, ja que activaven un programa transcripcional de supervivència, tot i que el nombre de gens afectats i la magnitud d'inducció per part dels fibroblasts, en comparació amb els adipòcits, era molt menor (**Figura 12**) [258,259].

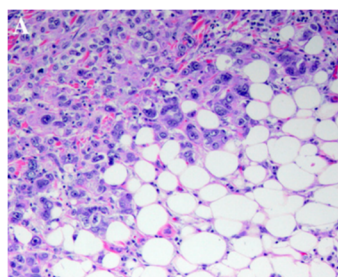


Figura 12. Cèl·lules tumorals de mama envaint el teixit adipós adjacent. Els adipòcits més allunyats del tumor presenten una mida normal, mentre que els que estan més pròxims són més petits. Aquesta observació evidencia la desdiferenciació i deslipidació que pateixen els adipòcits madurs, adoptant un fenotip de tipus fibroblast (400X). Font: Nieman, K. *et al. Biochim. Biophys. Acta* (2013).

Hi ha altres estudis que evidencien aquesta comunicació creuada (*cross-talk*) entre els adipòcits i les cèl·lules de càncer de mama. En els estudis que han explorat la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals de càncer de mama, els efectes observats s'han degut als factors secretats pels adipòcits [260]. També s'observa un canvi fenotípic en els adipòcits exposats a cèl·lules tumorals, ja que es produeix una disminució del contingut lipídic, una pèrdua dels marcadors de diferenciació, com adiponectina, FABP4 i resistina, i un augment de l'expressió de citocines proinflamatòries. Per tant, els adipòcits reverteixen a un fenotip de tipus fibroblast o preadipòcit [260]. Aquest contingut lipídic alliberat és utilitzat per les cèl·lules tumorals com a font d'energia per proliferar i per a la producció de la membrana [261]. A més, en aquest estudi també es va observar que el teixit adipós reclutava macròfags i augmenta la resposta inflamatòria, contribuint a un microambient més favorable per al creixement del tumor i un pitjor pronòstic per al pacient [261].

Per tant, tal com es representa en la **Figura 13**, el teixit adipós juga un paper important en la progressió tumoral, ja que els CAA estableixen un *cross-talk* actiu i dinàmic amb les cèl·lules tumorals, intercanviant metabòlits que estimulen l'adhesió, la migració i la invasió de les cèl·lules tumorals [262]. A més, els CAA alliberen AG i adipocines, els quals són utilitzats per les cèl·lules tumorals per produir energia, a través de la β -oxidació i l'activació de diferents vies metabòliques [31,263].

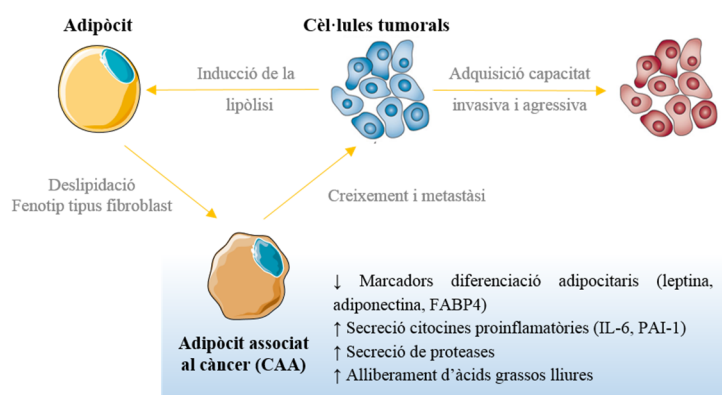


Figura 13. Senyalització recíproca entre els adipòcits associats a càncer (CAA) i les cèl·lules tumorals. Aquesta interacció dins del microambient tumoral provoca la creació d'un nínxol permissiu per al creixement cel·lular, així com per a la metastasi. Adaptat de Park, J. *et al. Nat. Rev. Endocrinol.* (2014).

5.2. Adipocines i càncer

Les adipocines són molècules sintetitzades i secretades pel teixit adipós. Aquestes estan implicades en diferents desordres metabòlics, incloent-hi la RI, la DT2 (*Veure Capítol 3*) i, més recentment, el càncer [264,265]. Hi ha diferents tipus d'adipocines implicades en la tumorigènesi [266,267]. Recentment, FABP4 s'ha proposat com una nova adipocina implicada en càncer.

5.2.1. FABP4 i càncer

FABP4, com s'ha comentat en capítols anteriors, es va descriure inicialment en adipòcits i macrofags. Ara bé, recentment, s'ha vist que s'expressa en diferents tipus de càncers [108–112]. Hi ha diferents articles que mostren una relació important entre FABP4 i la iniciació i progressió del tumor. A més, FABP4 també pot tenir un paper actiu en la interacció entre el tumor i el teixit adipós.

En estudis de càncer d'ovari i pròstata s'ha observat que FABP4 està implicada en la transferència de lípids entre els adipòcits i les cèl·lules tumorals, induint la β -oxidació [31,263]. A més, FABP4 es troba altament sobreexpressada en tumors de pròstata de ratolins obesos, així com en mostres de metàstasi òssia de pacients amb càncer de pròstata. Això mostra la implicació de FABP4 en el tràfic de lípids que es produeix en la metàstasi tumoral [268]. En l'estudi de Uehara *et al.*, la inhibició de FABP4 va bloquejar la interacció entre les cèl·lules tumorals i el teixit adipós. De fet, els ratolins KO per FABP4 tenien la proliferació cel·lular i la metàstasi disminuïda, així com una deficiència en la vasculatura del tumor [269]. Així mateix, nivells elevats de FABP4 en tumors primaris s'han associat amb una alta incidència de la malaltia residual després de la cirurgia en càncer d'ovari, suggerint la possibilitat d'utilitzar FABP4 com un biomarcador molecular de la malaltia residual [270].

En canvi, en altres estudis s'ha observat una relació inversa entre l'expressió de FABP4 i la progressió tumoral, almenys en línies cel·lulars i teixits de bufeta i ronyó. Ara bé, alguns d'aquests articles només s'han centrat en la regulació de l'expressió gènica i, en d'altres, els nivells de proteïna no sempre són congruents amb els nivells de mRNA [109,271].

Tot i això, FABP4, conjuntament amb FABP3, es troba sobreexpressada en cèl·lules de pulmó, respecte al teixit no tumoral adjacent. Aquesta sobreexpressió correlaciona amb una major estadificació del tumor, així com amb una menor supervivència [272]. També s'ha trobat una relació interessant entre FABP4 i PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [273], un supressor tumoral freqüentment deleccionat o mutat en diferents tipus tumorals [274]. A més, la delecció de PTEN provoca una sobreexpressió de FABP4 en queratinòcits i hepatòcits [275,276].

5.2.2. FABP4 i càncer de mama

Els nivells circulants de FABP4 correlacionen positivament amb càncer de mama, ja que aquests es troben elevats en dones obesas amb càncer de mama, en comparació amb les pacients no obesas i controls sans. Aquests nivells sèrics elevats s'han associat amb una mida del tumor més gran, així com amb la infiltració en els ganglis limfàtics [162]. Resultats pendents de publicar del nostre grup, conjuntament amb aquestes dades, reforcen el paper del teixit adipós i les adipocines que allibera en el càncer de mama [Guaita-Esteruelas *et al.* *Adipose-derived Fatty Acid-Binding Proteins plasma concentrations are increased in breast cancer patients. Submitted*].

Pel que fa als nivells de FABP4 intracel·lulars, aquests es troben augmentats en els tumors positius per HER2, directament relacionats amb canvis en l'expressió de PLIN1 (*perilipin 1*), CPT-1A (*carnitine palmitoyltransferase 1A*), FASN (*fatty acid synthase*) i ACOX-1 (*peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1*) [277]. Aquests resultats recolzen el paper de FABP4 en el càncer de mama. A més, el metabolisme lipídic en els tumors del subtipus HER2, respecte als altres subtipus, es troba més elevat [277]. Per tant, la regulació de les diferents vies metabòliques en funció del subtipus de càncer de mama pot tenir diferents implicacions clíniques. En aquest sentit, FABP4

s'associa positivament amb una menor supervivència lliure de malaltia⁵, així com una menor supervivència global en pacients amb càncer de mama triple negatiu [162]. A més, s'ha trobat un polimorfisme en FABP4 que s'associa amb el pronòstic del càncer de mama triple negatiu [278]. Una altra correlació que s'ha trobat en teixits de càncer de mama ductal és entre la FABP4 i la FASN. S'ha descrit que poden estar associades amb la mida del tumor i la metastasi als ganglis limfàtics [279].

Per tant, conjuntament, aquests resultats evidencien el paper que juga el teixit adipós en la progressió del càncer. El coneixement dels mecanismes moleculars implicats en el microambient tumoral permetrà identificar noves dianes terapèutiques. Les adipocines i, en concret, FABP4, tenen especial rellevància en la tumorigènesi de diferents tipus de càncer, entre ells el càncer de mama. Això planteja noves perspectives per poder utilitzar les adipocines com a biomarcadors moleculars, ja que poden ser un objectiu viable per atacar els càncers relacionats amb el teixit adipós. Malgrat això, no s'ha de deixar de banda la intervenció en els estils de vida per prevenir el càncer, incloent-hi una dieta equilibrada i l'exercici físic, ja que aquests tenen un impacte directe en el teixit adipós i les adipocines [280].

⁵ *Supervivència lliure de malaltia*: Terme utilitzat en l'àmbit del càncer. Període que transcorre després de finalitzar el tractament durant el qual el pacient sobreviu sense presentar signes ni símptomes de la malaltia. S'utilitza per comprovar l'eficàcia d'un tractament nou.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Hipòtesi i Objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Hipòtesi

El teixit adipós és un òrgan endocrí que secreta AG i adipocines al torrent circulatori, entre d'altres, FABP4. FABP4 circulant actua com a factor transmissor d'alteracions metabòliques associades a l'obesitat, com les derivades de la RI a nivell hepàtic i muscular. En aquests òrgans, FABP4 indueix RI a través de l'activació de l'estrès del RE. A més, els inhibidors de FABP4 poden millorar aquestes alteracions metabòliques. Aquests efectes de transmissió perifèrica de l'adipositat, mediat per FABP4, també poden afectar el creixement de processos tumorals, com el càncer de mama, explicant la relació epidemiològica existent entre obesitat i neoplàsia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Objectius

1. Determinar el paper de FABP4 en l'estrès del RE induït per AG i la seva implicació en la RI hepàtica (cèl·lules HepG2) i múscul esquelètic (cèl·lules C2C12).
 - 1.1. Analitzar el grau d'estrès del RE induït per FABP4 en presència o absència d'AG.
 - 1.2. Analitzar l'efecte de FABP4 en la via de senyalització de la insulina.
 - 1.3. Analitzar l'efecte de FABP4 en la mort cel·lular programada.
2. Identificar el paper de l'inhibidor de FABP4 (BMS309403) sobre l'estrès del RE i la inflamació induïda per AG.
 - 2.1. Analitzar l'efecte del BMS309403 sobre els paràmetres bioquímics en un model *in vivo* de ratolí alimentat amb una HFD.
 - 2.2. Analitzar el grau d'estrès del RE i la inflamació induïda per AG en presència o absència de BMS309403 en un model *in vivo* de ratolí i en la línia cel·lular C2C12.
 - 2.3. Determinar els mecanismes moleculars a través dels quals el BMS309403 millora aquestes alteracions metabòliques.
3. Determinar el paper de FABP4 en la proliferació del càncer de mama, concretament del subtipus luminal A i del subtipus basal.
 - 3.1. Analitzar l'efecte de FABP4 en la proliferació i la migració de les cèl·lules MCF-7 (luminal A) i MDA-MB-231 (basal).
 - 3.2. Analitzar l'efecte de FABP4 en l'activació de la via de les MAPK i AKT en ambdós tipus cel·lulars de càncer de mama.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

En aquesta secció es presenten les publicacions derivades d'aquesta tesi doctoral, així com un resum de les mateixes.

1. Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells.

Alba Bosquet, Sandra Guaita-Esteruelas, Paula Saavedra, Ricardo Rodríguez-Calvo, Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana. *Atherosclerosis* 249 (2016) 191-199.

2. FABP4 inhibitor BMS309403 decreases fatty-acid induced endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle by reducing MAPK activation.

Alba Bosquet, Ricardo Rodríguez-Calvo, Sandra Guaita-Esteruelas, Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana. *En revisió*.

3. Exogenous FABP4 increases breast cancer cell proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins.

Sandra Guaita-Esteruelas, **Alba Bosquet**, Paula Saavedra, Josep Gumà, Josefa Girona, Eric W.-F. Lam, Kepa Amillano, Joan Borràs i Lluís Masana. *Molecular Carcinogenesis* 56 (2016) 208-217.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells

Alba Bosquet, Sandra Guaita-Esteruelas, Paula Saavedra, Ricardo
Rodríguez-Calvo, Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana.

Atherosclerosis 249 (2016) 191-199

FABP4 és una proteïna intracel·lular implicada en el transport dels AG, tot i que també és secretada a la circulació. Nivells de FABP4 circulant es troben elevats en situació d'obesitat i/o diabetis. Els AG contribueixen en la RI promovent estrès del RE i alterant la via de senyalització de la insulina. Tot i això, el paper de FABP4 en l'estrès del RE en el fetge és desconegut. Per tant, l'**objectiu** d'aquest estudi ha estat investigar si la FABP4 exògena (eFABP4) està implicada en l'estrès del RE induït per AG en el fetge.

Els **resultats** principals d'aquest treball són:

- eFABP4 augmenta l'expressió dels marcadors d'estrès del RE ATF6 i IRE1 en les cèl·lules hepàtiques HepG2. En presència d'un AG, en aquest cas el LA, augmenta l'estrès del RE induït per eFABP4.
- Aquest augment es relaciona amb la RI, ja que s'observen canvis en la fosforilació d'AKT i JNK.
- eFABP4 activa vies de mort cel·lular programada (CHOP), sense afectar la necrosi ni la ubiquitinació.

Les **conclusions** d'aquest estudi suggereixen que eFABP4, *per se*, indueix estrès del RE i potencia l'efecte del LA en cèl·lules HepG2, essent un possible vincle entre les anomalies metabòliques associades amb l'obesitat i la RI hepàtica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells



Alba Bosquet, Sandra Guaita-Esteruelas, Paula Saavedra, Ricardo Rodríguez-Calvo, Mercedes Heras, Josefa Girona^{*}, Lluís Masana^{*}

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 December 2015
Received in revised form 21 March 2016
Accepted 13 April 2016
Available online 14 April 2016

Keywords:
Fatty acid/binding protein
Fatty acid/transport
Fatty acid
Linoleate
Signal transduction
Apoptosis
Hepatocytes

ABSTRACT

Background and aims: Fatty acid binding protein 4 (FABP4) is an intracellular fatty acid (FA) carrier protein that is, in part, secreted into circulation. Circulating FABP4 levels are increased in obesity, diabetes and other insulin resistance (IR) diseases. FAs contribute to IR by promoting endoplasmic reticulum stress (ER stress) and altering the insulin signaling pathway. The effect of FABP4 on ER stress in the liver is not known. The aim of this study was to investigate whether exogenous FABP4 (eFABP4) is involved in the lipid-induced ER stress in the liver.

Methods: HepG2 cells were cultured with eFABP4 (40 ng/ml) with or without linoleic acid (LA, 200 μ M) for 18 h. The expression of ER stress-related markers was determined by Western blotting (ATF6, EIF2 α , IRE1 and ubiquitin) and real-time PCR (ATF6, CHOP, EIF2 α and IRE1). Apoptosis was studied by flow cytometry using Annexin V-FITC and propidium iodide staining.

Results: eFABP4 increased the ER stress markers ATF6 and IRE1 in HepG2 cells. This effect led to insulin resistance mediated by changes in AKT and JNK phosphorylation. Furthermore, eFABP4 significantly induced both apoptosis, as assessed by flow cytometry, and CHOP expression, without affecting necrosis and ubiquitination. The presence of LA increased the ER stress response induced by eFABP4.

Conclusions: eFABP4, *per se*, induces ER stress and potentiates the effect of LA in HepG2 cells, suggesting that FABP4 could be a link between obesity-associated metabolic abnormalities and hepatic IR mechanisms.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity-linked metabolic disorders share a common signature of endoplasmic reticulum (ER) stress [1,2]. The liver plays a central role in glucose and lipid metabolism and, recently, ER has emerged as an important player in the onset of hepatic insulin resistance (IR)

[3]. The ER is a cytoplasmic organelle that controls the most important steps in the folding and modification of secretory and membrane proteins. Elevated plasma levels of free fatty acids (FAs), which are accompanied by obesity, have been postulated to play a central role in the pathophysiology of IR [4,5]. Previous research suggests that acute exposure to FAs such as palmitic acid (PA) can alter the function of this organelle, leading to the accumulation of unfolded or misfolded proteins inside the ER, resulting in a cellular condition referred to ER stress [6–9]. ER stress initiates a series of adaptive mechanisms known as the unfolded protein response (UPR) [10]. The UPR is signaled through three ER transmembrane protein sensors, IRE1 (inositol requiring kinase 1), PERK (pancreatic ER kinase) and ATF6 (activating transcription factor 6). The combined action of these pathways leads to the inhibition of protein translation, stimulation of protein degradation, via ubiquitination, and production of chaperone proteins, resulting in either recovery of ER function or apoptosis [11,12].

Abbreviations: ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; eFABP4, exogenous fatty acid binding protein 4; EA, elaidic acid; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; ER, endoplasmic reticulum; IR, insulin resistance; FABP4, fatty acid binding protein 4; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IRE1, inositol requiring kinase 1; LA, linoleic acid; MS, metabolic syndrome; NEAA, non-essential amino acids; PA, palmitic acid; PE, palmitoleic acid; PERK, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; PI, propidium iodide; PO, palmitoleic acid; UPR, unfolded protein response.

^{*} Corresponding authors. Lipids and Atherosclerosis Research Unit, Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Tarragona, Spain.

E-mail address: luís.masana@urv.cat (L. Masana).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.012>
0021-9150/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Fatty acid binding protein 4 (FABP4), also known as adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) or aP2, is a member of the intracellular lipid-binding protein family that is predominantly expressed in adipose tissue. In addition, FABP4 is also produced in significant amounts in macrophages and endothelial cells. FABP4 can reversibly bind with high affinity to hydrophobic ligands, such as saturated and unsaturated long-chain fatty acids, eicosanoids and other lipids [13]. We and other authors have shown that FABP4 levels are increased in obesity, metabolic syndrome (MS), type 2 diabetes (T2D), familial combine hyperlipidemia and lipodystrophy syndromes, and these increased levels are also closely correlated with adverse lipid profiles and IR. Additionally, serum FABP4 predicted the development of metabolic syndrome and atherosclerosis [14–17]. Moreover, we have demonstrated that plasma FABP4 is associated with endothelial dysfunction [18]. *In vitro* studies from our group have found that exogenous FABP4 (eFABP4) interacts with plasma membrane proteins in human endothelial cells and causes endothelial dysfunction by impairing the insulin-signaling pathway and NO production [19,20]. Moreover, eFABP4 shows a direct effect on the migration and proliferation of human coronary smooth muscle cells *in vitro*, suggesting a role in vascular remodeling primarily mediated through activation of MAPK-dependent pathways [21]. *Fabp4*-deficient mice have shown that FABP4 has a significant role in many aspects of metabolic syndrome. Deficiency of FABP4 protects mice against that the development of IR, hypertriglycerolemia and atherosclerosis [18]. The few studies that show an effect of FABP4 on ER stress are controversial. Whereas FABP4 in macrophages and mesangial cells mediates lipid-induced ER stress and apoptosis, FABP4 in adipocytes contributes to cytoprotection against oxidative and ER stress [1,11,22,23]. However, no one has addressed the question of how FABP4 impacts ER stress in hepatocytes, one of the most important tissues related to IR. In the current study we show that in hepatocytes, eFABP4 induces ER stress and enhances linoleic acid (LA)-induced ER stress.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human hepatocarcinoma HepG2 cells were obtained from ATCC and maintained in MEM medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 1 mM penicillin-streptomycin, 1 mM non-essential amino acids (NEAA) and 10% fetal bovine serum (v/v) (Biowest; Nuallé, France). Before the initiation of the assays, the cells were changed into MEM supplemented with 0.5% FBS for 24 h. Cells were treated with FAs [PA, oleate (OA), elaidate (EA), palmitoleate (PO), palmitelaidate (PE) and LA; Nu-Check; Elysian, MN, USA], with or without human native FABP4 (Biovendor; Brno, Czech Republic) at a concentration of 40 ng/ml for 18 h. We chose this concentration because studies from our group and others showed that the human FABP4 plasma concentration ranges between 13 and 100 ng/ml according to body weight [24]. Incubations with FAs were conducted in albumin-free system. FAs (salt form) were dissolved in ultrapure water at 70° C for 10 min in a water bath. The FA aliquots were stored at –80° C until further use. The cell viability assay was carried out using the Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Kit according to the manufacturer's protocol (Promega, Madrid, Spain).

2.2. Western blotting

HepG2 cells were lysed in RIPA buffer (0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 50 mM Tris-HCl, 0.5% deoxycholate) containing phosphatase and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Protein concentrations were determined using a Bradford Assay Kit (Bio-Rad, USA). 30 µg of total protein was

separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes using iBlot® Dry Blotting System (Life Technologies, Madrid, Spain). Antibodies against IRE, phospho-eukaryotic initiation factor 2 (p-eIF2), eIF2, Ubiquitin, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, phospho-AKT (Ser473), AKT and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). ATF6 antibody was obtained from Millipore (Billerica, MA, USA). Membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark). The bands were visualized using ECL reagents (Amersham Pharmacia, USA) with the ChemiDoc image system and quantified with Image Lab software, version 5.2 (Bio-Rad, USA). The ratio of target proteins to GAPDH was used to reflect the relative levels of the targeted proteins.

2.3. RNA extraction, cDNA preparation and real-time PCR

Total RNA was isolated from the cells using the ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, CA, USA). Total RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamers and SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, UK) following the manufacturer's protocol. TaqMan primers and probes for ATF6, C/EBP homologous protein (CHOP), eIF2 and IRE1 were obtained from validated and pre-designed Assays-on-Demand products (Applied Biosystems, CA, USA) and were used in real-time PCR amplifications. The mRNA expression for each gene and sample was calculated using the recommended $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. GAPDH was used as a housekeeping gene to normalize the results of the gene of interest.

2.4. Determination of apoptosis

Apoptotic cell death was assessed by flow cytometry (EPICS XL MCL, Beckman Coulter) using the Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) Apoptosis Detection Kit following the manufacturer's protocol (BD Biosciences, Madrid, Spain). Annexin V-FITC and PI double-negative cells were considered viable cells. Annexin V-FITC-positive/PI-negative cells were considered apoptotic cells, and annexin V-FITC/PI double-positive cells were considered dead cells.

2.5. Nile Red staining

To visualize the lipid droplets, cells were incubated with the lipophilic fluorescent dye Nile Red (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich, USA) diluted in PBS for 5 min at room temperature without prior fixation [25]. The cell images were captured using a microscope (Olympus IX71, Spain) and quantified with Image-J software.

2.6. Statistics

The results are presented as the mean ± SEM of at least 3 separate experiments. Differences between the means were determined using a t-test or a one-way analysis of variance (ANOVA), which was followed by a Dunnett's *post-hoc* test for multiple comparisons (time and dose-response). The differences were considered to be significant at $p < 0.05$. GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for the statistical analyses.

3. Results

3.1. eFABP4 increases ER stress markers in HepG2 cells

To establish the optimal conditions of eFABP4, we first examined the activation of IRE1, a key protein of the UPR, over a range of

different time periods (0, 1, 4, 18 and 24 h) and at different concentrations of eFABP4 (20, 40 and 100 ng/ml). The time-course studies (0–24 h) revealed that eFABP4 (40 ng/ml) significantly increased IRE mRNA levels compared with untreated cells at 18 h (1.63 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. S1A). Furthermore, as shown in Fig. S1B, dose-response studies (20–100 ng/ml) revealed that eFABP4 significantly increased IRE1 expression at 40 and 100 ng/ml with respect to untreated cells at 18 h. (1.55 and 2.29 fold-increase, respectively, $p < 0.05$). Thus, we chose to use eFABP4 at the concentration of 40 ng/ml and 18 h of treatment for the following experiments.

To analyze the effect of eFABP4 on ER stress in HepG2 cells, we examined the expression patterns of IRE1 and other molecular indicators of the UPR, ATF6 and eIF2 [27]. Fig. 1 shows a significant increase in IRE1 mRNA levels when the cells were treated with eFABP4 (Fig. 1A, 1.63 fold-increase, $p < 0.05$). Consequently, an increase in IRE1 protein levels was found (1.25 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. 1B). Tunicamycin (5 µg/ml), which was used as a control for ER stress, increased IRE1 mRNA and protein levels (6.62 and 2.64 fold-increase, respectively, $p < 0.05$) (Fig. 2A, B). eFABP4 also increased the expression of the ATF6 protein levels (Fig. 1D, 1.16 fold-increase, $p < 0.05$), without affecting ATF6 mRNA expression (Fig. 1C). Tunicamycin significantly increased ATF6 mRNA levels (3.10 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. 1C). Next, we examined the effect of eFABP4 on eIF2 mRNA expression and activation. As shown in Fig. 1E, eFABP4 significantly increased eIF2 mRNA levels (1.26 fold-increase, $p < 0.05$) without a significant change in eIF2 activation (Fig. 1F). Tunicamycin had a significant effect on the expression of eIF2 mRNA, but not on protein levels. Taken together, and considering that the protein is the functional component, our results show that eFABP4 triggers ER stress in HepG2 cells through IRE1 and ATF6 activation.

Because the IRE1 pathway activates JNK and impairs insulin signaling [28], we analyzed JNK and AKT phosphorylation. As shown in Fig. 1G, eFABP4 induced a statically significant increase in JNK phosphorylation (1.32 fold-increase, $p < 0.05$). To directly analyze the effect of eFABP4 on insulin resistance, we examined the activation of AKT in the presence or absence of insulin. Fig. 1H shows a significant attenuation of AKT phosphorylation when the cells were treated with eFABP4 both under basal (–27%, $p < 0.01$ vs. CT) and insulin-stimulated conditions (–50%, $p < 0.05$ vs. Ins). Combined, these data support the suggestion that eFABP4 attenuates the insulin signaling pathway through JNK phosphorylation.

3.2. eFABP4 increases ER stress-mediated apoptosis but not ubiquitination in HepG2 cells

We next evaluated the effect of eFABP4 on HepG2 apoptosis. Both apoptosis and necrosis were evaluated by flow cytometry after staining with FITC-conjugated annexin V and PI. eFABP4 induced apoptosis (1.54 fold-increase, $p < 0.05$) in HepG2 cells at similar levels than those levels found for tunicamycin (1.46 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. 2A). Furthermore, eFABP4 increased the mRNA levels of the proapoptotic gene CHOP (2.21 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. 2C). There were no significant changes in necrosis and ubiquitination (Fig. 2B, D). These results indicated that eFABP4 has an important role in apoptosis in HepG2 cells.

3.3. Synergistic effect of eFABP4 and LA on ER stress

Because FAs are ligands of FABP4 and are also well-known contributors to ER stress in several tissues [8,29], we investigated the effects of FAs on eFABP4 induced-ER stress. First, we analyzed the cell viability of HepG2 cells treated with different fatty acids (PA, OA, EA, PO, PE and LA) at serially diluted concentrations (100,

300, 500, 1000 µM) for 6 and 18 h. PA, OA, EA and PE treatment did not decrease cell viability within the first 6 h (Fig. 3A). In contrast, PO and LA treatment resulted in a significant reduction in cell viability (Fig. 3A; PO100: 4.4%; PO300: 35.6%; PO500: 47.5%; PO1000: 55.9%; LA100: 83.8%, $p < 0.05$). At 18 h (Fig. 3B), all the FAs caused a dose-dependent reduction in cell viability, but only linoleate reduced cell viability more than 50% at the lower dose (100 µM). Therefore, we chose linoleate for further experiments.

Because FABP4 is a FA transporter, we explored whether eFABP4 contributes to the effects of LA on cell viability. Treatment of HepG2 cells with LA and eFABP4 for 18 h significantly decreased cell viability (Fig. 3C), reducing cell viability more than 50% (eFABP4+LA: 13.7%, $p < 0.05$). To test whether cell viability was related to the lipid content, lipids were measured by Nile Red. As shown in Fig. 3D and E, both eFABP4 and LA, as well as the combination of the two molecules, significantly induced intracellular lipid accumulation compared to the control cells. The reduction in cell viability was paralleled by an increase in the lipid content in HepG2 cells.

We next analyzed the effect of eFABP4 on ER stress in the presence of LA. LA alone did not increase the mRNA levels of IRE1, ATF6 and eIF2. However, after treatment with eFABP4 plus LA, we observed a significant increase in the IRE1, ATF6 and eIF2 mRNA levels compared to the control (2.58, 1.67 and 1.76 fold-increase, respectively, $p < 0.05$) (Fig. 4A, C, E). LA alone increased ATF6 protein levels (1.16 fold-increase, $p < 0.05$) (Fig. 4D), but did not modify the protein levels of IRE1 (Fig. 4B) and eIF2 (Fig. 4F). After the treatment with eFABP4 plus LA, we observed an increase in protein levels of IRE1 (1.50 fold-increase, $p = 0.10$ vs. CT; $p = 0.058$ vs. LA) (Fig. 4B) and ATF6 (1.31 fold-increase, $p < 0.05$ vs. CT; $p = 0.063$ vs. LA) (Fig. 4D). These results indicate that eFABP4 is directly related to the activation of ER stress in HepG2 cells. Furthermore, LA-induced effects on ER stress-related gene expression are dependent on eFABP4.

