



Doctoral Thesis

## Role of aldosterone in energy balance

**Author(s):**

Liao, Wan-Hui

**Publication Date:**

2017

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000171968> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 24222

# **Role of aldosterone in energy balance**

A thesis submitted to attain the degree of DOCTOR OF SCIENCES  
of ETH ZURICH (Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Wan-Hui Liao

M.D., Poznan University of Medical Sciences

Born November 21, 1982

Taiwan

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Dr. Stephen C. Woods, co-examiner

Prof. Dr. Maciej Henneberg, co-examiner

2017

## SUMMARY

Aldosterone serves as a chief regulator of body sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), fluid and blood pressure levels and controls renal acid excretion. By acting on the epithelia of nephron and colon, aldosterone enhances  $\text{K}^+$  excretion and retains  $\text{Na}^+$  and water, which in turn elevates blood pressure. An increased level of plasma aldosterone is closely associated with obesity and supposedly involved in the pathogenesis of obesity-related hypertension and progressions of cardiovascular diseases. Weight loss in obesity not only improves blood pressure control and cardiovascular fitness, but also reduces aldosterone levels. Aldosterone could therefore be a critical mediator for obesity-related cardiovascular diseases. It might also be involved in the regulation of energy balance. The focus of this work is to understand how aldosterone regulates energy balance in physiological condition and in high-fat diet (HFD)-induced obesity. We used aldosterone synthase (key enzyme in aldosterone biosynthesis) knockout (ASKO) mice as an experimental model. The results of this study may also aid in the interpretation of the effects of aldosterone synthase inhibitors, a new class of cardiovascular drugs, on body weight (BW) in obese people.

ASKO mice maintained on chow diets (CD) at 22°C displayed growth retardation with lower BW (Male: ASKO vs WT =  $23.1 \pm 1.4$  vs  $28.7 \pm 1.7$  g; Female: ASKO vs WT =  $18.3 \pm 1.3$  vs  $22.5 \pm 2.0$  g), proportionally reduced weights of most organs and lengths of intestine measured at the time of transitioning into adulthood (2.5 months old). In adulthood, the BW of ASKO mice was as stable as that of WT mice, indicating that at this stage ASKO mice stayed in energy balance. Gross nutrient loss assessed by measuring fecal energy content with bomb calorimeter showed no difference between genotypes, suggesting that aldosterone deficiency does not alter intestinal macronutrient absorption. At the age of 5 months, however, ASKO mice had greater food intake and energy expenditure (EE) than WT mice and were hyperventilating, as suggested by a respiratory exchange ratio (RER) above 1 during the late 80% of the dark and the early light phases. Excessive acid accumulation in the body presumably triggered the hyperventilation in ASKO mice. The processing of nutrients and increased cellular metabolism during the active (dark) phase generates large amounts of endogenous acids, such as carbonic

and lactic acids. With a reduced renal capacity to eliminate acids due to aldosterone deficiency, ASKO mice rely on respiratory compensation, exhaling more CO<sub>2</sub> relative to their O<sub>2</sub> consumption, to restore acid-base balance. In addition, hyperventilation in ASKO mice overlapped with the period of increased EE. As the energy cost of breathing increases exponentially with enhanced ventilation, we assume hyperventilation accounts for the extra energy expense in ASKO mice at 22°C. In support of this assumption, the EE difference between dark and light phase was greater in ASKO mice than in WT mice (129.68 in ASKO vs 81.67 units in WT, mice, respectively). To examine the role of hyperventilation in ASKO mice in the EE difference between genotypes at 22°C, we increased the housing temperature to thermoneutrality. The usual housing temperature of 22°C is a mild cold stress for mice that worsens acidosis and, thus, enhances hyperventilation by increasing the metabolic rate (CO<sub>2</sub> production) and lactic acid production from increased anaerobic glycolysis as a result of peripheral vasoconstriction and from brown adipose tissue (BAT) activation. Increasing the housing temperature to 30°C attenuated the hyperventilation in ASKO mice. Their RER during the late 80% dark phase was reduced from 1.024 ± 0.002 to 1.017 ± 0.002 and was kept below 1 throughout the light phase. These changes were paralleled by a greater reduction in EE in ASKO mice than in WT mice in both dark (delta in ASKO - 307.28, in WT - 215.47 units) and light phases (delta in ASKO - 334.55, in WT - 233.79 units) to the extent that the EE difference between genotypes (observed at 22°C) disappeared. These results led us to conclude that aldosterone under normal physiological conditions increases the body's energetic efficiency. In situations of increased physiological and metabolic demands and thus enhanced endogenous acid production, such as during chronic cold exposure, aldosterone deficiency demands extra energy expenses to restore acid-base balance and, hence, burdens normal physiology.

