

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.
Oddělení biologie tukové tkáně

Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences
Department of Adipose Tissue Biology

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physiology



Autoreferát disertační práce

Synopsis of the PhD thesis

**Význam metabolismu tukové tkáně pro celotělovou
energetickou rovnováhu**

**Importance of adipose tissue metabolism for whole-body
energy balance**

Petr Zouhar

Praha / Prague

2015

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. Stanislav Vybíral, CSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. / Institute of Physiology CAS, v. v. i.

Autor / Author: RNDr. Petr Zouhar

Školitel / Supervisor: RNDr. Pavel Flachs, PhD

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

Obsah / Contents

ČESKÁ ČÁST (CZECH PART)

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abstrakt | 4 |
| Teoretický úvod | 5 |
| Cíle práce | 6 |
| Experimentální design a metody | 6 |
| Publikace A | 7 |
| Publikace B | 7 |
| Publikace C | 8 |
| Výsledky a diskuse | 8 |
| Publikace A: Účinky kyseliny chenodeoxycholové (CDCA) na energetickou rovnováhu a aktivaci tukové tkáně | 8 |
| Publikace B: Kombinace ω -3 vícenenasycených mastných kyselin a mírné kalorické restrikce při prevenci dietou indukované obezity | 9 |
| Publikace C: Chladem indukované změny v bílé a tukové tkáni myši v závislosti na kmenu | 10 |
| Závěry | 10 |
| Životopis | 12 |
| Seznam všech impaktovaných publikací | 13 |

ANGLICKÁ ČÁST (ENGLISH PART)

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abstract | 14 |
| Theoretical introduction | 15 |
| Aims of the thesis | 16 |
| Experimental design and methods | 16 |
| Publication A | 17 |
| Publication B | 17 |
| Publication C | 18 |
| Results and discussion | 18 |
| Publication A: Effects of chenodeoxycholic acid (CDCA) on energy balance and adipose tissue activation | 18 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Publication B: Combination of ω -3 polyunsaturated acids and mild calorie restriction in prevention of diet-induced obesity | 19 |
| Publication C: Strain-dependent cold-induced changes in brown and white adipose tissue | 20 |
| Conclusion | 20 |
| Curriculum vitae | 22 |
| List of scientific publications | 23 |
| | |
| Seznam literatury / List of references | 24 |
| Příloha / Appendix | 25 |

Abstrakt

Tuková tkáň hraje klíčovou roli v udržování homeostáze živin a energie. Rozšíření obezity a s ní souvisejících metabolických poruch nabývá v současnosti rozměrů pandemie, a nemalé úsilí je proto věnováno vývoji nových léčebných postupů, které by tento stav mohly zvrátit. Při plnění tohoto cíle se přitom zvažuje i možná modulace aktivity tukové tkáně, a to trojím možným způsobem: 1) indukci spalování energie v hnědé tukové tkáni závislého na odpřahovacím proteinu UCP1; 2) „hnědnutím“, tj. konverzí bílé tukové tkáně na „hnědou“; a 3) stimulací termogeneze v bílé tukové tkáni bez zapojení UCP1.

Tato práce je založena na dvou publikovaných studiích a jednom článku v přípravě. Na modelu laboratorní myši zkoumá možné ovlivňování všech třech výše zmíněných procesů a to pomocí: 1) suplementace diety žlučovými kyselinami; 2) kombinovaného působení ω -3 vícenenasycených mastných kyselin a kalorické restrikce; a 3) chladové expozice.

V pokusech s podáváním žlučových kyselin (konkrétně kyseliny chenodeoxycholové) jsme potvrdili indukci proteinu UCP1 jak v hnědé, tak v podkožní bílé tukové tkáni, což bylo spojeno s reverzí obezity. Většina příznivých účinků byla nicméně způsobena přechodným poklesem spotřeby potravy, zatímco aktivace termogeneze v hnědém tuku patrně může hrát významnější roli pouze při dlouhodobějším působení.