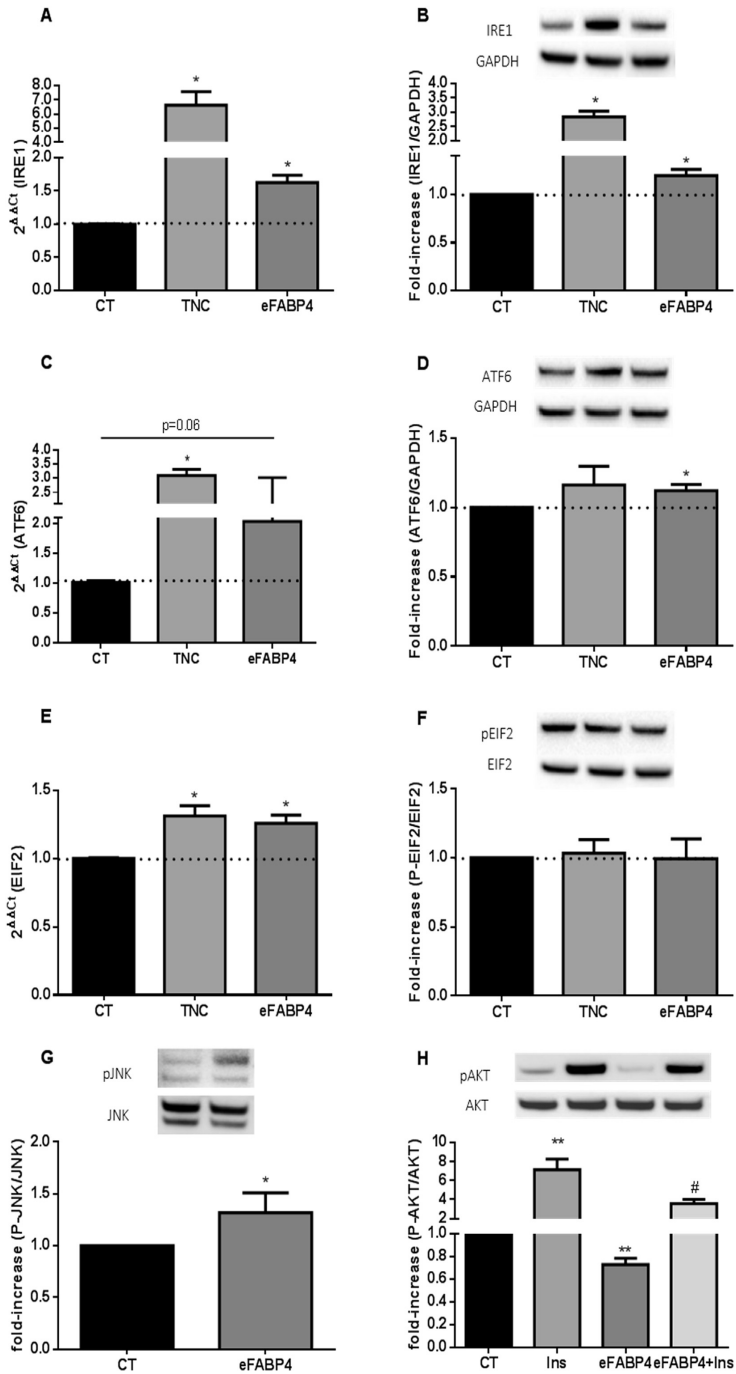
3.4. eFABP4 increases fatty acid-induced apoptosis related to ER stress but not ubiquitination

When HepG2 cells were treated with LA (200 µM) we observed a significant increase in the apoptosis rate (Fig. 5A, 1.28 fold-increase, $p < 0.05$) and in CHOP mRNA expression (Fig. 5C, 2.31 fold-increase, $p < 0.05$). In the presence of eFABP4 plus LA the effect is even more robust for apoptosis (Fig. 5A, 1.53 fold-increase, $p < 0.05$), without any change in CHOP expression (Fig. 5C, 2.29 fold-increase, $p < 0.05$). No changes were observed in necrosis (Fig. 5B). Similar to the results obtained with eFABP4 alone (Fig. 2D), neither LA nor eFABP4 plus LA, had any significant effect on ubiquitination (Fig. 5D).

4. Discussion

In the present study, we provide evidence for a novel link between hepatic ER stress and FABP4. We have demonstrated that eFABP4, *per se*, activates ER stress and attenuates the insulin signaling pathway in liver cells, one of the most important tissues involved in the IR. Furthermore, LA and eFABP4 exert a synergistic effect on the activation of ER stress.

Obesity is characterized by a chronic elevation of FAs concentrations and may have additional actions in the liver contributing to the development of IR and T2D [30]. In addition, FABP4 levels are increased in obesity, MS and T2D, and these increased levels are also closely correlated with adverse lipid profiles and IR. Long-term exposure to FAs might cause ER stress in the liver [12,31]. Here, we demonstrate that eFABP4 increased IRE1 and ATF6 protein levels in hepatocytes. This finding is partially consistent with other studies,



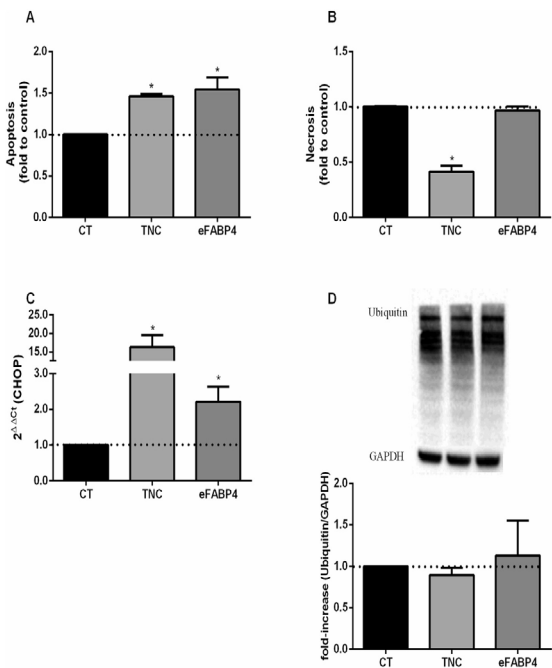


Fig. 2. Effect of eFABP4 on apoptosis and ubiquitination. HepG2 cells were treated with eFABP4 (40 ng/ml) and tunicamycin (TNC, 5 µg/ml) for 18 h (A, B). Apoptosis and necrosis were determined by flow cytometry. (C) CHOP expression was calculated using quantitative RT-PCR with TaqMan primers and the 2^{-ΔΔCT} method. (D) Ubiquitinated proteins were analyzed by western blot. A representative image (upper panel) from three independent experiments is shown. The results are expressed as the mean ± SEM of three separate experiments. *p < 0.05 vs. unstimulated cells (control, CT).

which demonstrated that FABP4 mediates ER stress in macrophages and mesangial cells [22], whereas Kajimoto et al. showed that FABP4 has a cytoprotective role against oxidative and ER stress in adipocytes [23]. These differences could be attributed to tissue-specific activities.

Chronic ER stress is present in the liver, β cells, brain and adipose tissue in animal models of obesity, as well as in obese humans. The mechanism by which ER stress impairs insulin actions and metabolic control is complex. At the signaling level, several mechanisms integrate the ER stress responses with the inflammatory and stress signaling cascades. These include activation of JNK through double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) and via the IRE1 or the PERK pathways, all of which result in impaired insulin receptor signaling [28]. Here, we demonstrate that eFABP4-induced IRE1 and ATF6 protein levels are directly correlated with an increase in JNK phosphorylation and a reduction in AKT phosphorylation, both under basal and in insulin-stimulated conditions, suggesting an impairment of insulin signaling.

Prolonged or severe ER stress also leads to apoptotic cell death. The UPR promotes the expression of CHOP, a pro-apoptotic transcription factor that plays a critical role in cell death. The UPR, possibly through CHOP, down-regulates the anti-apoptotic Bcl-2

family of proteins, but up-regulates the transcription of the pro-apoptotic genes *Bim* and *Puma* [32]. Overall, these effects contribute to apoptosis in cells undergoing irreversible ER stress. In this study, we found that eFABP4 induced apoptosis in HepG2 cells, as assessed by flow cytometry, and CHOP expression. A similar result was reported by Yao et al., who showed that FABP4 mediates apoptosis via ER stress in mesangial cells [22]. Although ER stress also drives protein ubiquitination, as an ER-associated protein degradation (ERAD) mechanism to further eliminate misfolded proteins via the proteasome [10], our results did not show changes in ubiquitinated proteins, suggesting that additional protein modifications, such as glycosylation, could be involved in FABP4-induced ER stress. Actually, the reduction in cell viability found in eFABP4-stimulated cells was related to an increase in the lipid content, suggesting a lipotoxic effect that might drive cellular death.

The role of FAs in ER stress is well established and has been considered to be a link between obesity and IR in peripheral tissues. For this study, we chose LA because in preliminary experiments this FA had a higher biological impact. Moreover, we performed the studies in an albumin-free system to avoid FA buffering effects. This method differs from other studies because our aim was to study the

Fig. 1. Effect of eFABP4 on ER stress and insulin pathway. HepG2 cells were treated with eFABP4 (40 ng/ml) for 18 h in the presence or absence of insulin (Ins, 100 nM) for the last 10 min of treatment. Tunicamycin (TNC) was used as the positive control (5 µg/ml). ER stress markers were analyzed by real time PCR (A, C, E) and western blot (B, D, F). JNK and AKT phosphorylation were analyzed by western blot (G, H). Representative western blots and relative densitometric analyses are shown. The results are expressed as the mean ± SEM of three separate experiments. *p < 0.05 vs. unstimulated cells (control, CT); #p < 0.01 vs. unstimulated cells (control, CT); #p < 0.05 vs. Ins.

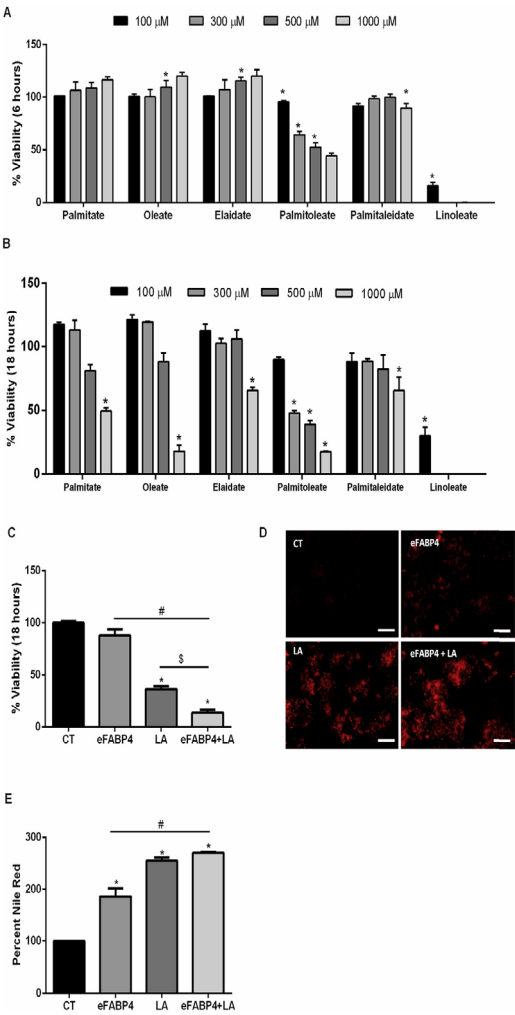


Fig. 3. Effect of fatty acids and eFABP4 on cell viability and lipid content. (A, B) HepG2 cells were treated with fatty acids (palmitate, oleate, elaidate, palmitoleate, palmitoleidate and LA) at different concentrations (100, 300, 500 and 1000 μ M) and incubated for (A) 6 h or (B) 18 h. (C) Cells were treated with eFABP4 (40 ng/ml) and LA (200 μ M). Cell viability is expressed as percentage of control. (D) Fluorescent images of Nile Red at 20 $\times$ magnification. (E) Quantification of Nile Red. The data are presented as the mean values $\pm$ SEM of three experiments. * p < 0.05 vs. unstimulated cells (control, CT); # p < 0.05 vs. eFABP4; $^{\dagger}p$ < 0.05 vs. LA.

combined effect of FA and eFABP4, which would be blunted by the presence of albumin. Our data confirmed that eFABP4 acts synergistically with LA to enhance the protein levels of the ER stress markers IRE1 and ATF6 and to increase their apoptotic properties. These effects support the observations in KO mice, in which the absence of FABP4 protects against IR. Similar findings have been observed using FABP4 inhibitors [33]. Increased hepatic expression and circulating levels of FABP4 have also been observed in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). A study from Hoo et al. demonstrates that FABP4 expression in the liver is dramatically elevated in high fat high cholesterol diet-induced obese mice

with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), whereas liver dysfunction is alleviated by treatment with BMS309403, a highly selective FABP4 inhibitor [34]. Our results could also suggest a role of FABP4 as the link between ER stress in hepatocytes and the development of NASH.

FABP4 is an intracellular FA transporter, and the role of circulating FABP4 is not well understood. In the liver, there is a specific FABP, referred to as FABP1, that prevents lipotoxicity of free FAs and regulates FA trafficking and partition in hepatocytes [35]. Because hepatocytes do not express FABP4, our results must be attributed to eFABP4. We tested the impact of exogenous adipocyte-derived

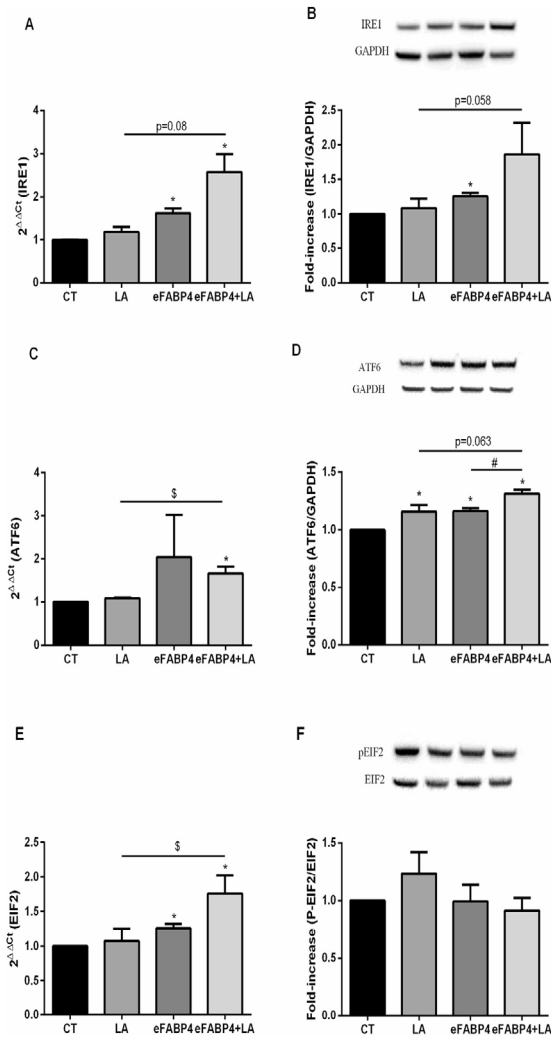


Fig. 4. eFABP4 enhances the expression of ER stress markers induced by LA. HepG2 cells were treated with tunicamycin (5 µg/ml), eFABP4 (40 ng/ml) and LA (200 µM) for 18 h (A, C, E) mRNA levels of genes involved in ER stress were determined using quantitative RT-PCR and normalized to GAPDH expression. (B, D, F) ER stress markers were analyzed by western blot. The data are presented as the mean values ± SEM, and a representative image (upper panel) from three independent experiments is shown. **p* < 0.05 vs. unstimulated cells (control, CT); #*p* < 0.05 vs. eFABP4; §*p* < 0.05 vs. LA.

FABP, that is, the role of eFABP4 as an adipokine. There are several lines of evidence suggesting this role of FABP. Data from our group show that eFABP4 interacts with endothelial membranes [20], eFABP4 induces endothelial dysfunction by interfering with NO production [19]. The presence of eFABP4 accelerates cellular migration [21]. Additionally, the presence of FABP4 alters myocardiocyte contractility [36]. Thus, there is a growing body of evidence supporting the adipokine role of FABP4.

In conclusion, our results demonstrate that eFABP4 induces ER stress in liver cells, mainly via IRE1 and ATF6 activation, as well as

apoptosis. Furthermore, in the presence of FAs, such as LA, ER stress pathways are enhanced due to a synergistic effect between eFABP4 and FAs. Further studies are necessary to fully characterize the underlying mechanisms by which eFABP4 induces ER stress and its impact on insulin signaling pathways. These data suggest that FABP4 could be a link between obesity-related metabolic alterations and hepatic IR. If this link can be demonstrated in humans, then FABP4 inhibition might be explored as a potential therapeutic strategy for treating IR alterations and reducing ER stress in the liver.

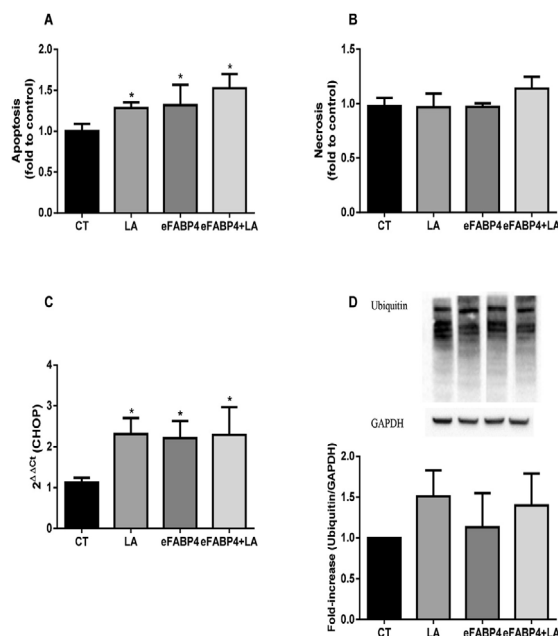


Fig. 5. Effect of eFABP4 on fatty acid-induced apoptosis related to ER stress and ubiquitination. HepG2 cells were treated with eFABP4 (40 ng/ml) and LA (200 μ M) for 18 h (A, B) Apoptosis and necrosis were determined by flow cytometry. (C) CHOP expression was calculated using quantitative RT-PCR with TaqMan primers and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. (D) Ubiquitinated proteins were analyzed by western blot. A representative image (upper panel) from three independent experiments is shown. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three separate experiments. * $p < 0.05$ vs. unstimulated cells (control, CT).

Conflict of interest

The authors declared that they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support

This study was funded by a grant from ISCIII, Madrid, Spain (PI11/022116), and from the CIBER in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CB07/08/0028).

Alba Bosquet is supported by a pre-doctoral fellowship from the ISCIII, Madrid, Spain (FI12/00421). Paula Saavedra is supported by a pre-doctoral fellowship from the Rovira i Virgili University (Martí Franquès Research Grant, 2012BPURV-60).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.012>.

References

- [1] H. Xu, A.V. Hertz, K.A. Steen, Q. Wang, J. Suttles, D.A. Bernlohr, Uncoupling lipid metabolism from inflammation through fatty acid binding protein-dependent expression of UCP2, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 1055–1065, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01122-14>.
- [2] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, et al., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science* 306 (2004) 457–461, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1103160>.
- [3] M. Flamment, E. Hajduch, P. Ferré, F. Foufelle, New insights into ER stress-induced insulin resistance, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 381–390, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.003>.
- [4] G. Boden, Obesity and free fatty acids, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 37 (2008) 635–646, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ect.2008.06.007> viii–ix.
- [5] J. Delarue, C. Magnan, Free fatty acids and insulin resistance, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10 (2007) 142–148, <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e328042ba90>.
- [6] Y. Zhang, R. Xue, Z. Zhang, X. Yang, H. Shi, Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells, *Lipids Health Dis.* 11 (2012) 1, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-11-1>.
- [7] J. Lu, Q. Wang, L. Huang, H. Dong, L. Lin, N. Lin, et al., Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator, *Endocrinology* 153 (2012) 5275–5284, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1418>.
- [8] Y. Wei, D. Wang, F. Topczewski, M.J. Pagliassotti, Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E275–E281, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00644.2005>.
- [9] W. Cui, J. Ma, X. Wang, W. Yang, J. Zhang, Q. Ji, Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of β -cells by Ca²⁺/calpain-2 pathways, *PLoS One* 8 (2013) e59921, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059921>.
- [10] C. Hetz, E. Chevet, H.P. Harding, Targeting the unfolded protein response in disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 703–719, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3976>.
- [11] E. Erbay, V.R. Babaev, J.R. Mayers, L. Makowski, K.N. Charles, M.E. Snitow, et al., Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis, *Nat. Med.* 15 (2009) 1383–1391, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2067>.
- [12] H. Malhi, R.J. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress in liver disease, *J. Hepatol.* 54 (2011) 795–809, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.005>.
- [13] M. Furuhashi, G.S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 489–503, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2589>.
- [14] A. Xu, Y. Wang, J.Y. Xu, D. Strejskal, S. Tam, J. Zhang, et al., Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome, *Clin. Chem.* 52 (2006) 405–413, <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.062463>.
- [15] A. Cabré, I. Lázaro, M. Cofán, E. Jaraúta, N. Plana, A.L. García-Ortín, et al., FABP4

plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* 51 (2010) 1173–1178. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M900066>.

[16] A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, et al., Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients, *Atherosclerosis* 195 (2007) e150–e158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.045>.

[17] A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, et al., Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1746–1751. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M800102-JLR200>.

[18] S. Kralisch, M. Fasshauer, Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 56 (2013) 10–21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2737-4>.

[19] G. Aragones, P. Saavedra, M. Heras, A. Cabré, J. Girona, L. Masana, Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells, *Cardiovasc. Diabetol.* 11 (2012) 72. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-11-72>.

[20] P. Saavedra, J. Girona, G. Aragones, A. Cabré, S. Guaita, M. Heras, et al., Interaction of FABP4 with plasma membrane proteins of endothelial cells, *Clin. Invest. Arterioscler.* 27 (2015) 26–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.artsci.2014.05.003>.

[21] J. Girona, R. Rosales, N. Plana, P. Saavedra, L. Masana, J.-C. Vallvé, FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway, *PLoS One* 8 (2013) e81914. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081914>.

[22] F. Yao, Z. Li, T. Ehara, L. Yang, D. Wang, L. Feng, et al., Fatty acid-binding protein 4 mediates apoptosis via endoplasmic reticulum stress in mesangial cells of diabetic nephropathy, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.003>.

[23] K. Kajimoto, Y. Minami, H. Harashima, Cytoprotective role of the fatty acid binding protein 4 against oxidative and endoplasmic reticulum stress in 3T3-L1 adipocytes, *FEBS Open Bio* 4 (2014) 602–610. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2014.06.008>.

[24] A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, et al., Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1746–1751. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M800102-JLR200>.

[25] P. Greenspan, E.P. Mayer, S.D. Fowler, Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 965–973. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 10.03.16).

[26] M. Schröder, R.J. Kaufman, The mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 739–789. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>.

[27] M. Schröder, R.J. Kaufman, ER stress and the unfolded protein response, *Mutat. Res.* 569 (2005) 29–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056>.

[28] S. Fu, S.M. Watkins, G.S. Hotamisligil, The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling, *Cell Metab.* 15 (2012) 623–634. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.007>.

[29] A.K. Leamy, R.A. Egnatchik, M. Shiota, P.T. Ivanova, D.S. Myers, H.A. Brown, et al., Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1478–1488. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M050237>.

[30] S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature* 444 (2006) 840–846. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05482>.

[31] X. Gu, K. Li, D.R. Laybutt, M. He, H.-L. Zhao, J.C.N. Chan, et al., Bip overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells, *Life Sci.* 87 (2010) 724–732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.012>.

[32] H. Urrea, E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, C. Hetz, When ER stress reaches a dead end, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 3507–3517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>.

[33] M. Furuhashi, G. Tuncman, C.Z. Görgün, L. Makowski, G. Atsumi, E. Vulliamour, et al., Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2, *Nature* 447 (2007) 959–965. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05844>.

[34] R.L.C. Hoo, L.P.C. Lee, M. Zhou, J.Y.L. Wong, X. Hui, A. Xu, et al., Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice, *J. Hepatol.* 58 (2013) 358–364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.022>.

[35] B.P. Atshaves, G.C. Martin, H.A. Hostetter, A.L. McIntosh, A.B. Kier, F. Schroeder, Liver fatty acid-binding protein and obesity, *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 1015–1032. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.01.005>.

[36] V. Lamounier-Zepter, C. Look, J. Alvarez, T. Christ, U. Ravens, W.-H. Schunck, et al., Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease, *Circ. Res.* 105 (2009) 326–334. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.200501>.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

FABP4 inhibitor BMS309403 decreases fatty-acid induced endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle by reducing MAPK activation.

Alba Bosquet, Ricardo Rodríguez-Calvo, Sandra Guaita-Esteruelas,
Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana.

En revisió

L'obesitat i la DM2 s'han relacionat amb un estrès del RE i inflamació crònics. Els inhibidors de FABP4 s'han proposat com a una possible diana terapèutica contra la inflamació associada a la RI i la DT2. Tot i això, els mecanismes moleculars a través dels quals aquestes molècules exerceixen la seva funció no són del tot coneguts. Per tant, l'**objectiu** d'aquest estudi ha estat investigar si el BMS309403 (inhibidor de FABP4) prevé la inflamació associada a l'estrès del RE induït per lípids en múscul esquelètic, tant *in vivo* com *in vitro*.

Els **resultats** principals d'aquest treball són:

- La HFD augmenta el pes corporal dels ratolins, així com diferents paràmetres bioquímics (glucosa, leptina, NEFAs, VLDL, TG i adiponectina). A més, els animals alimentats amb la HFD són intolerants a la glucosa. El tractament amb BMS309403 augmenta el colesterol total i disminueix la ràtio HDL/VLDL, índex de risc cardiovascular.
- El tractament amb BMS309403 redueix l'estrès del RE (*Bip*, *Chop*, IRE1 i pEIF2) i la inflamació (*Ccl2*, *Tnf*, *Il6*) induïda per lípids, tant en ratolins com en els miotubs C2C12.

- El tractament amb BMS309403 redueix els dipòsits lipídics intramioel·lulars. A més, aquesta reducció està relacionada amb una disminució de la fosforilació de les MAPK ERK1/2 i p38, i de la translocació nuclear de NF- κ B.

Les **conclusions** d'aquest estudi suggereixen que el BMS309403 redueix la inflamació associada a l'estrès del RE en múscul esquelètic, disminuint l'activació de les MAPK ERK1/2 i p38, i la translocació nuclear de NF- κ B.

FABP4 inhibitor BMS309403 decreases fatty-acid induced endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle by reducing MAPK activation.

Alba Bosquet, Ricardo Rodríguez-Calvo, Sandra Guaita-Esteruelas,
Mercedes Heras, Josefa Girona i Lluís Masana.

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital,
Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Spanish Biomedical
Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders
(CIBERDEM), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

Abstract

Aim/hypothesis: Fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors have been proposed as potential therapeutic approaches against insulin resistance-related inflammation and type 2 diabetes. However, the underlying molecular mechanisms by which these molecules drive these effects in skeletal muscle remain elusive. Here, we assessed whether the FABP4 inhibitor, BMS309403, prevented lipid-induced endoplasmic reticulum (ER) stress-associated inflammation in skeletal muscle.

Methods: The role of BMS309403 was assessed in both skeletal muscle of high-fat diet (HFD)-fed mice and in palmitate-stimulated C2C12 myotubes.

Results: HFD increased body weight, induced plasma levels of glucose, leptin, non-sterified fatty acids (NEFAs), very low-density lipoproteins (VLDL)-cholesterol and triglycerides, and reduced levels of adiponectin. Moreover, HFD increased the area under the curve (AUC) in a glucose tolerance test (GTT). Treatment with BMS309403 not reversed the effect of the HFD on the above-mentioned parameters, but increased plasma total cholesterol (mainly associated with both high-density (HDL) and low-density (LDL) lipoproteins), and reverted the HFD-induced reduction in the HDL/VLDL-cholesterol ratio. Treatment with BMS309403 also reduced lipid-induced ER stress and inflammation in both mice skeletal muscle and C2C12 myotubes. The effects of the FABP4 inhibitor reducing lipid-induced ER stress-associated inflammation were related to reduction of fatty acids (FAs)-induced intramyocellular lipid depots and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) nuclear translocation. Finally, BMS309403 reduced extracellular signal-related kinase ERK1/2 phosphorylation and lipid-induced p38 phosphorylation, which are upstream of the lipid-induced NF- κ B activation.

Conclusions: Overall, these findings indicate that BMS309403 reduces ER stress-associated inflammation in skeletal muscle by reducing both ERK1/2 and p38 MAPK activation.

Key words: BMS309403, ER stress, Inflammation, NF- κ B, ERK1/2, p38.

1. Introduction

Saturated fatty acids (FAs) have been proposed as main contributors to insulin resistance development [1,2]. Elevated plasma FAs are linked with ectopic fat accumulation in non-adipose tissues, such as liver, heart or skeletal muscle. Among them, skeletal muscle is the main consumer of the glucose stimulated by insulin, thus acting as the primary site sensitive to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [3]. Despite the mechanisms by which FAs impair insulin signalling in skeletal muscle are not completely elucidated, increasing evidence propose an activation of cellular responses conducing to activation of a chronic low-level inflammatory process [4]. At molecular level, the underlying mechanisms conducing to inflammatory response involve activation of the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B). Interestingly, this transcription factor has been related to the impairment of insulin signalling induced by fatty acids in skeletal muscle [5]. Once activated, NF- κ B regulates the expression of a wide range of genes involved in inflammation and insulin resistance [6].

