

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie
Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physiology
Doktorský studijní program: Fyziologie živočichů
Ph.D. study program: Animal Physiology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



**The Czech Academy
of Sciences**



**Zvýšení lipidového katabolismu ve
spojení s biogenezí mitochondrií v bílé
tukové tkáni jako terapeutický cíl při
prevenci a léčbě obezity a souvisejících
metabolických poruch**

**Induction of lipid catabolism and
mitochondrial biogenesis in white
adipose tissue as therapeutic target for
obesity and associated metabolic
disorders**

Mgr. Kateřina Adamcová

Praha, 2020

**Doktorské studijní programy v biomedicině
Doctoral Study Programmes in Biomedicine**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České
republiky*

*Charles University in Prague and Czech Academy of
Sciences*

**Studijní program / Study programme: Fyziologie
živočichů / Animal Physiology**

**Předseda oborové rady / President of Subject Area
Board:** Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR / Institute
of Physiology CAS

Autor / Author: Mgr. Kateřina Adamcová

Školitel / Supervisor: Ing. Petra Janovská, PhD

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Table of Contents

ČESKÁ ČÁST (CZECH PART)	6
1 Abstrakt	6
2 Úvod	8
3 Cíle práce	10
4 Materiál a metodika	11
4.1 Publikace A	11
4.2 Publikace B	12
4.3 Publikace C	13
5 Výsledky a diskuse	14
5.1 Publikace A	14
5.2 Publikace B	15
5.3 Publikace C	16
6 Závěry	18
7 Životopis	19
ANGLICKÁ ČÁST (ENGLISH PART)	22
8 Abstract	22
9 Introduction	24
10 Aims of the thesis	26
11 Experimental design and Methods	27
11.1 Publication A	28
11.2 Publication B	28
11.3 Publication C	29
12 Results and discussion	30

12.1	Publication A.....	30
12.1	Publication B.....	31
12.2	Publication C.....	33
13	Conclusions	35
14	Curriculum vitae	36
15	Souhrn všech publikací (List of scientific publications).....	38
15.1	Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace....	38
15.2	Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace	39
16	Seznam literatury (Reference list)	39

ČESKÁ ČÁST (CZECH PART)

1 Abstrakt

Funkcí tukové tkáně není jen ukládání tuků, ale také produkce a sekrece tzv. adipokinů, které ovlivňují metabolismus na celotělové úrovni. Narušení funkčnosti tukové tkáně vede k rozvoji diabetu 2. typu, ukládání tuku v játrech, kardio-vaskulárním onemocněním a dalším poruchám. Mnoho vědeckého úsilí je věnováno tomu, jak obezitě a s ní spojeným komplikacím předejít, popř. je zvrátit. Uvažuje se např. o indukci mitochondriálního odřahujícího proteinu 1 (UCP1) v hnědé a bílé tukové tkáni a/nebo stimulaci metabolických drah v bílé tukové tkáni, které spotřebovávají energii bez účasti UCP1, jako jsou prázdné/jalové cykly. Tato dizerační práce je založena na výsledcích z experimentů s dvěma imbredními myšmi kmeny lišícími se náchylností k obezitě, které byly vystaveny chladu, a z experimentů na myších krmených vysokotukovou dietou, nebo vysokotukovou dietou obohacenou n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami.

Myši kmene A/J, které jsou rezistentní k obesitě indukované dietou, vykazovaly v chladu vyšší indukci jalového cyklu mastných kyselin a triacylglycerolu v epididymální tukové tkáni v porovnání s B6 myšmi, které jsou k obezitě náchylné.

Množství UCP1 proteinu a jeho mRNA, který je esenciální pro netřesovou termogenezi v hnědé tukové tkáni, byly po vystavení chladu zvýšeny u obou kmenů podobně, což znamená, že hnědá tuková tkáň nepřispívá k rozdílnému fenotypu A/J a B6 myši, jak bylo navrženo dříve. Dalším důležitým orgánem pro spotřebu glukózy a mastných kyselin jsou kosterní svaly. Z našich výsledků vyplývá, že cyklování Ca^{2+} iontů v kosterním svalu přispívá k zdravějšímu fenotypu A/J myši.

n-3 polynenasycené mastné kyseliny ovlivňují k remodelaci bílé tukové tkáně. Bioaktivní metabolity kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové působí v prevenci hyperplasie tukové tkáně indukované vysokotukovou dietou snížením počtu endoteliálních buněk a preadipocytů. Navíc přispívají k rovnovážnému stavu imunitního systému tkáně.

Experimenty obsažené v této dizertační práci ukázaly, že jalové metabolické cykly a kontrola obratu buněk tukové tkáně mohou významně zlepšit homeostázu volných mastných kyselin v plazmě a ostatních tkáních. I přesto že příspěvek jalových metabolických cyklů k celotělovému energetickému výdeji je pravděpodobně relativně málo významný.

2 Úvod

Tukovou tkáň (**AT**) lze rozlišit dle lokalizace, morfologie a funkce na tři hlavní typy: bílou, hnědou a béžovou. Bílá tuková tkáň (**WAT**) zabudovává nadbytečné volné mastné kyseliny z plazmy do triacylglycerolů (**TAG**) a tím ukládá metabolickou energii. Při překročení kapacity WAT je narušena rovnováha mezi příjmem a výdejem energie AT, respektive mezi lipogenezí a štěpením lipidů (lipolýzou TAG a oxidací mastných kyselin; **FA**). Lipidy jsou ukládány v jiných tkáních jako jsou svaly, srdce a játra a to má za následek sníženou citlivost k inzulínu v těchto tkáních. Obezita vede celkově ke zvýšenému riziku srdečních onemocnění, mozkové mrtvici, cukrovce 2. typu atd., a také chronického zánětu, který přispívá k inzulínové rezistenci [1].

Léčba obezity a souvisejících nemocí se stala pro medicínu velkou výzvou. Od objevu hnědé tukové tkáň (**BAT**) u dospělých lidí v 80. letech 20. století [2] je věnována značná pozornost stimulaci netřesové termogeneze. FA z BAT nebo FA uvolňované z WAT do krve jsou použity jako palivo pro termogenezi a pro aktivaci odpřahujícího proteinu (**UCP**) 1. Odpražení oxidativní fosforylace (**OXPHOS**) od mitochondriální respirace prostřednictvím UCP1 vede k výrobě tepla místo k syntéze ATP [3].

Příspěvek dalších orgánů tj. kosterních svalů, jater a WAT k netřesové termogenezi je stále zpochybňován. Kosterní svaly představují 40% tělesné hmotnosti a mají tedy předpoklad ke generování velkého množství tepla. Zda jsou kosterní svaly schopné přispět k netřesové termogenezi kromě své prokázané role při třesu, je stále předmětem diskuzí. Publikovaným mechanismem netřesové termogeneze ve svalu je odpražení aktivity sarko/endoplazmatické retikulum Ca^{2+} ATPázy (**SERCA**) sarkolipinem, který se při vysoké koncentraci Ca^{2+} v cytosolu váže na SERCA. Hydrolyza ATP probíhá normálně, ale je snížen transport Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula (**SR**). To znamená, že k

transportu Ca^{2+} zpět na SR v přítomnosti sarkolipinu je třeba použít více ATP [4,5].

Další přístup léčby je založen na konceptu tzv. zdravého adipocytu, který je založen na skutečnosti, že 10–30% obézních lidí je metabolicky zdravých z hlediska citlivosti na inzulín, imunitní rovnováhy, udržování metabolických cyklů a ukládání TAG v adipocytech [6]. Jedním z hlavních rysů zdravého adipocytu je citlivé nastavení metabolických drah v bazálních podmínkách ale i v reakci na akutní i chronické požadavky organismu. Metabolismus AT je komplexní systém lipolýzy, reesterifikace, *de novo* lipogeneze (DNL) a dalších metabolických drah [7-9]. Malý posun v rovnováze těchto drah může do značné míry ovlivnit funkci WAT. Příznivé systémové účinky prázdného cyklu TAG/FA jsou reflektovány rychlým a citlivým nastavením FA v plazmě, díky schopnosti prázdného cyklování substrátů oscilovat mezi dvěma protilehlými metabolickými dráhami a zesílit velikost malých změn v aktivitě zúčastněných enzymů na množství uvolněných FA. Redistribuce FA tedy přispívá k jejich fyziologickým hladinám a brání jejich lipotoxicitě [10].