V druhé sérii pokusů bylo prokázáno, že kombinace mírné kalorické restrikce a příjmu ω -3 vícenenasycených mastných kyselin pomáhá předcházet rozvoji obezity vyvolané nadměrným příjmem tuků. Děje se tak prostřednictvím stimulace katabolismu lipidů v epididymální bílé tukové tkáni. Mitochondrie jsou přitom plně spřažené, takže uvolněná energie musí být zužitkována jiným způsobem – pravděpodobně je použita k syntéze triglyceridů a mastných kyselin, jejíž obrat je také navýšen.

Existence indukovatelného substrátového cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin v epididymální tukové tkáni byla potvrzena také na modelu myši vystavených po 7 dní chladu. Syntéza triglyceridů byla výrazněji zvýšena u myši kmene AJ (ve srovnání s kmenem B6), což může souviset s rezistencí AJ myši k dietou indukované obezitě. Flexibilnější cyklování lipidů u AJ zvířat tak může přispívat k ochraně metabolismu před nepříznivým působením zvýšeného příjmu tuků.

Ačkoli „hnědnutí“ bílé tukové tkáně, ani výše popsané prázdné substrátové cykly patrně nemohou významněji ovlivnit energetický výdej na celotělové úrovni, stále mohou příznivě působit na homeostázu lipidů v plazmě a tkáních a předcházet tak glukózové intoleranci.

Teoretický úvod

Tuková tkáň hraje klíčovou roli při uskládění energetických zásob ve formě netoxických triglyceridů. Morfologicky a funkčně rozlišujeme minimálně dva typy tukové tkáně: Bílá tuková tkáň je tvořena převážně uniloculárními adipocyty s malým množstvím mitochondrií. Ve srovnání s jinými tkáněmi je metabolicky poměrně málo aktivní a slouží především jako úložiště lipidů. Vedle toho produkuje ale také velké množství signálních molekul ovlivňujících metabolismus řady dalších orgánů.

Vedle toho se u savců vyskytuje i tzv. hnědá tuková tkáň tvořená multiloculárními adipocyty s vysokým obsahem odpáhovacího proteinu UCP1. Tato tkáň je uzpůsobena k rychlému odbourávání uložených lipidů v mitochondriích, přičemž nashromážděnou energii uvolňuje prostřednictvím UCP1 ve formě tepla. Hnědá tuková tkáň hraje klíčovou roli při adaptaci na chladné prostředí. Vyskytuje se u většiny savčích druhů - nedávno byla prokázána i u dospělého člověka. Je aktivována prostřednictvím sympatického nervového systému v reakci na chlad či jiné podněty (patrně i na potravu s nízkým obsahem proteinů). I malé množství aktivovaného hnědého tuku může zásluhou UCP1 vykazovat vysoký metabolický obrat a zvyšovat výrazně celkový energetický výdej těla (Cannon and Nedergaard 2004). Indukce UCP1 v hnědé tukové tkáni je proto jedním z možných terapeutických cílů při potlačování obezity a s ní spojených zdravotních komplikací.

U hlodavců byl při adrenergní stimulaci pozorován výskyt multiloculárních adipocytů i v některých depech bílé tukové tkáně (typicky např. v podkoží). Tyto buňky označujeme za "brite" (brown-in-white) adipocyty a proces jejich aktivace za "hnědnutí" bílé tukové tkáně. Za fyziologických podmínek je patrně příspěvek "brite" adipocytů k celkovému energetickému výdeji ve srovnání s klasickým hnědým tukem spíše druhotný.

Vedle noradrenalinu byla identifikována řada dalších látek, které mohou přispívat k indukci UCP1 v hnědém a hnědnoucím bílém tuku. Můžeme jmenovat např. thyroïdní hormony, natriuretické peptidy, žlučové kyseliny, irisin, FGF21, některé neuropeptidy a další (viz review (Bonet, et al. 2013; Villarroya and Vidal-Puig 2013)). Tyto látky jsou proto zkoumány z hlediska jejich potenciálu ovlivnit tělesnou energetickou bilanci.