Several reports have proposed endoplasmic reticulum (ER) stress as emerging potential mechanism responsible for the saturated FAs-induced inflammation and insulin resistance [7,8]. ER is a cellular organelle responsible for the protein synthesis and maturation. When ER function is altered, unfolded or misfolded proteins accumulate inside ER, leading to the activation of the unfolded protein response (UPR), aimed to re-establish the correct ER function [9]. The UPR is mainly mediated by the activation of three cellular signalling pathways, such inositol-requiring enzyme (IRE)-1 α , PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6). These three cellular pathways are able to interact with several inflammatory

and stress signalling, including NF- κ B [10]. It has been reported that UPR reduces the NF- κ B inhibitor I κ B α through several mechanisms [11–13], thus resulting in the NF- κ B activation and the regulation of genes involved in inflammation and insulin resistance [10].

Increasing evidence have proposed the use of the fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors as emerging therapeutic approach against insulin resistance and type 2 diabetes [14]. Among the synthetic FABP4 inhibitors developed to date, the BMS309403 is a biphenyl azole inhibitor that binds with high affinity to the FABP4-binding cavity (K_i value < 2 nM), thus competing for the FAs binding [14–17]. Experimental approaches have shown that BMS309403 protects against insulin resistance, type 2 diabetes, fatty liver disease, and atherosclerosis [18]. The mechanisms beyond BMS309403 effects involves inhibition of lipid accumulation, cholesterol efflux and inflammation in macrophages, and suppression of fatty acid uptake in adipocytes [18]. Additionally, BMS309403 may enhance glucose uptake in myotubes through FABPs-independent mechanisms, via activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) signalling pathway [19]. Nevertheless, the role of this drug reducing plasma glucose levels in experimental animals in front a GTT have shown somewhat conflicting results. Early studies reporting that BMS309403 reduces glucose intolerance in both ob/ob and HFD-fed mice [18], were not subsequently corroborated by others [20]. Recently, it has been reported that FABP4 inhibition prevented upregulation of ER stress markers by several stimuli in human mesangial cells [21]. However, the role of BMS309403 regulating the ER stress-associated inflammation in skeletal muscle has not been fully explored.

In the present study, we found that treatment with BMS309403 attenuates lipid-induced ER stress and inflammation in skeletal muscle through a mechanism involving attenuation of the p38 MAPK pathway and activation of the NF- κ B.

2. Material and methods

Reagents

BMS309403 was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Palmitate, insulin and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Animals

Six-week-old C57BL/6J male mice were maintained on a standard light-dark cycle (12 h light/dark cycle) and temperature ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) conditions, with *ad libitum* access to food and water. Animals were randomly distributed in three experimental groups ($n = 10$ each) and fed with a standard chow diet (STD: 10% kcal from fat. Panlab; Barcelona, Spain) or a high-fat diet (HFD: 60% kcal from fat. Panlab; Barcelona, Spain) for 12 weeks. After 6 weeks of feeding, a GTT was performed on mice fasted for 4 h. Briefly, animals received 2 g/kg body weight of glucose by intraperitoneal injection, and blood was collected from the tail vein after 0, 15, 30, 60, 120 and 180 min. Area Under the Curve (AUC) was determined as a measure of glucose intolerance. Then animals were treated with a daily oral gavage of PBS (STD or HFD) or of $15\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ of the FABP4 inhibitor BMS309403 (HFD+BMS) for six weeks more [18,22]. Before the end the procedure, a glucose tolerance test was performed again. After this period, mice were euthanized under ketamine/medetomidine anaesthesia (75 mg/kg and 1 mg/kg, respectively) and the skeletal muscle (soleus) were

immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. A blood sampled was collected and plasma samples were analysed for glucose (Spinreact; Barcelona, Spain), insulin, resistin, leptin, adiponectin (Milliplex®, Millipore; Billerica, MA, USA), FABP4 (Biovendor; Brno, Czech Republic), non-sterified fatty acids (NEFAs) (Wako; Osaka, Japan), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides (Spinreact; Barcelona, Spain). HDL/LDL-cholesterol and HDL/VLDL-cholesterol ratios were analysed as cardiovascular risk indexes. These experiments conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996). All procedures were approved by the University Rovira i Virgili Bioethics Committee, as stated in Law 5/21 July 1995 passed by the Generalitat de Catalunya (Autonomous Government of Catalonia).

Cell culture

Mouse C2C12 myoblasts (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin, at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded in multi-well plates and differentiated to myotubes in medium containing DMEM and 2% horse serum (HS) for 4 days (Biowest; Nuaille, France). Then cells were serum-starved in DMEM containing 0.1% HS for 24 hours and challenged with BSA-conjugated palmitate (0.25 mmol/l) for 16 hours (RNA and whole protein), 2 hour (nuclear protein extracts) or 10 min (whole protein), in presence or absence of BMS309403 (25 µM). Palmitate was conjugated with fatty acid-free BSA, following a modified method from Chavez et al. [23]. After incubation,

RNA, whole protein and nuclear protein extracts were extracted from myotubes as described below.

RNA preparation and quantitative real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Levels of mRNA were assessed by the real time PCR as previously described [26]. Total RNA was isolated from skeletal muscle using the TRI Reagent (Sigma-Aldrich; Barcelona, Spain), or from C2C12 using the PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies; Madrid, Spain), according to the manufacturer's recommendations. RNA integrity was determined by electrophoresis in agarose gel and was quantified by a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific; Madrid, Spain). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio; France). Levels of mRNA were assessed by real-time PCR on an ABI PRISM 7900 sequence detector (Applied Biosystems; CA, USA). TaqMan gene expression assays-on-demand (IDT; Leuven, Belgium) were used for mouse *Atf6* (Mm.PT.58.42093650), mouse *Bip* (Mm.PT.58.30646955), mouse CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (*Chop*) (Mm.PT.58.30882054), mouse *Ccl2* (Mm.PT.58.42151692), mouse tumor necrosis factor (*Tnf*) (Mm.PT.58.12575861) and mouse interleukin 6 (*Il6*) (Mm.PT.58.10005566). TATA-binding protein (*Tbp*) (Mm.PT.58.10867035) was used as endogenous controls [24].

Immunoblotting

Cellular extracts were obtained using RIPA buffer (0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 50 mM Tris-HCl, 0.5% deoxycholate) containing phosphatase and protease inhibitors (Roche Diagnostics; Basel, Switzerland). Protein extracts from mice skeletal muscle were generated using an ice-cold

lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl and 1 mM DTT, supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Roche Diagnostics; Basel, Switzerland). Nuclear extracts were obtained as previously described [25]. Protein concentrations were determined using a Bradford Assay Kit (Bio-Rad; USA). Equal amounts of proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using iBlot® Dry Blotting System (Life Technologies; Madrid, Spain). Western blot analyses were performed using antibodies against phospho-Ser⁴⁷³-AKT (#4060), AKT (#4691), IRE1 α (#3294), phospho-Ser⁵¹-eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)- α (# 9721), eIF2 α (#9722), phospho-Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 (#4370), ERK1/2 (#4695), phospho-Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 (#4511), p38 (#8690), all of them from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). ATF6 antibody (#09-069) was obtained from Millipore and p65 antibody (sc-109) from Santa Cruz Biotechnology. α -actin (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and Histone H3 (#9715, Cell Signaling) were used as a loading control for total and nuclear extracts respectively. Detection was performed using the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Dako; Glostrup, Denmark). The bands were visualized using ECL reagents (Amersham Pharmacia; USA) with the Amersham Imager 600 and quantified with ImageQuant TL software, version 8.1 (GE Healthcare; Barcelona, Spain).

Nile Red staining

To visualize the lipid droplets, cells were incubated with the lipophilic fluorescent dye Nile Red (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich; Barcelona, Spain) diluted in PBS for 5 min at room temperature without prior fixation [26]. The

cell images were captured using a microscope (Olympus IX71, Spain) and quantified with Image-J software from four random fields.

Statistics

The results are presented as the mean $\pm$ standard error mean (SEM) of at least 3 separate experiments. Differences between the means were determined using a t-test or a one-way analysis of variance (ANOVA), which was followed by a Bonferroni's *post-hoc* test for multiple comparisons, using the GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc; La Jolla, CA, USA). The differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of BMS309403 on weight, plasma profile and glucose tolerance test in mice fed with a HFD

To explore the effects of BMS309403 treatment once the effects of the HFD were established, mice were fed with STD or HFD for 6 weeks prior to drug administration. After 6 weeks, animals fed with the HFD showed increased body weight (STD: 28.44 ± 0.28 g vs HFD: 31.70 ± 0.54 g; $p < 0.001$) and glucose intolerance (data not shown) compared to STD-fed mice. Then, animals were treated with a daily oral gavage of BMS309403 ($15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) or vehicle for 6 weeks more. After this period, mice fed with HFD showed a further body weight increment (STD: 29.80 ± 0.60 g vs HFD: 38.08 ± 1.80 g; $p < 0.001$). In addition, mice fed with the HFD showed increased levels of plasma glucose, leptin, NEFAs, very low-density lipoproteins (VLDL)-cholesterol and triglycerides, and reduced levels of adiponectin compared with mice fed with STD diet. Regarding FABP4 levels, HFD increased these levels, but not significantly (Table 1). Treatment with BMS309403 not reduced the weight increment on animals fed with HFD

and not reversed the effect of HFD on the above-mentioned parameters. Since BMS309403 did not decrease circulating FABP4 levels, these data may suggest that BMS309403 may act by a FABP4 inhibition independent mechanism. Surprisingly, animals treated with BMS309403 showed increased plasma total cholesterol, mainly associated to both high-density (HDL) and low-density (LDL) lipoproteins, as compared to HFD-fed mice receiving vehicle (Table 1). Thus, we measured both HDL/LDL-cholesterol and HDL/VLDL-cholesterol ratios as indexes of cardiovascular risk. No changes were found in the HDL/LDL-cholesterol ratio, but BMS309403 reverted the HFD-induced reduction in the HDL/VLDL-cholesterol index (Table 1). Additionally, treatment with BMS309403 not reversed the glucose intolerance induced by HFD (Figure 1A and 1B).

3.2. BMS309403 reverses HFD-induced ER stress and inflammation in mice skeletal muscle

Despite BMS309403 not reduce glucose intolerance induced by HFD at systemic level, we explored the effect of this drug regulating ER stress in skeletal muscle, since this tissue is the primary consumer of glucose stimulated by insulin and thereby the major site sensitive to insulin resistance [3]. As a first approach, we analysed the expression of *Atf6*, one of the main effectors of UPR response. Unfortunately, we do not observed changes in the *Atf6* mRNA levels in animals fed with HFD, treated or not with BMS309403 (Figure 2A). However, this drug reversed the up-regulation of downstream ER stress markers by the HFD, such as the chaperone *Bip* (1.01 fold, $p < 0.05$ vs. HFD) (Figure 2B) and the pro-apoptotic transcription factor *Chop* (1.00 fold, $p < 0.05$ vs. HFD) (Figure 2C). Given that ER stress has been related to inflammation [7,27], we explored whether the changes observed in the ER stress markers by BMS309403 were related to

regulation in the expression of pro-inflammatory genes. Consistent with the regulation of the ER stress, *Ccl2* and *Tnf* mRNA levels were increased in skeletal muscle of mice fed with HFD (3.77 and 2.07 fold, respectively, $p < 0.05$ vs. STD), whereas treatment with BMS309403 significantly reduced the expression of these cytokines (0.73 and 0.99 fold, respectively, $p < 0.05$ vs. STD) (Figure 2C and 2D).

3.3. BMS309403 reduces palmitate-induced ER stress in C2C12 myotubes

Next we explored the BMS309403 effects in C2C12 myotubes. To mimic the effects of the HFD, cells were stimulated with palmitate (0.25 mM) for 16 hours, a well-known ER stress activator in skeletal muscle [28,29]. Accordingly, palmitate induced *Atf6* expression (1.32 fold, $p < 0.001$ vs. CT) (Figure 3D) although no changes were found in ATF6 protein levels (Figure 3A). Furthermore, palmitate increased IRE1 α protein levels (1.44 fold, $p < 0.05$ vs. CT) (Figure 3B), as well as EIF2 α phosphorylation (1.2 fold, $p < 0.01$ vs. CT) (Figure 3C). Conversely, palmitate effects on the UPR activation were prevented in cells treated with the FABP4 inhibitor (25 μ M) (0.83 and 0.93 fold, respectively, $p < 0.05$ vs. PA) (Figures 3B and 3C). Consistent with the regulation of the main pathways involved in the UPR, myotubes exposed to palmitate showed increased expression of the downstream ER stress markers *Bip* and *Chop* (3.95 and 5.74 fold, respectively, $p < 0.001$ vs. CT), whereas in the presence of BMS309403, the mRNA levels of these two genes were reduced (3.16 and 4.19 fold, respectively, $p < 0.05$ vs. PA) (Figures 3E and 3F).

3.4. BMS309403 attenuates palmitate-induced intramyocellular lipid accumulation in C2C12 myotubes

Because ER stress can promote lipid accumulation in several cell types [30,31], we explored whether effects of BMS309403 reducing palmitate-induced ER stress were related to lipid intracellular storage. In agreement with the augmented UPR, Nile Red staining revealed that palmitate-stimulated cells exhibited a 4.23-fold ($p<0.001$) increase in intramyocellular lipid storage compared to non-stimulated cells (Figure 4A and 4B). However, BMS309403 treatment almost completely suppressed the palmitate effect on lipid accumulation (49.64% reduction *vs.* PA, $p<0.05$) (Figure 4A and 4B).

3.5. BMS309403 prevents inflammation in C2C12 myotubes

Since ER stress contributes to activation of several signalling conducing to inflammation [7,27], we next assessed the role of BMS309403 counteracting the up-regulation of several pro-inflammatory mediators by palmitate. Similar to data obtained in mice, treatment with BMS309403 prevented the palmitate-induced expression of pro-inflammatory genes, such as *Ccl2*, *Tnf* and *Il6* (1.25, 11.83 and 6.92 fold, respectively, $p<0.05$ *vs.* PA) (Figures 5A-C), some of them involved in insulin resistance [32]. These pro-inflammatory cytokines are under the transcriptional regulation of NF- κ B. Interestingly, it has been previously reported that ER stress contributes to activation of this transcription by reducing I κ B α through several mechanisms [11–13]. Because I κ B α reduction lead NF- κ B nuclear translocation, we analysed nuclear protein levels of the NF- κ B p65 subunit. Accordingly with transcriptional changes, treatment with BMS309403 reduced palmitate-induced p65 nuclear translocation (0.96 fold, $p<0.05$ *vs.* PA) (Figure 5D).

3.6. BMS309403 regulates MAPK phosphorylation in C2C12 myotubes

Finally, we attempted to investigate the molecular mechanism by which BMS309403 inhibits NF- κ B activation in skeletal muscle cells. Several reports have identified that both, ERK1/2 and p38 MAPK leads the activation of NF- κ B [33]. Thereby, we analysed the effect of BMS309403 regulating both ERK1/2 and p38 MAPK in palmitate-stimulated C2C12 myotubes. As it is shown in Figure 6A, palmitate not induced ERK1/2 phosphorylation under our experimental conditions (Figure 6A), suggesting that additional pathways are required to mediate its effects in our model. However, palmitate stimulation significantly increased the phospho-p38 protein levels (1.23 fold, $p < 0.001$ vs. CT) (Figure 6B). Treatment with BMS309403 reduced both phospho-ERK1/2 and phospho-p38 protein levels in palmitate-stimulated cells (0.71 and 0.96 fold, respectively, $p < 0.05$ vs. PA), suggesting that one of the potential mechanisms by which this molecule attenuates the ER stress-associated inflammation in skeletal muscle is through reduction of both ERK1/2 and p38 MAPK activation.

4. Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time that BMS309403 treatment reduces fatty-acid induced-ER stress and inflammation in skeletal muscle by reducing both ERK1/2 and p38 activation.

Excessive intake of diets with high fat content promotes increase of plasma NEFAs, which actively contribute to development of insulin resistance in peripheral tissues [1,2]. Recently, FABP4 inhibitors, such as BMS309403, have been proposed as potential therapeutic agents for targeting some of these metabolic diseases [18]. Interestingly, *ob/ob* mice

treated with BMS309403 showed decreased blood glucose, insulin and triglyceride levels, and increased adiponectin concentration [18]. Furthermore, both *ob/ob* and HFD-fed mice showed improved glucose tolerance after treatment with BMS309403 [18]. However, the effect of this drug improving glucose tolerance has not been corroborated by others [20]. Under our experimental conditions, BMS309403 not reduced HFD-induced glucose intolerance, assessed by the calculation of the AUC, thus confirming the findings from Lan *et al.* [20]. Additionally, the FABP4 inhibitor was unable to reverse the HFD effect inducing plasma glucose, leptin, NEFAs, triglycerides and VLDL-cholesterol, and reducing adiponectin. Surprisingly, BMS309403 increased plasma total cholesterol, mainly associated with both HDL and LDL. Despite no changes were found in HDL/LDL-cholesterol ratio, BMS309403 reversed the HFD effect on the HDL/VLDL-cholesterol, suggesting a kind of protection reducing cardiovascular risk.

At tissue level, it has been reported that BMS309403 reduces the expression of inflammatory mediators and improves insulin sensitivity by inhibiting Jun N-terminal kinase (JNK) and AKT signalling, in both white adipose tissue and liver from *ob/ob* mice [18]. Moreover, in skeletal muscle cells this drug improves glucose uptake via AMPK activation [19]. Although these studies reported some of the mechanisms of action of BMS309403 reducing inflammation-related insulin resistance, there is no information as to whether this drug regulates these disturbances by additional processes. Interestingly, FABP4 inhibition prevents ER stress markers in human mesangial cells [21]. Given that ER stress has been proposed as one of the potential mechanisms by which FAs conduce to inflammation and insulin resistance [7,8], BMS309403 may improve these

alterations by regulating this process. Thereby, we explored the role of this drug regulating ER stress-associated inflammation in skeletal muscle of HFD-fed mice, since this is the main site sensitive to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [3]. The FABP4 inhibitor reduced the effects of HFD up-regulating the expression of genes downstream of UPR response, such as *Bip* and *Chop*, showing for first time that this drug directly impacts in the regulation of ER stress in skeletal muscle. In line with this observation, BMS309403 inhibited the HFD-induced cytokine expression, suggesting that some of the protective effect of this drug in skeletal muscle might be due to its ability to reduce the ER stress-associated inflammation. Similar results were obtained in C2C12 myotubes stimulated with palmitate, thus confirming the BMS309403 role regulating ER stress and inflammation in skeletal muscle cells. However, FABP4 stimulation did not induce ER stress in C2C12 myotubes (Fig. S1), suggesting that BMS309403 inhibits the ER stress-induced inflammation through a FABP4 independent mechanism. Interestingly, Lin *et al.* previously reported that BMS309403 was able to induce glucose uptake via a mechanism not mediated by FABP4 [19]. In order to explore the potential molecular mechanism by which BMS309403 decreased fatty acids-induced ER stress-associated inflammation, we analysed the p65 nuclear translocation. Accordingly with our previous data, BMS309403 treatment prevented palmitate-induced p65 nuclear translocation, proposing that regulation of the inflammatory process was at least partially mediated by the NF- κ B inhibition. Interestingly, palmitate-stimulated cells showed increased intracellular lipid content, which was not observed in BMS309403-treated cells. Given that accumulation of intracellular lipid species can activate cellular signalling cascades conducting to NF- κ B activation [4], BMS309403 may regulate the ER stress-associated inflammation by reducing intracellular

lipid content. Accordingly with this hypothesis, BMS309403 reduced ERK1/2 phosphorylation and attenuated palmitate-induced p38 MAPK activation, proposing regulation of these cellular pathways as one of the potential mechanisms by which this drug reduced palmitate-induced ER stress-associated inflammation in skeletal muscle cells.

Altogether, in the present study we show for the first time that treatment with BMS309403 reduced saturated FAs-induced ER stress-associated inflammation in skeletal muscle. The underlying molecular mechanisms involve reduction of intracellular lipid content and inhibition of the ERK1/2 and p38 MAPK signalling, all conducing to attenuation of the lipid-induced NF- κ B activation. Although further studies are necessary to fully characterize the role of BMS309403 regulating metabolic alterations induced by FAs, our data reveal a new mechanism of action by which this drug contribute to preventing the lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle.

Funding

This research was financially supported by a grant from ISCIII, Madrid, Spain (PI15/00627), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and from the CIBER in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CB07/08/0028). AB was supported by a pre-doctoral fellowship from the ISCIII, Madrid, Spain (FI12/00421).

References

- [1] B. Vessby, M. Uusitupa, K. Hermansen, G. Riccardi, A.A. Rivellese, L.C. Tapsell, C. Näslén, L. Berglund, A. Louheranta, B.M. Rasmussen, G.D. Calvert, A. Maffetone, E. Pedersen, I.B. Gustafsson, L.H. Storlien, Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin

-
-
- sensitivity in healthy men and women: The KANWU study, *Diabetologia*. 44 (2001) 312–319. doi:10.1007/s001250051620.
- [2] F.B. Hu, S. Liu, R.M. Van Dam, S. Liu, Diet and risk of Type II diabetes: The role of types of fat and carbohydrate, 2001. doi:10.1007/s001250100547.
- [3] D.E. Kelley, B.H. Goodpaster, L. Storlien, Muscle triglyceride and insulin resistance., *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 325–46. doi:10.1146/annurev.nutr.22.010402.102912.
- [4] K.E. Wellen, G.S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1111–1119. doi:10.1172/JCI200525102.
- [5] J.K. Kim, Y.J. Kim, J.J. Fillmore, Y. Chen, I. Moore, J. Lee, M. Yuan, Z.W. Li, M. Karin, P. Perret, S.E. Shoelson, G.I. Shulman, Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 437–46. doi:10.1172/JCI11559.
- [6] R.G. Baker, M.S. Hayden, S. Ghosh, NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease, *Cell Metab.* 13 (2011) 11–22. doi:10.1016/j.cmet.2010.12.008.NF-.
- [7] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease, *Cell.* 140 (2010) 900–917. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034.Endoplasmic.
- [8] K. Zhang, R.J. Kaufman, From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response, *Nature.* 454 (2008) 455–462. doi:10.1038/nature07203.
- [9] D. Ron, Translational control in the endoplasmic reticulum stress response, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 1383–1388. doi:10.1172/JCI200216784.
- [10] A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, P. Agostinis, ER stress-induced inflammation: Does it aid or impede disease progression?, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 589–598. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.010.

- [11] P. Hu, Z. Han, A.D. Couvillon, R.J. Kaufman, J.H. Exton, Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression., *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3071–84. doi:10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006.
- [12] J. Deng, P.D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R.J. Kaufman, N. Sonenberg, H.P. Harding, D. Ron, Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 10161–10168. doi:10.1128/MCB.24.23.10161-10168.2004.
- [13] H. Yamazaki, N. Hiramatsu, K. Hayakawa, Y. Tagawa, M. Okamura, R. Ogata, T. Huang, S. Nakajima, J. Yao, A.W. Paton, J.C. Paton, M. Kitamura, Activation of the Akt-NF- B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response, *J. Immunol.* 183 (2009) 1480–1487. doi:10.4049/jimmunol.0900017.
- [14] R. Bagheri, A.N. Qasim, N.N. Mehta, K. Terembula, S. Kapoor, S. Braunstein, M. Schutta, N. Iqbal, M. Lehrke, M.P. Reilly, Relation of plasma fatty acid binding proteins 4 and 5 with the metabolic syndrome, inflammation and coronary calcium in patients with type-2 diabetes mellitus., *Am. J. Cardiol.* 106 (2010) 1118–23. doi:10.1016/j.amjcard.2010.06.028.
- [15] R. Sulsky, D.R. Magnin, Y. Huang, L. Simpkins, P. Taunk, M. Patel, Y. Zhu, T.R. Stouch, D. Bassolino-Klimas, R. Parker, T. Harrity, R. Stoffel, D.S. Taylor, T.B. Lavoie, K. Kish, B.L. Jacobson, S. Sheriff, L.P. Adam, W.R. Ewing, J.A. Robl, Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP), *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 3511–3515. doi:10.1016/j.bmcl.2006.12.044.
- [16] M. Furuhashi, G.S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets., *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 489–503. doi:10.1038/nrd2589.

-
-
- [17] A. V. Hertz, K. Hellberg, J.M. Reynolds, A.C. Kruse, B.E. Juhlmann, A.J. Smith, M.A. Sanders, D.H. Ohlendorf, J. Suttles, D.A. Bernlohr, Identification and characterization of a small molecule inhibitor of fatty acid binding proteins, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 6024–6031. doi:10.1021/jm900720m.
- [18] M. Furuhashi, G. Tuncman, C.Z. Görgün, L. Makowski, G. Atsumi, E. Vaillancourt, K. Kono, V.R. Babaev, S. Fazio, M.F. Linton, R. Sulsky, J.A. Robl, R.A. Parker, G.S. Hotamisligil, Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2., *Nature*. 447 (2007) 959–65. doi:10.1038/nature05844.
- [19] W. Lin, X. Huang, L. Zhang, D. Chen, D. Wang, Q. Peng, L. Xu, J. Li, X. Liu, K. Li, K. Ding, S. Jin, J. Li, D. Wu, BMS309403 Stimulates Glucose Uptake in Myotubes through Activation of AMP-Activated Protein Kinase, *PLoS One*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0044570.
- [20] H. Lan, C.C. Cheng, T.J. Kowalski, L. Pang, L. Shan, C.-C. Chuang, J. Jackson, A. Rojas-Triana, L. Bober, L. Liu, J. Voigt, P. Orth, X. Yang, G.W. Shipps, J.A. Hedrick, Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity., *J. Lipid Res.* 52 (2011) 646–656. doi:10.1194/jlr.M012757.
- [21] F. Yao, Z. Li, T. Ehara, L. Yang, D. Wang, L. Feng, Y. Zhang, K. Wang, Y. Shi, H. Duan, L. Zhang, Fatty Acid-Binding Protein 4 mediates apoptosis via endoplasmic reticulum stress in mesangial cells of diabetic nephropathy., *Mol. Cell. Endocrinol.* (2015). doi:10.1016/j.mce.2015.05.003.
- [22] R.L.C. Hoo, I.P.C. Lee, M. Zhou, J.Y.L. Wong, X. Hui, A. Xu, K.S.L. Lam, Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice., *J. Hepatol.* 58 (2013) 358–364. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.022.
- [23] J.A. Chavez, T.A. Knotts, L.P. Wang, G. Li, R.T. Dobrowsky, G.L. Florant,

- S.A. Summers, A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10297–10303. doi:10.1074/jbc.M212307200.
- [24] R. Rodríguez-Calvo, B. Ferrán, J. Alonso, I. Martí-Pàmies, S. Aguil, O. Calvayrac, C. Rodríguez, J. Martínez-González, NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2m) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells, *Thromb. Haemost.* 113 (2015) 1323–1334. doi:10.1160/TH14-07-0645.
- [25] R. Rodríguez-Calvo, M. Jové, T. Coll, A. Camins, R.M. Sánchez, M. Alegret, M. Merlos, M. Pallàs, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, PGC-1beta down-regulation is associated with reduced ERRalpha activity and MCAD expression in skeletal muscle of senescence-accelerated mice., *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61 (2006) 773–780. doi:61/8/773 [pii].
- [26] A. Bosquet, S. Guaita-Esteruelas, P. Saavedra, R. Rodríguez-Calvo, M. Heras, J. Girona, L. Masana, Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells, *Atherosclerosis*. 249 (2016) 191–199. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.012.
- [27] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Görgün, L.H. Glimcher, G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes., *Science*. 306 (2004) 457–61. doi:10.1126/science.1103160.
- [28] L. Salvadó, T. Coll, A.M. Gómez-Foix, E. Salmerón, E. Barroso, X. Palomer, M. Vázquez-Carrera, Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism, *Diabetologia*. 56 (2013) 1372–82. doi:10.1007/s00125-013-2867-3.
- [29] R. Hage Hassan, I. Hainault, J.T. Vilquin, C. SamaM.A., F. Lasnier, P. Ferré, F. Foufelle, E. Hajdúch, Endoplasmic reticulum stress does not mediate

- palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells, *Diabetologia*. 55 (2012) 204–214. doi:10.1007/s00125-011-2328-9.
- [30] D.L. Fang, Y. Wan, W. Shen, J. Cao, Z.X. Sun, H.H. Yu, Q. Zhang, W.H. Cheng, J. Chen, B. Ning, Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells, *Mol. Cell. Biochem.* 381 (2013) 127–137. doi:10.1007/s11010-013-1694-7.
- [31] G.H. Werstuck, S.R. Lentz, S. Dayal, G.S. Hossain, S.K. Sood, Y.Y. Shi, J. Zhou, N. Maeda, S.K. Krisans, M.R. Malinow, R.C. Austin, Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1263–1273. doi:10.1172/JCI11596.
- [32] P.A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, G. Ranganathan, Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280 (2001) E745-51. doi:10.1210/jc.85.9.3338.
- [33] K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, K. Riehemann, S. Wesselborg, Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades., *Immunobiology*. 198 (1997) 35–49. doi:10.1016/S0171-2985(97)80025-3.

Table 1. Serum biochemical profile.