Interestingly, chronic HFD feeding increased BW gain and visceral adiposity more in ASKO mice than in WT mice starting from week seven. As daily food intake was similar in both genotypes and aldosterone deficiency was unlikely to enhance intestinal nutrient absorption, we suspected a higher metabolic efficiency in HFD-fed ASKO mice. Insulin, with its powerful anabolic and anti-catabolic effects, increased more in ASKO mice than in WT mice. HFD-fed ASKO mice had nearly five times higher plasma insulin levels than HFD-fed WT mice, suggesting

that aldosterone deficiency increases metabolic efficiency by enhancing HFD-induced hyperinsulinemia. As adipose tissue is one of the main target tissues for insulin to regulate nutrient metabolism and energy turnover, we performed gene expression analysis focusing on adipose metabolism in visceral adipose tissue (VAT). Unlike VAT of WT mice, VAT of ASKO mice showed blunted responses to HFD-induced thermogenic reprogramming with lower mRNA levels of uncoupling protein-1 (UCP1), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC1 $\alpha$ ), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta (PGC1 $\beta$ ). Adipocytes in VAT of HFD-fed ASKO mice were also more hypertrophic and had a reduced level of the active form of hormone sensitive lipase (HSL), the rate-limiting enzyme of lipolysis, when compared to those in VAT of HFD-fed WT mice. Probably due to a reduced lipolytic activity of VAT, HFD-fed ASKO mice had lower plasma non-esterified free fatty acid (NEFA) levels and a trend towards decreased liver triglyceride (TG) contents. As sympathetic stimulation of beta-3 adrenergic receptor ( $\beta$ 3-AR) signaling in adipose tissue is the key mediator of HFD-induced thermogenic reprogramming and lipolysis, those changes in ASKO mice might be due to a lack of sympathetic activation. We therefore assayed tissue contents of tyrosine hydroxylase, an indirect measure of sympathetic innervation, and found that VAT of HFD-fed ASKO mice did not have a reduced sympathetic input. On the other hand, overnight fasting decreased plasma insulin of HFD-fed WT and ASKO mice to a similarly low level and led to a quantitatively similar increase in thermogenic gene expression and liver TG contents. This indicates that insulin might play a main role in shutting down lipolysis and thermogenic reprogramming in HFD-fed ASKO mice. Using in vitro cell cultures - differentiated 3T3-F442 adipocytes and human adipocytes - we further found that aldosterone attenuated the suppressing effects of insulin and potentiated the activating effects of the norepinephrine analog isoproterenol on thermogenic gene expression and lipolysis. To assess the role of aldosterone in potentiating  $\beta$ 3-AR-mediated thermogenic and lipolytic effects on VAT in vivo, we injected CL316243, a selective  $\beta$ 3-AR agonist in CD-fed mice that do not have a difference in plasma insulin levels in the non-fasting state. As WT mice showed a greater increase in plasma NEFAs and VAT thermogenic gene expression, we concluded that aldosterone in vivo potentiates  $\beta$ 3-AR-mediated thermogenic and lipolytic effects on VAT. Moreover, we found that chronic HFD feeding increased the

transcriptional level of aldosterone synthase in VAT of WT mice. Together these data led us to postulate that adipocyte-derived aldosterone is involved in modulating lipolytic and thermogenic activities in VAT of HFD-fed mice. Activation of thermogenesis in adipose tissue reduces the coupling of respiratory oxidative phosphorylation to ATP production and accelerates temperature-dependent biochemical reactions, thus increasing the energy loss from energy transformation and from futile cycles. From these data, we concluded that aldosterone in chronic HFD-feeding promotes a negative energy balance by attenuating HFD-induced hyperinsulinemia and sensitizing adipocytes to norepinephrine-stimulated catabolism. It also reduced the inhibitory effects of insulin on thermogenic gene expression.

In sum, under normal physiological conditions aldosterone enhances energetic efficiency, whereas in HFD-induced obesity, it promotes a negative energy balance.

