



# JOURNAL READING

C COLD EXPOSURE INDUCES AUTOPHAGY TO  
TE FATTY ACID OXIDATION, MITOCHONDRIAL  
ER, AND THERMOGENESIS IN BROWN ADIPOSE  
TISSUE (BAT)

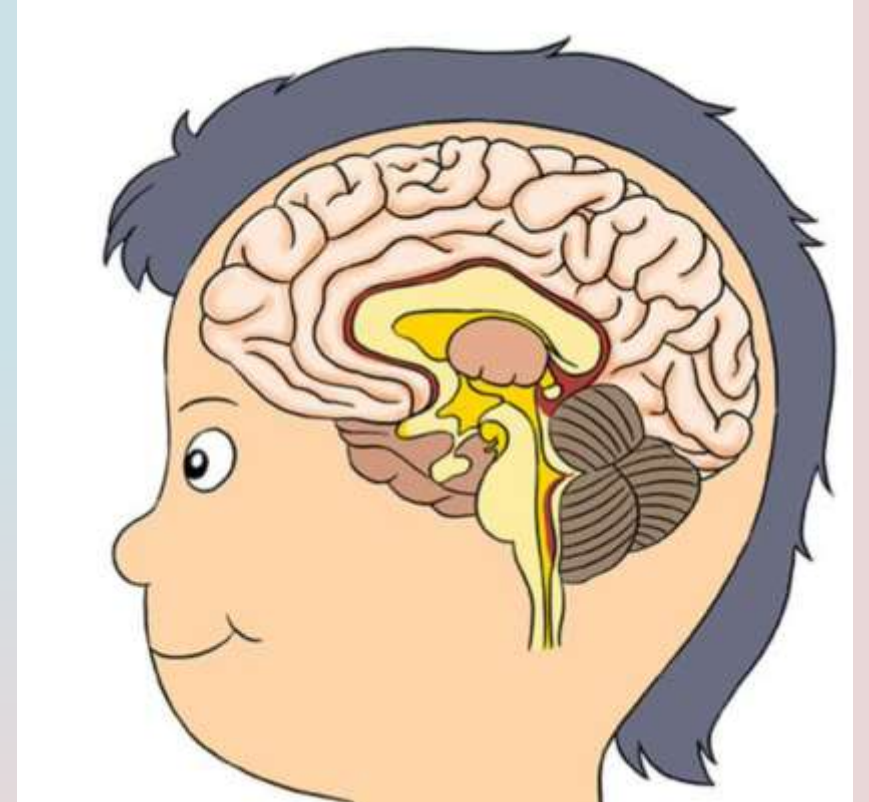
*Presented by:*  
*Fatma Ba'agil*

*Guided by:*  
*dr. Nurtakdir*

KEPANITERAAN KLINIK RS DR. GUNAWAN MANGUNKUSUMO  
DEPARTEMEN ILMU PENYAKIT SARAF  
FAKULTAS KEDOKTERAN UPN VETERAN JAKARTA  
2023

# Introduction

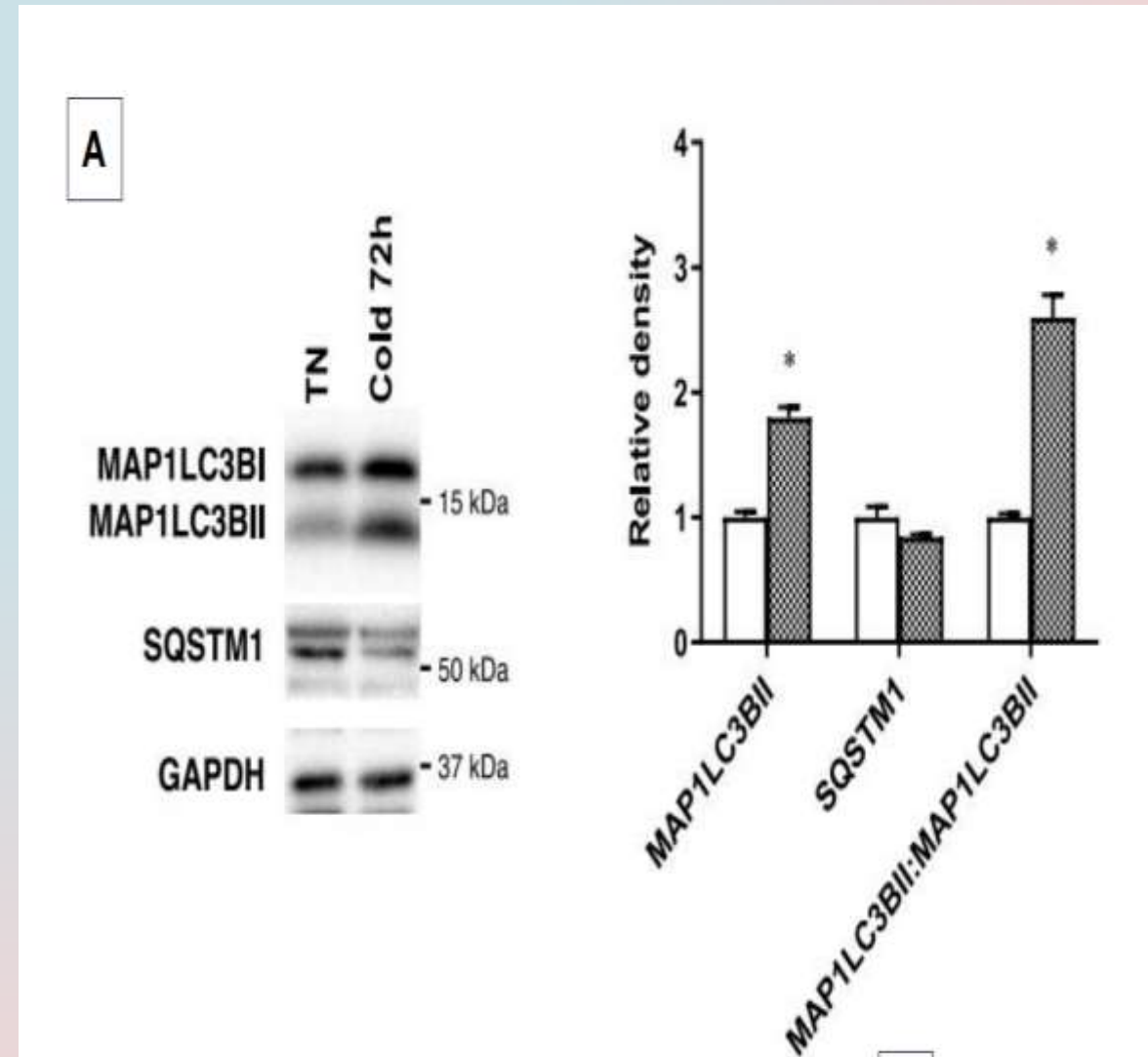
- Termogenesis adaptif adalah mekanisme bertahan hidup yang penting untuk homeoterm (pertahanan suhu terhadap lingkungan) yang terjadi kapan pun saat suhu sekitar turun di bawah termonetralitas (Silva, 2003).
- Brown Adipose Tissue (BAT) adalah jaringan untuk menghasilkan termogenesis adaptif (Lowell dan Spiegelman, 2000; Stock, 1989) dengan kapasitas oksidatif yang tinggi. Selama paparan dingin yang berkelanjutan, BAT mengalami remodeling untuk meningkatkan potensi kenaikan suhu tubuh.