	STD	HFD	HFD+BMS
Plasma Glucose (mg/dl)	175 ± 14,13	337,33 ± 33,42***	371,67 ± 15,37
Plasma Insulin (pg/ml)	71,18 ± 33,42	62,44 ± 16,83	138,69 ± 42,11
Plasma Resistin (pg/ml)	1413,99 ± 144,71	2476,79 ± 473,84	2287,82 ± 671,90
Plasma Leptin (pg/ml)	778,71 ± 271,04	5820,41 ± 2102,85**	5911,56 ± 1604,86
Plasma Adiponectin (µg/ml)	23,06 ± 3,77	11,87 ± 1,27*	9,53 ± 1,03
Plasma FABP4 (ng/ml)	282,24 ± 65,82	532,50 ± 120,33	442,54 ± 103,41
Plasma NEFA (µmol/l)	720,00 ± 54,63	934,56 ± 54,64**	982,22 ± 67,44
Total Cholesterol (mmol/l)	2,25 ± 0,10	2,48 ± 0,23	3,45 ± 0,16##
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,15 ± 0,07	1,21 ± 0,13	1,80 ± 0,11##
LDL-cholesterol (mmol/l)	0,91 ± 0,05	0,94 ± 0,10	1,31 ± 0,07#
VLDL-cholesterol (mmol/l)	0,19 ± 0,02	0,33 ± 0,03***	0,34 ± 0,02
Plasma Triglycerides (mmol/l)	0,42 ± 0,05	0,73 ± 0,08***	0,75 ± 0,05
Ratio HDL/VLDL	7,14 ± 1,18	3,85 ± 0,42**	5,43 ± 0,26#

Values are mean ± SEM from nine mice of each group. STD: Standard Diet;
HFD: High Fat Diet.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001 vs. STD

#p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,0001 vs. HFD

Figure 1. BMS309403 treatment not prevents glucose intolerance in mice fed with HFD. Data from glucose tolerance test (A) and the area under the curve (AUC) (B) are shown in STD or HFD-fed mice treated or not with BMS309403. Data are expressed as means $\pm$ SEM from nine mice per group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. STD-fed mice.

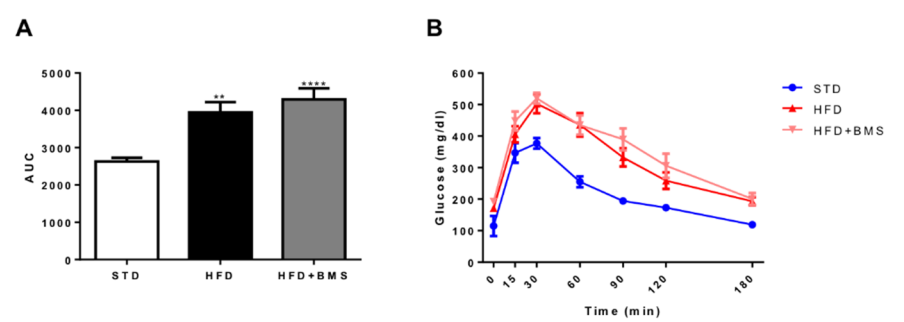


Figure 2. BMS309403 reverses HFD-induced ER stress and inflammation in mice skeletal muscle. Effects of BMS309403 on the mRNA levels of (A) *Atf6*, (B) *Bip*, (C) *Chop*, (D) *Ccl2* and (E) *Tnf* in the skeletal muscle of mice fed with a HFD. Total RNA was isolated from skeletal muscle and the mRNA levels were analysed by real time RT-PCR. Data were normalized to the *Tbp* mRNA levels. Data are expressed as means $\pm$ SEM from five mice per group. * $p<0.05$ vs. STD-fed mice; # $p<0.05$ vs. HTD-fed mice.

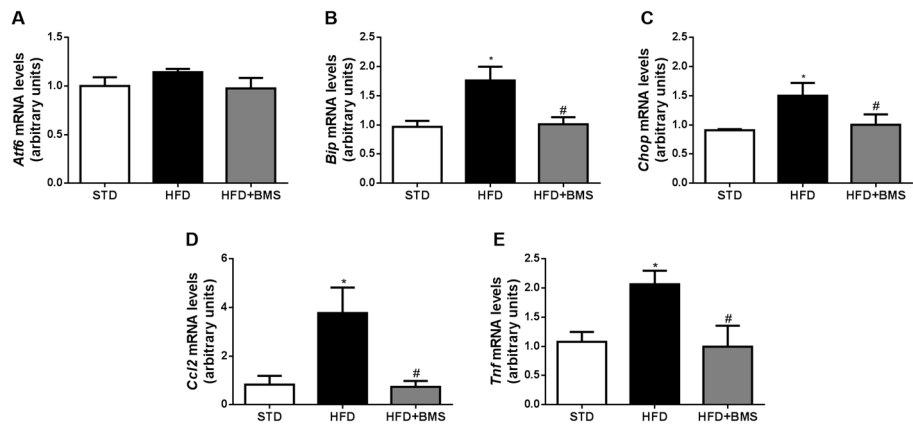


Figure 3. BMS309403 reduces palmitate-induced ER stress in C2C12 myotubes. C2C12 myotubes were stimulated for 16 hours in the absence or presence of palmitate (0.25 mmol/l) with or without treatment with BMS309403 (25 μ M). Analysis of (A) ATF6, (B) IRE1 α and (C) phospho-EIF2 α by immunoblotting of total protein extracts. α -actin (A, B) or total EIF2 α (C) protein levels are shown as a control to demonstrate equal loading. Effect of BMS309403 on the mRNA levels of (D) *Atf6*, (E) *Bip*, (F) *Chop* in C2C12 myotubes. The mRNA levels were analysed by real time RT-PCR and data were normalized to the *Tbp* mRNA levels. Data are expressed as means $\pm$ SEM from three separate experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 *vs.* control cells; # p <0.05 *vs.* palmitate-stimulated cells.

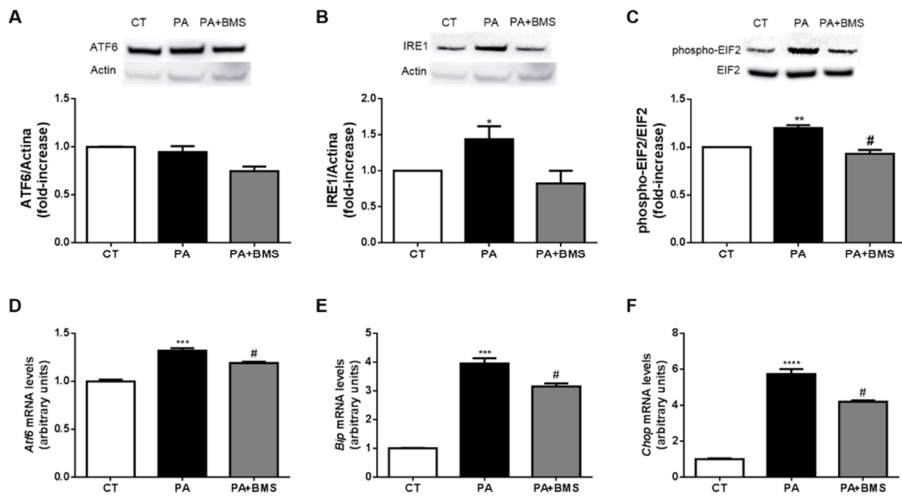
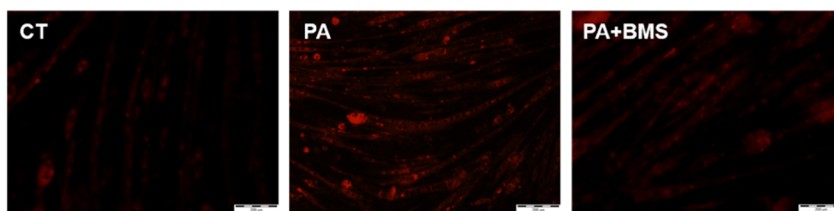


Figure 4. BMS309403 reduces palmitate-induced intramyocellular lipid storage. Lipid content was analysed by Nile-Red staining in C2C12 myotubes stimulated for 16 hours in the absence or presence of palmitate (0.25 mmol/l) with or without treatment with BMS309403 (25 μ M). (A) Representative microphotography showing lipid droplets (bar 200 μ m). (B) Quantification of stained areas relative to cell surface. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments. *** p <0.001 *vs.* control cells; # p <0.05 *vs.* palmitate-stimulated cells.

A



B

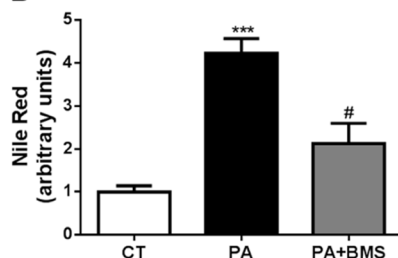


Figure 5. BMS309403 reduces palmitate-induced ER-associated inflammation in C2C12 myotubes. C2C12 myotubes were stimulated for 16 hours (RNA) or 2 hours (nuclear protein extracts) in the absence or presence of palmitate (0.25 mmol/l) with or without treatment with BMS309403 (25 μ M). Effects of BMS309403 on the mRNA levels of (A) *Ccl2*, (B) *Tnf* and (C) *Il6* in C2C12 myotubes. The mRNA levels were analysed by real time RT-PCR and data were normalized to the *Tbp* mRNA levels. (D) Analysis of p65 protein levels by immunoblotting of nuclear protein extracts in C2C12 myotubes. Histone 3 protein levels are shown as a control to demonstrate equal loading. Data are expressed as means $\pm$ SEM from three separate experiments. ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. control cells; # p <0.05 vs. palmitate-stimulated cells.

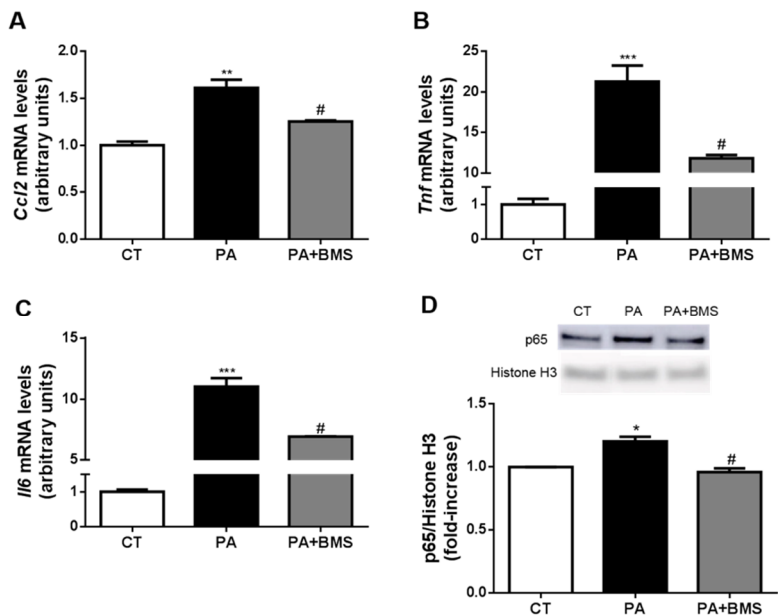


Figure 6. BMS309403 regulates MAPK phosphorylation in C2C12 myotubes. C2C12 myotubes were stimulated for 10 min in the absence or presence of palmitate (0.25 mmol/l) with or without treatment with BMS309403 (25 μ M). Analysis of (A) phospho-ERK1/2 and (B) phospho-p38 by immunoblotting of total protein extracts. Total ERK1/2 (A) or total p38 (B) protein levels are shown as a control to demonstrate equal loading. Data are expressed as means $\pm$ SEM from three separate experiments. *** p <0.001 *vs.* control cells; # p <0.05 *vs.* palmitate-stimulated cells.

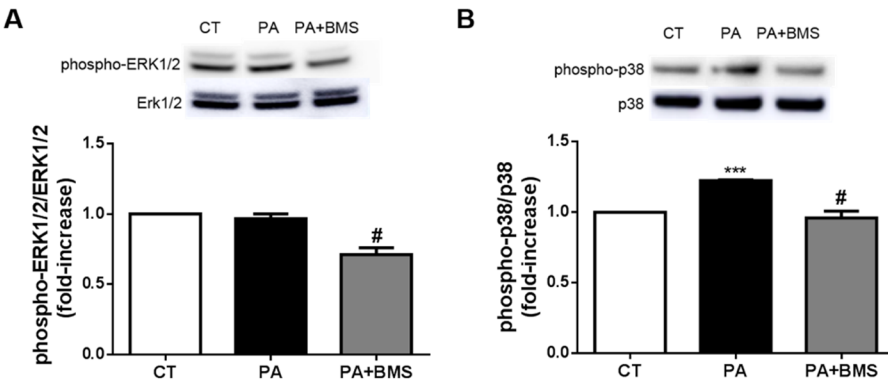
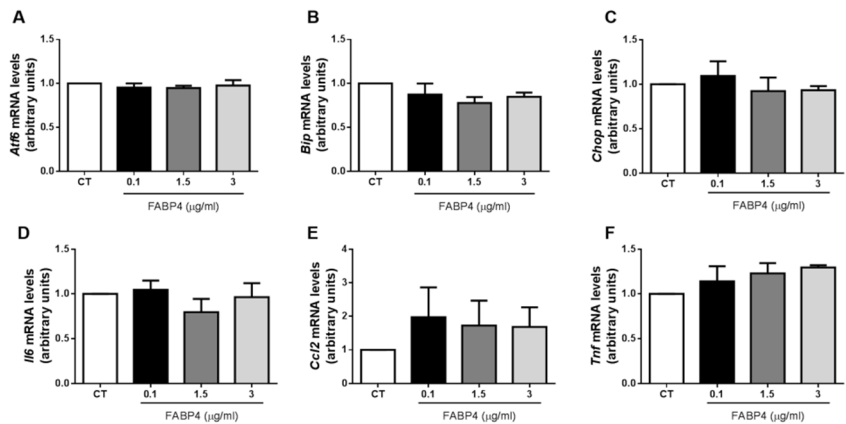


Figura S1. Effect of eFABP4 on ER Stress and inflammation. C2C12 cells were treated with exogenous FABP4 (0.1-3 μ g/ml) for 16 h. ER stress and inflammation markers were analyzed by real time PCR. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three separate experiments.



Abbreviations

ATF6: activating transcription factor 6

Chop: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein

ER: endoplasmic reticulum

ERK1/2: extracellular signal-related kinase 1/2

FABP4: fatty acid binding protein 4

FAs: fatty acids

HDL: high-density lipoproteins

HFD: high-fat diet

Il6: interleukin 6

IRE1 α : inositol-requiring enzyme 1 α

JNK: Jun N-terminal kinase

LDL: low-density lipoproteins

NEFAs: non-sterified fatty acids

NF- κ B: nuclear factor-kappaB

PERK: PKR-like ER kinase

STD: standard chow diet

Tbp: TATA-binding protein

Tnf: tumor necrosis factor

UPR: unfolded protein response

VLDL: very low-density lipoproteins

Exogenous FABP4 increases breast cancer cell proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins

Sandra Guaita-Esteruelas, Alba Bosquet, Paula Saavedra, Josep Gumà, Josefa Girona, Eric W.-F. Lam, Kepa Amillano, Joan Borràs i Lluís Masana.

Molecular Carcinogenesis 56 (2016) 208-217

El teixit adipós juga un paper molt important en la progressió tumoral, ja que proporciona nutrients i adipocines a les cèl·lules canceroses. FABP4, una proteïna clau en el transport dels AG, s'ha descrit recentment com una nova adipocina. En càncer de mama, així com en altres patologies metabòliques, els nivells circulants de FABP4 es troben elevats. Tot i això, els mecanismes moleculars implicats són confusos. Per tant, l'**objectiu** d'aquest estudi ha estat investigar si eFABP4 està implicada en la progressió del càncer de mama.

Els **resultats** principals d'aquest treball són:

- eFABP4 augmenta la proliferació d'aquestes cèl·lules, malgrat que no té cap efecte en la migració.
- eFABP4 activa les vies de senyalització d'AKT i de les MAPK. La inhibició d'aquestes vies disminueix la proliferació induïda per eFABP4. A més, en les cèl·lules MCF-7 augmenten els nivells del factor de transcripció FoxM1 i de les proteïnes transportadores d'AG CD36 i FABP5.

Les **conclusions** d'aquest estudi suggereixen que eFABP4 està implicada en la proliferació tumoral, així com en l'activació de proteïnes transportadores d'AG en cèl·lules de càncer de mama.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Exogenous FABP4 Increases Breast Cancer Cell Proliferation and Activates the Expression of Fatty Acid Transport Proteins

Sandra Guaita-Esteruelas,^{1,2,3*} Alba Bosquet,^{1,2} Paula Saavedra,² Josep Gumà,³ Josefa Girona,² Eric W.-F. Lam,⁴ Kepa Amillano,³ Joan Borràs,³ and Lluís Masana²

¹Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Centre d'R+D+I en Nutrició i Salut. Avda. de la Universitat, Reus, Spain

²Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili, carrer Sant Llorenç, Reus, Spain

³Oncology Research Group, "Sant Joan" University Hospital, Oncology Institute of Southern Catalonia (IOCS), Av. del Dr. Josep Laporte, Reus, Spain

⁴Department of Surgery and Cancer, Imperial Centre for Translational and Experimental Medicine (ICTEM), Imperial College London, London W12 0NN, United Kingdom

Adipose tissue plays an important role in tumor progression, because it provides nutrients and adipokines to proliferating cells. Fatty acid binding protein 4 (FABP4) is a key adipokine for fatty acid transport. In metabolic pathologies, plasma levels of FABP4 are increased. However, the role of this circulating protein is unknown. Recent studies have demonstrated that FABP4 might have a role in tumor progression, but the molecular mechanisms involved are still unclear. In this study, we analysed the role of eFABP4 (exogenous FABP4) in breast cancer progression. MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells did not express substantial levels of FABP4 protein, but intracellular FABP4 levels increased after eFABP4 incubation. Moreover, eFABP4 enhanced the proliferation of these breast cancer cells but did not have any effect on MCF-7 and MDA-MB-231 cell migration. Additionally, eFABP4 induced the AKT and MAPK signaling cascades in breast cancer cells, and the inhibition of these pathways reduced the eFABP4-mediated cell proliferation. Interestingly, eFABP4 treatment in MCF-7 cells increased levels of the transcription factor FoxM1 and the fatty acid transport proteins CD36 and FABP5. In summary, we showed that eFABP4 plays a key role in tumor proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins in MCF-7 breast cancer cells. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: lipid chaperones; lipid metabolism; cell biology; cancer progression; metabolic pathways

INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequent malignancy in women and the second leading cause of cancer-related deaths [1]. Epidemiologic studies have indicated that obesity is associated with a higher risk of certain cancers, including postmenopausal breast cancer. This positive association may be partly explained by insulin resistance, hyperinsulinaemia, sustained hyperglycaemia, glucose intolerance, oxidative stress, and inflammation. Emerging research has also begun to focus on the role of circulating adipokines (i.e., adipocyte-secreted factors) in breast cancer [2–4]. Moreover, patients with metabolic syndrome and diabetes have an increased risk of developing postmenopausal breast cancer [5,6].

Fatty acid binding protein 4 (FABP4) is an adipokine that transports fatty acids to various cellular compartments to exert their metabolic functions [7,8]. FABP4 is implicated in several critical cellular processes, such as the uptake and intracellular storage of fatty acids and the regulation of gene expression, cell proliferation, and differentiation [7].

FABP4 has gained increasing interest in recent years because we and others identified circulating FABP4 as a metabolic and vascular risk biomarker. FABP4 is

released from adipocytes and macrophages and is present in human blood. High blood levels of this protein are associated with some metabolic diseases, such as obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes and atherosclerosis, thus making FABP4 a useful prognostic marker for these pathologies [9–17]. Moreover, we have described how eFABP4 (exogenous FABP4) is involved in controlling the proliferation and migration of human smooth muscle cells from the coronary artery [18].

Abbreviations: FABP4, fatty acid binding protein 4; FABP5, fatty acid binding protein 5; CD36, cluster of differentiation 36, also known as FAT (fatty acid translocase); FOXM1, forkhead box protein M1; PI3K/AKT, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT; MAPK/ERK, mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase.

Grant sponsor: Universitat Rovira i Virgili-Banco de Santander; Grant number: 2013-LINE05

*Correspondence to: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Centre d'R+D+I en Nutrició i Salut. Avda. de la Universitat, 43204 Reus, Spain.

Received 2 December 2015; Revised 22 February 2016; Accepted 18 March 2016

DOI 10.1002/mc.22485

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

While FABP4 was initially described in adipocytes and macrophages, current evidence has demonstrated the expression of this protein in different cell types and in some tumors [19–21]. FABP4 has increasingly been thought to have important role in tumor progression, but few studies have explored the relationship between FABP4 and breast cancer. FABP4 has been described as a new prognostic factor in bladder cancer, in residual disease of ovarian cancer, and in obese patients with breast cancer [22–24]. Moreover, FABP4 is overexpressed in glioblastomas and could have a pro-angiogenic role because it is regulated by VEGF and bFGF. [20,21].

FABP4 is a mediator of interactions between bone marrow adipocytes and prostate tumor cells [25]. eFABP4 promotes tumor progression in prostate cancer [26]. Finally, FABP4 is a key protein in the migration of ovarian cancer cells. Given the various aforementioned functions of FABP4, this protein is a very good target for the prevention or treatment of some types of cancer [19].

While much effort in recent years has been focused on uncovering the role of FABP4, the role of eFABP4 in breast cancer is still unknown. The objective of this study was to analyse the role of eFABP4 in breast cancer progression.

RESULTS

eFABP4 is Internalised by Breast Cancer Cells

We demonstrated previously that eFABP4 is internalized in different cell line models [18,27]. Here, we examined the role of eFABP4 in breast cancer. First, we analysed the expression of FABP4 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. These breast cancer cells did not express FABP4 protein at considerable levels (Figure 1A). Next, we assessed whether eFABP4 is internalized by breast cancer cells. We added 100 ng/ml of recombinant eFABP4 to the culture medium, and we detected eFABP4 expression by western blotting (Figure 1A; 36.79-fold increase in MCF-7 cells, **** $P < 0.0001$ vs. unstimulated cells; 19.13-fold increase in MDA-MB-231 cells, *** $P = 0.0002$ vs. unstimulated cells) and immunofluorescence (Figure 1B; 100% FABP4 positive cells in MCF-7 and 85.14% FABP4 positive cells in MDA-MB-231 cells, **** $P < 0.0001$ vs. unstimulated cells). These results showed that eFABP4 is internalized in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. This internalization could have some impact on breast cancer progression and metabolism; therefore, we decided to study the role of this exogenous protein in cell proliferation, cell migration and the expression of fatty acid transport proteins.

eFABP4 Induces Breast Cancer Cell Proliferation

After demonstrating that eFABP4 is internalized by breast cancer cells, we investigated whether eFABP4 induces breast cancer cell proliferation. A

cell proliferation assay was performed by assessing levels of BrdU incorporation. We observed that eFABP4 increased breast cancer cell proliferation in a dose-dependent manner (Figure 2A and B). eFABP4 treatment (20–100 ng/ml) significantly (Figure 2A; **** $P < 0.0001$) increased BrdU incorporation in MCF-7 cells compared to in untreated MCF-7 cells, demonstrating the effects of this protein on MCF-7 cell proliferation at 20 ng/ml, 40 ng/ml, and 100 ng/ml of eFABP4 (Figure 2A; ** $P < 0.005$ and **** $P < 0.0001$ vs. unstimulated cells). Moreover, 100 ng/ml of eFABP4 induced an increase in BrdU incorporation in MDA-MB-231 cells (Figure 2B; * $P < 0.05$ vs. unstimulated cells), but lower concentrations of eFABP4 did not have this effect. Thus, eFABP4 induced MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation.

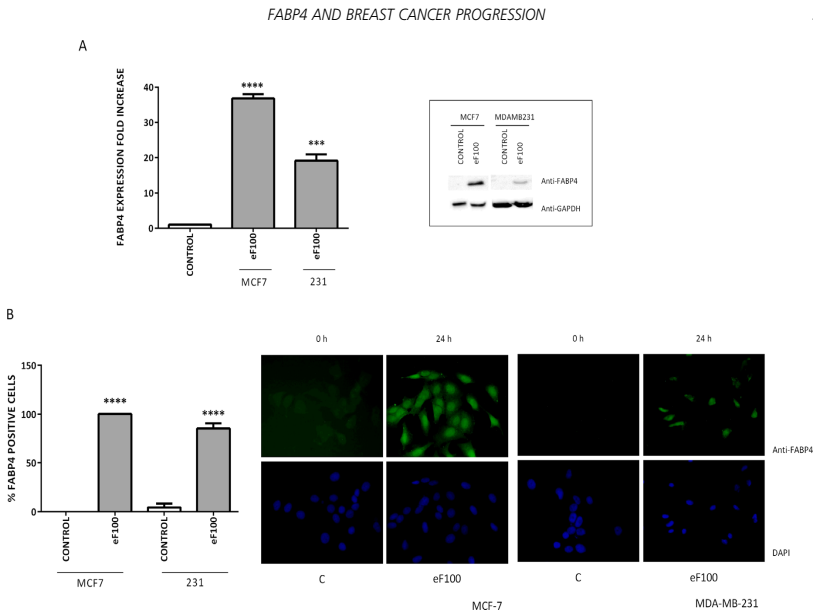
Next, we analysed the effect of eFABP4 on breast cancer cell migration using a wound-healing assay. However, eFABP4 treatment (20–100 ng/ml) did not have an effect on MCF-7 or MDA-MB-231 cell migration at any of the time points examined time examined (6 h and 24 h) (Figure 3A and B), suggesting that eFABP4 does not have any effect on breast cancer cell migration under these conditions.

We also determined the effects of eFABP4 on cell cytotoxicity and viability. To assess cell cytotoxicity, we used an LDH detection kit. We did not observe any significant modifications in LDH secretion levels at 24–48 h after the treatment of breast cancer cells with eFABP4 (100 ng/ml) (Figure S1A). Therefore, no cytotoxic effects were observed in any of the experiments performed. On the other hand, when we examined the effect of eFABP4 on cell viability, we observed a significant but small increase in the viability of MDA-MB-231 cells at 48 h after eFABP4 treatment (100 ng/ml) (Figure S1B; * $P < 0.05$ vs. untreated cells). Thus, eFABP4 had a slight effect on increasing cell viability in MDA-MB-231 cells. However, this difference is probably not biologically relevant.

eFABP4 Induces the AKT and MAPK Pathways in Breast Cancer Cells

The MAPK and AKT pathways play an important role in cancer progression, so we analysed the role of eFABP4 in MAPK and AKT activation. After 5–15 min of eFABP4 treatment (100 ng/ml), we observed an increase in the phosphorylation of the ERK and AKT proteins (Figure 4A and B; 3.09-fold increase in AKT and 4.31-fold increase in MAPK in MCF-7 cells; 2.80-fold increase in AKT and 1.67-fold increase in MAPK in MDA-MB-231 cells; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$ vs. unstimulated cells), which is indicative of the activation of these proteins.

As shown above, eFABP4 induced cell proliferation in breast cancer cells. Therefore, we analysed whether this induction is mediated by the MAPK and AKT pathways. We performed proliferation experiments with eFABP4 in the presence or absence of a PI3 K/AKT (LY-294002,



5 μ M) or MAPK (PD98059, 10 μ M) inhibitor. eFABP4 was unable to induce cell proliferation in breast cancer cells in the presence of either the PI3 K/AKT or the MAPK inhibitor (Figure 5A, MCF-7 and Figure 5B, MDA-MB-231; **** $P < 0.0001$ and * $P < 0.05$ vs. untreated cells). Therefore, eFABP4 mediates cell proliferation through MAPK and AKT pathway activation.

eFABP4 Increases the Expression of FoxM1 in MCF-7 Cells

FoxM1 is a transcription factor that controls key processes in cancer progression, such as cell proliferation [28]; therefore, we next analysed whether eFABP4 could regulate this transcription factor. After 24 h of treatment with eFABP4 (100 ng/ml), the expression of the FoxM1 protein increased in MCF-7 cells (Figure 6A; 4.64-fold increase, * $P = 0.028$ vs. untreated cells). In contrast, the levels of FoxM1 in MDA-MB-231 cells did not change significantly (Figure 6B). Thus, eFABP4 induces cell proliferation not only by the activation of the PI3 K/AKT and MAPK/ERK pathways but also by increasing levels of the oncogene FOXM1.

eFABP4 Induces the Expression of FABP5 and CD36 in MCF-7 Cells

Because fatty acid transport proteins have been implicated in cancer progression [29], we examined

whether eFABP4 has any effect on the regulation of other fatty acid transport proteins, such as FABP5 and CD36. To this end, we treated breast cancer cells with 100 ng/ml of eFABP4 for 24 h, and total cell extracts were analysed by western blotting for the expression of FABP5 and CD36. eFABP4 increased FABP5 and CD36 protein levels in MCF-7 cells but not in MDA-MB-231 cells (Figure 6A and B; 1.685-fold increase in FABP5 and 27.03-fold increase in CD36; **** $P < 0.0001$, *** $P = 0.0001$ and * $P < 0.05$ vs. untreated cells). In addition, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were incubated with eFABP4 for 24 h, and immunofluorescence staining was performed with anti-FABP5 and anti-CD36. Immunofluorescence images showed higher levels of FABP5 and CD36 in MCF-7 cells that were incubated with eFABP4 compared to control cells, but no changes were found in MDA-MB-231 cells (Figure 6C and E, **** $P < 0.0001$ and * $P < 0.05$ vs untreated cells for MCF-7 cells; Figure 6D and E, MDA-MB-231 cells). Therefore, lipid metabolism-related proteins are differentially expressed and regulated in these two breast cancer cell lines.