## ZUSAMMENFASSUNG

Aldosteron reguliert im Wesentlichen die Natrium- ( $\text{Na}^+$ ) und Kaliumkonzentration ( $\text{K}^+$ ) im Körper und ist somit massgeblich an der Regulation des Wasserhaushalts sowie des Blutdrucks beteiligt. Darüber hinaus kontrolliert Aldosteron die renale Ausscheidung von Säuren und beeinflusst somit ebenfalls den Säure-Basen Haushalt. Die Wirkung von Aldosteron auf das Epithel in Niere und Darm führt zu einer verstärkten  $\text{Na}^+$ -Rückresorption und  $\text{K}^+$ -Exkretion und somit zur Erhöhung des Blutdrucks. Erhöhte Aldosteron-Plasmaspiegel sind mit Fettleibigkeit assoziiert und stehen möglicherweise mit der Entstehung von Bluthochdruck und dessen Einfluss auf die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Zusammenhang. So ist bekannt, dass eine Gewichtsabnahme bei Fettleibigen nicht nur zu einer Erniedrigung der Blutdruckwerte und damit einhergehenden verminderten Herzmuskelbelastung führt, sondern ebenfalls mit verminderten Aldosteron-Plasmaspiegeln assoziiert ist. Basierend auf dieser Beobachtung wird vermutet, dass Aldosteron an der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei stark übergewichtigen Patienten massgeblich beteiligt ist. Darüber hinaus wird vermutet, dass Aldosteron ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation des Energiestoffwechsels hat. In diesem Zusammenhang soll in dieser Arbeit die Rolle von Aldosteron in der Regulation des Energiestoffwechsels sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter Bedingungen von Hoch-Fett Diät (HFD)-induzierter Fettleibigkeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Aldosteron-Synthase knock-out Mausmodell (ASKO) bezüglich verschiedener physiologischer Parameter charakterisiert. Die Aldosteron-Synthase ist das Schrittmacher-Enzym in der Aldosteron-Synthese. Darüber hinaus soll diese Arbeit helfen, die Wirkung von Aldosteron Synthase-Inhibitoren, einer neuen Wirkstoffklasse gegen Bluthochdruck, auf das Körpergewicht neu zu interpretieren.

Bei Eintritt in die Adoleszenz (2.5 Monate) weisen ASKO-Mäuse auf Chow-Diät bei 22°C Umgebungstemperatur sowohl eine Wachstumsretardierung als auch eine geringere Körpermasse als Wildtyp (WT) Mäuse auf (Männchen: ASKO vs. WT =  $23.1 \pm 1.4$  vs.  $28.7 \pm 1.7$  g; Weibchen: ASKO vs. WT =  $18.3 \pm 1.3$  vs.  $22.5 \pm 2.0$  g), die mit proportional verringerten Organengewichten und einer verkürzten Gesamtdarmlänge einhergeht. Im Erwachsenenalter normalisieren sich jedoch die Gewichtsunterschiede zwischen den