Remodelace AT zahrnuje mnoho buněčných odpovědí, jako jsou modulace angiogeneze, remodelace extracelulárního prostoru a nábor makrofágů, které se dynamicky mění. Tyto procesy přispívají k udržení zdravé funkce AT. Chronicky nadměrný přísun energie u obezity však iniciuje patologickou přestavbu. Pro-zánětlivé odpovědi a metabolický stres převažují nad fyziologickými změnami, což vede k systémovému zánětu a inzulínové rezistenci [11,12]. Imunitní a metabolická funkce WAT je regulována také lipidovými mediátory. Tradiční eikosanoidy (odvozené od n-6 polynenasycených mastných kyselin; PUFA) vykazují pro-zánětlivé účinky, zatímco mediátory odvozené od n-3 PUFA vykazují převážně proti-zánětlivé účinky. n-3 PUFA suplementace v potravě myši vedla k polarizaci AT makrofágů směrem k proti-zánětlivému stavu M2. Kromě toho bylo

prokázáno, že lipidové mediátory odvozené od kyseliny dokosaehexaenové (**DHA**), rezolvin D1 a protektin D1, snižují akumulaci AT makrofágů a zlepšují také příjem glukózy, lipolýzu a DNL ve WAT [13]. n-3 PUFA navíc snížily velikost adipocytů ve srovnání se skupinou krmenou vysokotukovou dietou (**HFD**) a zvýšily počet adipocytů na úroveň kontrolní skupiny [14] a snížily počet a diferenciaci bílých adipocytových progenitorů u myši [15]. Celkově bylo prokázáno, že n-3 PUFA zlepšují metabolickou flexibilitu adipocytů a fenotyp imunitních buněk, což vede ke zdravému adipocytu [10,16].

3 Cíle práce

Obecným cílem této práce bylo prozkoumat morfolonii a funkčnost AT se zaměřením na modulaci lipidového metabolismu a adipozity za energeticky náročných a energeticky nadbytečných podmínek s ohledem na vlastnosti zdravého adipocytu.

Byly řešeny tyto konkrétní cíle:

- Charakterizovat zapojení prázdného TAG/FA cyklování v odolnosti k obezitě u dvou myších kmenů A/JOláHsd (**A/J**) a C57BL/6JBomTac (**B6**), které se liší sklonem k obezitě. K maximální stimulaci metabolismu byla využita chladová expozice (**CE**).
- Vyhodnotit příspěvek netřesové termogeneze v BAT a/nebo jiných tkáních k rezistenci k obezitě u A/J a B6 myši. K maximální stimulaci metabolismu byla využita **CE**.
- Charakterizovat účinek n-3 PUFA na hyperplazii WAT u myši krmených HFD dietou se zaměřením na příspěvek imunometabolizmu.

4 Materiál a metodika

Myši kmeny B6 (Taconic, Dánsko), A/J (Harlan, Velká Británie; publikace A a B) a C57BL/6N (**B6/N**; Charles River Laboratories, Německo; publikace C) byly použity k provedení experimentů uvedených v dizertační práci.

Samci myši byli chováni při 30°C (publikace A a B) nebo 20°C (publikace C) v zvířetníku Fyziologického ústavu s volným přístupem k vodě a jídlu a pravidelném světelném režimu 12h:12h (světlo:tma). Myši byly v kleci po třech (publikace A a B) nebo po jedné (publikace C). Tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly sledovány každý druhý den (publikace A a B) nebo denně během prvního týdne experimentu a poté jednou týdně (publikace C). Myši byly krmeny standardní laboratorní dietou (STD; energetická hustota 13,0 kJ.g⁻¹, ~3,4% lipidů, extrudovaná R/M-H strava, SsniffSpezialdiäten, Soest, Německo), pokud není specifikováno jinak. Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu se všemi příslušnými regulačními normami podle protokolu 172/2009 nebo 81/2016 schváleného Výborem pro péči o zvířata a komisí Akademie věd České republiky a řídily se pokyny Fyziologického ústavu pro péči o laboratorní zvířata.

4.1 Publikace A

Šestitýdenní samci myši B6 a A/J krmené STD byli chováni při teplotě 30°C po dobu alespoň jednoho týdne a poté byli rozděleni do 3 skupin: (i) myši, které zůstaly při teplotě 30°C další týden, a myši, které byly vystaveny teplotě 6°C po dobu (ii) 2 nebo (iii) 7 dnů před zabitím. Myši byly injikovány i.p. 0,9% solným roztokem rozpuštěným v 99,8% ²H₂O (za účelem získání 5% ²H₂O v krvi) a bylo jim podáno 5% ²H₂O v H₂O k pití 48 hodin před disekcí. Experiment byl ukončen usmrcením zvířet mezi 8. a 10. hodinou a odebráním krve, různých tukových tkání a jater pro další analýzy.

V plazmě byly měřeny různé biochemické parametry. Byly analyzovány hladiny lipidů, glukózy, ketolátek a adipokinů. Expres genů podílejících se na metabolismu lipidů byla hodnocena v epididymálním WAT (eWAT), subkutánním AT, BAT a játrech. Hladina 5'adenosinmonofosfátu aktivované protein kinázy (AMKP) a její fosforylace byly měřeny western blottem. ^2H obohacení glycerolu a acylové skupiny bylo měřeno pomocí NMR v purifikovaných eWAT TAG k zhodnocení indukce syntézy FA a TAG vlivem CE. V eWAT byla analyzována morfologie adipocytů a imunohistochemicky kvantifikovány proteiny tuková triglyceridová lipáza (ATGL), diglyceridová acyltransferáza (DGAT) 1 a UCP1.

4.2 Publikace B

Experimenty v Publikaci B byly provedeny ve stejném schématu jako v Publikaci A s výjimkou skupiny myši vystavených 6°C po dobu 2 dnů. Na konci experiment byla odebrána krev, BAT a kosterní sval gastrocnemius.

V BAT byla hodnocena Ucp1 a ve svalu gastrocnemius genová exprese Ucp3 a genů zapojených do cyklování Ca^{2+} . Množství UCP1 proteinu bylo měřeno western blottem a proteomikou v BAT. Proteomická analýza byla také použita k analýze dalších proteinů v BAT a svalu gastrocnemius. V mitochondriích izolovaných z BAT a v homogenátu kosterního svalu bylo měřeno dýchání buněk (spotřeba kyslíku mitochondriemi) po přidání substrátů a inhibitorů. Maximální produkce tepla (HPmax), maximální produkce tepla stimulovaného norepinefrinem (NEmax) a produkce klidového tepla (HPrest) byly hodnoceny pomocí nepřímé kalorimetrie. Příjem glukózy byl měřen pozitronovou emisní tomografií/počítačovou tomografií (PET/CT) u hladových myši pod anestézií injikovaných ^{18}F -fluorodeoxyglukózou (^{18}F FDG) a ponechaných jednu hodinu ve chladové místnosti při 4°C . Lipidomika a metabolomika

byla měřena pomocí LC-MS jak v BAT, tak ve svalu gastrocnemius. Výsledky byly analyzovány metodou dílčích nejmenších čtverců-diskriminační analýzy (PLSDA) a bylo získáno VIP skóre.