DISCUSSION

Adipocytes are active and important modulators of the tumor microenvironment by direct contact with

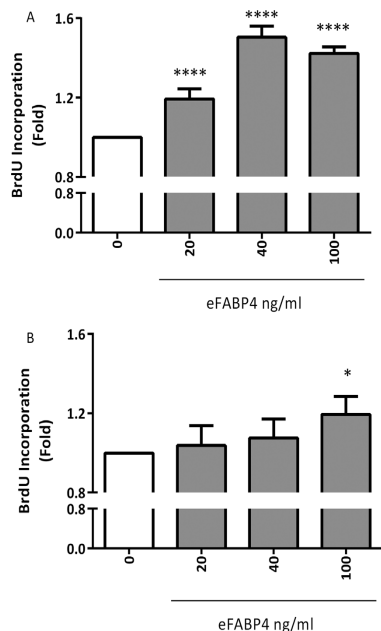


Figure 2. Effect of eFABP4 on the proliferation of breast cancer cells. Effect of eFABP4 (20–100 ng/ml) on the proliferation of MCF-7 (Figure 2A) and MDA-MB-231 (Figure 2B) cells was assessed by BrdU incorporation. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments run in quintuplicate. **** P < 0.0001, ** P < 0.005, and * P < 0.05 versus untreated cells.

neighbouring cells or by secreted adipokines [25]. Thus, the role of some adipokines in cancer has been established [30]. Recent studies have demonstrated that autocrine, endocrine, and paracrine adipokines may contribute to the regulation of breast cancer development and progression [31,32].

FABP4 is a fatty acid transport protein that has been implicated in some metabolic disorders. Moreover, FABP4 has been implicated in cancer cell growth and metastasis [33,34]. Despite these data, little is known about the role of FABP4 in breast cancer. In this study, we examined the role of eFABP4 in breast cancer progression.

Previously, we and others have reported increased levels of circulating FABP4 in individuals with some metabolic diseases. Moreover, FABP4 has a direct effect on peripheral tissues and can interact with the plasma membrane by binding to CK1 [27]. These previous results demonstrated that circulating FABP4 is not simply a biomarker; rather, it may have a causal relationship with these diseases due to its interactions with other cell types.

To define the role of eFABP4 in breast cancer progression, we assessed whether eFABP4 is internalized

by breast cancer cells. Our results demonstrated that eFABP4 was internalized in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Figure 1A and B; **** P < 0.0001 and P = 0.0002 vs. untreated cells). These results agree with those of others [26] and with our previous data [18,27], reinforcing the idea that eFABP4 could have a central role in breast cancer cells. However, FABP4 is not highly expressed in these breast cancer cells. In this sense, adipose tissue could have an active role in breast cancer progression by providing adipokines, such as FABP4, to breast cancer cells.

Next, we analysed the role of eFABP4 in cell proliferation and migration. We found that eFABP4 increased cell proliferation (Figure 2) but not cell migration (Figure 3) in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. In fact, cell proliferation was affected in a dose-dependent manner. BrdU incorporation increased upon the addition of 20 to 100 ng/ml of eFABP4 in MCF-7 cells (Figure 2A; ** P < 0.005 and **** P < 0.0001 vs. untreated cells) and with 100 ng/ml of eFABP4 in MDA-MB-231 cells (Figure 2B; * P < 0.05 vs. untreated cells). These concentrations are physiologically relevant given that Hancke et al. [24] described serum FABP4 levels of 41.16 ng/ml in obese women (BMI > 25) and 24.95 ng/ml in non-obese women (BMI < 24.9). Importantly, there is a significant difference between the results obtained with 20 and 100 ng/ml of eFABP4 in MCF-7 cells (Figure 2A; ** P < 0.005 20 ng/ml vs. 100 ng/ml), pointing to the importance of not only the presence of the protein but the concentration as well.

Cell growth can be promoted by the activation of a signaling network that induces pathways that are mediated by phosphoinositide 3-kinase (PI3K-AKT) and extracellular signaling kinase (MAPK-ERK). For this reason, we analysed whether eFABP4 can activate these two pathways. eFABP4 induced AKT and MAPK pathway activation, as defined by the detection of phospho-AKT (Ser⁴⁷³) and phospho-p42/p44 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (Figure 4; * P < 0.05 and ** P < 0.005 vs. unstimulated control). Therefore, eFABP4 induces cell proliferation by activating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K-AKT) and extracellular signaling kinase (MAPK-ERK) pathways.

It is notable that the increase in proliferation upon eFABP4 introduction is approximately 20–50%. This eFABP4-mediated enhancement in proliferation rates is likely to depend on the steady-state proliferation rates of the breast cancer cells before treatment. As a fair number of these pretreated cells would be proliferating and expressing substantially high levels of P-AKT, P-MAPK, and FOXM1 after 24 h of 0.1% FCS starvation, the additional proliferative potential that is inducible by eFABP4 may be limited. This idea is supported by the observation that treatment with PI3 K/AKT and MAPK inhibitors can reduce the proliferation eFABP4-treated cells to levels much lower than those exhibited by the cells prior to eFABP4 treatment (Figure 5; **** P < 0.0001,

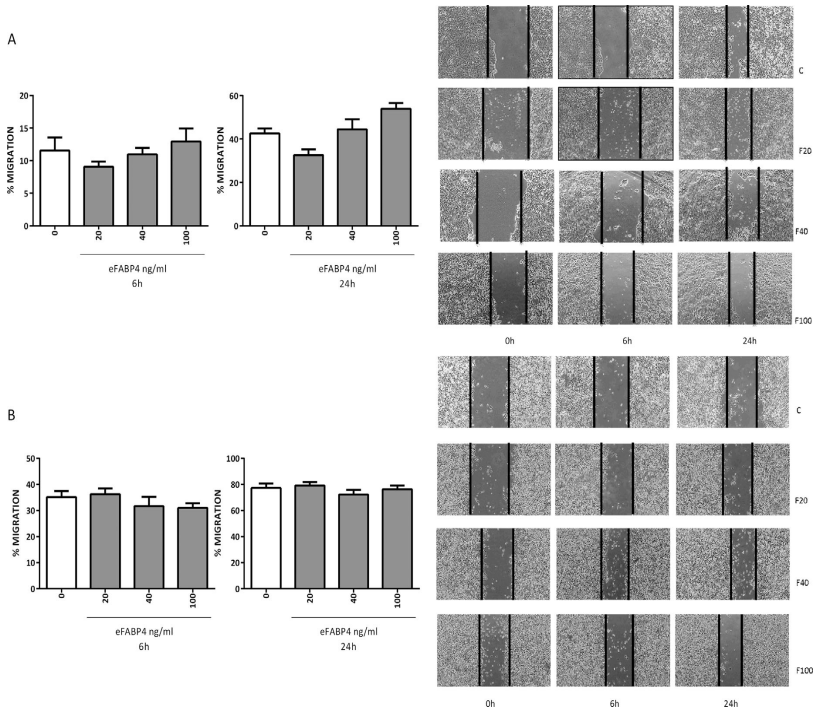


Figure 3. Effect of eFABP4 on the migration of breast cancer cells. After reaching confluence, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with eFABP4 (20–100 ng/ml) at different times. A wound-healing assay was performed, and the % of migration was measured in MCF-7 (Figure 3A) and MDA-MB-231 (Figure 3B) cells. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments run in quintuplicate.

* $P < 0.05$). In addition, other growth factors, such as long-chain fatty acids, will also be needed to complement eFABP4 and thereby induce proliferation. Moreover, the proliferation effects of eFABP4 will also depend on its stability, rates of uptake and metabolism.

The FOXM1 transcription factor has a central function in cell cycle progression and cell proliferation. Moreover, FOXM1 overexpression has been identified in many types of cancers, including breast cancer. In addition, there is a key role for FOXM1 in tumorigenesis, cancer progression and drug resistance [28]. We assessed whether eFABP4 has any role in FOXM1 regulation; treatment with 100 ng/ml of eFABP4 induced FOXM1 expression in MCF-7 cells (Figure 6A and B; * $P < 0.05$) but did not have any effect in MDA-MB-231 cells (Figure 6A and B). Thus, eFABP4 can regulate cancer cell proliferation by different mechanisms: the activation of PI3K-AKT and MAPK-ERK pathways and the induction of FOXM1 transcription factor expression in MCF-7 cells.

Several proteins have been identified to facilitate the uptake of fatty acids into cells, and these proteins are deregulated in some cancers, such as breast cancer [29]. Accordingly, we analysed whether eFABP4 is able to induce the expression of other fatty acid transport proteins. We demonstrated that eFABP4 increased the levels of CD36 and FABP5 (Figure 6A and B; western blotting and Figure 6C, D, and E immunofluorescence; **** $P < 0.0001$, *** $P = 0.0001$, and * $P < 0.05$ vs untreated cells) in MCF-7 cells but not in MDA-MB-231 cells. Balaban et al. [29] reported that CD36 levels were low in breast cancer cells and they describe how the levels of CD36 in MCF7 cells were higher than those in MDA-MB-231 cells. In our experiments, we have observed the same pattern; in the basal state, MDA-MB-231 cells did not express CD36 at appreciable levels, and MCF7 cells exhibited low-level expression of this fatty acid transport protein. However, we observed that in the presence of some exogenous stimuli, such as eFABP4, the levels of endogenous CD36 were increased in

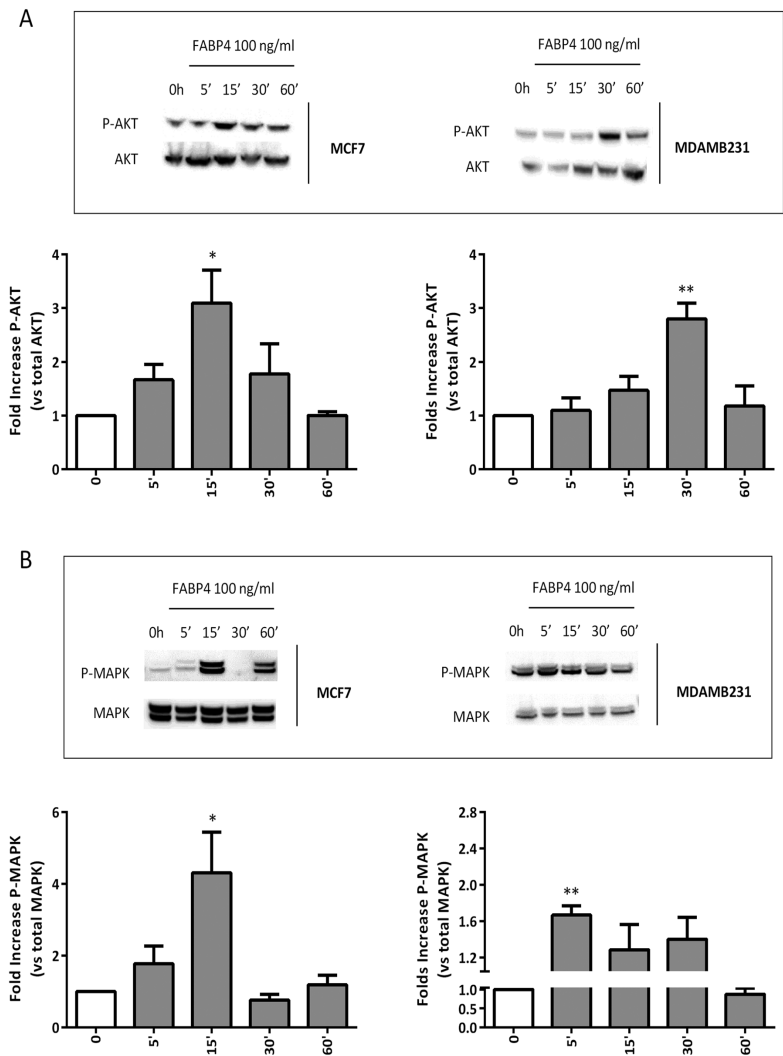


Figure 4. Effect of eFABP4 on the AKT and MAPK pathways in breast cancer cells. The effect of eFABP4 (100 ng/ml) on the AKT (Figure 4A, MCF-7 left, MDA-MB-231 right) and MAPK (Figure 4B MCF-7 left, MDA-MB-231 right) pathways was assessed by western blotting at short times. Representative western blotting and relative densitometric analyses are shown. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$ versus unstimulated cells (control).

MCF7 cells but not in MDA-MB-231 cells. These results are in agreement with several recent publications reporting that some lipid compounds upregulate CD36 levels in some breast cancer cell lines [35–37]. Breast cancer cells can adapt their lipid

metabolism to increase the catabolism of their lipids. This metabolic adaptation may provide benefits for breast cancer cell growth [35]. Moreover, the oncogenic transformation of breast cells by HER2 overexpression may require a reprogramming of lipogenic

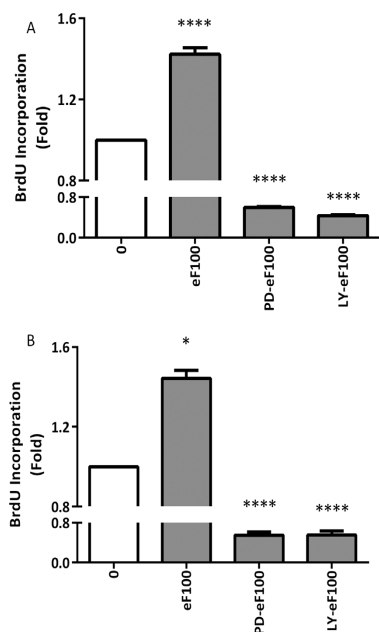


Figure 5. Effect of AKT and MAPK pathway inhibition on eFABP4 cell proliferation induction in MCF-7 (Figure 5A) and MDA-MB-231 (Figure 5B) cells. AKT (LY-294002, 5 μ M) and MAPK (PD98059, 10 μ M) inhibitors were added to breast cancer cells to assess the pathways activated upon eFABP4 (100 ng/ml) treatment. BrdU incorporation was analysed. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **** P < 0.0001 and * P < 0.05 versus untreated cells.

genes, such as CD36 and FABP4 [36]. Perhaps during the early stages of breast cancer progression, such as cell proliferation, cells could exhibit increased activation of lipid metabolism proteins, such as fatty acid transport proteins. Then, during the later stages of breast cancer progression, such as cell migration, the role of these fatty acid binding proteins could change.

As a consequence, under some pathological conditions in which modified crosstalk occurs between adipose tissue and breast cancer cells, the breast cancer cells could take advantage not only of the lipid metabolism products provided by the adipocytes but also of the modifications of lipid metabolism in breast cancer cells, such as the upregulation of fatty acid transport proteins.

In fact, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exhibit differences in the regulation of lipid metabolism pathways [38]. Therefore, lipid metabolism-related proteins are differentially expressed and regulated in these two breast cancer cell lines.

The role of FABP4 in some tumors has been described previously, but in this paper, we described

a new role for eFABP4 in breast cancer. Adipose tissue has a crucial role in breast cancer development. In fact, some adipokines from this tissue have been implicated in breast cancer progression [2–4]. Here, we described the role of eFABP4 in breast cancer progression, emphasizing the role of eFABP4 in cell proliferation and regulation of expression of fatty acid transport proteins. FABP4 could have three roles in the control of breast cancer development: (i) FABP4 could induce angiogenesis in breast cancer tissue, as has been shown in glioblastomas [20,21]; (ii) FABP4 could be over-expressed in breast cancer tissue [39], even though other authors have described the opposite expression [40]; and (iii) eFABP4 from the surrounding adipose tissue could have a central role in cancer progression, as we have described in this paper and as has previously been described for ovarian and prostate cancers [19,26,31]. Moreover, the majority of the FABP4 that is in circulation is generated by the stromal compartment; [41] thus, adipose tissue could have a central role in breast cancer progression.

Finally, the cross-talk between adipokines/adipose tissue and breast cancer tissue should be reciprocal. Breast cancer cells could induce fatty acid and adipokine mobilization from adipose tissue. This process could be through the control of FABP4 secretion in adipose tissue by regulating the lipolysis secretory pathway [42] or the calcium-dependent secretion mechanism [43]. Interestingly, increased FABP4 release from adipose tissue has been observed in adipocytes that are exposed to hypoxia [44]. This condition is frequently found in tumor tissue and in the adipose tissue of obese individuals.

In summary, we described a novel role for eFABP4 in breast cancer progression. eFABP4 induces breast cancer cell proliferation by activating the PI3K-AKT and MAPK-ERK pathways. Moreover, in MCF-7 cells, eFABP4 induces the expression of the potent oncogene FOXM1 and the fatty acid transport proteins CD36 and FABP5.

Thus, FABP4 might act as a paracrine adipokine and may be one of the key molecules for understanding the mechanisms underlying the obesity-breast cancer progression link and the cross-talk between cancer cells and adipose tissue in non-obese patients.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Reagents

Human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells were kindly provided by Professor Eric W. Lam (Department of Surgery and Cancer, Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London, UK). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum, 1 mM glutamine, 1 mM penicillin-streptomycin and 1 mM NEAA (Biowest, Nuaille, France) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Before the initiation of the

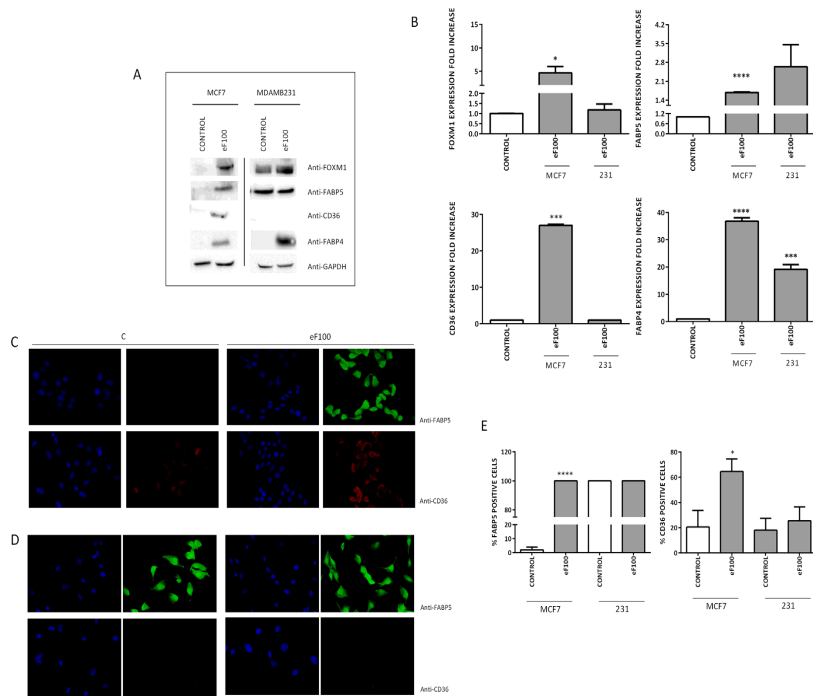


Figure 6. Regulation of the expression of fatty acid transport proteins by eFABP4. MCF-7 and MDA-MB-231 (231) cells were treated with 100 ng/ml of eFABP4 (eF100). After 24 h, the cells were lysed with 2% SDS buffer, and western blotting (a and b; **** $P < 0.0001$, *** $P = 0.0001$, and * $P < 0.05$ vs. untreated cells) or immunofluorescence (Figure 6C-MCF-7 cells, 7D-MDA-MB-231 cells and 6E; **** $P < 0.0001$ and * $P < 0.05$ vs. untreated cells) was performed. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

assays, the cells were changed into DMEM supplemented with 0.1% FBS for 24 h.

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with increasing concentrations (20, 40, and 100 ng/ml) of recombinant FABP4 (eFABP4) (Biovendor, Brno, Czech Republic) for 24 h. To study the activation of proliferation pathways in these cells, the PI3K inhibitor LY294002 (5 μ M) and the MAPK inhibitor PD98059 (10 μ M) (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany) were used.

Western Blotting

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were lysed in 2% SDS buffer (2% SDS and 67 mmol/l Tris HCl pH 6.8). Protein concentrations were determined using the Lowry assay. Thirty micrograms of total protein were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes using an iBlot[®] Dry Blotting System (Life Technologies, Madrid, Spain). Antibodies against AKT, pAKT (Ser473), p44/p42 MAPK (Erk1/2), p-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)

and GAPDH were obtained from Cell Signalling Technology, Inc. (Beverly, MA). The FOXM1 (C-20) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). The FABP5 antibody was obtained from (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). The CD36 antibody was obtained from (Abcam plc, Cambridge, UK). Membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark). The bands were visualized using ECL reagents (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) with the ChemiDoc image system and quantified with Image Lab software, version 5.2 (Bio-Rad, Alcobendas, Madrid, Spain). The ratio of target proteins to GAPDH was used to reflect the relative levels of the target proteins.

Immunofluorescence Microscopy

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were incubated in chambered slides (Nunc, Roskilde, Denmark) with or without eFABP4 (100 ng/ml) for 24 h, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for

15 min at room temperature and washed at each step three times with DPBS (GIBCO®; Life Technologies, Alcobendas-Madrid, Spain). The cells were permeabilized after fixation with a solution containing DPBS, 2% FBS, 0.1% BSA, and 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT. Then, blocking solution was added for 20 min at RT. The cells were incubated for 1 h at 37°C with FABP4, FABP5 and CD36 antibodies and further incubated with Alexa Fluor® 488 anti-goat and rhodamine anti-mouse antibodies (Invitrogen Life Technologies, Alcobendas-Madrid, Spain) for 1 h at RT. The antibodies were diluted in blocking solution (DPBS, 2% FBS, and 0.1% BSA). The cells were incubated with the nuclear stain DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (Life Technologies) for 5 min. Immunofluorescence images were captured with an Olympus IX71 inverted microscope, processed with Cell[®]F Software (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) and quantified with ImageJ (Fiji, Madison, WI).

Cell Proliferation Studies

The cell proliferation assay was performed with a colorimetric bromodeoxyuridine (BrdU) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10,000 cells were seeded into a 96-well microplate and cultured with increasing concentrations of eFABP4 (20–200 ng/ml) and LY294002 (5 μ M) or PD98059 (10 μ M) for 24 h. The cells were labelled with BrdU labeling reagent overnight. After fixation, the cells were incubated with an anti-BrdU antibody for 90 min. Finally, 100 μ l of substrate (tetramethylbenzidine) was added to each well, and the plates were incubated at room temperature for 30 min. The absorbance at 450 nm was measured with an ELISA reader (Synergy H4, Biotek).

In Vitro Wound-Healing Assay

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were cultured in 12-well plates until they reached confluence. Then, the cells were maintained for 24 h in 0.1% FBS medium. A single scratch wound was created in the centre of the cell monolayer by gently removing the attached cells with a sterile plastic pipette tip. The cells were incubated with eFABP4 (20–200 ng/ml), and images were taken at 0 h and then every 2 h until 24 h of treatment; the images were compared to quantify the migration rate of the cells. The closure of the wound represented 100% migration. The cell images were captured using a microscope (Olympus IX71, Spain) and analysed using imaging software (X cell).

Viability Analysis

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded at 7,500 cells/cm² in p96 plates. The cells were starved in 0.1% FBS-containing medium for 24 h and treated with eFABP4 (20–200 ng/ml). The CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay was performed according the manufacturer's protocol. To determine the number of

viable cells in culture, the amount of ATP present was quantitated (Promega Biotech Ibérica, SL., Alcobendas, Madrid).

Cytotoxicity Analysis

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded at 10,000 cells/cm² in p96 plates. The cells were starved in 0.1% FBS-containing medium for 24 h and treated with eFABP4 (20–200 ng/ml). A cytotoxicity assay was performed by analysing LDH release into the medium using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles-Barcelona, Spain).

Statistics

The results represented the means $\pm$ SEM of at least three separate experiments. Differences between the means were determined using a *t*-test (2-tailed) or a one-way analysis of variance (ANOVA), which was followed by a Bonferroni's post-hoc test for multiple comparisons. The differences were considered significant at $P < 0.05$. GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) was used for the statistical analyses.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the grant Universitat Rovira i Virgili-Banco de Santander (2013-LINEOS). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9–29.
2. Nimptsch K, Pischon T. Body fatness, related biomarkers and cancer risk: An epidemiological perspective. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2015;22:39–51.
3. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2015;21:57–74.
4. Schmidt S, Monk JM, Robinson LE, Mourtzakis M. The integrative role of leptin, oestrogen and the insulin family in obesity-associated breast cancer: Potential effects of exercise. *Obes Rev* 2015;16:473–487.
5. Parkin DM BL. Cancers attributable to overweight and obesity in the UK in 2010. *Br J Cancer* 2011;6:S34–S37.
6. Doyle SL, Donohoe CL, Lysaght J, Reynolds JV. Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, and cancer. *Proc Nutr Soc* 2012;71:181–189.
7. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1096–1116.
8. Vogel Hertz A, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:175–180.
9. Cabré A, Babio N, Lázaro I, et al. FABP4 predicts atherogenic dyslipidemia development. The PREDIMED study. *Atherosclerosis* 2012;222:229–234.
10. Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic Patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008;54:181–187.

11. Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49b:1746–1751.
12. Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195: e150–e158.
13. Aragonès G, Ferré R, Lázaro I, et al. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010;213: 329–331.
14. Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147–153.
15. Lázaro I, Díaz M, Cabré A, Masana L, Ibáñez L. Fatty acid-binding protein-4 plasma levels are associated to metabolic abnormalities and response to therapy in girls and young women with androgen excess. *Gynecol Endocrinol* 2011;27: 935–939.
16. Lázaro I, Ferré R, Plana N, et al. Lifestyle changes lower FABP4 plasma concentration in patients with cardiovascular risk. *Rev Española Cardiol* 2012;65:152–157.
17. Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte Fatty Acid? Binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52: 405–413.
18. Girona J, Rosales R, Plana N, Saavedra P, Masana L, Vallvé J-C. FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS ONE* 2013;8:e81914.
19. Nieman KM, Penicka CV, Ladanyi A, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 2011;30:1498–1503.
20. Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J* 2009;23:3865–3873.
21. Cataltepe O, Arkan MC, Ghelfi E, et al. Fatty acid binding protein 4 is expressed in distinct endothelial and non-endothelial cell populations in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38:400–410.
22. Boiteux G, Lascombe I, Roche E, et al. A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int J Cancer* 2009;124:1820–1828.
23. Tucker SL, Herbrich SM, Unruh AK, et al. Molecular biomarkers of residual disease after surgical debulking of high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20:3280–3288.
24. Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss JM. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:367–377.
25. Herroon M, Rajagurubandara E, Hardaway AL, et al. Bone marrow adipocytes promote tumor growth in bone via FABP4-dependent mechanisms. *Oncotarget* 2013;4:2108–2123.
26. Uehara H, Takahashi T, Oha M, Ogawa H, Izumi K. Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression. *Int J Cancer* 2014;135:2558–2568.
27. Saavedra P, Girona J, Bosquet A, et al. New insights into circulating FABP4: Interaction with cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1853;2015: 2966–2974.
28. Koo C-Y, Muir KW, Lam EWF. FOXML: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:28–37.
29. Balaban S, Lee LS, Schreuder M, Hoy AJ. Obesity and cancer progression: Is there a role of fatty acid metabolism? *Biomed Res Int* 2015;2015:274585.
30. Iyengar NM, Hudis CA, Dannenberg AJ. Obesity and cancer: Local and systemic mechanisms. *Annu Rev Med* 2015;66: 297–309.
31. Mauro L, Naimo GD, Ricchio E, Panno ML, Andò S. Cross-talk between adiponectin and IGF-IR in breast cancer. *Front Oncol* 2015;5:157.
32. Surmacz E. Leptin and adiponectin: Emerging therapeutic targets in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013;18:321–332.
33. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1831;2013:1533–1541.
34. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:592–605.
35. Blanquer-Rosselló MDM, Oliver J, Sastre-Serra J, Valle A, Roca P. Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;72:18–26.
36. Ravacci GR, Brentani MM, Tortelli TC, et al. Docosahexaenoic acid modulates a HER2-associated Lipogenic Phenotype, induces apoptosis, and increases trastuzumab action in HER2-overexpressing breast carcinoma cells. *Biomed Res Int* 2015;2015:838652.
37. Zhang F, Chen Y, Long J, Dong L, Wang Y, Chen Y. Dietary fatty acids affect lipid metabolism and estrogen receptor expression in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary cancer model. *Clin Lab* 2015;61:389–395.
38. Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: Towards a stratification of malignancy. *PLoS ONE* 2012;7:e46456.
39. Kim S, Lee Y, Koo JS. Differential expression of lipid metabolism-related proteins in different breast cancer subtypes. *PLoS ONE* 2015;10:e0119473.
40. Merdad A, Karim S, Schulten H-J, et al. Transcriptomics profiling study of breast cancer from Kingdom of Saudi Arabia revealed altered expression of adiponectin and fatty acid binding protein4: Is lipid metabolism associated with breast cancer? *BMC Genomics* 2015;16:S11–S11.
41. Cao H, Sekiya M, Erikci M, et al. Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab* 2013;17:768–778.
42. Ertunc ME, Sikkeland J, Fenaroli F, et al. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *J Lipid Res* 2015;56:423–434.
43. Schlottmann I, Ehrhart-Bornstein M, Wabitsch M, Bornstein SR, Lamounier-Zepter V. Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes. *Int J Obes* 2014;38:1221–1227.
44. Wu LE, Samocha-Bonet D, Whitworth PT, et al. Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Mol Metab* 2014;465–473.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Nombrosos estudis corroboren l'existència d'una associació directa entre l'obesitat i diferents patologies, com la RI, la DT2 i el càncer [1-3]. L'obesitat es caracteritza per un estat inflamatori crònic de baixa intensitat i un augment dels nivells d'AG circulants, els quals juguen un paper clau en el desenvolupament d'aquestes patologies [9]. A més, la ingesta de dietes riques en AG i l'elevada taxa lipolítica del teixit adipós també contribueixen a augmentar els nivells d'AG lliures [281]. Recentment, FABP4 ha estat identificada com una potencial adipocina, implicada en la patogènesi d'aquestes malalties. De fet, nivells circulants elevats de FABP4 correlacionen positivament amb RI-DT2 i càncer de mama.