Gruppen, welches auf einen Ausgleich der Energiebilanz hindeutet. Messungen des Energiegehalts im Fäzes mittels Bombenkalorimetrie zeigen keinen Unterschied zwischen den Gruppen und schliessen einen Energieverlust durch gestörte intestinale Resorption von Makronährstoffen in Aldosteron-defizienten Mäusen aus. Im Alter von 5 Monaten besitzen ASKO-Mäuse sowohl eine gesteigerte Futterraufnahme als auch einen gesteigerten Energieumsatz (EU) und sind durch Hyperventilation, indiziert durch einen respiratorischen Quotienten ( $RQ: VCO_2/VO_2$ )  $> 1$ , in den späten 80% Aktiv- und frühen Schlafphase charakterisiert. Als Ursache dieser Hyperventilation wird die gesteigerte Akkumulierung von Säuren (z.B. Bicarbonat und Laktat) vermutet, die insbesondere während der Metabolisierung von Nährstoffen in der aktiven Phase produziert werden. Die durch Aldosteron-Defizienz bedingte, verminderte renale Ausscheidung von Säuren, führt bei ASKO-Mäusen zu einer gesteigerten Abatmung von  $CO_2$  relativ zur  $O_2$  Aufnahme, um der gesteigerten Säurebelastung des Organismus kompensatorisch entgegenzuwirken. Darüber hinaus könnte der bei ASKO-Mäusen beobachtete gesteigerte EU durch den erhöhten Energieaufwand für die Steigerung der Atemfrequenz erklärt werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Differenz des EU zwischen der Aktiv- und Schlafphase bei ASKO-Mäusen grösser ist als bei WT-Mäusen (129.68 bei ASKO vs. 81.67 Einheiten bei WT). Um den Zusammenhang zwischen Hyperventilation und dem gesteigerten EU bei ASKO-Mäusen näher charakterisieren zu können, wurden die Experimente unter für Mäusen thermoneutralen Bedingungen ( $30^\circ C$ ) wiederholt. Die Haltung von Labormäusen bei einer Standardtemperatur von  $22^\circ C$  ist gleichbedeutend mit einem milden kälteinduzierten Stress, der zu einer Verstärkung einer metabolischen Azidose führt. Ursächlich dafür ist zum einen, eine durch die Aktivierung von braunem Fett gesteigerte Stoffwechselrate ( $CO_2$  Produktion) und zum anderen ein Anstieg der Laktatproduktion als Resultat einer gesteigerten anaeroben Glykolyse, bedingt durch die periphere Vasokonstriktion. Die Haltung bei  $30^\circ C$  führte bei ASKO-Mäusen sowohl zu einer Verminderung der Hyperventilation als auch zu einer Reduktion des RQ von  $1.024 \pm 0.002$  auf  $1.017 \pm 0.002$  in den späten 80% der Aktivphase und von konstant unter 1.0 während der Schlafphase. Gleichzeitig war ein Abfall des EU bei ASKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen sowohl in der Aktiv- (Delta bei ASKO - 307.28, bei WT - 215.47 Einheiten) als auch in der Schlafphase (Delta bei ASKO - 334.55, in WT - 233.79 Einheiten) zu beobachten, der im Vergleich zu den Haltungsbedingungen bei  $22^\circ C$  keinen signifikanten Unterschied bezogen



auf den EU zwischen den Gruppen darstellt. Zusammengefasst ist festzustellen, dass unter Bedingungen erhöhter physiologischer und metabolischer Belastung, wie z.B. chronischer Kälteexposition, die ihrerseits eine Steigerung der Säureproduktion zu Folge hat, eine Aldosteron-Defizienz zu einer Steigerung des Energiebedarfs zur Entlastung des Säure-Basen Haushalts führt und somit eine physiologische Mehrbelastung des Organismus darstellt. Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass Aldosteron unter physiologischen Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Regulation des Energiehaushaltes hat.

ASKO-Mäuse auf HFD weisen im Vergleich zu WT-Mäusen interessanterweise nach 7 Wochen eine gesteigerte Gewichtszunahme und eine Zunahme an Viszeralfett (VF) auf. Aufgrund der unveränderten täglichen Futtermittelaufnahme zwischen den Gruppen und der Annahme, dass Aldosteron-Defizienz zu keiner verbesserten intestinalen Nährstoffresorption führt, kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass ASKO-Mäuse auf HFD eine gesteigerte metabolische Effizienz aufweisen. Wir konnten beobachten, dass Insulin, ein massgebliches Hormon in der Regulation von anabolen und anti-katabolen Prozessen, auf HFD bei ASKO-Mäusen stärker anstieg als bei WT-Mäusen. So sind die Insulin-Plasmaspiegel bei ASKO-Mäusen auf HFD im Vergleich zu WT-Mäusen auf HFD um ein fünffaches erhöht. Dies führt zur Annahme, dass Aldosteron-Defizienz zu einer Verstärkung einer HFD-induzierten Hyperinsulinämie und somit einer Steigerung der metabolischen Effizienz führt. Insulin hat im Fettgewebe einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Metabolismus von Nahrungsinhaltsstoffen sowie den Energieumsatz. Daher führten wir im VF Expressionsanalysen von Genen durch, die einen direkten Einfluss auf den Fettstoffwechsel haben. VF von ASKO-Mäusen reagiert vermindert auf HFD-induzierte thermogene Umprogrammierung, was sich in reduzierten mRNA Spiegeln von "uncoupling protein-1" (UCP1), "peroxisome proliferator-activated receptoralpha" (PPAR $\alpha$ ), "peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha" (PGC1 $\alpha$ ) und "peroxisome proliferator-activated receptorgamma coactivator-1 beta" (PGC1 $\beta$ ) manifestierte. Darüber hinaus sind Adipozyten des VF von ASKO-Mäusen auf HFD durch Hypertrophie sowie eine verminderte Expression der aktiven Form der hormonsensitiven Lipase (HSL), dem schrittmachendem Enzym der Lipolyse, charakterisiert. Möglicherweise ist diese reduzierte Aktivität ursächlich für die verminderten Plasmaspiegel von freien Fettsäuren und für die