4.3 Publikace C

Šestitýdenní samci B6/N myši krmených STD byli chováni při teplotě 20°C po dobu 7 týdnů. Ve věku 13 týdnů byly myši náhodně rozděleny do skupin s různými dietami: kontrolní skupina krmená STD; skupina krmená vysokotukovou dietou na bázi kukuřičného oleje (**HFD**; ~35% hmotn./hmotn. lipidů) a strava na bázi HFD, ve které bylo 15% (hmotn./hmotn.) dietních lipidů nahrazeno koncentrátem s n-3 PUFA, EPAX 1050TG (**HFF**; Epax 1050 TG, který obsahoval ~14% kyseliny eikosapentaenové (**EPA**) a ~46% DHA, hmotn./hmotn.; celková koncentrace EPA + DHA ~30 g/kg stravy; EPAX AS, Aalesund, Norsko). Byly provedeny dva experimenty lišící se časovým rámcem; s krmením trvajícím buď 1 nebo 8 týdnů. Experiment byl ukončen usmrcením zvířat ve věku 14, respektive 21 týdnů, mezi 8. a 10. hodinou. K dalším analýzám byla odebrána eWAT.

Expresí genů zapojených do adipogeneze, metabolismu PUFA a zánětu byla měřena v eWAT nebo adipocytech a stromální vaskulární frakci (SVF) izolované z eWAT. Lipidové mediátory byly hodnoceny v extraktech eWAT pomocí LC-MS lipidomické analýzy. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou hlavních komponent (PCA) a bylo získáno VIP skóre. V eWAT byla imunohistochemicky hodnocena velikost adipocytů, proliferace makrofágů a přítomnost tzv. struktur připomínajících korunu (CLS) a vícejaderných obřích buněk. Obsah DNA byl měřen v eWAT a adipocytech izolovaných z eWAT. Množství imunitních buněk, prekurzorů adipocytů a endoteliálních buněk bylo měřeno průtokovou cytometrií v SVF izolované z eWAT.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Publikace A

Flachs P, Adamcova K, Zouhar P, Janovska P, Bardova K, Svobodova M, Hansikova J, Kuda O, Rossmesl M, Kopecky J. *Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype.*

Vystavení myši CE vedlo k aktivaci třesové a netřesové termogeneze [3,17]. V reakci na zvýšený výdej energie byl u obou kmenů myši zvýšen příjem potravy a uvolněny energetické zásoby z tukových tkání, s větším úbytkem u A/J myši. Nadměrné množství FA v plazmě může vést k lipotoxicitě, proto je určité množství FA zpětně přijato a esterifikováno ve WAT. Pro detekci re-esterifikace a DNL bylo použito měření inkorporace ^2H do molekuly glycerolu a posledního methyly FA z TAG pomocí NMR. Aktivita syntézy a re-esterifikace FA byla více indukována chladem u A/J myši ve srovnání s B6 myšmi. Indukci obratu TAG prokázala také Granemanova skupina s použitím β -3 adrenergního agonisty [18]. V souladu s výsledky NMR byla genová exprese syntázy mastných kyselin (**Fasn**) a Dgat 1 a 2 indukována více u A/J myši CE. Genová exprese Fasn a Dgat2, enzymů zapojených do syntézy FA a esterifikace *de novo* syntetizovaných FA, kopírovala průběh *de novo* syntézy FA měřené pomocí NMR. Imunohistochemické barvení jak DGAT1, tak ATGL proteinu bylo zvýšeno u eWAT CE-myši a zvýšení bylo vyšší u A/J myši.

Hlavním zjištěním této publikace byla vyšší indukce prázdného cyklu TAG/FA v eWAT u A/J myši v porovnání s B6 myšmi po CE. Tato práce ukázala souvislost mezi schopností indukovat TAG/FA cyklus a štíhlým fenotypem na modelu CE-myši A/J a B6, které se liší náchylností k obezitě. Současná aktivace protichůdných drah lipolýzy a syntézy FA a TAG přispívá k energetické rovnováze relativně málo, avšak i

tyto malé změny a správná regulace FA jsou důležité pro metabolickou flexibilitu a zdravý metabolismus.

5.2 Publikace B

Janovska P, Bardova K, Vrbacky P, Adamcova K, Lenkova L, Funda J, Drahota Z, Rossmeisl M, Zouhar P, Kopecky J. *Strain-specific involvement of brown fat and muscle in cold-induced thermogenesis in mice: link to lean phenotype.*

Cílem publikace B bylo zkoumat příspěvek netřesové termogeneze, zejména v BAT a případně v jiných tkáních, jako je kosterní sval, u dvou myších kmenů rozdílných A/J a B6 v náchylnosti k obezitě. Předchozí studie využívající tyto dva myší kmeny ukázaly, že vyšší citlivost k β -3 agonistovi a vyšší kapacita indukce Ucp1 mRNA ve WAT a BAT mohou souviset s relativní rezistencí A/J myši k obezitě [19,20].

Produkce tepla u savců je představována třesovou a netřesovou termogenezí. Zatímco během třesové termogeneze je teplo produkováno nedobrovolnými kontrakcemi kosterních svalů, netřesová termogeneze je založena na odpáření syntézy ATP od OXPHOS pomocí UCP1 v BAT [21,22]. Ucp1 mRNA, protein a aktivita byly aktivovány CE na podobné hladiny v obou myších kmenech. Rovněž celková kapacita pro netřesovou termogenezi v BAT, hodnocená pomocí množství UCP1 proteinu vyjádřená na celé tukové depo, se mezi kmeny nelišila.

Jak A/J tak B6 myši jsou schopné vypořádat se s CE, což dokazuje podobná produkce tepla měřená pomocí INCA. Podíl HPmax, který nebyl stimulován norepinefrinem, byl vyšší u A/J myši. Tyto výsledky nás vedly k hledání jiného orgánu než BAT podílejícího se na termogenezi u A/J myši. PET/CT měření příjmu glukózy u myši stimulovaných chladem ukázalo vyšší absorpci do kosterního svalu A/J myši, z čehož vyplývá pravděpodobná existence jiného mechanismu produkce tepla nezávislého na UCP1. BAT je stále považována za jedinou tkáň, která je schopna netřesové

termogeneze, nicméně kosterní sval by mohl mít kromě své uznané role při třesu také roli v netřesové termogenezi [23,24]. Publikované odpražení SERCA sarkolipinem v kosterním svalu může vést k uvolnění tepla a spotřebě energie. Tato hypotéza byla podpořena i) vyššími hladinami mRNA a proteinu SERCA2a a proteinu sarcolipinu a ii) vyššími hladinami karnitinu i acetylkarnitinu ve svalu gastrocnemius, což naznačuje preferenci oxidace FA u A/J myši. Také oxidace palmitoyl karnitinu byla chladem více indukována u A/J myši. Zdá se tedy, že oxidace FA ve svalech B6 myši není dostačující a že se acylkarnitiny spíše hromadí v mitochondriích, než aby byly zpracovány. Tyto výsledky jsou v souladu s vyšším obsahem Ucp3 mRNA v kosterním svalu B6 myši a obecně s jeho rolí v této tkáni. UCP3 snižuje mitochondriální produkci volných radikálů a chrání před oxidačním poškozením buněk. Kromě toho UCP3 transportuje přebytečné FA z mitochondrií a chrání je před toxickými účinky aniontů a peroxidů FA [25,26]. Tyto výsledky tedy naznačují, že B6 myši mají pomalejší obrát FA v kosterním svalu než myši A/J a spíše se chrání zvýšeným UCP3 před oxidačním poškozením.

Závěrem lze říci, že netřesová termogeneze v BAT nepřispívá k hubenému fenotypu A/J myši. A/J myši se pravděpodobně spoléhají také na termogenezi ve svalu, která by mohla být spojena s jejich zdravějším fenotypem spolu se zvýšeným cyklem TAG/FA ve WAT [27] a některými dosud neobjevenými metabolickými drahami. Cyklování Ca^{2+} může být hledaným hráčem v termogenezi nezávislé na UCP1 u A/J myši.

5.3 Publikace C

Adamcova K, Horakova O*, Bardova K*, Janovska P, Brezinova M, Kuda O, Rossmeisl M, Kopecky J. *Reduced Number of Adipose Lineage and Endothelial Cells in*

Epididymal fat in Response to Omega-3 PUFA in Mice Fed High-Fat Diet.

