

DISS. ETH Nr. 19107

Molecular mechanisms of adipogenesis in obesity and the metabolic syndrome

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences
Dr. sc. ETH Zürich

presented by
Bettina Meissburger
Diplom-Biologin (t.o.), Universität Stuttgart

born May 19th 1981
Citizen of Germany

Accepted on recommendation of
Prof. Dr. Christian Wolfrum
Prof. Dr. Markus Stoffel
Prof. Dr. Christoph Meier

2010

Abstract

Adipose tissue is a key player in whole body metabolism and excess adipose tissue poses a major risk factor for the development of metabolic disorders such as type 2 diabetes. In response to nutritional overload, *de novo* adipocyte differentiation can serve as an adaptive mechanism by increasing the storage capacity of adipose tissue and maintaining normal adipocyte function. This in turn prevents systemic lipid overload, which is a major cause for insulin resistance.

This PhD thesis provides novel insights into the regulation of adipogenesis and its impact on glucose and lipid metabolism. Chapter 2 describes the transcription factor retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) as an important inhibitor of adipocyte differentiation through its direct target gene matrix-metalloproteinase 3 (MMP3). Evaluating ROR γ expression in human stromal-vascular fraction (SVF), which contains adipocyte precursor cells, shows that ROR γ is increased in obese compared to lean patients. Decreased expression of ROR γ in murine and human obese subjects is correlated with increased adipogenesis, smaller adipocytes and improved insulin sensitivity. Through its influence on adaptive adipose tissue plasticity ROR γ is an important regulator of lipid and glucose homeostasis in the state of obesity. Further studies will need to elucidate how MMP3 remodels the extracellular matrix of adipose tissue thereby regulating adipogenesis.

As described above, extracellular matrix reorganization has an important impact on adipocyte differentiation. Preadipocytes need to remodel their cell shape during adipogenesis and the matrix scaffold serves as an anchor for growth factors, thus regulating their availability. The process of matrix degradation is controlled by matrix-metalloproteinases (MMPs) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). Chapter 3 investigates the regulation of TIMP1 in obesity and its impact on adipocyte differentiation. TIMP1 is upregulated in obese mouse models and inhibits adipocyte formation. TIMP1 injections in mice in combination with a high fat diet challenge lead to increased adipocyte size, impaired glycemic control and increased systemic fatty acid overload compared to PBS injected control mice. Thus, TIMP1 promotes insulin resistance in the state of obesity. Future experiments will need to address how TIMP1

regulates the activity of MMPs and thereby influences the extracellular matrix in adipose tissue.

In addition to matrix regulation, body fat distribution plays a crucial role in the risk assessment of obesity-related metabolic complications. Reasons for this are functional differences in intra-abdominal adipose tissue compared to subcutaneous fat. Chapter 4 explores depot-specific differences in the adipogenic potential, which might contribute to dysregulated adipocyte function in visceral adipose tissue. We show that adipogenesis of murine subcutaneous SVF is enhanced compared to visceral SVF, which is reflected in a shift towards smaller adipocytes in subcutaneous adipose tissue. Experiments using conditioned media reveal that paracrine secreted factors from the SVF inhibit adipocyte differentiation; this effect is more pronounced in visceral compared to subcutaneous SVF. Applying a mass spectrometry approach and mRNA expression analysis, a set of secreted proteins, which are upregulated in visceral compared to subcutaneous SVF, has been identified. Functional analysis of these proteins in adipocyte differentiation have led to the identification of 7 novel secreted factors with a negative impact on adipogenesis, the majority of these proteins being associated with the extracellular matrix. Further studies will need to investigate their exact role in adipocyte differentiation. It will also be of interest to explore which cell population within the SVF is responsible for the secretion of these inhibitory factors and whether these factors are deregulated in adipose tissue in the state of obesity.

Taken together, this PhD thesis identifies several novel factors that control adipogenesis and have an impact on metabolic homeostasis. These factors are tightly linked to extracellular matrix organization, it will therefore be of interest for the future to study the influence of altered extracellular matrix structure on adipocyte differentiation in the progression of obesity.

Zusammenfassung

Das Fettgewebe hat einen großen Einfluss auf den Metabolismus des Körpers. Übergewicht ist daher ein Hauptrisikofaktor für metabolische Erkrankungen. Ein wichtiger adaptiver Mechanismus, der bei Übergewicht die Speicherkapazität des Fettgewebes erhöht und dadurch normale Adipozytenfunktion erhält, ist die Neubildung von Adipozyten durch Differenzierung. Dieser Vorgang verhindert eine Akkumulierung von Lipiden außerhalb des Fettgewebes, welches eine Hauptursache für das Entstehen von Insulinresistenz darstellt.

