

DISS. ETH NO. 24380

**ORIGIN AND REGULATION OF INTRAMUSCULAR
BROWN-LIKE ADIPOCYTES**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

TATIANE GORSKI

Master of Science in Sport Science, Universität Bern

born on 15.09.1987

citizen of Brazil

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christian Wolfrum

Prof. Dr. Jan Krütfeldt

Prof. Dr. Michael Ristow

2017

Summary

Given the rising worldwide prevalence of obesity, there has been growing interest in the development and function of adipose tissue, as well as in mechanisms that could elevate whole-body energy expenditure. While white adipocytes store excess energy intake as triglycerides in intracellular lipid droplets, brown and beige/brite adipocytes dissipate energy as heat in response to cold exposure or a high-fat diet. The latter is only possible due to the activity of uncoupling protein 1 (UCP1), located in the inner mitochondrial membrane of these thermogenic adipocytes. As a result of their high metabolic activity, brown and beige/brite adipocytes act as a sink for excessive glucose in the circulation. In addition to classical white and brown adipose tissue depots, adipose tissue can also accumulate in ectopic locations, including skeletal muscle. Intramuscular fatty infiltration is generally associated with the accumulation of white adipocytes in skeletal muscle, impairing skeletal muscle function and metabolism. In this regard, it is tempting to speculate that the deposition of brown adipocytes instead of white adipocytes in skeletal muscle could improve metabolism of fatty-infiltrated skeletal muscle. Whether such a shift in intramuscular adipocyte phenotype is indeed possible had not yet been elucidated.

Here, we detected intramuscular expression of UCP1 and other brown-adipocyte markers during glycerol-induced fatty infiltration in an obesity-resistant mouse strain and showed that intramuscular adipocytes acquire a brown-like phenotype in response to beta 3-adrenergic stimulus, known to stimulate browning of white adipose tissue (WAT) depots. An extensive comparison of the brown adipogenic potential of myogenic progenitors (MPs) and fibro/adipogenic progenitors (FAPs) residing in skeletal muscle indicates that, while MPs are committed to the myogenic lineage, FAPs undergo brown adipogenesis more readily than previously appreciated. *In vitro*, UCP1 expression in differentiated FAPs was influenced by genetic background, sex and the thyroid hormone triiodothyronine, known as an important regulator of brown adipose tissue (BAT) activity.

The responsiveness of UCP1 expression in fatty-infiltrated skeletal muscle to beta 3-adrenergic stimulation prompted us to study how intramuscular FAPs and adipocytes respond to other factors known to affect UCP1 in other BAT and WAT depots, namely high-fat diet-feeding and exercise training. We observed that fatty-infiltrated skeletal muscle responds to high-fat diet feeding similarly to inguinal WAT (ingWAT), i.e., with an increase in leptin mRNA levels, but with no regulation of *Ucp1* mRNA expression. Importantly, FAPs from high-fat diet-fed animals retained their ability to differentiate into UCP1-positive adipocytes *in vitro*, suggesting that, at least at the early stages of diet-induced metabolic

disturbance, FAPs are still a possible target for interventions aiming at intramuscular-adipocyte browning. Exercise-training status did not influence *Ucp1* expression in skeletal muscle during glycerol-induced fatty infiltration and UCP1 protein levels in FAPs differentiated into brown-like adipocytes *in vitro*. Interestingly, *Ucp1* expression in ingWAT of exercise-trained mice was higher than in untrained mice four weeks after the end of the training period, despite no differences immediately after it, suggesting that the training status-related increase in *Ucp1* expression could result from indirect effects of endurance exercise training.

Finally, we showed that aging, but not ovariectomy, decreases UCP1 protein expression in FAPs following brown adipogenic differentiation *in vitro*, though *Ucp1* mRNA levels in skeletal muscle during glycerol-induced fatty infiltration *in vivo* were not decreased in ovariectomized or aged mice. The results from ovariectomized mice and high-fat diet-fed mice contribute to the notion that, at least in obesity-resistant 129S6/SvEvTac mice, FAPs retain their ability to differentiate into UCP1-positive cells under conditions that are commonly related to impaired skeletal muscle function. The results from the *in vitro* experiments using FAPs from aged mice, on the other hand, show that FAP function and plasticity can be affected by aging, similarly to what has been previously observed in other stem cell populations.

Our results shed light onto the plasticity of intramuscular adipocytes and point to FAPs and intramuscular adipocytes as possible targets for interventions aiming at adipocyte browning. Whether intramuscular brown adipocytes can enhance skeletal muscle metabolism, in contrast to the deleterious effects attributed to intramuscular white adipocytes, remains to be elucidated. The confirmation of the present results in humans could contribute to the development of new therapies to treat obesity and enhance fatty-infiltrated skeletal muscle health.

Zusammenfassung

Aufgrund der weltweit steigenden Prävalenz von Adipositas wächst das Interesse an der Funktion und Entwicklung von Fettgewebe sowie an Mechanismen, die den Energieumsatz erhöhen könnten. Während weisse Adipozyten überschüssige Energie als Triglyzeride in intrazellulären Lipidtröpfchen speichern, setzen braune und «beige»/«brite» Adipozyten Energie, als Reaktion auf Kälte oder während einer fettreichen Diät, in Wärme um. Letzteres ist nur möglich aufgrund der Aktivität von Uncoupling Protein 1 (UCP1), das in der inneren Mitochondrienmembran der thermogenen Adipozyten lokalisiert ist. Infolge ihrer hohen metabolischen Aktivität wirken braune und brite Adipozyten als Senke für übermässig anfallende Glukose im Kreislauf. Neben der Ansammlung von Adipozyten in den klassischen weissen und braunen Fettdepots können sie jedoch auch an ektopischen Orten, wie zum Beispiel in der Skelettmuskulatur, vorkommen. Die intramuskuläre Fettinfiltration ist in der Regel mit der Akkumulation von weissen Adipozyten im Skelettmuskel verbunden, was zur Beeinträchtigung der Skelettmuskelfunktion und des Stoffwechsels führt. In dieser Hinsicht ist es verlockend zu spekulieren, dass die Ablagerung von braunen Adipozyten anstelle von weissen Adipozyten im Skelettmuskel den Stoffwechsel des mit Fett infiltrierten Skelettmuskels verbessern könnte. Ob diese Verschiebung des intramuskulären Adipozyten-Phänotyps in der Tat möglich ist, war bisher noch nicht aufgeklärt.