Hlavním zjištěním této studie bylo, že nárůst neimunitních CD45⁻ buněk, zejména preadipocytů a endoteliálních buněk, je limitován suplementací n-3 PUFA. Výsledky ukázaly vysokou remodelaci eWAT v obou vysokotukových dietních skupinách (HFD a HFF). Jak hypertrofie, tak hyperplazie byly pozorovány ve skupinách HFD i HFF. Ve skupině HFF však suplementace n-3 PUFA částečně působila proti těmto procesům, jak je patrné z kvantifikace DNA (marker počtu buněk v tkáni) a velikosti adipocytů.

Jak adipocyty rostou, dosahují svého limitu a umírají, což spouští zánětlivé procesy. Makrofágy jsou klíčové imunitní buňky v AT, agregují se kolem umírajících adipocytů a vytvářejí tzv. struktury připomínající korunu a odstraňují zbytky adipocytů [28]. Množství makrofágů měřené jak imunohistochemicky, tak průtokovou cytometrií bylo stejné mezi skupinami HFD a HFF v 8. týdnu. Jednotlivé populace makrofágů však pravděpodobně ovlivnily zánět v eWAT. Poměr M2/M1 měl tendenci se zvyšovat ve skupině HFF v týdnu 1 i v týdnu 8 ve srovnání se skupinou HFD a rozdíl mezi dietními skupinami se s časem zvyšoval. Imunitní buňky celkově nepřispěly k pozorovaným změnám v počtu buněk pomocí n-3 PUFA, avšak spolu s adipocyty přispěly k nastavení rovnováhy na proti-zánětlivou stranu ve skupině HFF sníženou expresí pro-zánětlivých genů *Nos2*, *Tnf α* , *Tgfp*, *IL1p* a *Ccl2*. Vyšší pro-zánětlivý profil HFD myši ve srovnání s HFF myši byl tedy potvrzen pomocí qPCR. Ve skupině HFF byla také pozorována indukce proti-zánětlivých 5-, 12- a 15-HEPE a 17,18-diHETE a snížení pro-zánětlivých 5-, 8- a 15-HETE.

CD45⁻ buňky byly více v souladu s měřením DNA, zejména pak preadipocyty a endoteliální buňky. Prostaglandin E2, který zvyšuje angiogenezi [29], byl ve skupině HFF

snížen ve srovnání s HFD a mohl by přispět ke snížení endoteliálních buněk. Zvýšené procento proliferujících CD45⁺ buněk naznačuje zvýšený obrat těchto buněk (preadipocytů a endoteliálních buněk), což je v rozporu s počtem preadipocytů a endoteliálních buněk a vede to ke spekulacím o zapojení nějakého druhu buněčné smrti. Suplementace n-3 PUFA byla popsána jako induktor apoptózy u WAT [30-32]

I když suplementace n-3 PUFA neměla vliv na počet imunitních buněk, polarizace makrofágů a mnoho bioaktivních sloučenin produkovaných imunitními buňkami ovlivnily imunitní rovnováhu a množství prekurzorů adipocytů a jejich obrat a přispěly k remodelaci AT. Klíčovými hráči v prevenci diety indukované hyperplazie WAT pomocí n-3 PUFA jsou prekurzory adipocytů, primárně preadipocyty a endoteliální buňky. Závěrem lze říci, že suplementace n-3 PUFA měla antiadipogenní účinek během vývoje obezity omezením jak hypertrofie, tak hyperplazie buněk tukové tkáně.

6 Závěry

Na základě získaných dat v této dizertační práci lze formulovat tyto závěry:

1) Lipolýza vyvolaná CE vedla k mobilizaci zásob lipidů ve všech depech AT. Snížení velikosti tukových dep, které bylo výraznější u A/J myší, bylo kompenzováno zvýšeným příjmem potravy u obou myších kmenů bez rozdílu. Dále nebyly pozorovány žádné známky intolerance na chlad. Aby bylo zabráněno lipotoxicitě FA, myši indukovali re-esterifikaci a DNL v reakci na CE. A/J myši reagovali s vyšší flexibilitou na stres vyvolaný chladem než myši B6. I když prázdný cyklus TAG/FA přispívá k navýšení energetického výdeje relativně málo, mohou být i tyto malé změny a správná

regulace FA důležité pro metabolickou flexibilitu a zdravý metabolismus.

2) Vyšší rychlost metabolismu v BAT nebyla spojena se zdravým fenotypem A/J myši, které spíše spoléhají na termogenezi ve svalu. Jak množství Ucp1 mRNA, tak proteinu byly indukovány CE podobně mezi A/J a B6 myšmi v BAT, což odpovídalo funkčnímu testu mitochondrií BAT pomocí Oxygraphu. Příjem glukózy do tkání (měřeno pomocí PET/CT) a proteomická analýza v BAT však odhalily vyšší využití glukózy v BAT u myši B6 ve srovnání s A/J myšmi na rozdíl od kosterního svalu, kde příjem glukózy byl vyšší u A/J myši ve srovnání s B6 myšmi. Také metabolismus lipidů a cyklování Ca^{2+} byly indukovány ve svalu více u A/J než u B6 myši (měřené pomocí qPCR a hladin proteinů zúčastněných enzymů). Tyto výsledky podporují myšlenku, že svalová termogeneze přispívá k zdravému fenotypu A/J myši.

3) n-3 PUFA suplementace zabránila hyperplázii WAT snížením počtu preadipocytů a endoteliálních buněk. Je zajímavé, že data ukázala vyšší proliferaci těchto buněk, což naznačuje zvýšený obrat preadipocytů a endoteliálních buněk. Překvapivě i když suplementace n-3 PUFA kvantitativně neovlivnila imunitní buňky, poměr makrofágů M2/M1 byl zachován n-3 PUFA suplementací ve srovnání s myšmi krmenými vysokotukovou dietou. Kromě toho polarizace makrofágů a mnoho bioaktivních sloučenin produkovaných imunitními buňkami ovlivnily imunitní rovnováhu a množství a obrat prekurzorů adipocytů a přispěly k remodelaci AT. Závěrem lze říci, že suplementace n-3 PUFA omezuje jak hypertrofii, tak hyperplazii buněk tukové tkáně během vývoje obezity.

7 Životopis

Narozena 25.5.1990 v Českých Budějovicích

Národnost česká

Vzdělání: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Ph.D. studium Fyziologie živočichů 2015-2021

Výzkumný projekt: Zvýšení lipidového katabolismu ve spojení s biogenezí mitochondrií v bílé tukové tkáni jako terapeutický cíl při prevenci a léčbě obezity a souvisejících metabolických poruch

Mgr. studium Klinické a toxikologické analýzy 2012-2014

Diplomová práce: Výskyt β -rutosidasy v eurokaryotických mikroorganismech

Bc. studium Klinické a toxikologické analýzy 2009-2012

Bakalářská práce: Substrátová specifita rekombinantní α -L-rhamnosidasy

Aktivní účast na konferencích:

- 2015 ■ **„EMBO - Nuclear receptors: From molecules to humans”, Ajaccio; „Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2015”, Desná v Jizerských horách**

- 2016 ■ **„EAS CONGRESS”, Innsbruck; „Česká lipidomická konference”, Prague; „Heidelberg International Symposium on Diabetic Complications”, Heidelberg; Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2016”, Zahrádky u České Lípy**

- 2017 ■ **„International symposium on insulin receptor and insulin action in connection with DZD Diabetes Research School for Graduate Students and Postdocs 2017”, Nice; EMBO: Brown adipose**

- tissue”, Sitges; **„Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2017”**, Dvůr Králové
- 2018 ■ **„EASD 2018”**, Berlin; **„Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2018”**, Vranovská Ves
- 2019 ■ **„CPHBAT 2019 Brown and white adipose in metabolism -Plasticity and metabolic crosstalk”**, Kobehavn; **„Lipid Meeting”**, Leipzig
- 2020 ■ **„ECO ICO 2020”**, virtual meeting

ANGLICKÁ ČÁST (ENGLISH PART)

8 Abstract

Adipose tissue is not only crucial in the storage of excessive fat and its release but also plays important role in the secretion of endo/para- and autocrine factors, thus influencing energy metabolism on the whole body level. The incapability of adipose tissue to meet its responsibilities leads to whole-body metabolic problems resulting in type 2 diabetes, storing of fat in the liver, coronary disease, and other diseases. How to prevent development of obesity and its consequences and/or completely reverse it, is a subject of great scientific interest. Activation of brown adipose tissue (**BAT**) and brite cells via induction of uncoupling protein 1 (**UCP1**) and/or stimulation of UCP1-independent energy-dissipating metabolic pathways such as futile cycles in white adipose tissue may be a promising path to fulfill this goal. This thesis is based on results from experiments with two cold-exposed inbred murine strains differing in the propensity to obesity and murine experiments with diet-induced obesity prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids (**PUFA**).