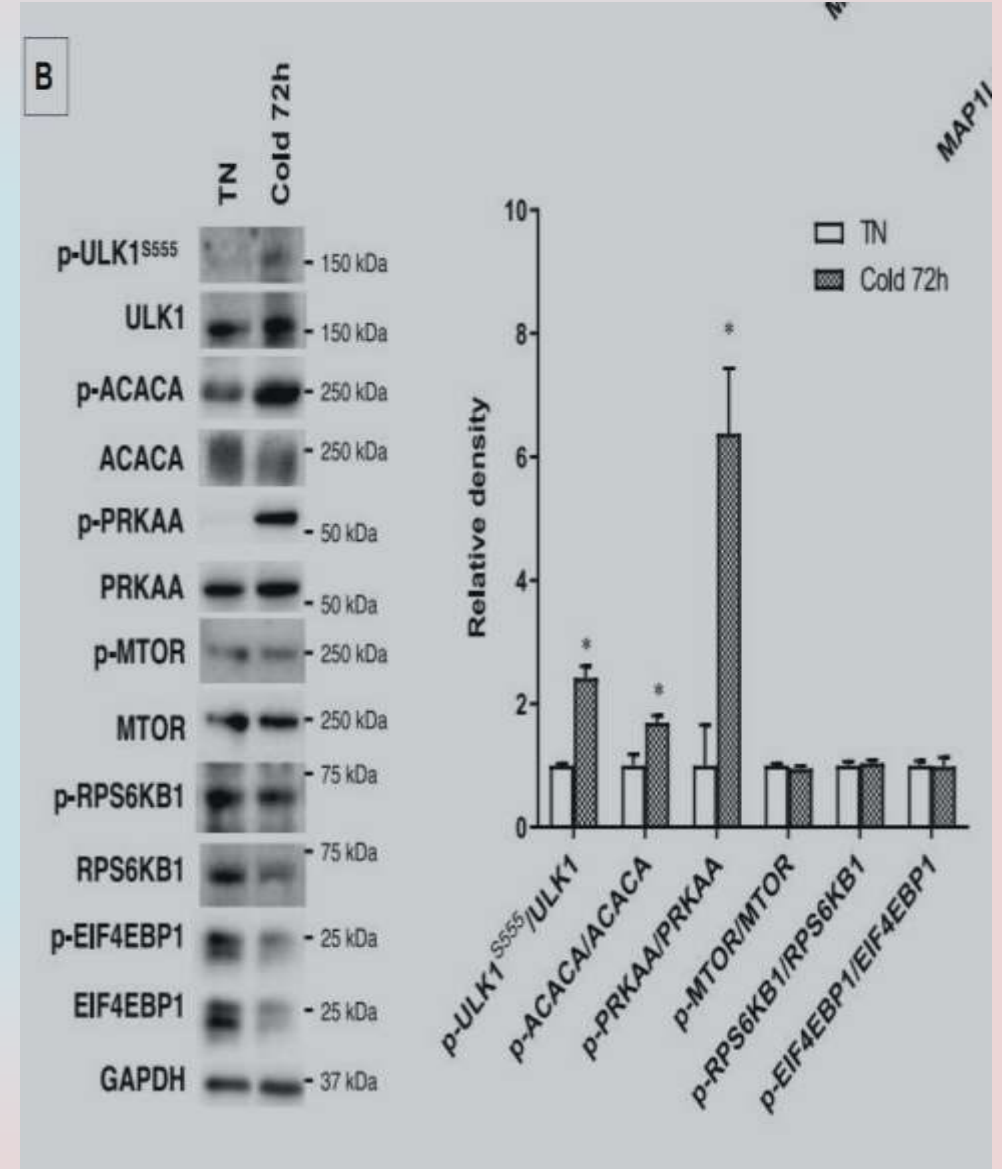
- Paparan dingin kronis menyebabkan peningkatan aktivitas mitokondria di BAT dengan induksi b-oksidasi asam lemak, aktivitas transpor elektron, dan ekspresi protein 1 (UCP1) uncoupling untuk menghasilkan panas ( Cannon dan Nedergaard, 2004; Blondin et al., 2014, 2017) . Namun, aktivitas mitokondria yang meningkat ini juga meningkatkan Reaktif oksigen spesies (ROS) (Barja De Quiroga et al., 1991; Buzadzic et al., 1999) yang dapat menyebabkan kerusakan mitokondria dan gangguan thermogenesis (Lettieri-Barbato, 2019).
- Untuk mencegah akumulasi kerusakan oksidatif, BAT memanfaatkan autophagy untuk menghilangkan dan mendaur ulang organel yang rusak seperti mitokondria (mitophagy).
- Peran autophagy dalam BAT selama paparan dingin tidak dipahami dengan baik karena terdapat hasil yang bertentangan dalam literatur (Martinez-Lopez et al., 2016) (Cairo et al., 2016; Lu et al., 2018).