FABP4 indueix estrès del RE en cèl·lules hepàtiques

A nivell molecular, un dels mecanismes pel qual l'increment dels AG circulants pot produir RI en persones obesas és l'estrès del RE [20,193]. En els últims anys diferents investigacions s'han centrat en l'estudi d'aquest, amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement dels mecanismes moleculars responsables de l'aparició de processos inflamatoris i RI [20].

Fins al moment, pocs estudis han investigat la relació entre FABP4 i l'estrès del RE. Erbay *et al.* i Yao *et al.* van demostrar que FABP4 està implicada en l'estrès del RE en macròfags i cèl·lules mesangials [136,228]. En canvi, en adipòcits, FABP4 protegeix contra l'estrès del RE [229]. Atès que el fetge és un dels principals teixits implicats en la RI, en primer lloc es va valorar l'efecte de eFABP4 sobre l'estrès del RE. En les nostres condicions, eFABP4 augmentava els nivells dels marcadors d'estrès del RE en hepatòcits. Aquests resultats demostren per primera vegada la capacitat de eFABP4 per induir estrès del RE en cèl·lules hepàtiques, reforçant les observacions d'estudis previs [136,228]. Respecte a l'efecte protector que presenta en els adipòcits, aquestes diferències possiblement es podrien

atribuir a funcions específiques de teixit. De fet, FABP4 es produeix i s'expressa en gran quantitat en els adipòcits, essent necessària per a la seva correcta diferenciació.

A continuació, i donat que una característica comuna de la RI són nivells elevats d'AG circulants, així com lipotoxicitat en els teixits perifèrics [282], el següent objectiu va ser determinar la implicació de FABP4 en presència d'AG. De fet, estudis previs han demostrat que dietes riques en greixos i, en concret, el PA indueixen estrès del RE [218,22]. En un rastreig sobre l'efecte dels AG en la viabilitat cel·lular, l'AG que va tenir més impacte biològic en cèl·lules HepG2 va ser el LA. Alguns autors han proposat que els AG insaturats confereixen protecció contra l'estrès del RE [223–225], mentre que d'altres han vist que l'indueixen [226,227]. Cal destacar que en els nostres estudis els AG es van preparar sense albúmina. Aquest mètode difereix de l'utilitzat per la majoria d'estudis, ja que el nostre objectiu era determinar l'efecte combinat de l'AG i eFABP4, el qual es podria veure emmascarat en presència d'albúmina, una de les principals proteïnes transportadores d'AG en sang. Així doncs, els nostres resultats van confirmar que eFABP4, en presència de LA, actuava sinèrgicament augmentant l'estrès del RE. Addicionalment, eFABP4 i LA, tan separats com en combinació, augmentaven el contingut lipídic dels hepatòcits, confirmant la lipotoxicitat que es produeix en els teixits perifèrics [282]. Així doncs, l'estrès del RE induït per FABP4 i AG es podria relacionar amb el desenvolupament del fetge gras no alcohòlic, ja que s'han trobat nivells elevats de FABP4 en ratolins amb aquesta patologia [283].

A més, la UPR i l'estrès del RE s'han associat estretament amb la RI. De fet, s'ha descrit que IRE1 activa JNK, inhibint la via de senyalització de la insulina [284]. En el nostre model, l'augment de l'estrès del RE induït per

eFABP4 correlacionava amb un augment de la fosforilació de JNK i una disminució de la fosforilació d'AKT, tant a nivell basal com induïda per insulina. Aquests resultats suggereixen que eFABP4 s'associa amb un deteriorament de la via de senyalització de la insulina hepàtica, a través de la inducció de l'estrès del RE (**Figura 14**). De fet, ratolins *Fabp4*^{-/-} estan protegits enfront de la RI induïda per la dieta [128,129]. La utilització d'inhibidors de FABP4 produeix efectes similars, ja que disminueix els nivells de JNK i augmenta la fosforilació d'AKT en teixit adipós i fetge de ratolins *ob/ob* [72].

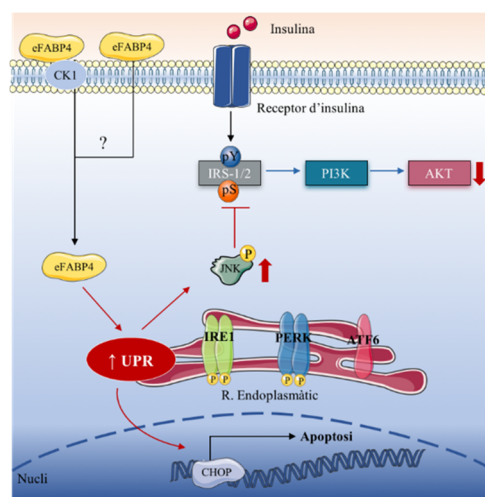


Figura 14. eFABP4 induïx estrès del RE i RI en cèl·lules hepàtiques, principalment a través de l'activació d'IRE1 i ATF6, així com també induïx apoptosi.

Una activació crònica de l'estrès del RE s'associa amb mort cel·lular programada, ja que la UPR induïx l'expressió de CHOP, un factor de transcripció pro-apoptòtic [285]. En el nostre estudi, eFABP4 induïa apoptosi i també augmentava els nivells de CHOP, la qual podria relacionar-se, possiblement, amb l'activació de la UPR. Aquest fet ja s'ha

demonstrat en cèl·lules mesangials, on la inhibició farmacològica de FABP4 disminueix els nivells de CHOP [228].

És important destacar que al fetge hi ha una FABP específica de teixit, anomenada FABP1. Donat que FABP4 no s'expressa en el fetge, els efectes observats en fetge es deuen a la eFABP4, elucidant el seu paper com adipocina. En aquest sentit, estudis previs realitzats pel nostre grup van demostrar que eFABP4 accelera la migració en cèl·lules de múscul llis [166] i indueix disfunció endotelial [167], a causa de la interacció i internalització de FABP4 en les cèl·lules dels teixits perifèrics [168].

El BMS309403 disminueix l'estrès del RE en múscul esquelètic

En els últims anys, diferents estudis han proposat que els inhibidors de FABP4, com el BMS309403, poden prevenir el desenvolupament de diferents alteracions metabòliques [72]. El múscul és el principal teixit responsable de la captació de glucosa dependent d'insulina. Donat que l'acumulació de lípids en aquest teixit pot activar l'estrès del RE i les vies de senyalització que condueixen a inflamació i RI [20,206], la inhibició farmacològica de l'estrès del RE podria ser una possible estratègia terapèutica per al tractament de la RI.

En estudis previs s'ha observat que el BMS309403 disminueix els nivells plasmàtics de glucosa, insulina i TG, així com augmenta els nivells d'adiponectina en ratolins obesos [72]. A més, s'observa una millor resposta enfront a un test de tolerància a la glucosa [72]. Tot i això, en aquest punt hi ha certa controvèrsia, ja que estudis de Lan *et al.* no van corroborar aquesta millora [286]. En el teixit adipós i el fetge dels ratolins obesos, el BMS309403 redueix els marcadors inflamatoris i millora la sensibilitat a la insulina, mitjançant la inhibició de JNK i incrementant AKT [72]. Així mateix, millora

la captació de glucosa a través de l'activació d'AMPK en múscul esquelètic [176]. En les nostres condicions experimentals, el tractament amb BMS309403 no millorava la intolerància a la glucosa induïda per HFD, confirmant els resultats de Lan *et al.* [286]. A més, l'inhibidor de FABP4 va ser incapaç de disminuir els nivells plasmàtics de glucosa, leptina, NEFA, TG i colesterol VLDL provocats per la HFD. Sorprenentment, els BMS309403 augmentava el colesterol total, principalment associat a HDL i LDL. Tot i això, aquest revertia la ràtio HDL/VLDL, utilitzada com a índex de risc cardiovascular.

En el múscul esquelètic, l'inhibidor de FABP4 disminuïa l'expressió dels marcadors d'estrès del RE, evidenciant que aquest fàrmac actua directament en la regulació dels marcadors de l'estrès del RE. En línia amb aquests resultats, el BMS309403 també disminuïa els nivells de citocines proinflamatòries induïdes per HFD. En miotubs C2C12 estimulats amb PA es van obtenir resultats similars, confirmant que el tractament amb BMS309403 atenuava l'estrès del RE i la inflamació en múscul esquelètic. Tot i això, l'estimulació directa dels miotubs amb FABP4 no va activar l'estrès del RE, suggerint que els efectes del BMS309403 poden ser deguts a un mecanisme independent de la inhibició de FABP4. De fet, un estudi previ va descriure que el BMS309403 indueix la captació de glucosa en miotubs per una via independent de les FABPs [176].

A continuació, es va voler elucidar quin era el mecanisme responsable pel qual el BMS309403 atenuava l'estrès del RE i la inflamació induïda per PA en cèl·lules de múscul esquelètic. A més, l'acumulació lipídica en múscul indueix l'activació de cascades de senyalització que activen NF- κ B [287]. En les nostres condicions experimentals, el tractament

amb BMS309403 reduïa l'acumulació de lípids intracel·lular induïda per PA en els miotubs.

Estudis previs han evidenciat un fort vincle entre les vies de senyalització de les MAPK i la UPR, actuant com a molècules efectores i moduladores de la UPR [211]. Les MAPK juguen un paper clau en l'activació del procés inflamatori, ja que activen els factors de transcripció AP-1 [288] i NF- κ B [289]. De fet, Green *et al.* van demostrar que l'activitat NF- κ B era superior en el múscul de pacients obesos amb DT2 respecte individus que no presentaven obesitat [290]. El tractament amb l'inhibidor evitava la translocació de p65 a nucli induïda per PA i, per tant, l'expressió de gens proinflamatoris regulats per NF- κ B [290]. Addicionalment, Hwang *et al.* van observar que la inhibició de la via de senyalització d'ERK1/2 en miotubs incubats amb tunicamicina, un inductor de l'estrès del RE, augmentava la fosforilació d'AKT i AMPK [291]. A més, en ratolins obesos, la inhibició d'ERK1/2 confereix protecció enfront de la RI i l'esteatosi hepàtica, disminuint la inflamació en teixit adipós i augmentant la captació de glucosa en múscul [292]. De fet, Barbarroja *et al.* van suggerir que l'activació de les vies que involucren ERK1/2 i NF- κ B són mediadors de la RI [293]. En els nostres experiments, el PA induïa la fosforilació de p38, sense observar-se canvis en ERK1/2. En canvi, el BMS309403 reduïa l'activació d'ambdues vies en presència de PA. Per tant, la regulació d'aquestes vies cel·lulars explicaria el mecanisme pel qual el BMS309403 contribueix en la regulació de les vies inflammatòries induïdes per PA en cèl·lules C2C12 (Figura 15).

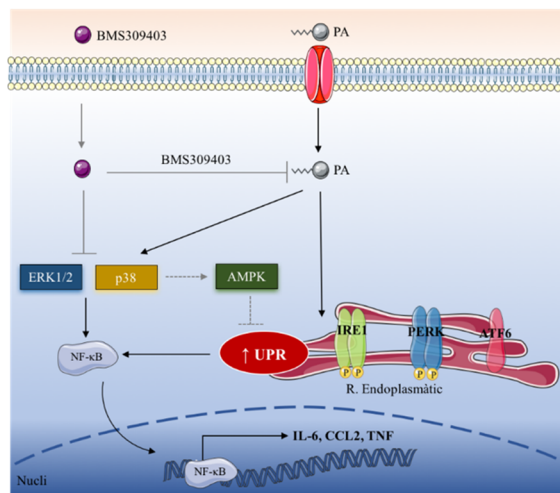


Figura 15. L'estrès del RE condueix a l'activació de vies inflamatòries en múscul esquelètic. El tractament farmacològic amb BMS309403 disminueix la inflamació induïda per estrès del RE, a través de la disminució de p38 i ERK1/2.

FABP4 indueix la migració i la proliferació en cèl·lules de càncer de mama

En estudis previs s'ha evidenciat el paper de FABP4 com adipocina i la seva implicació en diferents alteracions metabòliques. Tot i això, pocs estudis han investigat el paper de FABP4 en càncer de mama. Per aquest motiu, es va voler avaluar l'impacte de FABP4 en proliferació i migració de cèl·lules de càncer de mama.

En cèl·lules MCF-7 i MDA-MB-231, eFABP4 augmentava la proliferació, però no la migració. De fet, la proliferació es va veure afectada de manera dosi-dependent, destacant la importància no només de la presència de FABP4, sinó de la seva concentració.

Per tal d'esbrinar les vies de senyalització implicades en la proliferació de les cèl·lules tumorals, es van analitzar els nivells d'AKT i d'ERK1/2. Les MAPK controlen diferents processos cel·lulars fonamentals,

com ara el creixement, la proliferació, la diferenciació, la migració i l'apoptosi [294]. ERK1/2 és la via millor estudiada de totes les MAPK i s'ha observat que està desregulada en, aproximadament, una tercera part de tots els càncers [295]. La via de senyalització de PI3K/AKT també és, probablement, una de les vies millor caracteritzades pel que fa a la transmissió de senyals anti-apoptòtiques en la supervivència cel·lular [296]. En les nostres condicions, eFABP4 induïa un augment de la fosforilació d'AKT i ERK1/2, confirmant la implicació d'aquestes vies en la proliferació de les cèl·lules de càncer de mama.

El factor de transcripció FOXM1 està implicat en la progressió del cicle cel·lular i la proliferació cel·lular. A més, aquest es troba sobreexpressat en molts tipus de càncer, entre ells, el càncer de mama, suggerint un vincle entre FOXM1 i la tumorigènesi, la progressió del càncer i la resistència a fàrmacs [297]. Per tant, es va avaluar el paper de eFABP4 en la regulació de FOXM1. Malgrat que en les cèl·lules MCF-7 aquest es trobava augmentat, no es van observar canvis en les cèl·lules MDA-MB-321. Això suggereix que eFABP4 pot regular la proliferació cel·lular per diferents mecanismes, en funció de les característiques moleculars del tumor.

A part de FABP4, hi ha altres proteïnes implicades en la captació i el transport dels AG, les quals també es troben desregulades en càncer de mama [298]. En línia amb aquestes dades, eFABP4 augmentava els nivells de CD36 i FABP5 en les cèl·lules MCF-7, però no en les cèl·lules MDA-MB-231. Balaban *et al.* prèviament ja havien descrit que els nivells de CD36, en cèl·lules de càncer de mama, eren baixos i, a més, aquests eren considerablement inferiors en les cèl·lules MDA-MB-231, respecte a les cèl·lules MCF-7 [298]. En els nostres experiments, basalment, s'observava el mateix patró, tot i que en presència d'estímul externs, com eFABP4, es

produïa un increment dels nivells endògens de CD36 en les cèl·lules MCF-7. Aquests resultats recolzen altres estudis que han demostrat que diferents components lipídics, com els AG o la leptina, augmenten els nivells de CD36 en línies cel·lulars de càncer de mama [299–301].

Les cèl·lules tumorals poden adaptar el seu metabolisme lipídic, augmentant el catabolisme dels AG i proporcionant beneficis per al creixement de les cèl·lules tumorals [299]. A més, Ravacci *et al.* van descriure que la transformació oncogènica de cèl·lules mamàries que sobreexpressaven HER2 es devia, possiblement, a una reprogramació dels gens lipogènics, com CD36 i FABP4 [300]. Possiblement, durant les etapes inicials de la progressió del càncer de mama, quan es produeix un augment en la proliferació cel·lular, les cèl·lules podrien augmentar l'activació de proteïnes implicades en el metabolisme lipídic, com les proteïnes implicades en el transport d'AG. En canvi, en etapes posteriors de la progressió, quan es produeix la migració cel·lular, el paper de les proteïnes transportadores podria canviar. Tanmateix, recentment s'ha descrit que les cèl·lules tumorals que expressen nivells elevats de CD36 són les responsables de la iniciació de la metàstasi [302], elucidant la importància d'aquesta proteïna en estadis més avançats del tumor. Per tant, les cèl·lules tumorals no només es beneficien dels productes resultants del metabolisme lipídic proporcionats pels adipòcits, sinó també de les modificacions que es produeixen en la regulació d'aquest. De fet, les cèl·lules MCF-7 i MDA-MB-231 presenten diferències en la regulació de les vies implicades en el metabolisme lipídic, ja que aquestes s'expressen i es regulen de manera diferent en ambdós tipus cel·lulars (Figura 16).

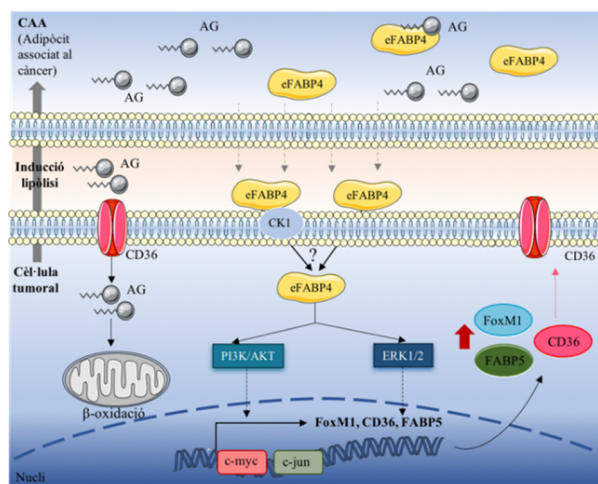


Figura 16. eFABP4 indueix la proliferació de les cèl·lules de càncer de mama a través de les vies de senyalització de PI3K/AKT i MAPK-ERK1/2. A més, en funció del subtipus tumoral, pot induir l'expressió de l'oncogen FOXM1 i de les proteïnes transportadores d'AG CD36 i FABP5.

En resum, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral reforcen el paper del teixit adipós, i de FABP4 en concret, en les diferents alteracions relacionades amb l'obesitat, entre elles, la RI i el càncer, ja que està implicada directament amb l'activació de l'estrès del RE (IRE1 i ATF6) i la proliferació cel·lular (PI3K-AKT i ERK1/2), respectivament. A més, s'ha mostrat per primera vegada que el tractament amb BMS309403 redueix la inflamació i l'activació de l'estrès del RE induït per AG saturats en múscul esquelètic, a través de la inhibició de p38 i ERK1/2. Tot i això, són necessaris més estudis per caracteritzar totalment el paper del BMS309403, així com la inhibició de FABP4, en la regulació de les alteracions associades al metabolisme.

Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Les conclusions d'aquest treball són (Figura 17):

1. FABP4 circulant no és simplement un marcador biològic, sinó que pot contribuir al desenvolupament de malalties com la DM2 i el càncer, com a conseqüència de les seves interaccions amb les cèl·lules dels teixits perifèrics.
2. En el fetge, eFABP4 indueix estrès del RE i RI. A més, en presència d'AG, l'estrès del RE augmenta a causa d'un efecte sinèrgic entre FABP4 i els AG.
3. En cèl·lules de càncer de mama, eFABP4 promou directament la proliferació cel·lular.
4. El BMS309403, inhibidor de FABP4, atenua l'estrès del RE induït per AG i la inflamació en múscul esquelètic.
5. El BMS309403 també podria presentar potencial antitumoral, ja que la RI i la inflamació crònica de baixa intensitat característica de l'obesitat contribueixen en la iniciació i progressió del tumor.
6. La inhibició de FABP4 pot suposar una potencial estratègia terapèutica per al tractament de malalties associades amb l'obesitat, com la DM2 i el càncer.

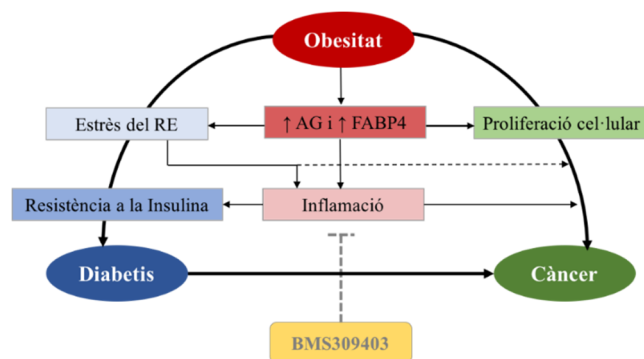


Figura 17. Mecanisme de connexió proposat entre la diabetis, el càncer i FABP4, essent l'obesitat el factor de risc en comú.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

Bibliografia

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FABP4 EN LES MALALTIES METABÒLIQUES I EL CÀNCER: IMPLICACIÓ EN L'ESTRÈS
DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I ALTRES MECANISMES MOLECULARS
Alba Bosquet Agudo

- [1] G. De Pergola, F. Silvestris, Obesity as a Major Risk Factor for Cancer, *J. Obes.* 2013 (2013) 1–11. doi:10.1155/2013/291546.
- [2] S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature.* 444 (2006) 840–6. doi:10.1038/nature05482.
- [3] H.B. Hubert, M. Feinleib, P.M. McNamara, W.P. Castelli, Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study, *Circulation.* 67 (1983) 968–977. doi:10.1161/01.cir.67.5.968.
- [4] World Health Organization, Obesity and Overweight, (2016). doi:10.1080/10810730903279694.
- [5] P.A. Grimsrud, M.J. Picklo, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr, Carbonylation of Adipose Proteins in Obesity and Insulin Resistance: Identification of Adipocyte Fatty Acid-binding Protein as a Cellular Target of 4-Hydroxynonenal, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 624–637. doi:10.1074/mcp.M600120-MCP200.
- [6] C.A. Drevon, Fatty acids and expression of adipokines, in: *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 2005: pp. 287–292. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.019.
- [7] S. De Ferranti, D. Mozaffarian, The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences, *Clin. Chem.* 54 (2008) 945–955. doi:10.1373/clinchem.2007.100156.
- [8] J. Han, R.J. Kaufman, The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 1329–38. doi:10.1194/jlr.R067595.
- [9] K. Makki, P. Froguel, I. Wolowczuk, K. Makki, P. Froguel, I. Wolowczuk, Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines, *ISRN Inflamm.* 2013 (2013) 1–12.

doi:10.1155/2013/139239.

- [10] R.A. DeFronzo, D. Tripathy, Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes., *Diabetes Care*. 32 Suppl 2 (2009) S157-63. doi:10.2337/dc09-S302.
- [11] J.F. Bak, N. Møller, O. Schmitz, A. Saaek, O. Pedersen, In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effects of diet treatment, *Diabetologia*. 35 (1992) 777–784. doi:10.1007/BF00429100.
- [12] G.R. Freidenberg, D. Reichart, J.M. Olefsky, R.R. Henry, Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss, *J. Clin. Invest.* 82 (1988) 1398–1406. doi:10.1172/JCI113744.
- [13] R.S. Ahima, M.A. Lazar, The Health Risk of Obesity—Better Metrics Imperative, *Science* (80-.). 341 (2013) 856–858. doi:10.1126/science.1241244.
- [14] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*. 414 (2001) 799–806. doi:10.1038/414799a.
- [15] J.H. Lee, S.H. Shin, S. Kang, Y.S. Lee, S. Bae, A novel activation-induced suicidal degradation mechanism for Akt by selenium, *Int. J. Mol. Med.* 21 (2008) 91–97. doi:10.1016/S0168-8227(11)70014-6.
- [16] M.F. White, The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action, *Mol. Cell. Biochem.* 182 (1998) 3–11. doi:10.1023/A:1006806722619.
- [17] C.M. Taniguchi, B. Emanuelli, C.R. Kahn, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 85–96. doi:10.1038/nrm1837.
- [18] V.T. Samuel, G.I. Shulman, Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links, *Cell*. 148 (2012) 852–871.

doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.

- [19] V. Saini, Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus., *World J. Diabetes.* 1 (2010) 68–75. doi:10.4239/wjd.v1.i3.68.
- [20] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease, *Cell.* 140 (2010) 900–917. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034.Endoplasmic.
- [21] S.E. Shoelson, L. Herrero, A. Naaz, Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance, *Gastroenterology.* 132 (2007) 2169–2180. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.059.
- [22] W. Cui, J. Ma, X. Wang, W. Yang, J. Zhang, Q. Ji, Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of β -cells by Ca^{2+} /calpain-2 pathways., *PLoS One.* 8 (2013) e59921. doi:10.1371/journal.pone.0059921.
- [23] K.Y. Wolin, K. Carson, G.A. Colditz, Obesity and Cancer, *Oncologist.* 15 (2010) 556–565. doi:10.1634/theoncologist.2009-0285.
- [24] A. Booth, A. Magnuson, J. Fouts, M. Foster, Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion, *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 21 (2015) 57–74. doi:10.1515/hmbci-2014-0037.
- [25] C.H. Lee, Y.C. Woo, Y. Wang, C.Y. Yeung, A. Xu, K.S.L. Lam, Obesity, adipokines and cancer: an update, *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 83 (2015) 147–156. doi:10.1111/cen.12667.
- [26] A.G. Renehan, M. Tyson, M. Egger, R.F. Heller, M. Zwahlen, Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies, *Lancet.* 371 (2008) 569–578. doi:10.1016/S0140-6736(08)60269-X.
- [27] G.K. Reeves, K. Pirie, V. Beral, J. Green, E. Spencer, D. Bull, Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study, *BMJ.* 335 (2007).

- [28] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2016, CA. Cancer J. Clin. 66 (2016) 7–30. doi:10.3322/caac.21332.
- [29] X. Dai, T. Li, Z. Bai, Y. Yang, X. Liu, J. Zhan, B. Shi, Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends., Am. J. Cancer Res. 5 (2015) 2929–43.
- [30] C.M. Perou, T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, a L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours., Nature. 406 (2000) 747–752. doi:10.1038/35021093.
- [31] K.M. Nieman, I.L. Romero, B. Van Houten, E. Lengyel, Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids. 1831 (2013) 1533–1541. doi:10.1016/j.bbalip.2013.02.010.
- [32] E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak, E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as a biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 155 (2011). doi:10.5507/bp.2011.038.
- [33] V. Rioux, P. Legrand, Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 10 (2007) 752–758. doi:10.1097/MCO.0b013e3282f01a75.
- [34] J.E. Hunter, J. Zhang, P.M. Kris-Etherton, Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review, Am. J. Clin. Nutr. 91 (2010) 46–63. doi:10.3945/ajcn.2009.27661.
- [35] R.P. Mensink, Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans, Lipids. 40 (2005) 1201–1205. doi:10.1007/s11745-005-1486-x.

-
-
- [36] T. Tholstrup, Influence of stearic acid on hemostatic risk factors in humans, *Lipids*. 40 (2005) 1229–1235. doi:10.1007/s11745-005-1490-1.
- [37] D. Mozaffarian, J.H.Y. Wu, (n-3) Fatty Acids and Cardiovascular Health: Are Effects of EPA and DHA Shared or Complementary?, *J. Nutr.* 142 (2012) 614S–625S. doi:10.3945/jn.111.149633.
- [38] E. Lopez-Huertas, Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 200–207. doi:10.1016/j.phrs.2009.10.007.
- [39] B. Choque, D. Catheline, V. Rioux, P. Legrand, Linoleic acid: Between doubts and certainties, *Biochimie.* 96 (2014) 14–21. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.012.
- [40] H. Sales-Campos, P. Reis De Souza, B.C. Peghini, J. Santana, D. Silva, C.R. Cardoso, An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease, *Mini-Reviews Med. Chem.* 13 (2013) 1–10. doi:10.2174/1389557511313020003.
- [41] C.M. Anderson, A. Stahl, SLC27 fatty acid transport proteins, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013) 516–528. doi:10.1016/j.mam.2012.07.010.
- [42] H. Doege, A. Stahl, Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models, *Physiology.* 21 (2006) 259–268. doi:10.1152/physiol.00014.2006.
- [43] A. Chmurzyńska, The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism., *J. Appl. Genet.* 47 (2006) 39–48. doi:10.1007/BF03194597.
- [44] J.A. Hamilton, Fatty acid transport: difficult or easy?, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 467–481.
- [45] B.M. Moran, P.R. Flatt, A.M. McKillop, G protein-coupled receptors: signalling and regulation by lipid agonists for improved glucose

- homoeostasis, *Acta Diabetol.* 53 (2016) 177–188. doi:10.1007/s00592-015-0826-9.
- [46] P. Steneberg, N. Rubins, R. Bartoov-Shifman, M.D. Walker, H. Edlund, The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse, *Cell Metab.* 1 (2005) 245–258. doi:10.1016/j.cmet.2005.03.007.
- [47] D.H. Hwang, J.A. Kim, J.Y. Lee, Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid, *Eur. J. Pharmacol.* 785 (2015) 24–35. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.024.
- [48] L. Li, Regulation of innate immunity signaling and its connection with human diseases., *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* 3 (2004) 81–6. doi:10.2174/1568010043483863.
- [49] W. Stremmel, G. Strohmeyer, F. Borchard, S. Kochwa, P.D. Berk, Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 4–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=396959&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [50] J.D. Cechetto, S.K. Sadacharan, P.D. Berk, R.S. Gupta, Immunogold localization of mitochondrial aspartate aminotransferase in mitochondria and on the cell surface in normal rat tissues., *Histol. Histopathol.* 17 (2002) 353–64.
- [51] K.J. Clemetson, S.L. Pfueller, E.F. Luscher, C.S.P. Jenkins, Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography, *BBA - Biomembr.* 464 (1977) 493–508. doi:10.1016/0005-2736(77)90025-6.
- [52] Y.M. Park, CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis., *Exp. Mol. Med.* 46 (2014) e99. doi:10.1038/emm.2014.38.