Mice resistant to diet-induced obesity (A/J mice) showed higher induction of triacylglycerol (**TAG**)/fatty acid (**FA**) futile cycle in epididymal white adipose tissue by cold exposure in comparison to obesity-prone B6 mice.

Interestingly, the level of both Ucp1 mRNA and protein in BAT were induced similarly in both strains by cold exposure. Thus, BAT does not contribute to the lean phenotype of A/J mice as was proposed earlier. Besides BAT, skeletal muscles are also a large sink for glucose and fatty acids. Our results suggest that Ca^{2+} cycling in skeletal muscle contributes to a healthier phenotype of A/J mice.

n-3 PUFA were shown to be involved in the remodeling of epididymal white adipose tissue. Bioactive metabolites of

eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid prevented diet-induced hyperplasia by reducing the number of endothelial cells and preadipocytes and prevented disruption of immune balance.

To conclude, these experiments showed that the contribution of futile cycles, as well as control of fat cell turnover to buffer nonesterified fatty acids in plasma and to the prevention of fatty acids storing in extra-adipose tissues, leads to a healthy phenotype. Even though, the contribution of mentioned futile cycles probably would not influence whole-body energy expenditure.

9 Introduction

Adipose tissue (**AT**) can be distinguished either by localization, morphology, or function to three main types: white, brown, and beige/brite. White AT (**WAT**) takes excessive fatty acids (**FA**) from plasma and builds triacylglycerols (**TAG**), and thereby stores metabolic energy. When the capacity of WAT is exceeded, balance between AT energy intake and expenditure or basically between lipogenesis and breakdown of lipids (TAG lipolysis and FA oxidation) is disrupted, and lipids are ectopically stored in other tissues such as muscle, heart, and liver. This results in impaired insulin sensitivity in these tissues. Overall, obesity leads to an increased risk of heart disease, stroke, type 2 diabetes, etc., and low-level, but chronic inflammation, which contributes to the development and/or amelioration of insulin resistance [1].

Treatment of obesity and related diseases has become a major challenge for medicine. Since the discovery of brown adipose tissue (**BAT**) in adult humans in the 1980s [2], significant attention is paid to the stimulation of non-shivering thermogenesis and thereby the energy expenditure of AT. FA within BAT or FA released from WAT to blood are used as a fuel for thermogenesis and for activation of proton conductance by uncoupling protein (**UCP**) 1. Due to the uncoupling of oxidative phosphorylation (**OXPHOS**) from mitochondrial respiration via UCP1, energy is not accumulated to adenosine triphosphate (**ATP**) synthesis but rather used for heat production [3].

The contribution of other organs to non-shivering thermogenesis such as skeletal muscle, liver, and WAT is still questioned. Skeletal muscles represent 40% of body mass and thus have a capacity to generate large amounts of heat. It is still discussed whether skeletal muscles are able to contribute to non-shivering thermogenesis besides to their proven role in shivering. It was proposed that the sarcolipin uncoupling of

sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (**SERCA**) activity could be the mechanism of non-shivering thermogenesis in the muscle. Sarcolipin binds to SERCA in the presence of high Ca^{2+} in the cytosol, allows ATP hydrolysis, but decreases Ca^{2+} transport to sarcoplasmic reticulum (**SR**). That means that more ATP needs to be utilized in order to transport Ca^{2+} back to SR in the presence of sarcolipin [4,5].

Another treatment approach is based on the concept of so called healthy adipocyte based on the fact that 10-30% of obese people are metabolically healthy in terms of insulin sensitiveness, immune balance, maintenance of metabolic cycles, and storing TAG in adipocytes [6]. One of the main features of healthy adipocyte is the fine tuning of metabolic pathways in the basal conditions as well as in response to both acute and chronic demands of the organism. The metabolism of AT is a complex system of lipolysis, re-esterification, and *de novo* lipogenesis (**DNL**), and other pathways. A small shift in the balance of these pathways could largely affect the WAT function [7-9]. Beneficial systemic effects of the futile cycle of TAG/FA are reflected by fast and fine tuning of FA in plasma, due to the ability of futile substrate cycling to oscillate between two opposite metabolic pathways and to amplify the magnitude of small changes in the activity of the involved enzymes on the net amount of liberated FA. Thus, the redistribution of FA contributes to their physiological levels and prevents from their lipotoxicity in terms of fat accumulation in extra-adipose tissues and deterioration of insulin signaling [10].

AT remodeling involves many cellular responses such as modulation of angiogenesis, extracellular matrix remodeling, and recruitment of macrophages, which are changed dynamically. These processes contribute to the maintenance of healthy AT. However, chronic excessive energy supply in obesity initiates pathological remodeling. Pro-inflammatory responses and metabolic stress prevail over physiological

changes leading to systemic inflammation and insulin resistance [11,12]. The immune and metabolic function of WAT is regulated by lipid mediators as well. Traditional eicosanoids (derived from n-6 polyunsaturated fatty acids; **PUFA**) demonstrate pro-inflammatory effects, while n-3 PUFA derived mediators demonstrate mostly anti-inflammatory effects [10]. Indeed, mice treated with n-3 PUFA drives polarization of AT macrophages toward M2 state (anti-inflammatory state). Moreover, docosahexaenoic acid (**DHA**)-derived lipid mediators resolvin D1 and protectin D1 were shown to decrease the accumulation of AT macrophages and improved glucose uptake, lipolysis, and DNL in WAT [13]. In addition, n-3 PUFA decreased adipocyte volume as compared with the high fed diet (**HFD**) group and increased the number of adipocytes on the level of the control group [14]. On the other hand, it was shown that n-3 PUFA reduced the number and differentiation of white adipocyte progenitors in mice [15]. Overall, n-3 PUFA were shown to improve the metabolic flexibility of adipocytes and phenotype of immune cells leading to healthy adipocyte [10,16].

10 Aims of the thesis

The general goal of this thesis was to investigate the composition and functionality of AT with a focus on the modulation of lipid metabolism and adiposity under energy-demanding and energy-surplus conditions concerning attributes of healthy adipocyte.

The following specific aims were addressed:

- To characterize TAG/NEFA futile cycling in WAT and its involvement in resistance to obesity in two inbred murine strains C57BL/6JBomTac (**B6**) and A/JOlHsd (**A/J**) differing in the propensity to obesity. This characterization was performed under the conditions of

cold exposure (**CE**), i.e. in an energy-demanding situation leading to a maximal stimulation of WAT metabolism.

- To evaluate the contribution of non-shivering thermogenesis in BAT and/or other tissues to resistance to obesity in A/J and B6 mice. This characterization was performed under the conditions of CE (energy-demanding situation).
- To characterize the effect of n-3 PUFA on hyperplasia of WAT in mice fed HFD with a focus on the contribution of immunometabolism.

11 Experimental design and Methods

Murine strains B6 from Taconic, Denmark; A/J from Harlan, UK (publications A and B) and C57BL/6N (**B6/N**) obtained from Charles River Laboratories (publication C) were used to perform experiments presented in the thesis.