# HASIL

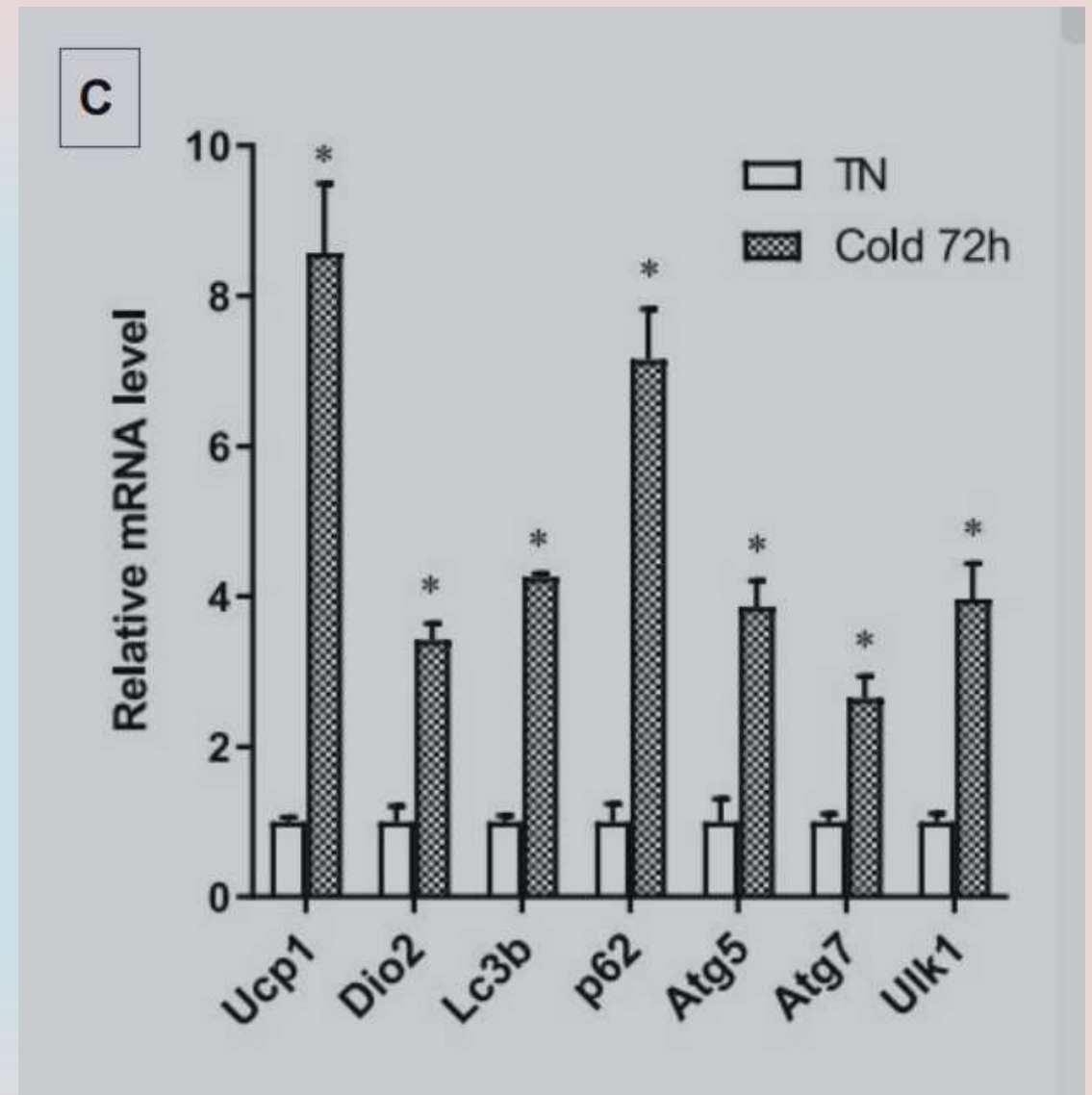
Untuk menguji efek paparan dingin pada autophagy di BAT, jurnal ini menampung mencit selama 72 jam dgn suhu termoneutral (TN) untuk tikus. Setelah 72 jam paparan dingin, terjadi peningkatan yang nyata pada MAP1LC3BII/protein terkait mikrotubulus 1 rantai ringan 3 beta II dan penurunan ekspresi protein SQSTM1 serta peningkatan konversi MAP1LC3BI menjadi MAP1LC3BII menunjukkan adanya peningkatan autophagy setelah paparan dingin kronis (Gambar 1A).