-
-
- [53] R.L. Silverstein, M. Febbraio, CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior., *Sci. Signal.* 2 (2009). doi:10.1126/scisignal.272re3.
- [54] M. Febbraio, D.P. Hajjar, R.L. Silverstein, CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism., *J.Clin.Invest.* 108 (2001) 785–791. doi:10.1172/JCI200114006.CD36.
- [55] A. Ibrahimi, A. Bonen, W.D. Blinn, T. Hajri, X. Li, K. Zhong, R. Cameron, N.A. Abumrad, Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26761–6.
- [56] M. Febbraio, N.A. Abumrad, D.P. Hajjar, K. Sharma, W. Cheng, S.F. Pearce, R.L. Silverstein, A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19055–62.
- [57] T.J. Aitman, A.M. Glazier, C.A. Wallace, L.D. Cooper, P.J. Norsworthy, F.N. Wahid, K.M. Al-Majali, P.M. Trembling, C.J. Mann, C.C. Shoulders, D. Graf, E. St Lezin, T.W. Kurtz, V. Kren, M. Pravenec, A. Ibrahimi, N.A. Abumrad, L.W. Stanton, J. Scott, Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats., *Nat. Genet.* 21 (1999) 76–83. doi:10.1038/5013.
- [58] R.E. Gimeno, Fatty acid transport proteins., *Curr. Opin. Lipidol.* 18 (2007) 271–6. doi:10.1097/MOL.0b013e3281338558.
- [59] J.K. Kim, R.E. Gimeno, T. Higashimori, H. Kim, H. Choi, S. Punreddy, R.L. Mozell, G. Tan, A. Stricker-krongrad, D.J. Hirsch, J.J. Fillmore, Z. Liu, J. Dong, G. Cline, A. Stahl, H.F. Lodish, G.I. Shulman, Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle, 113 (2004). doi:10.1172/JCI200418917.756.

- [60] Q. Wu, A.M. Ortegon, B. Tsang, K.R. Feingold, A. Stahl, H. Doege, FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity, 26 (2006) 3455–3467. doi:10.1128/MCB.26.9.3455.
- [61] A.K. Heinzer, P.A. Watkins, J.-F. Lu, S. Kemp, A.B. Moser, Y.Y. Li, S. Mihalik, J.M. Powers, K.D. Smith, A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy., *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1145–54.
- [62] Z. Pei, P. Fraisl, J. Berger, Z. Jia, S. Forss-Petter, P.A. Watkins, Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 54454–62. doi:10.1074/jbc.M410091200.
- [63] A. Stahl, D.J. Hirsch, R.E. Gimeno, S. Punreddy, P. Ge, N. Watson, S. Patel, M. Kotler, A. Raimondi, L.A. Tartaglia, H.F. Lodish, Identification of the major intestinal fatty acid transport protein., *Mol. Cell.* 4 (1999) 299–308.
- [64] R.E. Gimeno, D.J. Hirsch, S. Punreddy, Y. Sun, A.M. Ortegon, H. Wu, T. Daniels, A. Stricker-Krongrad, H.F. Lodish, A. Stahl, Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 49512–6. doi:10.1074/jbc.M309759200.
- [65] H. Doege, R.A. Baillie, A.M. Ortegon, B. Tsang, Q. Wu, S. Punreddy, D. Hirsch, N. Watson, R.E. Gimeno, A. Stahl, Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis., *Gastroenterology.* 130 (2006) 1245–58. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.006.
- [66] B. Hubbard, H. Doege, S. Punreddy, H. Wu, X. Huang, V.K. Kaushik, R.L. Mozell, J.J. Byrnes, A. Stricker-Krongrad, C.J. Chou, L.A. Tartaglia, H.F. Lodish, A. Stahl, R.E. Gimeno, Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity.,

-
-
- Gastroenterology. 130 (2006) 1259–69. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.012.
- [67] R.E. Gimeno, A.M. Ortegon, S. Patel, S. Punreddy, P. Ge, Y. Sun, H.F. Lodish, A. Stahl, Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 16039–44. doi:10.1074/jbc.M211412200.
- [68] M. Schmuth, A.M. Ortegon, M. Mao-Qiang, P.M. Elias, K.R. Feingold, A. Stahl, Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages., *J. Invest. Dermatol.* 125 (2005) 1174–81. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23934.x.
- [69] A.W. Zimmerman, J.H. Veerkamp, New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1096–1116. doi:10.1007/s00018-002-8490-y.
- [70] N.R. Coe, D. a. Bernlohr, Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1391 (1998) 287–306. doi:10.1016/S0005-2760(97)00205-1.
- [71] M. Furuhashi, G.S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets., *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 489–503. doi:10.1038/nrd2589.
- [72] M. Furuhashi, G. Tuncman, C.Z. Görgün, L. Makowski, G. Atsumi, E. Vaillancourt, K. Kono, V.R. Babaev, S. Fazio, M.F. Linton, R. Sulsky, J.A. Robl, R.A. Parker, G.S. Hotamisligil, Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2., *Nature.* 447 (2007) 959–65. doi:10.1038/nature05844.
- [73] L. Makowski, G.S. Hotamisligil, The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis., *Curr. Opin. Lipidol.* 16 (2005) 543–8. doi:10.1097/01.mol.0000180166.08196.07.
- [74] R.K. Ockner, J.A. Manning, R.B. Poppenhausen, W.K. Ho, A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other

- tissues., *Science*. 177 (1972) 56–8.
- [75] J. Storch, L. McDermott, Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S126–S131. doi:10.1194/jlr.R800084-JLR200.
- [76] J. Storch, A.E. Thumser, Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32679–32683. doi:10.1074/jbc.R110.135210.
- [77] A. Vogel Hertz, D.A. Bernlohr, The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function, *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (2000) 175–180. doi:10.1016/S1043-2760(00)00257-5.
- [78] A. Ong'iro, V. Ismet Ugursal, A.M. Al Taweel, G. Lajeunesse, Thermodynamic simulation and evaluation of a steam CHP plant using ASPEN plus, *Appl. Therm. Eng.* 16 (1996) 263–271. doi:10.1016/1359-4311(95)00071-2.
- [79] J.F. Glatz, F. a van Nieuwenhoven, J.J. Luiken, F.G. Schaap, G.J. van der Vusse, Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*. 57 (1997) 373–8. doi:10.1016/S0952-3278(97)90413-0.
- [80] M. Furuhashi, S. Hiramitsu, T. Mita, T. Fuseya, S. Ishimura, A. Omori, M. Matsumoto, Y. Watanabe, K. Hoshina, M. Tanaka, N. Moniwa, H. Yoshida, J. Ishii, T. Miura, Reduction of serum FABP4 level by sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus., *J. Lipid Res.* 56 (2015) 2372–80. doi:10.1194/jlr.M059469.
- [81] F.G. Schaap, G.J. van der Vusse, J.F.C. Glatz, Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates, *Mol. Cell. Biochem.* 239 (2002) 69–77. doi:10.1023/A:1020519011939.
- [82] J.C. Sacchettini, J.I. Gordon, L.J. Banaszak, The structure of crystalline

-
-
- escherichia-coli-derived rat intestinal fatty acid-binding protein at T 2.5-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 5815–5819.
- [83] J.A. Hamilton, Fatty acid interactions with proteins: What X-ray crystal and NMR solution structures tell us, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 177–199. doi:10.1016/j.plipres.2003.09.002.
- [84] A.E. Jenkins, J.A. Hockenberry, T. Nguyen, D.A. Bernlohr, Testing of the portal hypothesis: Analysis of a V32G, F57G, K58G mutant of the fatty acid binding protein of the murine adipocyte, *Biochemistry.* 41 (2002) 2022–2027. doi:10.1021/bi015769i.
- [85] G.G. Martin, H. Danneberg, L.S. Kumar, B.P. Atshaves, E. Erol, M. Bader, F. Schroeder, B. Binas, Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21429–21438. doi:10.1074/jbc.M300287200.
- [86] E.P. Newberry, Y. Xie, S. Kennedy, X. Han, K.K. Buhman, J. Luo, R.W. Gross, N.O. Davidson, Decreased Hepatic Triglyceride Accumulation and Altered Fatty Acid Uptake in Mice with Deletion of the Liver Fatty Acid-binding Protein Gene, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 51664–51672. doi:10.1074/jbc.M309377200.
- [87] G. Vassileva, L. Huwyler, K. Poirier, L.B. Agellon, M.J. Toth, The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice., *FASEB J.* 14 (2000) 2040–6. doi:10.1096/fj.99-0959com.
- [88] L.J. Baier, J.C. Sacchettini, W.C. Knowler, J. Eads, G. Paolisso, P.A. Tataranni, H. Mochizuki, P.H. Bennett, C. Bogardus, M. Prochazka, An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance., *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 1281–7. doi:10.1172/JCI117778.
- [89] F.G. Schaap, B. Binas, H. Danneberg, G.J. van der Vusse, J.F. Glatz, Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice

- lacking the heart-type fatty acid binding protein gene., *Circ. Res.* 85 (1999) 329–37.
- [90] M. Furuhashi, S. Saitoh, K. Shimamoto, T. Miura, Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases., *Clin. Med. Insights. Cardiol.* 8 (2014) 23–33. doi:10.4137/CMC.S17067.
- [91] J. Storch, B. Corsico, The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins., *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008) 73–95. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093710.
- [92] R.L. Smathers, D.R. Petersen, The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions., *Hum. Genomics.* 5 (2011) 170–191. doi:10.1186/1479-7364-5-3-170.
- [93] L.Z. Xu, R. Sánchez, A. Sali, N. Heintz, Ligand specificity of brain lipid-binding protein., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24711–9.
- [94] M.F. Sánchez-Font, A. Bosch-Comas, R. González-Duarte, G. Marfany, Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance., *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 2769–77.
- [95] A. Watanabe, T. Toyota, Y. Owada, T. Hayashi, Y. Iwayama, M. Matsumata, Y. Ishitsuka, A. Nakaya, M. Maekawa, T. Ohnishi, R. Arai, K. Sakurai, K. Yamada, H. Kondo, K. Hashimoto, N. Osumi, T. Yoshikawa, Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype., *PLoS Biol.* 5 (2007) e297. doi:10.1371/journal.pbio.0050297.
- [96] T. Kido, S. Arata, R. Suzuki, T. Hosono, Y. Nakanishi, J. Miyazaki, I. Saito, T. Kuroki, S. Shioda, The testicular fatty acid binding protein PERF15 regulates the fate of germ cells in PERF15 transgenic mice., *Dev. Growth Differ.* 47 (2005) 15–24. doi:10.1111/j.1440-169x.2004.00775.x.
- [97] R.-Z. Liu, X. Li, R. Godbout, A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene

-
-
- resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis., *Genomics*. 92 (2008) 436–45. doi:10.1016/j.ygeno.2008.08.003.
- [98] B.M. Spiegelman, M. Frank, H. Green, Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10083–9.
- [99] C.R. Hunt, J.H. Ro, D.E. Dobson, H.Y. Min, B.M. Spiegelman, Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 3786–90.
- [100] D.A. Bernlohr, M.A. Bolanowski, T.J. Kelly, M.D. Lane, Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5563–5567.
- [101] L. Makowski, G.S. Hotamisligil, Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses., *J. Nutr.* 134 (2004) 2464S–2468S.
- [102] M.Y.K. Lee, H. Li, Y. Xiao, Z. Zhou, A. Xu, P.M. Vanhoutte, Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells, *Br. J. Pharmacol.* 162 (2011) 1564–1576. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01158.x.
- [103] M.S. Rolph, T.R. Young, B.O. V Shum, C.Z. Gorgun, C. Schmitz-Peiffer, I.A. Ramshaw, G.S. Hotamisligil, C.R. Mackay, Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2., *J. Immunol.* 177 (2006) 7794–801.
- [104] Y. Fu, N. Luo, M.F. Lopes-Virella, W.T. Garvey, The adipocyte lipid binding protein (ALBP/ap2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages., *Atherosclerosis*. 165 (2002) 259–69.

- [105] B.O. V Shum, C.R. Mackay, C.Z. Gorgun, M.J. Frost, R.K. Kumar, G.S. Hotamisligil, M.S. Rolph, The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation., *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2183–2192. doi:10.1172/JCI24767.
- [106] M.R. Nourani, Y. Owada, N. Kitanaka, H. Sakagami, H. Hoshi, H. Iwasa, F. Spener, H. Kondo, Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary, *J. Mol. Histol.* 36 (2005) 491–497. doi:10.1007/s10735-006-9024-y.
- [107] J. Wang, J. Tang, B. Wang, J. Song, J. Liu, Z. Wei, F. Zhang, X. Ma, Y. Cao, FABP4: a novel candidate gene for polycystic ovary syndrome., *Endocrine.* 36 (2009) 392–6. doi:10.1007/s12020-009-9228-5.
- [108] F. Wang, S. Gao, F. Chen, Z. Fu, H. Yin, X. Lu, J. Yu, C. Lu, Mammary fat of breast cancer: gene expression profiling and functional characterization., *PLoS One.* 9 (2014) e109742. doi:10.1371/journal.pone.0109742.
- [109] A. Tölle, S. Suhail, M. Jung, K. Jung, C. Stephan, Fatty acid binding proteins (FABPs) in prostate, bladder and kidney cancer cell lines and the use of IL-FABP as survival predictor in patients with renal cell carcinoma., *BMC Cancer.* 11 (2011) 302. doi:10.1186/1471-2407-11-302.
- [110] J.H. Bennett, S. Shousha, B. Puddle, N.A. Athanasou, Immunohistochemical identification of tumours of adipocytic differentiation using an antibody to aP2 protein., *J. Clin. Pathol.* 48 (1995) 950–4.
- [111] O. Cataltepe, M.C. Arikan, E. Ghelfi, C. Karaaslan, Y. Ozsurekci, K. Dresser, Y. Li, T.W. Smith, S. Cataltepe, Fatty acid binding protein 4 is expressed in distinct endothelial and non-endothelial cell populations in glioblastoma, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38 (2012) 400–410. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01237.x.
- [112] G. Ohlsson, J.M.A. Moreira, P. Gromov, G. Sauter, J.E. Celis, Loss of

-
-
- expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas., *Mol. Cell. Proteomics.* 4 (2005) 570–81. doi:10.1074/mcp.M500017-MCP200.
- [113] H. Fischer, T. Gustafsson, C.J. Sundberg, J. Norrbom, M. Ekman, O. Johansson, E. Jansson, Fatty acid binding protein 4 in human skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 125–130. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.083.
- [114] A. Xu, Y. Wang, J.Y. Xu, D. Stejskal, S. Tam, J. Zhang, N.M.S. Wat, W.K. Wong, K.S.L. Lam, Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome., *Clin. Chem.* 52 (2006) 405–13. doi:10.1373/clinchem.2005.062463.
- [115] G. V Richieri, R.T. Ogata, A.M. Kleinfeld, Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23918–30.
- [116] A.J. Smith, M.A. Sanders, B.E. Juhlmann, A. V Hertz, D.A. Bernlohr, Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33536–43. doi:10.1074/jbc.M806732200.
- [117] A.J. Smith, B.R. Thompson, M.A. Sanders, D.A. Bernlohr, Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation., *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 32424–32. doi:10.1074/jbc.M703730200.
- [118] L. Scheja, L. Makowski, K.T. Uysal, S.M. Wiesbrock, D.R. Shimshek, D.S. Meyers, M. Morgan, R.A. Parker, G.S. Hotamisligil, Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/- mice., *Diabetes.* 48 (1999) 1987–94.

- [119] B.I. Frohnert, A.R. Sinaiko, F.J. Serrot, R.E. Foncea, A. Moran, S. Ikramuddin, U. Choudry, D.A. Bernlohr, Increased adipose protein carbonylation in human obesity., *Obesity* (Silver Spring). 19 (2011) 1735–41. doi:10.1038/oby.2011.115.
- [120] M.K. Buelt, Z. Xu, L.J. Banaszak, D.A. Bernlohr, Structural and functional characterization of the phosphorylated adipocyte lipid-binding protein (pp15), *Biochemistry*. 31 (1992) 3493–3499. doi:10.1021/bi00128a025.
- [121] R.E. Gillilan, S.D. Ayers, N. Noy, Structural Basis for Activation of Fatty Acid-binding Protein 4, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 1246–1260. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.040.
- [122] S.D. Ayers, K.L. Nedrow, R.E. Gillilan, N. Noy, Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4., *Biochemistry*. 46 (2007) 6744–6752. doi:10.1021/bi700047a.
- [123] A. Adida, F. Spener, Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor γ agonists in cultured cell, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1761 (2006) 172–181. doi:10.1016/j.bbalip.2006.02.006.
- [124] F. Schroeder, A.D. Petrescu, H. Huang, B.P. Atshaves, A.L. McIntosh, G.G. Martin, H.A. Hostetler, A. Vespa, D. Landrock, K.K. Landrock, H.R. Payne, A.B. Kier, Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription, *Lipids*. 43 (2008) 1–17. doi:10.1007/s11745-007-3111-z.
- [125] L. Makowski, K.C. Brittingham, J.M. Reynolds, J. Suttles, G.S. Hotamisligil, The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity: Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IKB kinase activities, *J. Biol. Chem*. 280 (2005) 12888–12895. doi:10.1074/jbc.M413788200.

-
-
- [126] X. Hui, H. Li, Z. Zhou, K.S.L. Lam, Y. Xiao, D. Wu, K. Ding, Y. Wang, P.M. Vanhoutte, A. Xu, Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH 2-terminal kinases and activator protein-1, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10273–10280. doi:10.1074/jbc.M109.097907.
- [127] L. Makowski, J.B. Boord, K. Maeda, V.R. Babaev, K.T. Uysal, M.A. Morgan, R.A. Parker, J. Suttles, S. Fazio, G.S. Hotamisligil, M.F. Linton, Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis., *Nat. Med.* 7 (2001) 699–705. doi:10.1038/89076.
- [128] G.S. Hotamisligil, R.S. Johnson, R.J. Distel, R. Ellis, V.E. Papaioannou, B.M. Spiegelman, Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein., *Science* (80-.). 274 (1996) 1377–9. doi:10.1126/science.274.5291.1377.
- [129] K.T. Uysal, L. Scheja, S.M. Wiesbrock, S. Bonner-Weir, G.S. Hotamisligil, Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2., *Endocrinology*. 141 (2000) 3388–96. doi:10.1210/endo.141.9.7637.
- [130] A.E. Jenkins-Kruchten, A. Bennaars-Eiden, J.R. Ross, W.-J. Shen, F.B. Kraemer, D.A. Bernlohr, Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47636–43. doi:10.1074/jbc.M307680200.
- [131] A.J. Smith, M.A. Sanders, B.R. Thompson, C. Londos, F.B. Kraemer, D.A. Bernlohr, Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 52399–405. doi:10.1074/jbc.M410301200.
- [132] A. V. Hertzal, L.A. Smith, A.H. Berg, G.W. Cline, G.I. Shulman, P.E. Scherer, D.A. Bernlohr, Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding

- protein null and transgenic mice, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 290 (2006).
- [133] K. Maeda, H. Cao, K. Kono, C.Z. Gorgun, M. Furuhashi, K.T. Uysal, Q. Cao, G. Atsumi, H. Malone, B. Krishnan, Y. Minokoshi, B.B. Kahn, R.A. Parker, G.S. Hotamisligil, Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes., *Cell Metab.* 1 (2005) 107–19. doi:10.1016/j.cmet.2004.12.008.
- [134] K. Maeda, K.T. Uysal, L. Makowski, C.Z. Görgün, G. Atsumi, R.A. Parker, J. Brüning, A.V. Hertzel, D.A. Bernlohr, G.S. Hotamisligil, Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance., *Diabetes.* 52 (2003) 300–7.
- [135] H. Cao, K. Gerhold, J.R. Mayers, M.M. Wiest, S.M. Watkins, G.S. Hotamisligil, Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism, *Cell.* 134 (2008) 933–944. doi:10.1016/j.cell.2008.07.048.
- [136] E. Erbay, V.R. Babaev, J.R. Mayers, L. Makowski, K.N. Charles, M.E. Snitow, S. Fazio, M.M. Wiest, S.M. Watkins, M.F. Linton, G.S. Hotamisligil, Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis., *Nat. Med.* 15 (2009) 1383–91. doi:10.1038/nm.2067.
- [137] H. Cao, K. Maeda, C.Z. Gorgun, H.-J. Kim, S.-Y. Park, G.I. Shulman, J.K. Kim, G.S. Hotamisligil, Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice., *Diabetes.* 55 (2006) 1915–22. doi:10.2337/db05-1496.
- [138] H. Münzberg, C.D. Morrison, Structure, production and signaling of leptin., *Metabolism.* 64 (2015) 13–23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010.
- [139] A. Reese-Wagoner, J. Thompson, L. Banaszak, Structural properties of the adipocyte lipid binding protein., *Biochim. Biophys. Acta.* 1441 (1999) 106–16.

-
-
- [140] S. Kralisch, M. Fasshauer, Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease?, *Diabetologia*. 56 (2013) 10–21. doi:10.1007/s00125-012-2737-4.
- [141] I. Schlottmann, M. Ehrhart-Bornstein, M. Wabitsch, S. Bornstein, V. Lamounier-Zepter, Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes, *Int. J. Obes.* 38 (n.d.) 1221–1227. doi:10.1038/ijo.2013.241.
- [142] T. Mita, M. Furuhashi, S. Hiramitsu, J. Ishii, K. Hoshina, S. Ishimura, T. Fuseya, Y. Watanabe, M. Tanaka, K. Ohno, H. Akasaka, H. Ohnishi, H. Yoshida, S. Saitoh, K. Shimamoto, T. Miura, FABP4 is secreted from adipocytes by adenyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms, *Obesity*. 23 (2015) 359–367. doi:10.1002/oby.20954.
- [143] M.E. Ertunc, J. Sikkeland, F. Fenaroli, G. Griffiths, M.P. Daniels, H. Cao, F. Saatcioglu, G.S. Hotamisligil, Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 423–434. doi:10.1194/jlr.M055798.
- [144] T. Reinehr, B. Stoffel-Wagner, C.L. Roth, Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss, *Metabolism*. 56 (2007) 1735–1741. doi:10.1016/j.metabol.2007.07.019.
- [145] D.G. Haider, K. Schindler, A. Bohdjalian, G. Prager, A. Luger, M. Wolzt, B. Ludvik, Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity, *Diabetes, Obes. Metab.* 9 (2007) 761–763. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00717.x.
- [146] R. Corripio, J.M. González-Clemente, J. Pérez-Sánchez, S. Näf, L. Gallart, R. Nosàs, J. Vendrell, A. Caixàs, Weight loss in prepubertal obese children is associated with a decrease in adipocyte fatty-acid-binding protein without changes in lipocalin-2: A 2-year longitudinal study, *Eur. J. Endocrinol.* 163 (2010) 887–893. doi:10.1530/EJE-10-0408.

- [147] D. Stejskal, M. Karpisek, J. Bronsky, Serum adipocyte-fatty acid binding protein discriminates patients with permanent and temporary body weight loss, *J. Clin. Lab. Anal.* 22 (2008) 380–382. doi:10.1002/jcla.20270.
- [148] K.M. Choi, T.N. Kim, H.J. Yoo, K.W. Lee, G.J. Cho, T.G. Hwang, S.H. Baik, D.S. Choi, S.M. Kim, Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 70 (2009) 569–574. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03374.x.
- [149] I. Simón, X. Escoté, N. Vilarrasa, J. Gómez, J.M. Fernández-Real, A. Megía, C. Gutiérrez, L. Gallart, C. Masdevall, J. Vendrell, Adipocyte Fatty Acid-binding Protein as a Determinant of Insulin Sensitivity in Morbid-obese Women, *Obesity*. (2009). doi:10.1038/oby.2008.665.
- [150] S. Ishimura, M. Furuhashi, Y. Watanabe, K. Hoshina, T. Fuseya, T. Mita, Y. Okazaki, M. Koyama, M. Tanaka, H. Akasaka, H. Ohnishi, H. Yoshida, S. Saitoh, T. Miura, Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population, *PLoS One*. 8 (2013) e81318. doi:10.1371/journal.pone.0081318.
- [151] R.M. Fisher, P. Eriksson, J. Hoffstedt, G.S. Hotamisligil, A. Thörne, M. Rydén, A. Hamsten, P. Arner, Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals, *Diabetologia*. 44 (2001) 1268–1273. doi:10.1007/s001250100643.
- [152] R.M. Fisher, A. Thörne, A. Hamsten, P. Arner, Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals, *Mol. Cell. Biochem.* 239 (2002) 95–100. doi:10.1023/A:1020532823751.
- [153] P. Zimmet, D. Magliano, Y. Matsuzawa, G. Alberti, J. Shaw, The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition., *J. Atheroscler. Thromb.* 12 (2005) 295–300. doi:10.5551/jat.12.295.
- [154] A. Xu, A.W.K. Tso, B.M.Y. Cheung, Y. Wang, N.M.S. Wat, C.H.Y. Fong,

-
-
- D.C.Y. Yeung, E.D. Janus, P.C. Sham, K.S.L. Lam, Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: A 5-year prospective study, *Circulation*. 115 (2007) 1537–1543. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.647503.
- [155] A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, L. Masana, Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients., *Atherosclerosis*. 195 (2007) e150-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.045.
- [156] B. Coll, A. Cabre, C. Alonso-Villaverde, I. Lazaro, G. Aragonés, S. Parra, J. Girona, L. Masana, The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients, *Atherosclerosis*. 199 (2008) 147–153. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.032.
- [157] A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, L. Masana, Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes., *J. Lipid Res*. 49 (2008) 1746–51. doi:10.1194/jlr.M800102-JLR200.
- [158] G. Aragonès, R. Ferré, I. Lázaro, A. Cabré, N. Plana, J. Merino, M. Heras, J. Girona, L. Masana, Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes., *Atherosclerosis*. 213 (2010) 329–31. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.026.
- [159] G. Liu, M. Ding, S.E. Chiuve, E.B. Rimm, P.W. Franks, J.B. Meigs, F.B. Hu, Q. Sun, Plasma Levels of Fatty Acid-Binding Protein 4, Retinol-Binding Protein 4, High-Molecular-Weight Adiponectin, and Cardiovascular Mortality among Men with Type 2 Diabetes: A 22-Year Prospective Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 36 (2016) 2259–2267. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308320.
- [160] A. Cabré, I. Lázaro, M. Cofán, E. Jarauta, N. Plana, A.L. Garcia-Otín, J.F.

- Ascaso, R. Ferré, F. Civeira, E. Ros, L. Masana, FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia., *J. Lipid Res.* 51 (2010) 1173–8. doi:10.1194/jlr.M900066.
- [161] M.M. Balci, U. Arslan, H. Firat, İbrahim Kocaoğlu, M.G. Vural, K.G. Balci, O. Maden, O.A. Gürbüz, S. Ardiç, E. Yeter, Serum Levels of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Are Independently Associated With Left Ventricular Mass and Myocardial Performance Index in Obstructive Sleep Apnea Syndrome, *J. Investig. Med.* 60 (2015).
- [162] K. Hancke, D. Grubeck, N. Hauser, R. Kreienberg, J.M. Weiss, Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* 119 (2010) 367–377. doi:10.1007/s10549-009-0577-9.
- [163] G. Tuncman, E. Erbay, X. Hom, I. De Vivo, H. Campos, E.B. Rimm, G.S. Hotamisligil, A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 6970–5. doi:10.1073/pnas.0602178103.
- [164] J. Saksi, P. Ijas, M.I. Mayranpaa, K. Nuotio, P.M. Isoviita, J. Tuimala, E. Lehtonen-Smeds, M. Kaste, A. Jula, J. Sinisalo, M.S. Nieminen, M.-L. Lokki, M. Perola, A.S. Havulinna, V. Salomaa, J. Kettunen, M. Jauhiainen, P.T. Kovanen, P.J. Lindsberg, Low-Expression Variant of Fatty Acid-Binding Protein 4 Favors Reduced Manifestations of Atherosclerotic Disease and Increased Plaque Stability, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7 (2014) 588–598. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000499.
- [165] D. Ibarretxe, J. Girona, N. Plana, A. Cabré, M. Heras, R. Ferré, J. Merino, J.C. Vallvé, L. Masana, FABP4 plasma concentrations are determined by acquired metabolic derangements rather than genetic determinants., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25 (2015) 875–80. doi:10.1016/j.numecd.2015.05.008.

-
-
- [166] J. Girona, R. Rosales, N. Plana, P. Saavedra, L. Masana, J.-C.C. Vallvé, FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway., *PLoS One*. 8 (2013) e81914. doi:10.1371/journal.pone.0081914.
- [167] G. Aragonès, P. Saavedra, M. Heras, A. Cabré, J. Girona, L. Masana, Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells., *Cardiovasc. Diabetol.* 11 (2012) 72. doi:10.1186/1475-2840-11-72.
- [168] P. Saavedra, J. Girona, A. Bosquet, S. Guaita, N. Canela, G. Aragonès, M. Heras, L. Masana, New insights into circulating FABP4: Interaction with cytokeratin 1 on endothelial cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 2966–2974. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.002.
- [169] V. Lamounier-Zepter, C. Look, J. Alvarez, T. Christ, U. Ravens, W.-H. Schunck, M. Ehrhart-Bornstein, S.R. Bornstein, I. Morano, Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease., *Circ. Res.* 105 (2009) 326–34. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.200501.
- [170] G.S. Hotamisligil, D. a. Bernlohr, Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 11 (2015) 592–605. doi:10.1038/nrendo.2015.122.
- [171] Y. Zhou, T. Nie, Y. Zhang, M. Song, K. Li, M. Ding, K. Ding, D. Wu, Y. Xu, The discovery of novel and selective fatty acid binding protein 4 inhibitors by virtual screening and biological evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 4310–4317. doi:10.1016/j.bmc.2016.07.022.
- [172] H. Cai, G. Yan, X. Zhang, O. Gorbenko, H. Wang, W. Zhu, Discovery of highly selective inhibitors of human fatty acid binding protein 4 (FABP4) by virtual screening, 2010. doi:10.1016/j.bmcl.2010.04.095.
- [173] F. Lehmann, S. Haile, E. Axen, C. Medina, J. Uppenberg, S. Svensson, T.