Diese Doktorarbeit liefert neue Erkenntnisse über die Regulierung der Adipozytendifferenzierung und deren Einfluss auf den Zucker- und Lipid-Metabolismus. Kapitel 2 erörtert, wie Retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) die Expression von Matrix-metalloproteinase 3 (MMP3) kontrolliert und dadurch die Adipogenese inhibiert. Expressionsanalysen in der Stromafraktion (SVF), die Adipozyten-Vorläuferzellen enthält, ergaben, dass ROR γ bei dickleibigen Patienten hochreguliert ist. Verminderte Expression von ROR γ in murinem und humanem Fett bei Dickleibigkeit korreliert mit erhöhter Adipozytendifferenzierung, kleineren Adipozyten und verbesserter Insulinsensitivität. Durch seinen Einfluss auf die Plastizität des Fettgewebes ist ROR γ daher ein Faktor, der die Lipid- und Glucose-Homeostase bei Übergewicht beeinflusst. Die Rolle von MMP3 in extrazellulärer Matrix-Reorganisation und wie sich dies auf die Adipozytendifferenzierung auswirkt, wird für die Zukunft Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Wie vorangehend beschrieben ist die dynamische Veränderung der extrazellulären Matrix ein wichtiger Bestandteil der Adipozytendifferenzierung. Preadipozyten müssen während der Differenzierung ihre Zellstruktur verändern und darüber hinaus dient die extrazelluläre Matrix als Anker für Wachstumsfaktoren, die den Differenzierungsprozess beeinflussen. Die Remodellierung der extrazellulären Matrix wird durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) bewerkstelligt. Kapitel 3 untersucht die Regulation von TIMP1 in Adipositas und dessen Einfluss auf die Adipozytendifferenzierung. TIMP1 ist hochreguliert in dickleibigen Mausmodellen und inhibiert die Adipogenese. Injektionen von TIMP1 in Kombination mit einer

Hochfett-Diät führt zu vergrößerten Adipozyten, verschlechterter Kontrolle des Blutzuckers und erhöhten Blutfettwerten verglichen mit Kontrollmäusen. Dadurch begünstigt TIMP1 Insulinresistenz bei Übergewicht. Weitere Experimente werden die Rolle von TIMP1 in der Regulation der MMP-Aktivität, und wie sich dies auf die Matrix des Fettgewebes auswirkt, untersuchen.

Neben Matrixregulation spielt auch die Verteilung von Fettgewebe im Körper eine wichtige Rolle für die Ausbildung von metabolischen Komplikationen. Funktionale Unterschiede in intra-abdominalem und subkutanem Fettgewebe sind der Grund dafür. Kapitel 4 vergleicht das Differenzierungspotential verschiedener Fettdepots. Die Adipogenese in subkutaner SVF ist signifikant erhöht im Vergleich zu viszeraler SVF, was sich in kleineren Adipozyten im subkutanen Fettgewebe widerspiegelt. Experimente mit konditioniertem Überstand zeigen, dass parakrine Faktoren, sekretiert von der Stromafraktion, die Adipozytendifferenzierung inhibieren; dieser Effekt ist ausgeprägter in der viszeralen verglichen mit der subcutanen SVF. Mittels massenspektrometrischer und mRNA-Expressionsanalysen wurden Proteine ermittelt, die von der Stromafraktion sekretiert werden und in visceraler SVF hochreguliert sind. Eine funktionelle Analyse dieser Proteine führte zur Identifikation von sieben neuen, sekretierten Faktoren, die die Adipogenese unterdrücken. Die Mehrheit dieser identifizierten Proteine ist mit der extrazellulären Matrix assoziiert. Deren exakte Rolle im Differenzierungsprozess wird Gegenstand weiterer Studien sein. Darüber hinaus wird es von Interesse sein zu untersuchen, welche Zellpopulationen in der Stromafraktion diese Proteine sekretieren und ob diese Proteine in Zusammenhang mit Übergewicht dereguliert sind.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit mehrere neue Faktoren, die die Adipogenese beeinflussen und dadurch einen Einfluss auf den Metabolismus haben. All diese Faktoren hängen eng mit extrazellulärer Matrixorganisation zusammen. Für die Zukunft wird es daher von Bedeutung sein zu untersuchen, wie eine veränderte extrazelluläre Matrixstruktur im Fett bei Übergewicht die Adipozytendifferenzierung beeinflusst.