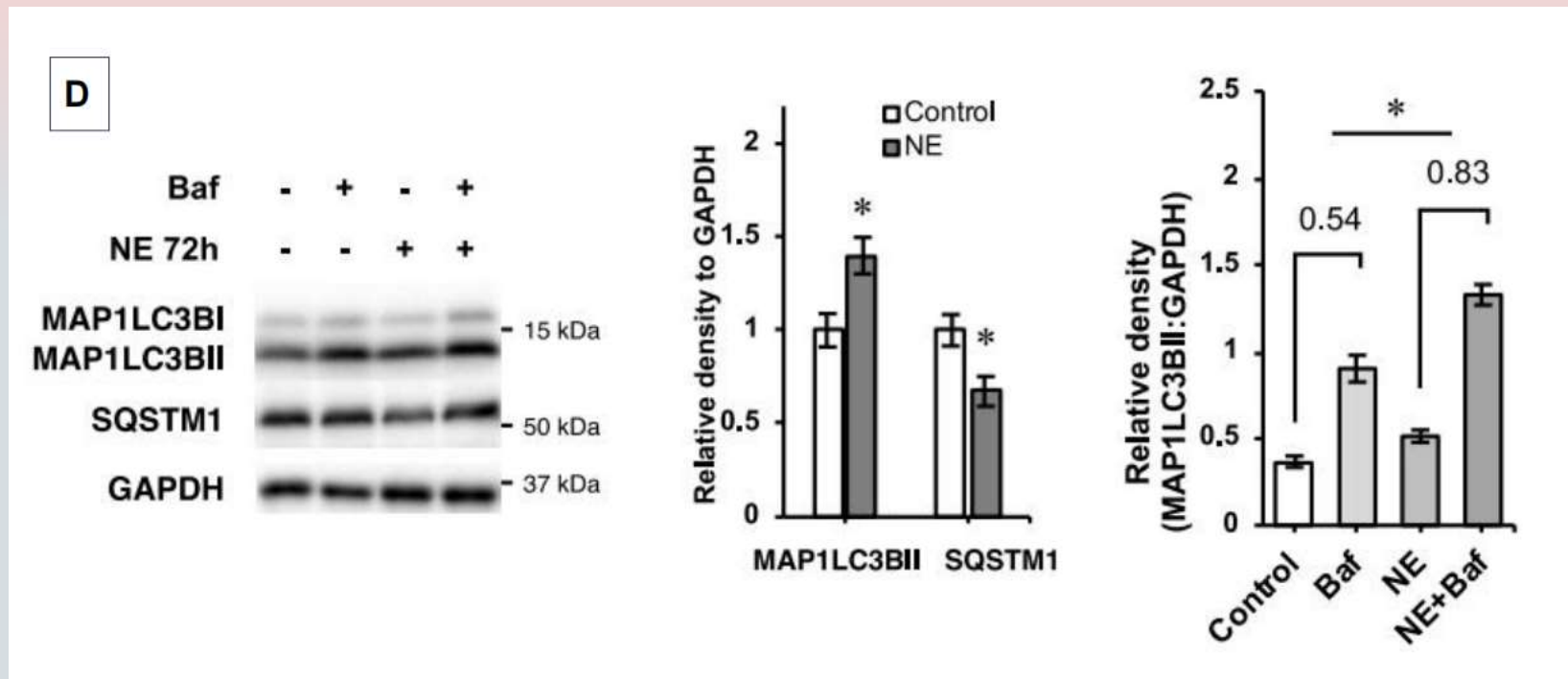


- Aktivasi PRKAA / AMPK merangsang autophagy dengan memfosforilasi protein inisiator autophagosome, Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK1) di serin 555 (S555). Sebaliknya, aktivasi MTOR menghambat autophagy. Kami mengamati peningkatan fosforilasi PRKAA, target hilirnya ACC, serta ULK1 di S555 tetapi tidak ada perubahan dalam fosforilasi MTOR atau target hilirnya RPS6KB1 dan EIF4EBP1, menunjukkan bahwa PRKAA mendorong peningkatan autophagy (Gambar 1B ).