- Lundbäck, L. Rondahl, T. Barf, Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4445–8. doi:10.1016/j.bmcl.2004.06.057.
- [174] R. Ringom, E. Axen, J. Uppenberg, T. Lundbäck, L. Rondahl, T. Barf, Substituted benzylamino-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4(1H)-ones: A novel class of selective human A-FABP inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4449–4452. doi:10.1016/j.bmcl.2004.06.058.
- [175] R. Sulsky, D.R. Magnin, Y. Huang, L. Simpkins, P. Taunk, M. Patel, Y. Zhu, T.R. Stouch, D. Bassolino-Klimas, R. Parker, T. Harrity, R. Stoffel, D.S. Taylor, T.B. Lavoie, K. Kish, B.L. Jacobson, S. Sheriff, L.P. Adam, W.R. Ewing, J.A. Robl, Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP), *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 3511–3515. doi:10.1016/j.bmcl.2006.12.044.
- [176] W. Lin, X. Huang, L. Zhang, D. Chen, D. Wang, Q. Peng, L. Xu, J. Li, X. Liu, K. Li, K. Ding, S. Jin, J. Li, D. Wu, BMS309403 Stimulates Glucose Uptake in Myotubes through Activation of AMP-Activated Protein Kinase, *PLoS One.* 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0044570.
- [177] J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang, C.Z. Görgün, K.T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, G.S. Hotamisligil, A central role for JNK in obesity and insulin resistance., *Nature.* 420 (2002) 333–336. doi:10.1038/nature01137.
- [178] Y.-W. Won, P.P. Adhikary, K.S. Lim, H.J. Kim, J.K. Kim, Y.-H. Kim, Oligopeptide complex for targeted non-viral gene delivery to adipocytes., *Nat. Mater.* 13 (2014) 1–8. doi:10.1038/nmat4092.
- [179] M.F. Burak, K.E. Inouye, A. White, A. Lee, G. Tuncman, E.S. Calay, M. Sekiya, A. Tirosh, K. Eguchi, G. Birrane, D. Lightwood, L. Howells, G. Odede, H. Hailu, S. West, R. Garlish, H. Neale, C. Doyle, A. Moore, G.S. Hotamisligil, Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes., *Sci.*

Transl. Med. 7 (2015) 319ra205. doi:10.1126/scitranslmed.aac6336.

- [180] B. Qin, M.M. Polansky, R.A. Anderson, Cinnamon Extract Regulates Plasma Levels of Adipose-derived Factors and Expression of Multiple Genes Related to Carbohydrate Metabolism and Lipogenesis in Adipose Tissue of Fructose-fed Rats, *Horm. Metab. Res.* 42 (2010) 187–193. doi:10.1055/s-0029-1242746.
- [181] R. Aoyagi, M. Funakoshi-Tago, Y. Fujiwara, H. Tamura, Coffee Inhibits Adipocyte Differentiation via Inactivation of PPAR γ , *Biol. Pharm. Bull.* 37 (1820) 1820–1825.
- [182] C. Hetz, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 89–102. doi:10.1038/nrm3270.
- [183] J. Krebs, L.B. Agellon, M. Michalak, Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460 (2015) 114–121. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.004.
- [184] P. Fagone, S. Jackowski, Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function., *J. Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S311-6. doi:10.1194/jlr.R800049-JLR200.
- [185] T. Anelli, R. Sitia, Protein quality control in the early secretory pathway., *EMBO J.* 27 (2008) 315–27. doi:10.1038/sj.emboj.7601974.
- [186] T. Gidalevitz, F. Stevens, Y. Argon, Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 2410–2424. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.007.
- [187] Y. Ma, L.M. Hendershot, ER chaperone functions during normal and stress conditions, *J. Chem. Neuroanat.* 28 (2004) 51–65. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.007.
- [188] P.I. Merksamer, A. Trusina, F.R. Papa, Real-Time Redox Measurements

- during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions, *Cell*. 135 (2008) 933–947. doi:10.1016/j.cell.2008.10.011.
- [189] M.H. Smith, H.L. Ploegh, J.S. Weissman, Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum, *Science* (80-.). 334 (2011) 1086–1090. doi:10.1126/science.1209235.
- [190] M. Schröder, R.J.R.J. Kaufman, ER stress and the unfolded protein response, *Mutat. Res.* 569 (2005) 29–63. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- [191] M. Schröder, R.J. Kaufman, The mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 739–789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
- [192] I. Tabas, D. Ron, Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 184–190. doi:10.1038/ncb0311-184.
- [193] J. Lee, U. Ozcan, Unfolded protein response signaling and metabolic diseases, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2014. doi:10.1074/jbc.R113.534743.
- [194] S. Siyan Cao, R.J. Kaufman, Unfolded protein response, *Curr. Biol.* 22 (2012). doi:10.1016/j.tig.2012.01.004.
- [195] K.T. Pfaffenbach, A.S. Lee, The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress., *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (2011) 150–6. doi:10.1016/j.ceb.2010.09.007.
- [196] Y. Chen, F. Brandizzi, IRE1: ER stress sensor and cell fate executor, *Trends Cell Biol.* 23 (2013) 547–555. doi:10.1016/j.tcb.2013.06.005.
- [197] C.Y. Liu, Z. Xu, R.J. Kaufman, Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α ., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17680–7. doi:10.1074/jbc.M300418200.

- [198] A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, L.H. Glimcher, XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response., *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7448–59.
- [199] H.P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron, Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response., *Mol. Cell.* 5 (2000) 897–904.
- [200] Y. Ma, J.W. Brewer, J. Alan Diehl, L.M. Hendershot, Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response, *J. Mol. Biol.* 318 (2002) 1351–1365. doi:10.1016/S0022-2836(02)00234-6.
- [201] R.C. Wek, H.-Y. Jiang, T.G. Anthony, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 7. doi:10.1042/BST20060007.
- [202] D. Ron, P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 519–529. doi:10.1038/nrm2199.
- [203] S.A. Oakes, F.R. Papa, The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 10 (2015) 173–194. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- [204] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress., *Mol. Biol. Cell.* 10 (1999) 3787–99.
- [205] A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, P. Agostinis, ER stress-induced inflammation: Does it aid or impede disease progression?, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 589–598. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.010.

- [206] K. Zhang, R.J. Kaufman, From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response, *Nature*. 454 (2008) 455–462. doi:10.1038/nature07203.
- [207] S.B. Cullinan, J.A. Diehl, Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 317–332. doi:10.1016/j.biocel.2005.09.018.
- [208] C.M. Haynes, E.A. Titus, A.A. Cooper, Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death, *Mol. Cell.* 15 (2004) 767–776. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.025.
- [209] R.J. Davis, Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases, *Cell*. 103 (2000) 239–252. doi:10.1016/S0092-8674(00)00116-1.
- [210] F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, D. Ron, Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1., *Science*. 287 (2000) 664–6. doi:10.1126/science.287.5453.664.
- [211] N.J. Darling, S.J. Cook, The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843 (2014) 2150–2163. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.009.
- [212] K.J. Campbell, N.D. Perkins, Regulation of NF-kappaB function., *Biochem. Soc. Symp.* 180 (2006) 165–80.
- [213] P. Hu, Z. Han, A.D. Couvillon, R.J. Kaufman, J.H. Exton, Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression., *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3071–84. doi:10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006.
- [214] J. Deng, P.D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R.J. Kaufman, N. Sonenberg, H.P. Harding, D. Ron, Translational Repression Mediates Activation of Nuclear

-
-
- Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 10161–10168. doi:10.1128/MCB.24.23.10161-10168.2004.
- [215] H. Yamazaki, N. Hiramatsu, K. Hayakawa, Y. Tagawa, M. Okamura, R. Ogata, T. Huang, S. Nakajima, J. Yao, A.W. Paton, J.C. Paton, M. Kitamura, Activation of the Akt-NF- κ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response, *J. Immunol.* 183 (2009) 1480–1487. doi:10.4049/jimmunol.0900017.
- [216] G. Tuncman, J. Hirosumi, G. Solinas, L. Chang, M. Karin, G.S. Hotamisligil, Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10741–6. doi:10.1073/pnas.0603509103.
- [217] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Görgün, L.H. Glimcher, G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes., *Science.* 306 (2004) 457–61. doi:10.1126/science.1103160.
- [218] Y. Wei, D. Wang, F. Topczewski, M.J. Pagliassotti, Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E275–81. doi:10.1152/ajpendo.00644.2005.
- [219] P. Marchetti, M. Bugliani, R. Lupi, L. Marselli, M. Masini, U. Boggi, F. Filipponi, G.C. Weir, D.L. Eizirik, M. Cnop, The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients, *Diabetologia.* 50 (2007) 2486–2494. doi:10.1007/s00125-007-0816-8.
- [220] J. Yin, Y. Wang, L. Gu, N. Fan, Y. Ma, Y. Peng, Palmitate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in mature adipocytes: Implications for apoptosis and inflammation, *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 932–940. doi:10.3892/ijmm.2015.2085.
- [221] W. Guo, S. Wong, W. Xie, T. Lei, Z. Luo, Palmitate modulates intracellular

- signaling , induces endoplasmic reticulum stress , and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes Palmitate modulates intracellular signaling , induces endoplasmic reticulum stress , and causes apoptosis, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293 (2012). doi:10.1152/ajpendo.00523.2006.
- [222] J. Lu, Q. Wang, L. Huang, H. Dong, L. Lin, N. Lin, F. Zheng, J. Tan, Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: Prevention by AMPK activator, *Endocrinology*. 153 (2012) 5275–5284. doi:10.1210/en.2012-1418.
- [223] E. Katsoulieiris, J.G. Mabley, M. Samai, I.C. Green, P.K. Chatterjee, α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress, *Eur. J. Pharmacol.* 623 (2009) 107–112. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.015.
- [224] L. Salvadó, T. Coll, A.M. Gómez-Foix, E. Salmerón, E. Barroso, X. Palomer, M. Vázquez-Carrera, Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism, *Diabetologia*. 56 (2013) 1372–82. doi:10.1007/s00125-013-2867-3.
- [225] J. Ishiyama, R. Taguchi, Y. Akasaka, S. Shibata, M. Ito, M. Nagasawa, K. Murakami, Unsaturated FAs prevent palmitate-induced LOX-1 induction via inhibition of ER stress in macrophages, *J Lipid Res.* 52 (2011) 299–307. doi:10.1194/jlr.M007104 [pii]\r10.1194/jlr.M007104.
- [226] C.D. Byrne, Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 82 (2010) 265–271. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.012.
- [227] Y. Wei, D. Wang, M.J. Pagliassotti, Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells, *Mol. Cell. Biochem.* 303 (2007) 105–

-
-
113. doi:10.1007/s11010-007-9461-2.
- [228] F. Yao, Z. Li, T. Ehara, L. Yang, D. Wang, L. Feng, Y. Zhang, K. Wang, Y. Shi, H. Duan, L. Zhang, Fatty Acid-Binding Protein 4 mediates apoptosis via endoplasmic reticulum stress in mesangial cells of diabetic nephropathy., *Mol. Cell. Endocrinol.* (2015). doi:10.1016/j.mce.2015.05.003.
- [229] K. Kajimoto, Y. Minami, H. Harashima, Cytoprotective role of the fatty acid binding protein 4 against oxidative and endoplasmic reticulum stress in 3T3-L1 adipocytes., *FEBS Open Bio.* 4 (2014) 602–10. doi:10.1016/j.fob.2014.06.008.
- [230] S.S. Cao, R.J. Kaufman, Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease., *Expert Opin. Ther. Targets.* 17 (2013) 437–48. doi:10.1517/14728222.2013.756471.
- [231] L. Salvadó, X. Palomer, E. Barroso, M. Vázquez-Carrera, Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance, *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 438–448. doi:10.1016/j.tem.2015.05.007.
- [232] U. Ozcan, E. Yilmaz, L. Ozcan, M. Furuhashi, E. Vaillancourt, R.O. Smith, C.Z. Görgün, G.S. Hotamisligil, Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes., *Science.* 313 (2006) 1137–1140. doi:10.1126/science.1128294.
- [233] C. Xiao, A. Giacca, G.F. Lewis, Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and β -cell dysfunction in humans, *Diabetes.* 60 (2011) 918–924. doi:10.2337/db10-1433.
- [234] M. Kars, L. Yang, M.F. Gregor, B.S. Mohammed, T.A. Pietka, B.N. Finck, B.W. Patterson, J.D. Horton, B. Mittendorfer, G.S. Hotamisligil, S. Klein, Tauroursodeoxycholic acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women, *Diabetes.* 59 (2010) 1899–1905. doi:10.2337/db10-0308.

- [235] T. Teodoro-Morrison, I. Schuiki, L. Zhang, D.D. Belsham, A. Volchuk, GRP78 overproduction in pancreatic beta cells protects against high-fat-diet-induced diabetes in mice, *Diabetologia*. 56 (2013) 1057–1067. doi:10.1007/s00125-013-2855-7.
- [236] P. Tsaytler, H.P. Harding, D. Ron, A. Bertolotti, Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis., *Science*. 332 (2011) 91–94. doi:10.1126/science.1201396.
- [237] J.M. Axten, S.P. Romeril, A. Shu, J. Ralph, J.R. Medina, Y. Feng, W.H.H. Li, S.W. Grant, D.A. Heerding, E. Minthorn, T. Mencken, N. Gaul, A. Goetz, T. Stanley, A.M. Hassell, R.T. Gampe, C. Atkins, R. Kumar, Discovery of GSK2656157: An optimized PERK inhibitor selected for preclinical development, *ACS Med. Chem. Lett.* 4 (2013) 964–968. doi:10.1021/ml400228e.
- [238] F. Engin, A. Yermalovich, T. Nguyen, S. Hummasti, W. Fu, D.L. Eizirik, D. Mathis, G.S. Hotamisligil, Restoration of the Unfolded Protein Response in Pancreatic β Cells Protects Mice Against Type 1 Diabetes, *Sci. Transl. Med.* 5 (2013) 211ra156–211ra156. doi:10.1126/scitranslmed.3006534.
- [239] S.W. Park, U. Ozcan, Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease, *Semin. Immunopathol.* 35 (2013) 351–373. doi:10.1007/s00281-013-0370-z.
- [240] S. Fu, L. Yang, P. Li, O. Hofmann, L. Dicker, W. Hide, X. Lin, S.M. Watkins, A.R. Ivanov, G.S. Hotamisligil, Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity, *Nature*. 473 (2011) 528–531. doi:10.1038/nature09968.
- [241] S.W. Park, Y. Zhou, J. Lee, J. Lee, U. Ozcan, Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 19320–5. doi:10.1073/pnas.1012044107.

-
-
- [242] Y. Ma, L.M. Hendershot, The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?, *Nat. Rev. Cancer*. 4 (2004) 966–977. doi:10.1038/nrc1505.
- [243] H. Urra, E. Dufey, T. Avril, E. Chevet, C. Hetz, Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer, *Trends in Cancer*. 2 (2016) 252–262. doi:10.1016/j.trecan.2016.03.007.
- [244] H.J. Clarke, J.E. Chambers, E. Liniker, S.J. Marciniak, Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy, *Cancer Cell*. 25 (2014) 563–573. doi:10.1016/j.ccr.2014.03.015.
- [245] J.D. Blais, V. Filipenko, M. Bi, H.P. Harding, D. Ron, C. Koumenis, B.G. Wouters, J.C. Bell, Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress., *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7469–82. doi:10.1128/MCB.24.17.7469-7482.2004.
- [246] B. Luo, A.S. Lee, The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies, *Oncogene*. 32 (2013) 1–14. doi:10.1038/onc.2012.130.
- [247] C. Jamora, G. Dennert, A.S. Lee, Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7690–4.
- [248] J.D. Blais, C.L. Addison, R. Edge, T. Falls, H. Zhao, K. Wary, C. Koumenis, H.P. Harding, D. Ron, M. Holcik, J.C. Bell, Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress., *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 9517–32. doi:10.1128/MCB.01145-06.
- [249] L. Romero-Ramirez, H. Cao, D. Nelson, E. Hammond, A.H. Lee, H. Yoshida, K. Mori, L.H. Glimcher, N.C. Denko, A.J. Giaccia, Q.T. Le, A.C. Koong, XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth, *Cancer Res.* 64 (2004) 5943–5947. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1606.

- [250] P.M. Voorhees, R.Z. Orlowski, The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46 (2006) 189–213. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141300.
- [251] S.V. Rajkumar, P.G. Richardson, T. Hideshima, K.C. Anderson, Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 630–639. doi:10.1200/JCO.2005.11.030.
- [252] I. Papandreou, N.C. Denko, M. Olson, H. Van Melckebeke, S. Lust, A. Tam, D.E. Solow-Cordero, D.M. Bouley, F. Offner, M. Niwa, A.C. Koong, Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma, *Blood.* 117 (2011) 1311–1314. doi:10.1182/blood-2010-08-303099.
- [253] D. Hanahan, L.M. Coussens, Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment., *Cancer Cell.* 21 (2012) 309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- [254] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [255] A. Östman, M. Augsten, Cancer-associated fibroblasts and tumor growth - bystanders turning into key players, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19 (2009) 67–73. doi:10.1016/j.gde.2009.01.003.
- [256] C.E. Lewis, J.W. Pollard, Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments, *Cancer Res.* 66 (2006) 605–612. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.
- [257] B. Dirat, L. Bochet, G. Escourrou, P. Valet, C. Muller, Unraveling the Obesity and Breast Cancer Links: A Role for Cancer-Associated Adipocytes?, in: *Adipose Tissue Dev.*, KARGER, Basel, 2010: pp. 45–52. doi:10.1159/000316896.
- [258] A.M. Santander, O. Lopez-Ocejo, O. Casas, T. Agostini, L. Sanchez, E.

-
-
- Lamas-Basulto, R. Carrio, M.P. Cleary, R.R. Gonzalez-Perez, M. Torroella-Kouri, Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue, *Cancers (Basel)*. 7 (2015) 143–178. doi:10.3390/cancers7010143.
- [259] J.C. Carter, F.C. Church, Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility, *Exp. Mol. Pathol.* 92 (2012) 312–317. doi:10.1016/j.yexmp.2012.03.005.
- [260] B. Dirat, L. Bochet, M. Dabek, D. Daviaud, S. Dauvillier, B. Majed, Y.Y. Wang, A. Meulle, B. Salles, S. Le Gonidec, I. Garrido, G. Escourrou, P. Valet, C. Muller, Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion, *Cancer Res.* 71 (2011) 2455–2465. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3323.
- [261] L.A. Sturtz, B. Deyarmin, R. van Laar, W. Yarina, C.D. Shriver, R.E. Ellsworth, Gene expression differences in adipose tissue associated with breast tumorigenesis., *Adipocyte*. 3 (2014) 107–14. doi:10.4161/adip.28250.
- [262] J. Park, T.S. Morley, M. Kim, D.J. Clegg, P.E. Scherer, Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence., *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 455–65. doi:10.1038/nrendo.2014.94.
- [263] K.M. Nieman, H.A. Kenny, C. V Penicka, A. Ladanyi, R. Buell-Gutbrod, M.R. Zillhardt, I.L. Romero, M.S. Carey, G.B. Mills, G.S. Hotamisligil, S.D. Yamada, M.E. Peter, K. Gwin, E. Lengyel, Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth., *Nat. Med.* 17 (2011) 1498–503. doi:10.1038/nm.2492.
- [264] D. Housa, J. Housová, Z. Vernerová, M. Haluzík, Adipocytokines and cancer, *Physiol. Res.* 55 (2006) 233–244.
- [265] S.D. Hursting, J. DiGiovanni, A.J. Dannenberg, M. Azrad, D. LeRoith, W. Demark-Wahnefried, M. Kakarala, A. Brodie, N.A. Berger, Obesity, energy

- balance, and cancer: New opportunities for prevention, *Cancer Prev. Res.* 5 (2012) 1260–1272. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-12-0140.
- [266] L. Vona-Davis, D.P. Rose, Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression, *Endocr. Relat. Cancer.* 14 (2007) 189–206. doi:10.1677/ERC-06-0068.
- [267] S. Khan, S. Shukla, S. Sinha, S.M. Meeran, Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets, *Cytokine Growth Factor Rev.* 24 (2013) 503–513. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.10.001.
- [268] M.K. Herroon, E. Rajagurubandara, A.L. Hardaway, K. Powell, A. Turchick, D. Feldmann, I. Podgorski, Bone marrow adipocytes promote tumor growth in bone via FABP4-dependent mechanisms., *Oncotarget.* 4 (2013) 2108–23. doi:10.18632/oncotarget.1482.
- [269] H. Uehara, T. Takahashi, M. Oha, H. Ogawa, K. Izumi, Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression, *Int. J. Cancer.* 135 (2014) 2558–2568. doi:10.1002/ijc.28903.
- [270] S.L. Tucker, K. Gharpure, S.M. Herbrich, A.K. Unruh, A.M. Nick, E.K. Crane, R.L. Coleman, J. Guenthoer, H.J. Dalton, S.Y. Wu, R. Rupaimoole, G. Lopez-berestein, B. Ozpolat, C. Ivan, W. Hu, K.A. Baggerly, A.K. Sood, Molecular Biomarkers of Residual Disease after Surgical Debulking of High-Grade Serous Ovarian Cancer, *Clin Cancer Res.* 20 (2014) 3280–3289. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0445.
- [271] G. Boiteux, I. Lascombe, E. Roche, M.L. Plissonnier, A. Clairotte, H. Bittard, S. Fauconnet, A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells, *Int. J. Cancer.* 124 (2009) 1820–1828. doi:10.1002/ijc.24112.
- [272] Z. Tang, Q. Shen, H. Xie, X. Zhou, J. Li, J. Feng, H. Liu, W. Wang, S. Zhang, S. Ni, Elevated expression of FABP3 and FABP4 cooperatively correlates

-
-
- with poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC)., *Oncotarget*. 7 (2016) 46253–62. doi:10.18632/oncotarget.10086.
- [273] O. Gorbenko, G. Panayotou, A. Zhyvoloup, D. Volkova, I. Gout, V. Filonenko, Identification of novel PTEN-binding partners: PTEN interaction with fatty acid binding protein FABP4, *Mol. Cell. Biochem.* 337 (2010) 299–305. doi:10.1007/s11010-009-0312-1.
- [274] M.L. Sulis, R. Parsons, PTEN: From pathology to biology, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 478–483. doi:10.1016/S0962-8924(03)00175-2.
- [275] M. Tsuda, T. Inoue-Narita, A. Suzuki, S. Itami, M. Blumenberg, M. Manabe, Induction of gene encoding FABP4 in Pten-null keratinocytes, *FEBS Lett.* 583 (2009) 1319–1322. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.030.
- [276] Y. Horie, A. Suzuki, E. Kataoka, T. Sasaki, K. Hamada, J. Sasaki, K. Mizuno, G. Hasegawa, H. Kishimoto, M. Iizuka, M. Naito, K. Enomoto, S. Watanabe, T.W. Mak, T. Nakano, Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1774–1783. doi:10.1172/JCI200420513.
- [277] S. Kim, Y. Lee, J.S. Koo, Differential expression of lipid metabolism-related proteins in different breast cancer subtypes, *PLoS One*. 10 (2015) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0119473.
- [278] W. Wang, P. Yuan, D. Yu, F. Du, A. Zhu, Q. Li, P. Zhang, D. Lin, B. Xu, A single-nucleotide polymorphism in the 3'-UTR region of the adipocyte fatty acid binding protein 4 gene is associated with prognosis of triple-negative breast cancer, *Oncotarget*. 7 (2014). doi:10.18632/oncotarget.7920.
- [279] L. Zhou, Y. Zhao, X. Wang, S. Jiang, H. Li, Expression of fatty acid synthase and adipocyte fatty acid-binding protein and the relationship with the clinicopathological characteristics in human infiltrating ductal breast cancer., *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban.* 46 (2015) 228–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25924435>.

- [280] Y. Wu, D. Zhang, S. Kang, Physical activity and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective studies, *Breast Cancer Res. Treat.* 137 (2013) 869–882. doi:10.1007/s10549-012-2396-7.
- [281] G. Boden, Obesity and free fatty acids., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37 (2008) 635–46, viii–ix. doi:10.1016/j.ecl.2008.06.007.
- [282] J. Delarue, C. Magnan, Free fatty acids and insulin resistance, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 10 (2007) 142–148. doi:10.1097/MCO.0b013e328042ba90.
- [283] R.L.C. Hoo, I.P.C. Lee, M. Zhou, J.Y.L. Wong, X. Hui, A. Xu, K.S.L. Lam, Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice., *J. Hepatol.* 58 (2013) 358–364. doi:10.1016/j.jhep.2012.10.022.
- [284] S. Fu, S.M. Watkins, G.S. Hotamisligil, The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling., *Cell Metab.* 15 (2012) 623–34. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.007.
- [285] H. Urra, E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, C. Hetz, When ER stress reaches a dead end., *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (2013) 3507–17. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.
- [286] H. Lan, C.C. Cheng, T.J. Kowalski, L. Pang, L. Shan, C.-C. Chuang, J. Jackson, A. Rojas-Triana, L. Bober, L. Liu, J. Voigt, P. Orth, X. Yang, G.W. Shipps, J.A. Hedrick, Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity., *J. Lipid Res.* 52 (2011) 646–656. doi:10.1194/jlr.M012757.
- [287] R.G. Baker, M.S. Hayden, S. Ghosh, NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease, *Cell Metab.* 13 (2011) 11–22. doi:10.1016/j.cmet.2010.12.008.NF-.
- [288] M. Karin, The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16483–16486. doi:10.1098/rstb.1996.0008.

-
-
- [289] C.J. Green, K. Macrae, S. Fogarty, D.G. Hardie, K. Sakamoto, H.S. Hundal, Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor κ B signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase., *Biochem. J.* 435 (2011) 463–474. doi:10.1042/BJ20101517.
- [290] C.J. Green, M. Pedersen, B.K. Pedersen, C. Scheele, Elevated NF-KB activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase, *Diabetes.* 60 (2011) 2810–2819. doi:10.2337/db11-0263.
- [291] S.L. Hwang, Y.T. Jeong, X. Li, Y.D. Kim, Y. Lu, Y.C. Chang, I.K. Lee, H.W. Chang, Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 69–81. doi:10.1111/bph.12124.
- [292] J. Jager, V. Corcelle, T. Grémeaux, K. Laurent, A. Waget, G. Pagès, B. Binétruy, Y. Le Marchand-Brustel, R. Burcelin, F. Bost, J.F. Tanti, Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity, *Diabetologia.* 54 (2011) 180–189. doi:10.1007/s00125-010-1944-0.
- [293] N. Barbarroja, R. López-Pedrerá, M.D. Mayas, E. García-Fuentes, L. Garrido-Sánchez, M. Macías-González, R. El Bekay, A. Vidal-Puig, F.J. Tinahones, The obese healthy paradox: is inflammation the answer?, *Biochem. J.* 430 (2010) 141–149. doi:10.1042/BJ20100285.
- [294] M. Cargnello, P.P. Roux, Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75 (2011) 50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10.
- [295] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene.* 26 (2007) 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- [296] E.R. Lee, J.Y. Kim, Y.J. Kang, J.Y. Ahn, J.H. Kim, B.W. Kim, H.Y. Choi, M.Y. Jeong, S.G. Cho, Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling

- pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763 (2006) 958–968. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.006.
- [297] C.Y. Koo, K.W. Muir, E.W.F. Lam, FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819 (2012) 28–37. doi:10.1016/j.bbagr.2011.09.004.
- [298] S. Balaban, L.S. Lee, M. Schreuder, A.J. Hoy, Obesity and cancer progression: is there a role of fatty acid metabolism?, *Biomed Res Int.* 2015 (2015) 274585. doi:10.1155/2015/274585.
- [299] M. del M. Blanquer-Rosselló, J. Oliver, J. Sastre-Serra, A. Valle, P. Roca, Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 72 (2016) 18–26. doi:10.1016/j.biocel.2016.01.002.
- [300] G.R. Ravacci, M.M. Brentani, T.C. Tortelli, R.S.M.M. Torrinhas, J.R. Santos, A.F. Logullo, D.L. Waitzberg, Docosahexaenoic Acid Modulates a HER2-Associated Lipogenic Phenotype, Induces Apoptosis, and Increases Trastuzumab Action in HER2-Overexpressing Breast Carcinoma Cells, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–13. doi:10.1155/2015/838652.
- [301] F. Zhang, Y. Chen, J. Long, L. Dong, Y. Wang, Y. Chen, Dietary fatty acids affect lipid metabolism and estrogen receptor expression in n-methyl-n-nitrosourea-induced rat mammary cancer model, *Clin. Lab.* 61 (2015) 389–395. doi:10.7754/Clin.Lab.2014.140901.
- [302] G. Pascual, A. Avgustinova, S. Mejetta, M. Martín, A. Castellanos, C.S. Attolini, A. Berenguer, N. Prats, A. Toll, J.A. Hueto, C. Bescós, L. Di Croce, S. Aznar Benitah, Targeting metastasis stem cells through the fatty acid receptor CD36, *Nature.* 1 (2016) 1–25. doi:10.1038/nature20791.