Tendenz zu verringerten Triglyzeriden in der Leber, die bei ASKO-Mäusen auf HFD beobachtet werden. Da die Stimulierung des sympathischen Nervensystems durch den beta-3 Adrenorezeptor ( $\beta$ 3-AR) Signalweg im Fettgewebe eine wesentliche Rolle bei der thermogenen Umprogrammierung spielt, wird vermutet, dass die verminderte Genexpression bei ASKO-Mäusen auf HFD auf eine reduzierte Aktivierung des sympathischen Nervensystems zurückzuführen ist. Die Quantifizierung der Tyrosin-Hydroxylase, ein indirekter Marker für sympathische Innervation, wies keinen Unterschied zwischen ASKO-Mäusen und WT-Mäusen auf HFD auf und lässt demnach auf keine gestörte sympathische Aktivierung bei ASKO-Mäusen schliessen. Interessanterweise führt ein Übernachtfasten von ASKO-Mäusen und WT-Mäusen auf HFD zu einer Reduzierung auf vergleichbare Insulin-Plasmaspiegel und damit einhergehenden erhöhten Expressionsniveaus von thermogenen Genen wie auch Triglyzeridspiegeln in der Leber. Daher wird vermutet, dass Insulin im Wesentlichen sowohl für die verminderte Induktion der thermogenen Umprogrammierung als auch für die reduzierten Lipolyse bei ASKO-Mäusen auf HFD verantwortlich ist. *In vitro*-Untersuchungen an differenzierten 3T3-F442 und humanen Adipozyten konnten zeigen, dass Aldosteron einerseits in der Lage war, die inhibierende Wirkung von Insulin bezüglich thermogener Umprogrammierung aufzuheben, als auch die stimulierende Wirkung des Norepinephrin-Analogs Isoproterenol auf die Expression von thermogenen Genen sowie die Lipolyse zu verstärken. Um die *in vivo* Rolle von Aldosteron im VF bei der Verstärkung des  $\beta$ 3-AR vermittelten thermogenen und lipolytischen Effektes zu untersuchen, injizierten wir CL316243, einen selektiven  $\beta$ 3-AR-Agonisten, bei Mäusen auf Chow-Diät. WT-Mäuse wiesen im Vergleich zu ASKO-Mäusen sowohl einen grösseren Anstieg der Plasmaspiegel von freien Fettsäuren, als auch eine gesteigerte Expression von thermogenen Genen im VF auf. Darüber hinaus führt eine chronische HFD bei WT-Mäusen zu erhöhten Genexpressionsspiegeln der Aldosteron-Synthase im VF. Zusammengefasst führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass Aldosteron im Wesentlichen in der Modulierung der thermogenen und lipolytischen Aktivierung im VF von Mäusen auf HFD involviert ist. Die Aktivierung der Thermogenese im Fettgewebe vermindert die Kopplung der oxidativen Phosphorylierung an die ATP-Produktion, beschleunigt temperaturabhängige Reaktionen und führt somit zu einem Energieverlust durch den Einfluss auf Energieumwandlungsprozesse und die Aktivierung von alternativen Substratzyklen. Basierend auf unseren Daten schlussfolgern wir, dass Aldosteron sowohl

durch die Verminderung der HFD-induzierten Hyperinsulinämie als auch durch die gleichzeitige Verstärkung des Norepinephrin-stimulierten Katabolismus in Fettzellen zu einer negativen Energiebilanz führt. Darüber hinaus ist Aldosteron in der Lage, die inhibierende Wirkung von Insulin auf die thermogene Genexpression zu reduzieren. Zusammengenommen verstärkt Aldosteron unter physiologischen Bedingungen die Energieeffizienz, während es unter HFD-induzierter Fettleibigkeit zu einer negativen Energiebilanz führt.