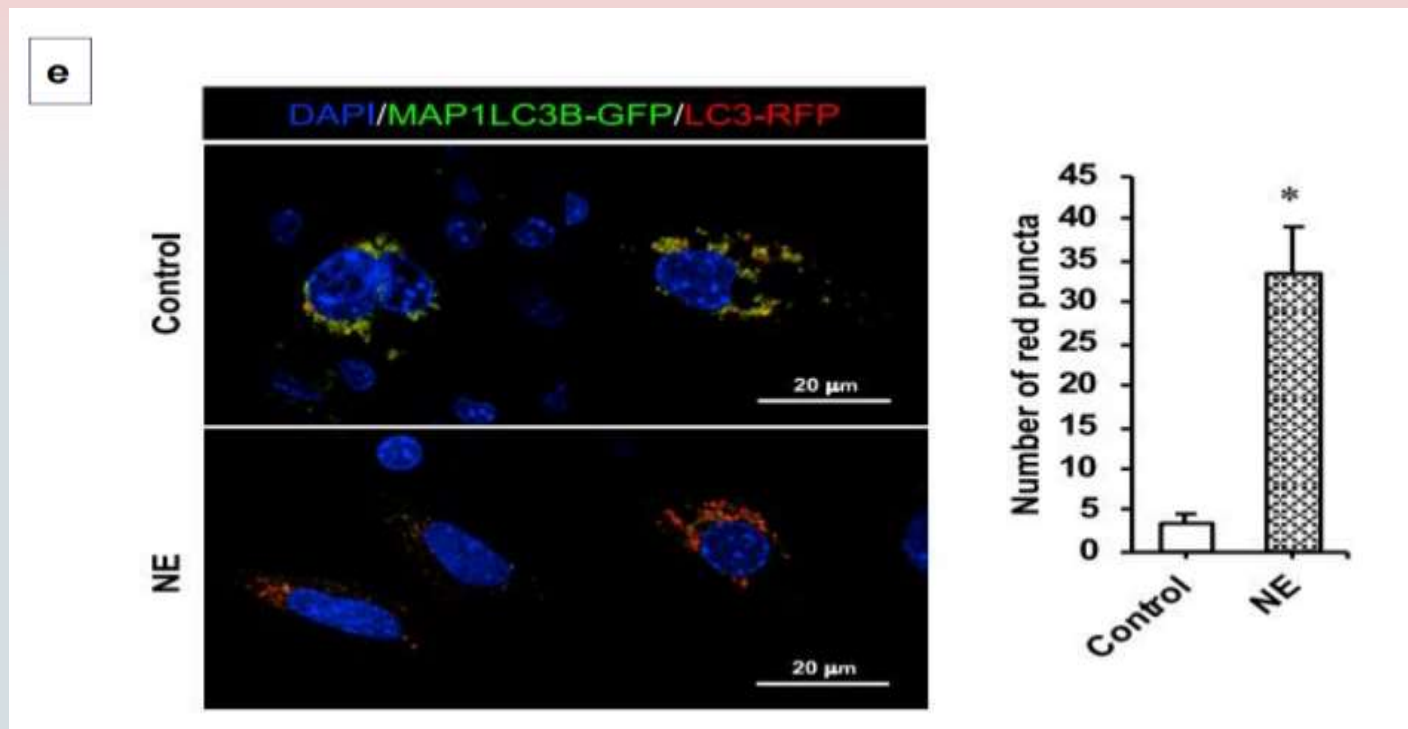


- Pada level transkripsi, terjadi induksi level mRNA Map1lc3b, Sqstm1, Atg5, Atg7, dan Ulk1 pada 72 jam yang menunjukkan bahwa peningkatan autophagy dikaitkan dengan peningkatan ekspresi gen autophagy pada 72 jam (Gambar 1C) . Konsisten dengan aktivasi BAT, level mRNA Ucp1 dan Dio2 juga diregulasi setelah 72 jam paparan dingin (Gambar 1C).