Male mice were maintained at 30°C (publication A and B) or 20°C (publication C) in the Animal house of the Institute of Physiology on a 12:12 hour light-dark cycle with free access to water and food. Mice were three in a cage (pub.A and B) or single-caged (pub.C). Body weight and food consumption were monitored every second day (pub. A and B) or daily during first week of experiment and then once a week (pub. C). Mice were fed standard laboratory chow diet (**STD**; energy density 13.0 kJ.g⁻¹, ~3.4% wt.wt⁻¹ of lipids, extruded R/M-H diet, SsniffSpezialdiäten, Soest, Germany), if not specified otherwise. All animal procedures were conducted in accordance with all appropriate regulatory standards under protocol 172/2009 or 81/2016 approved by Animal Care and Use Committee of the Czech Academy of Sciences and followed the guidelines for the use and care of laboratory animals of the Institute of Physiology.

11.1 Publication A

Six-weeks old male B6 and A/J mice fed STD maintained at 30°C for at least one week and then were subgrouped into 3 groups: (i) mice that stayed at 30°C for another week and mice that were exposed to 6°C cold for (ii) 2 or (iii) 7 days before killing. Mice were injected i.p. with 0,9% saline solution dissolved in 99,8% $^2\text{H}_2\text{O}$ (in order to obtain 5% $^2\text{H}_2\text{O}$ in blood) and were given 5% $^2\text{H}_2\text{O}$ in H_2O to drink 48 hours before dissection. Animals were dissected under ether anesthesia in a randomly fed state at the age of 9 weeks between 8 and 10 a.m. Blood, various adipose tissue (AT) depots and liver were collected.

In plasma various biochemical analysis were done. Plasma lipid, glucose, ketone bodies and adipokines levels were measured. Expression of genes involved in lipid metabolism were evaluated in epididymal WAT (eWAT), subcutaneous AT, BAT and liver. 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMKP) level and its phosphorylation were measured by western blotting. eWAT TAG were purified and ^2H enrichment of glycerol and fatty acyl moiety was measured by NMR in order to obtain FA and TAG synthesis rate. Adipocyte morphology and immunohistochemistry of adipose triglyceride lipase (ATGL), diglyceride acyltransferase (DGAT) 1 and UCP1 were performed in eWAT. Also lipolytic activity of adipocytes was measured *ex vivo*.

11.2 Publication B

Experimental set up in publication B was the same as Publication A except the group exposed to CE for 2 days. BAT and gastrocnemius skeletal muscle were collected.

Gene expression of Ucp1 in BAT and genes involved in Ca^{2+} cycling and Ucp3 in gastrocnemius muscle was evaluated using qPCR. UCP1 protein was measured by western blotting and proteomics in BAT. Proteomic analysis

was also used to analyze differences in metabolic proteins in BAT and gastrocnemius muscle. In both BAT and skeletal muscle, respiration (consumption of oxygen by mitochondria) of cells after adding substrates and inhibitors was measured. The maximal heat production (**HPmax**), maximal norepinephrine stimulated heat production (**NEmax**) and resting heat production (**HPrest**) were evaluated using indirect calorimetry. Glucose uptake was measured by positron emission tomography/computed tomography (**PET/CT**) in fasted, anesthetised mice injected by 18-fluorodeoxyglucose (**18FDG**), and kept one hour in in 4°C cold room. LC-MS-based lipidomics and metabolomics were measured in both BAT and gastrocnemius muscle. Results were analyzed by partial least squares-discriminant analysis (**PLSDA**) and variable importance in projection (**VIP**) score was obtained.

11.3 Publication C

Six- weeks old male B6/N mice fed STD were maintained at 20°C for 7 weeks. At 13 weeks of age, mice were randomly divided into groups with various diets: control group fed STD; a corn oil-based HFD (~35% wt/wt as lipids) and HFD-based diet, in which 15% (wt/wt) of dietary lipids was replaced with EPAX 1050TG concentrate (**HFF**; Epax 1050 TG contained ~14% eicosapentaenoic acid (**EPA**) and ~46% DHA, wt/wt; total EPA + DHA concentration of ~30 g/kg diet; EPAX AS, Aalesund, Norway). Two experiments differing in time-frame were performed; with feeding lasting either 1 or 8 weeks. Animals were dissected under ether anesthesia in a randomly fed state at the age of 14 or 21 weeks, respectively, between 8 and 10 a.m.eWAT was collected.

Expression of genes involved in adipogenesis, metabolism of PUFA and inflammation was measured in eWAT or adipocytes and stromal vascular fraction (**SVF**)

isolated from eWAT. Lipid mediators were evaluated in eWAT extracts by LC-MS lipidomics. Results were analyzed by principal component analysis (PCA) and VIP score was obtained. Adipocyte size, macrophage proliferation and presence of crown like structures (CLS) and multinucleated giant cells were evaluated in eWAT sections. DNA content was measured in eWAT and adipocytes isolated from eWAT. Amount of immune cells, adipose lineage and endothelial cells was measured in eWAT-isolated SVF by flow cytometry.

12 Results and discussion

12.1 Publication A

Flachs P, Adamcova K, Zouhar P, Janovska P, Bardova K, Svobodova M, Hansikova J, Kuda O, Rossmesl M, Kopecky J. *Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype.*

CE led to activation of body temperature defense mechanisms, i.e. shivering and non-shivering thermogenesis [3,17]. To fulfil requirements of increased energy expenditure, in both murine strains, food intake was increased and energy reserves were released from adipose tissues more pronounced in A/J mice. Excessive amount of NEFA in plasma could lead to lipotoxicity. Therefore, some amount of FA is re-uptaken and re-esterified in WAT. For detection of re-esterification and DNL, measurement of ²H incorporation into molecule of glycerol and last methyl of FA from TAG by NMR was used. Activity of FA synthesis and re-esterification was more induced by 7 days cold in A/J mice in comparison to B6 mice. Induction of TAG turnover was also shown by Graneman's group using β -3 adrenergic agonist [18]. In keeping with results from NMR, gene expression of fatty acid synthase (**Fasn**) and Dgat 1 and 2 was induced more in A/J mice by CE. Gene expression of Fasn and Dgat2, enzymes involved in

FA synthesis and esterification of *de novo* synthesized FA, respectively, copied the course of the *de novo* FA synthesis measured by NMR. Immunohistochemistry staining of both DGAT1 and ATGL proteins was increased in eWAT of cold exposed mice and the increase was higher in A/J mice.

The principal finding of this publication was higher induction of futile TAG/FA cycle in eWAT in response to CE of A/J mice than of B6 mice. To summarize, we showed a link between ability to induce TAG/NEFA cycle and lean phenotype on the model of cold exposed A/J and B6 mice, which differ in their propensity to obesity. Simultaneous activation of contradictory pathways of lipolysis and FA and TAG synthesis contributes to energy balance relatively little. However, even these small changes and proper regulation of NEFA is important for metabolic flexibility and healthy metabolism.

12.1 Publication B

Janovska P, Bardova K, Vrbacky P, Adamcova K, Lenkova L, Funda J, Drahota Z, Rossmeisl M, Zouhar P, Kopecky J.
Strain-specific involvement of brown fat and muscle in cold-induced thermogenesis in mice: link to lean phenotype.

The aim of publication B was to investigate the contribution of non-shivering thermogenesis, especially in BAT and possibly in other tissues such as skeletal muscle in two murine strains A/J and B6 to difference in propensity to obesity. Previous studies using these two mouse strains showed that higher sensitivity to β -3 agonist and higher capacity to Ucp1 mRNA induction in WAT and BAT can be connected to relative resistance of A/J mice to obesity [19,20].

Heat production in mammals is represented by shivering and non-shivering thermogenesis. While during shivering thermogenesis, heat is produced by involuntary contractions of skeletal muscles, non-shivering thermogenesis is based on uncoupling of ATP synthesis from OXPHOS by

UCP1 in BAT [21]. UCP1 was concluded as the only mediator of adrenergically induced thermogenesis in brown adipocytes [22]. All three, *Ucp1* mRNA, protein and activity were activated by CE to similar levels in both mice strains. Also total capacity for non-shivering thermogenesis of iBAT, assessed by amount of UCP1 protein expressed per whole depot, did not differ between strains and was recruited by CE.