Wir detektierten die intramuskuläre Expression von UCP1 und anderen Markern von braunen Adipozyten während einer Glycerin-induzierten Fettinfiltration in einem Adipositas-resistenten Mausstamm und zeigten weiterhin, dass intramuskuläre Adipozyten einen braunen Phänotyp als Reaktion auf einen beta 3-adrenergen Stimulus erwerben. Dieser ist bekannt dafür, dass er die Bräunung von weissen Fettgewebe stimuliert. Ein umfangreicher Vergleich des braun-adipogenen Potentials von myogenen Vorläufern des Skelettmuskels (MPs) und fibro/adipogenen Vorläufern (FAPs) zeigte, dass FAPs sich leichter als bisher gedacht, zu braunen Adipozyten differenzieren, während MPs hingegen der myogenen Linie verpflichtet bleiben. *In vitro* konnte es gezeigt werden, dass die UCP1-Expression in differenzierten FAPs durch den genetischen Hintergrund, das Geschlecht und das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin, auch bekannt als wichtiger Regulator der Aktivität von braunem Fettgewebe (BAT), beeinflusst wird.

Die Veränderbarkeit der UCP1-Expression im mit Fett infiltrierten Skelettmuskel nach beta 3-adrenerger Stimulation veranlasste uns zu untersuchen, wie intramuskuläre FAPs und Adipozyten auf andere Faktoren reagieren, von denen bekannt ist, dass sie UCP1 in

anderen BAT- und WAT-Depots beeinflussen, wie zum Beispiel eine fettreiche Diät oder Ausdauertraining. Wir beobachteten, dass der mit Fett infiltrierte Skelettmuskel, ähnlich wie das inguinale weiße Fettgewebe (ingWAT), nach einer fettreichen Diät, zu einer Erhöhung der Leptin mRNA-Spiegel, jedoch zu keiner Veränderung der *Ucp1* mRNA-Expression führt. Darüber hinaus behielten FAPs von mit einer fettreichen Diät gefütterte Tieren ihre Fähigkeit, sich *in vitro* in UCP1-positive Adipozyten zu differenzieren. Dies deutet darauf hin, dass FAPs, zumindest in den frühen Stadien der fettreiche Diät-induzierten metabolischen Störung, immer noch ein mögliches Ziel für Interventionen sind, die auf eine intramuskuläre Adipozyten-Bräunung abzielen. Der Trainingsstatus zeigte weder einen Einfluss auf die *Ucp1*-Expression im Skelettmuskel, während der Glycerin-induzierten Fettinfiltration, noch auf die UCP1-Proteinmenge in FAPs, die *in vitro* in braunähnliche Adipozyten differenziert wurden. Interessanterweise jedoch, war vier Wochen nach dem Ende der Trainingszeit die *Ucp1*-Expression im ingWAT von trainierten Mäusen höher als bei Kontrolltieren, obwohl unmittelbar nach dem Training keine Unterschiede feststellbar waren. Dies deutet darauf hin, dass die Trainingsstatus-abhängige Zunahme der *Ucp1*-Expression aus indirekten Effekten des Ausdauertrainings resultieren könnte.

Schlussendlich haben wir gezeigt, dass Alterung, aber nicht Ovariectomie, die UCP1-Proteinmenge in FAPs, nach der braun-adipogenen Differenzierung *in vitro*, verringert, obwohl die *Ucp1* mRNA-Expression im Skelettmuskel, während der Fettinfiltration *in vivo*, bei ovariectomierten oder gealterten Mäusen, nicht verringert wurde. Die Ergebnisse der ovariectomierten und mit einer fettreichen Diät gefütterten Mäuse lassen vermuten, dass FAPs, zumindest bei Adipositas-resistenten 129S6/SvEvTac-Mäusen, ihre Fähigkeit beibehalten, unter verschiedenen Zuständen, die häufig mit einer beeinträchtigten Skelettmuskelfunktion zusammenhängen, in UCP1-positive Zellen zu differenzieren. Die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten unter Verwendung von FAPs aus gealterten Mäusen zeigen dagegen, dass FAP-Funktion und -Plastizität durch Alterung beeinflusst werden können, ähnlich wie bereits bisherige Untersuchungen in anderen Stammzellpopulationen zeigen konnten.

Unsere Ergebnisse untermauern damit die Plastizität von intramuskulären Adipozyten und zeigen FAPs und intramuskuläre Adipozyten als mögliche Ziele für Interventionen auf, die auf die Bräunung von Adipozyten abzielen. Im Gegensatz zu den negativen Wirkungen, die den intramuskulären weißen Adipozyten zugeschrieben werden, bleibt jedoch zu klären, ob intramuskuläre braune Adipozyten den Skelettmuskelstoffwechsel verbessern können. Die Bestätigung der gegenwärtigen Ergebnisse beim Menschen könnte zu der Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung von Adipositas und zur Verbesserung der Gesundheit des mit Fett infiltrierte Skelettmuskels beitragen.