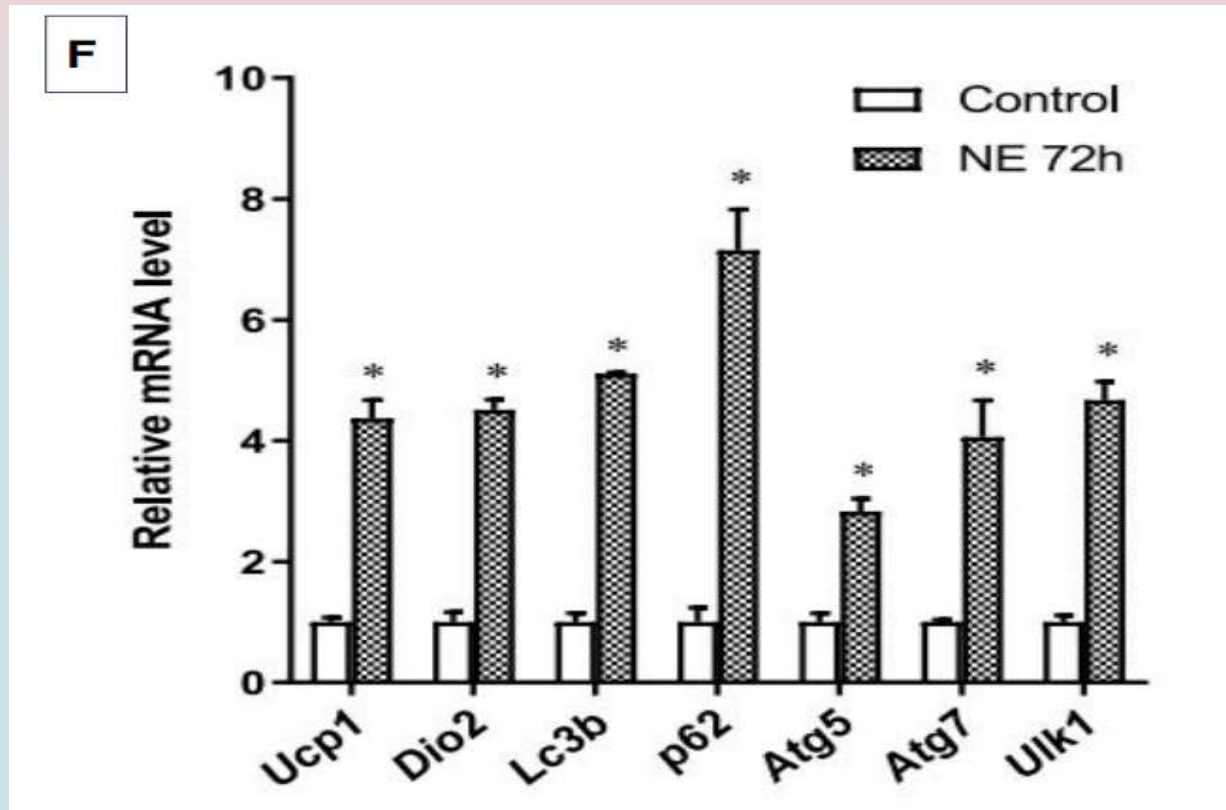


- **Pengobatan NE jangka panjang menginduksi autophagy pada BAT saat Paparan dingin**
- pengaktifkan pensinyalan adrenergik pada BAT untuk memulai thermogenesis (Silva, 2003). Kami selanjutnya memeriksa efek langsung stimulasi adrenergik pada autophagy BAT dengan treatment BAT menggunakan NE. Kami mengamati bahwa ketika sel diperlakukan dengan NE selama 72 jam, mereka menunjukkan peningkatan MAP1LC3BII dan penurunan ekspresi SQSTM1 yang konsisten dengan peningkatan fluks autophagy (Gambar 1D). Ketika kami menggunakan bafilomycin (Baf), untuk memblokir autophagy yang terlambat, ada peningkatan yang lebih besar dalam MAP1LC3BII setelah penambahan Baf dalam sel yang diobati dengan NE versus sel kontrol yang tidak diobati (0,83 versus 0,54), menunjukkan bahwa NE meningkatkan fluks autofagik (Gambar 1D) .



- Kami selanjutnya memeriksa fluks autofagik dengan mentransfeksi tandem fluorescent Map1lc3b (RFP-eGFP-MAP1LC3B) plasmid yang mengekspresikan MAP1LC3B dengan domain fluoresen hijau dan merah menjadi garis sel mBAP-9 tikus adiposit coklat. Sinyal hijau dan merah dipancarkan saat protein fusi berada dalam autofagosom. Namun, sinyal hijau padam dan hanya fluoresensi merah yang dipancarkan di lingkungan asam autolisosom yang menyatu. Dalam sel yang diinkubasi dengan NE selama 72 jam, terdapat peningkatan jumlah puncta merah yang menunjukkan mereka memiliki fluks autophagic yang lebih tinggi daripada sel kontrol (Gambar 1E).





- Mirip dengan pengamatan in vivo kami setelah paparan dingin, kami mengamati induksi ekspresi gen autophagy setelah 72 jam pengobatan NE pada adiposit coklat primer (Gambar 1F). Kami juga mendeteksi upregulasi ekspresi gen Ucp1 dan Dio2 setelah 72 jam pengobatan NE. Hasil ini sangat menyarankan bahwa autophagy diaktifkan setelah stimulasi BAT kronis.

# Paparan dingin kronis meningkatkan b-oksidasi asam lemak di BAT

- Untuk memeriksa aktivitas mitokondria di BAT setelah paparan dingin kronis, kami selanjutnya melakukan analisis intermediet asil karnitin dan asam trikarboksilat (TCA) di BAT dari tikus yang terpapar suhu dingin selama 72 jam.
- Dan hasilnya menunjukkan peningkatan b-oksidasi mitokondria.

# Paparan dingin kronis meningkatkan pergantian mitofag dan mitokondria di BAT

- Secara keseluruhan, temuan ini menunjukkan bahwa ada degradasi mitokondria dewasa oleh mitofagi dan sintesis mitokondria baru.
- Kami selanjutnya menguji efek dari peningkatan pergantian mitokondria ini pada respirasi mitokondria dengan oksimetri kuda laut dengan merawat adiposit coklat primer dengan NE selama 72 jam. Sel-sel ini menunjukkan tingkat konsumsi oksigen basal (OCR) yang secara signifikan lebih tinggi serta kapasitas pernapasan maksimum daripada sel yang tidak diobati. Konsisten dengan peningkatan aktivitas mitokondria, sel yang diobati dengan NE juga menunjukkan peningkatan jumlah protein mitokondria. Secara kolektif, temuan ini menunjukkan bahwa stimulasi b-adrenergik meningkatkan mitofag, jumlah mitokondria, dan pergantian mitokondria untuk merangsang respirasi mitokondria.