Both A/J and B6 were able to deal with CE as was proved by the similar heat production measured by INCA. The portion of HPmax, which was not stimulated by norepinephrine, was higher in A/J than B6 mice. These results led us to search for another organ than BAT involved in thermogenesis in A/J mice. PET/CT scan of glucose uptake in tissues of cold exposed mice showed higher uptake into skeletal muscle of A/J mice. Thus, there may be a UCP1-independent mechanism of heat production in skeletal muscle of A/J mice. BAT is still considered as only tissue, that is capable of non-shivering thermogenesis, however, also skeletal muscle was suggested as potential player in non-shivering thermogenesis besides its recognized role in shivering [23,24]. Sarcolipin uncoupling SERCA in skeletal muscle could lead to release of heat and energy consumption. Both SERCA2a mRNA and protein and sarcolipin protein were higher in A/J mice in comparison to B6 mice. A/J mice oxidised mainly FA as documented by higher carnitine as well as acetylcarnitine levels in gastrocnemius muscle. Also palmitoyl carnitine oxidation (assessed by Oxygraph) was more induced in A/J mice than B6 by cold. Thus, it seems that FA oxidation in muscle of B6 mice is not that sufficient and that acylcarnitines accumulate in mitochondria rather than being processed. This is consistent with higher *Ucp3* mRNA content in B6 skeletal muscle and UCP3 role in skeletal muscle generally. UCP3 attenuates mitochondrial production of free radicals and protects against oxidative damage thanks to activation of UCP3 by reactive oxygen species and by-

products of lipid peroxidation. In addition, UCP3 transports excessive FA out of mitochondria protecting it from toxic effects of FA anions and peroxides [25,26]. Thus, these results suggest, that B6 mice have slower turnover of FA in skeletal muscle than A/J mice and rather protects themselves by increased UCP3 against oxidative damage.

To conclude, non-shivering thermogenesis in BAT does not contribute to lean phenotype of A/J mice. They rather rely on thermogenesis in muscle which could be connected to their healthier phenotype together with increased TAG/FA cycling in WAT [27] and some not yet discovered pathways. Together, we showed that Ca^{2+} cycling could be the hidden player in UCP-independent thermogenesis in A/J mice.

12.2 Publication C

Adamcova K*, Horakova O*, Bardova K*, Janovska P, Brezinova M, Kuda O, Rossmeisl M, Kopecky J. *Reduced Number of Adipose Lineage and Endothelial Cells in Epididymal fat in Response to Omega-3 PUFA in Mice Fed High-Fat Diet.*

The principal finding of this study was that non-immune CD45⁻ cells, mainly preadipocytes and endothelial cells are limited in HFF group as compared to HFD group. The results show high remodeling of eWAT by HFD and HFF feeding. Both hypertrophy and hyperplasia were observed in both HFD and HFF groups. However, in the HFF group n-3 supplementation partially counteracted these processes, as seen by quantification of DNA (a marker of cell number in the tissue) and adipocyte size.

As adipocytes grow, they reach their limit and die, which triggers inflammatory processes. Macrophages are the key immune cells in AT, they aggregate around dying adipocytes, forming so called crown-like structures, and begin to remove adipocytes residues [28]. The same amount of

macrophages was observed between HFD and HFF groups at Week 8 by both immunohistochemistry and flow cytometry. However, individual populations of macrophages probably influenced inflammatory balance of eWAT. M2/M1 ratio tended to be augmented in HFF group at both Week 1 and Week 8 as compared to HFD group and the difference between dietary groups tended to increase in time. Immune cells, overall, did not contribute to observed changes in cell numbers by n-3 PUFA. However, immune cells together with adipocytes contributed to setting balance on pro-resolving side in HFF group by reduced expression of pro-inflammatory *Nos2*, *Tnfa*, *Tgfb*, *IL1β* and *Ccl2* genes. Therefore, higher pro-inflammatory profile of HFD mice compared to HFF mice was confirmed by qPCR. Also, induction of anti-inflammatory 5-, 12- and 15-HEPE and 17,18- diHETE and decrease in pro-inflammatory 5-,8- and 15- HETE were observed in HFF group.

CD45⁺ cells were more in accordance with DNA data, especially preadipocytes and endothelial cells. Prostaglandin E2, that augments angiogenesis [29], was reduced in HFF as compared to HFD group and could contribute to reduction in endothelial cells. Increased percentage of proliferating CD45⁺ cells suggests elevated turnover of these cells (preadipocytes and endothelial cells). This is in strong contrast with numbers of preadipocytes and endothelial cells and leads to speculation about involvement of some kind of cell death. Indeed, n-3 PUFA supplementation was described as inducer of apoptosis in WAT, previously [30-32].

Eventhough, immune cells numbers did not react to n-3 PUFA supplementation, polarization of macrophages, numbers of bioactive compounds produced by immune cells influenced immune balance and adipose lineage cells amount and turnover and contributed to remodeling of AT. Adipose lineage cells, primarily preadipocytes, and endothelial cells are the key players in prevention of diet induced WAT hyperplasia by n-3

PUFA. In conclusion, n-3 PUFA supplementation had antiadipogenic effect during development of obesity by limiting both hypertrophy and hyperplasia of cells in AT.

13 Conclusions

In conclusion, this PhD thesis shows that:

- 1) CE-induced lipolysis led to the mobilization of lipid stores in all AT depots. This reduction was more pronounced in A/J mice. It was compensated by increased food intake, however, there was no difference between strains and no sign of cold intolerance in A/J mice. Consequently, CE induced re-esterification and DNL in order to avoid lipotoxicity of FA. A/J mice responded with higher flexibility to cold-induced stress than B6 mice. TAG/FA futile cycle contributes to energy expenditure relatively little. However, even these small changes and proper regulation of NEFA could be important for metabolic flexibility and a healthy metabolism.
- 2) A higher metabolic rate in BAT was not linked with the healthy phenotype of A/J mice, which rather relied on thermogenesis in muscle. Both Ucp1 mRNA and protein were induced by CE similarly in BAT of A/J and B6 mice, which corresponded to the functional test of BAT mitochondria by Oxygraph. However, both glucose uptake (measured by PET/CT) and proteomics in BAT revealed higher glucose utilization of B6 mice in comparison to A/J mice. On the contrary, glucose uptake was shown to be higher in muscle in A/J mice in comparison to B6 by PET/CT measurement. Also, lipid metabolism was induced in muscle more in A/J than in B6 mice. In addition, Ca²⁺ cycling, measured on mRNA and protein levels of

involved enzymes was increased in A/J mice. These results support the idea, that muscle thermogenesis is the link with the healthy phenotype of A/J mice.

- 3) HFD supplemented by n-3 PUFA prevented WAT hyperplasia by reducing the number of preadipocytes and endothelial cells. Interestingly, a higher proliferation of these cells was shown suggesting increased turnover of preadipocytes and endothelial cells. Immune cells were not affected by n-3 PUFA quantitatively. However, the HFD-induced-decrease in M2/M1 macrophages ratio was prevented by n-3 PUFA. Moreover, the polarization of macrophages, many bioactive compounds produced by immune cells influenced immune and adipose lineage cells balance and contributed to the remodeling of AT. In conclusion, n-3 PUFA supplementation limits both hypertrophy and hyperplasia in eWAT during obesity development.

14 Curriculum vitae

Date and place of birth: 25.5.1990, České Budějovice

Nationality: Czech

Education:

Ph.D. study of Animal Physiology 2015-2021

Research project: Induction of lipid catabolism and mitochondrial biogenesis in white adipose tissue as therapeutic target for obesity and associated metabolic disorders

M.Sc. study of Clinical and toxicological analysis 2012-2014
Thesis: Occurrence of β -rutosidase in eukaryotic microorganisms

B.Sc. study of Clinical and toxicological analysis 2009-2012
Thesis: Substrate specificity of recombinant α -L-rhamnosidase

Conferences:

- 2015 ■ **„EMBO - Nuclear receptors: From molecules to humans”, Ajaccio; „Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2015”, Desná v Jizerských horách**
- 2016 ■ **„84th EAS CONGRESS”, Innsbruck; „Česká lipidomická konference”, Prague; „Heidelberg International Symposium on Diabetic Complications”, Heidelberg; „Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2016”, Zahrádky u České Lípy**
- 2017 ■ **„International symposium on insulin receptor and insulin action in connection with 5th DZD Diabetes Research School for Graduate Students and Postdocs 2017”, Nice; „EMBO: Brown adipose tissue”, Sitges; „Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2017”, Dvůr Králové**

- 2018 ■ „EASD 2018”, Berlin; „Czech-Slovak conference: Bioenergetika 2018”, Vranovská Ves
- 2019 ■ „CPHBAT 2019 Brown and white adipose in metabolism -Plasticity and metabolic crosstalk”, Kobehavn; „Lipid Meeting”, Leipzig
- 2020 ■ „ECO ICO 2020”, virtual meeting

15 Souhrn všech publikací (List of scientific publications)

15.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Flachs P*, Adamcova K*, Zouhar P, Janovska P, Bardova K, Svobodova M, Hansikova J, Kuda O, Rossmeisl M, Kopecky J. Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype. *International Journal Obesity*. 2017; 41: 372–380. IF=4.36 (2020)

* These authors contributed equally

Adamcova K*, Horakova O*, Bardova K*, Janovska P, Brezinova M, Kuda O, Rossmeisl M, Kopecky J. Reduced number of adipose lineage and endothelial cells in epididymal fat in response to omega-3 PUFA in mice fed high-fat diet. *Marine Drugs*. 2018; 16 (12): 515-534. IF=3.81 (2020)

* These authors contributed equally

Publication under preparation:

Janovska P, Bardova K, Vrbacky P, Adamcova K, Lenkova L, Funda J. Drahota Z, Rossmeisl M, Zouhar P, Kopecky J.

Strain-specific involvement of brown fat and muscle in cold-induced thermogenesis in mice: link to lean phenotype

15.2 Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Paluchova V, Oseeva M, Brezinova M, Cajka T, Bardova K, **Adamcova K**, Zacek P, Brejchova K, Balas L, Chodounska H, Kudova E, Schreiber R, Zechner R, Durand T, Rossmesl M, Abumrad N, Kopecky J, Kuda O. Lipokine 5-PAHSA is regulated by adipose triglyceridelipase and primes adipocytes for *de novo* lipogenesis in mice. *Diabetes*. 2020; 69: 300-312. IF=6.73 (2020)

Janovska P, Melenovsky V, Svobodova M, Havlenova T, Haluzik M, Hoskova E, Pelikanova T, Kautzner J, Monzo L, Jurcova I, **Adamcova K**, Lenkova L, Buresova J, Rossmesl M, Kuda O, Cajka T, Kopecky J. Dysregulation of epicardial adipose tissue in cachexia due to heart failure: the role of natriuretic peptides and cardiolipin. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2020; IF= 9.80 (2020)

Bardova K, Funda J, Pohl R, Cajka T, Hensler M, Kuda O, Janovska P, **Adamcova K**, Irodenko I, Lenkova L, Zouhar P, Horakova O, Flachs P, Rossmesl M, Colca J, Kopecky J. Additive effects of omega-3 fatty acids and thiazolidinediones in mice fed a high-fat diet: triacylglycerol/fatty acid cycling in adipose tissue. *Nutrients*. 2020; IF 4.55 (2020)

16 Seznam literatury (Reference list)

1. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV (2018) Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab* 27: 68-83.

2. Trayhurn P (2017) Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. *Biochimie* 134: 62-70.
3. Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359.
4. Pant M, Bal NC, Periasamy M (2016) Sarcolipin: A Key Thermogenic and Metabolic Regulator in Skeletal Muscle. *Trends Endocrinol Metab* 27: 881-892.
5. Bal NC, Sahoo SK, Maurya SK, Periasamy M (2018) The Role of Sarcolipin in Muscle Non-shivering Thermogenesis. *Front Physiol* 9: 1217.
6. Bluher M (2020) Metabolically Healthy Obesity. *Endocr Rev* 41.
7. Kopecky J (2001) Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes. 674th Meeting of the Biochemical Society, Dublin 29: 791-797.
8. Wang T, Zang Y, Ling W, Corkey BE, Guo W (2003) Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *ObesRes* 11: 880-887.
9. Leibel RL, Hirsch J, Berry EM, Gruen RK (1985) Alterations in adipocyte free fatty acid re-esterification associated with obesity and weight reduction in man. *Am J Clin Nutr* 42: 198-206.
10. Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J (2015) Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1851: 503-518.
11. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB (2016) Adipose Tissue Remodeling: its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology* 7.

12. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M (2012) Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends EndocrinolMetab* 23: 407-415.
13. Kuda O, Rombaldova M, Janovska P, Flachs P, Kopecky J (2016) Cell type-specific modulation of lipid mediator's formation in murine adipose tissue by omega-3 fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 469: 731-736.
14. da Cunha de Sa RDC, Cruz MM, de Farias TM, da Silva VS, de Jesus Simao J, et al. (2020) Fish oil reverses metabolic syndrome, adipocyte dysfunction, and altered adipokines secretion triggered by high-fat diet-induced obesity. *Physiol Rep* 8: e14380.
15. Chen CY, Su CW, Kang JX (2020) Endogenous Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce the Number and Differentiation of White Adipocyte Progenitors in Mice. *Obesity (Silver Spring)* 28: 235-240.
16. Flachs P, Rossmeisl M, Kuda O, Kopecky J (2013) Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. *BiochimBiophysActa* 1831: 986-1003.
17. Nedergaard J, Cannon B (2004) Brown adipose tissue: Development and function. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and neonatal physiology: SAUNDERS An imprint of Elsevier*. pp. 404-415.
18. Mottillo EP, Balasubramanian P, Lee YH, Weng C, Kershaw EE, et al. (2014) Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res* 55: 2276-2286.
19. Collins S, Daniel KW, Petro AE, Surwit RS (1997) Strain-specific response to beta3-adrenergic receptor

- agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology* 138: 405-413.
20. Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, et al. (1998) Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci US A* 95: 4061-4065.
 21. Meyer CW, Willershauser M, Jastroch M, Rourke BC, Fromme T, et al. (2010) Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1396-R1406.
 22. Matthias A, Ohlson KB, Fredriksson JM, Jacobsson A, Nedergaard J, et al. (2000) Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem* 275: 25073-25081.
 23. Aydin J, Shabalina IG, Place N, Reiken S, Zhang SJ, et al. (2008) Nonshivering thermogenesis protects against defective calcium handling in muscle. *FASEB J* 22: 3919-3924.
 24. Jansky L (1973) Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol Rev Camb Philos Soc* 48: 85-132.
 25. Echtay KS (2007) Mitochondrial uncoupling proteins-- what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43: 1351-1371.
 26. Schrauwen P, Hesselink M (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol* 205: 2275-2285.
 27. Flachs P, Adamcova K, Zouhar P, Marques C, Janovska P, et al. (2017) Induction of lipogenesis in white fat

- during cold exposure in mice: link to lean phenotype. *Int J Obes (Lond)* 41: 372-380.
28. Catrysse L, van Loo G (2018) Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell Immunol* 330: 114-119.
 29. Szymczak M, Murray M, Petrovic N (2008) Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood* 111: 3514-3521.
 30. Kim HK, Della-Fera M, Lin J, Baile CA (2006) Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 136: 2965-2969.
 31. Todorcovic M, Hodson L (2015) The Effect of Marine Derived n-3 Fatty Acids on Adipose Tissue Metabolism and Function. *J Clin Med* 5.
 32. Yin H, Zhou Y, Zhu M, Hou S, Li Z, et al. (2013) Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion* 13: 209-224.