# DISKUSI

- Dalam penelitian ini, kami melaporkan bahwa termogenesis BAT sebagai respons terhadap paparan dingin kronis memerlukan autophagy. Temuan ini konsisten dengan laporan sebelumnya yang menunjukkan adanya peningkatan autophagy selama paparan dingin jangka panjang (Martinez-Lopez et al., 2016; Lu et al., 2018).
- Namun, ini kontras dengan laporan sebelumnya tentang penurunan autophagy di BAT setelah 24 jam paparan dingin (Cairo et al., 2016). Ada kemungkinan bahwa perbedaan ini mungkin disebabkan oleh efek temporal paparan dingin pada autophagy, dengan peningkatan autophagy selama paparan kronis yang disebabkan oleh induksi transkripsi gen autophagy yang kami mengamati setelah 72 jam paparan dingin. Temuan kami juga konsisten dengan penelitian kami sebelumnya yang menunjukkan bahwa T3 menginduksi autophagy pada BAT selama termogenesis teraktivasi pada suhu kamar (Yau et al., 2019). Diambil bersama dengan temuan kami, induksi autophagy tampaknya terjadi selama paparan dingin kronis dan stimulasi farmakologis BAT.

# DISKUSI

- Selain efeknya pada metabolisme lipid dan kontrol kualitas mitokondria selama stimulasi dingin kronis, autophagy juga mungkin memiliki efek pada proses seluler lainnya di BAT. Aklimasi dingin menginduksi hiperplasia BAT dengan proliferasi preadiposit dan sel endotel vaskular yang signifikan. Dalam hubungan ini, autophagy ditemukan untuk mengatur diferensiasi adiposit coklat dan angiogenesis.

# SUMMARY

- penelitian kami menunjukkan bahwa paparan dingin kronis dan / atau stimulasi NE menginduksi autophagy, b-oksidasi asam lemak, dan aktivitas mitokondria dalam BAT.
- Autophagy memainkan peran penting dalam menjaga integritas dan fungsi mitokondria yang diperlukan untuk thermogenesis selama paparan dingin kronis in vivo. Mitophagy diinduksi dalam BAT selama paparan dingin kronis, dan kehilangannya menyebabkan gangguan termogenesis in vivo dan penurunan respirasi pada adiposit coklat primer. Aktivitas BAT telah dikaitkan secara negatif dengan obesitas dan diabetes pada pria.
- Dengan demikian, hasil kami mendukung gagasan bahwa modulasi farmakologis autophagy dalam BAT untuk meniru efek termogenik yang diamati selama paparan dingin kronis dapat menjadi pendekatan potensial untuk meningkatkan aktivitas BAT untuk pengobatan penyakit metabolik seperti obesitas dan diabetes.

## REFERENCES

- Barja De Quiroga, G., Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Abelenda, M., Paz Nava, M., and Puerta, M.L. (1991). Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue. *Biochem. J.* 277 (Pt 1), 289–292.
- Bingol, B., and Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, parkin, USP30 and beyond. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 210–222.
- Blondin, D.P., Daoud, A., Taylor, T., Tingelstad, H.C., Bezaire, V., Richard, D., Carpentier, A.C., Taylor, A.W., Harper, M.E., Aguer, C., and Haman, F. (2017). Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *J. Physiol.* 595, 2099–2113.
- Blondin, D.P., Labbe, S.M., Tingelstad, H.C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guerin, B., Turcotte, E.E., Carpentier, A.C., Richard, D., and Haman, F. (2014). Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E438–E446.
- Bukowiecki, L.J., Geloan, A., and Collet, A.J. (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am. J. Physiol.* 250, C880–C887.
- Burman, J.L., Pickles, S., Wang, C., Sekine, S., Vargas, J.N.S., Zhang, Z., Youle, A.M., Nezich, C.L., Wu, X., Hammer, J.A., and Youle, R.J. (2017). Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J. Cell Biol.* 216, 3231–3247.
- Buzadzic, B., Korac, B., and Petrovic, V.M. (1999). The effect of adaptation to cold and re-adaptation to room temperature on the level of glutathione in rat tissues. *J. Therm. Biol.* 24, 373–377.
- Cairo, M., Villarroya, J., Cereijo, R., Campderros, L., Giralt, M., and Villarroya, F. (2016). Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue. *Int. J. Obes. (Lond)* 40, 1591–1599.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.
- Christoffolete, M.A., Linardi, C.C., De Jesus, L., Ebina, K.N., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Rabelo, R., Curcio, C., Martins, L., Kimura, E.T., and Bianco, A.C. (2004). Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* 53, 577–584.
- Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17, 143–149.
- Du, J., Teng, R.J., Guan, T., Eis, A., Kaul, S., Konduri, G.G., and Shi, Y. (2012). Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C383–C391.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Fu, X., Jin, L., Han, L., Yuan, Y., Mu, Q., Wang, H., Yang, J., Ning, G., Zhou, D., and Zhang, Z. (2019). miR-129-5p inhibits adipogenesis through autophagy and may be a potential biomarker for obesity. *Int. J. Endocrinol.* 2019, 5069578.
- Fukano, K., Okamatsu-Ogura, Y., Tsubota, A., Nio-Kobayashi, J., and Kimura, K. (2016). Cold exposure induces proliferation of mature Brown adipocyte in a ss3-adrenergic receptor-mediated pathway. *PLoS One* 11, e0166579.
- Gospodarska, E., Nowialis, P., and Kozak, L.P. (2015). Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 290, 8243–8255.
- Hassanpour, M., Rezabakhsh, A., Pezeshkian, M., Rahbarghazi, R., and Nouri, M. (2018). Distinct role of autophagy on angiogenesis: highlights on the effect of autophagy in endothelial lineage and progenitor cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 305.
- Herz, C.T., and Kiefer, F.W. (2019). Adipose tissue browning in mice and humans. *J. Endocrinol.* 241, R97–R109.
- Hinchey, E.C., Gruszczyn, A.V., Willows, R., Navaratnam, N., Hall, A.R., Bates, G., Bright, T.P., Krieg, T., Carling, D., and Murphy, M.P. (2018). Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J. Biol. Chem.* 293, 17208–17217.
- Jin, S.M., and Youle, R.J. (2012). PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 795–799.
- Kim, Y.C., and Guan, K.L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* 125, 25–32.
- Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol.* 88, 141–148.
- Laker, R.C., Xu, P., Ryall, K.A., Sujkowski, A., Kenwood, B.M., Chain, K.H., Zhang, M., Royal, M.A., Hoehn, K.L., Driscoll, M., et al. (2014). A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo. *J. Biol. Chem.* 289, 12005–12015.
- Lettieri-Barbato, D. (2019). Redox control of non-shivering thermogenesis. *Mol. Metab.* 25, 11–19.
- Lin, J.Z., Martagon, A.J., Cimini, S.L., Gonzalez, D.D., Tinkey, D.W., Biter, A., Baxter, J.D., Webb, P., Gustafsson, J.A., Hartig, S.M., and Phillips, K.J. (2015). Pharmacological activation of thyroid hormone receptors elicits a functional conversion of white to Brown fat. *Cell Rep.* 13, 1528–1537.
- Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652–660.

Lu, Y., Fujioka, H., Joshi, D., Li, Q., Sangwung, P., Hsieh, P., Zhu, J., Torio, J., Sweet, D., Wang, L., et al. (2018). Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge. *Sci. Rep.* 8, 8251.

Mao, K., and Klionsky, D.J. (2011). AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ. Res.* 108, 787–788.

Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Sahu, S., Coletto, L., Zong, H., Bastie, C.C., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Singh, R. (2013). Autophagy in Myf5+ progenitors regulates energy and glucose homeostasis through control of brown fat and skeletal muscle development. *EMBO Rep.* 14, 795–803.

Martinez-Lopez, N., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Athonvarangkul, D., Liebling, E., Merlo, P., Cecconi, F., Schwartz, G.J., and Singh, R. (2016). Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the Brown adipose tissue and liver. *Cell Metab.* 23, 113–127.

Meyer, C.W., Willershauser, M., Jastroch, M., Rourke, B.C., Fromme, T., Oelkrug, R., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R1396–R1406.

Murholm, M., Dixen, K., Qvortrup, K., Hansen, L.H., Amri, E.Z., Madsen, L., Barbatelli, G., Quistorff, B., and Hansen, J.B. (2009). Dynamic regulation of genes involved in mitochondrial DNA replication and transcription during mouse

brown fat cell differentiation and recruitment. *PLoS One* 4, e8458.

Rabinovitch, R.C., Samborska, B., Faubert, B., Ma, E.H., Gravel, S.P., Andrzejewski, S., Raissi, T.C., Pause, A., St-Pierre, J., and Jones, R.G. (2017). AMPK maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Rep.* 21, 1–9.

Shabalina, I.G., Hoeks, J., Kramarova, T.V., Schrauwen, P., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Cold tolerance of UCP1-ablated mice: a skeletal muscle mitochondria switch toward lipid oxidation with marked UCP3 up-regulation not associated with increased basal, fatty acid- or ROS-induced uncoupling or enhanced GDP effects. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 968–980.

Silva, J.E. (2003). The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann. Intern. Med.* 139, 205–213.

Stock, M.J. (1989). Thermogenesis and brown fat: relevance to human obesity. *Infusionstherapie* 16, 282–284.

Sukumaran, A., Choi, K., and Dasgupta, B. (2020). Insight on transcriptional regulation of the energy sensing AMPK and biosynthetic mTOR pathway genes. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 671.

Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zarskiy, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., et al. (2000). "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science* 290, 1585–1588.

Wei, H., Liu, L., and Chen, Q. (2015). Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2784–2790.

Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 27, 234–250.

Yau, W.W., Singh, B.K., Lesmana, R., Zhou, J., Sinha, R.A., Wong, K.A., Wu, Y., Bay, B.H., Sugii, S., Sun, L., and Yen, P.M. (2019). Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy* 15, 131–150.

Yoneshiro, T., Wang, Q., Tajima, K., Matsushita, M., Maki, H., Igarashi, K., Dai, Z., White, P.J., Mcgarrah, R.W., Ilkayeva, O.R., et al. (2019). BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature* 572, 614–619.

Yu, J., Zhang, S., Cui, L., Wang, W., Na, H., Zhu, X., Li, L., Xu, G., Yang, F., Christian, M., and Liu, P. (2015). Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 918–928.

Zhang, X., Wu, D., Wang, C., Luo, Y., Ding, X., Yang, X., Silva, F., Arenas, S., Weaver, J.M., Mandell, M., et al. (2020). Sustained activation of autophagy suppresses adipocyte maturation via a lipolysis-dependent mechanism. *Autophagy* 16, 1668–1682.