Zvýšení energetického výdeje není ale jedinou cestou, jak může tuková tkáň přispívat k uchování metabolického zdraví. Bílá tuková tkáň pufruje hladiny lipidů v plazmě a tím ovlivňuje citlivost ostatních tkání k inzulínu. K tomu je nutná značná flexibilita procesů lipolýzy, popř. syntézy triglyceridů (tj. esterifikace mastných kyselin). I relativně málo metabolicky aktivní klasická bílá tuková tkáň tak může hrát významnou roli při regulaci hladiny lipidů v plazmě a lokální adiposity. Modulace aktivity bílého tuku je tedy i bez aktivace UCP1 dalším možným terapeutickým cílem při snahách o prevenci a léčbu metabolického syndromu.

Cíle práce

Obecným cílem práce bylo zkoumání možných modulace energetické rovnováhy organismu, zejména skrze ovlivnění metabolických toků v hnědé i bílé tukové tkáni. Hlavní důraz byl přitom kladen na konkrétní roli stimulované funkce mitochondrií, disipaci energie pomocí odpřahovacího proteinu UCPI a prázdné substrátové cyklování nezávislé na UCPI.

Konkrétní cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

1) ověření očekávaného stimulačního účinku žlučové kyseliny chenodeoxycholové (CDCA) na aktivaci hnědé tukové tkáně myši a zhodnotit příspěvek zvýšeného výdeje energie k celotělové energetické rovnováze;

2) zkoumání možných účinků CDCA na "hnědnutí" některých dep bílé tukové tkáně a posouzení fyziologického významu tohoto procesu v kontextu celého organismu;

3) studium potenciálu mírné kalorické restrikce v kombinaci s podáváním ω -3 vícenenasycených mastných kyselin při předcházení nepříznivých účinků zvýšeného příjmu tuků v potravě a popis mechanismu tohoto působení s přihlédnutím k pravděpodobnému zapojení mitochondrií v bílé tukové tkáni;

4) charakterizace modelu chladové adaptace dvou různých kmenů myši (AJ a B6 myši) lišících se náchylností k obezitě a s ní spojeným poruchám; pozorování aktivace hnědé tukové tkáně a hnědnutí podkožního bílého tuku u těchto zvířat;

5) ověření pravděpodobné role prázdného substrátového cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin v bílé tukové tkáni při použití výše popsaného modelu chladové expozice; srovnání těchto efektů s účinky kombinace kalorické restrikce a ω -3 vícenenasycených mastných kyselin.

Experimentální design a metody

Základem všech zde prezentovaných experimentů jsou pokusy s myším modelem, popř. doplněné o výsledky získané na primárních buněčných kulturách (jako v publikaci B). Myši kmene C57BL/6J byly získány z Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA) a po několik generací množeny v našem ústavním zvěřinci (publikace A a B). Základní dietou byla standardní laboratorní dieta (**STD**; obsah energie $13.0 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$, $\sim 35.2\% \text{ wt} \cdot \text{wt}^{-1}$ ve formě lipidů, extrudovaná R/M-H diet, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Německo). V pokusech s chladovou expozicí (publikace C), byly myši kmene C57BL/6J BomTac (**B6**) obědnány přímo od firmy Taconic (Dánsko) a myši kmene A/JOLA Hsd (**AJ**) z Harlanu (UK).

S výjimkou publikace C byla zvířata po celou dobu ustájena při teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 12:12 hodinovém světelném cyklu s volným přístupem k vodě i (není-li řečeno jinak) k potravě. Myši

byly během experimentů umístěny v klecích po jedné. Tělesná hmotnost a příjem potravy byly kontrolovány nejméně každý týden.

Publikace A

Myši samci byli od věku 2 měsíců po 4 měsíce krmeni dietou zvýšeným obsahem lipidů (**cHF** - kompozitní vysokotuká dieta; obsah energie 22.8 kJ.g^{-1} , $\sim 35.2\% \text{ wt.wt}^{-1}$ ve formě lipidů, zejména kukuřičného oleje (Kuda, et al. 2009)), což vedlo k rozvoji obezity. Tato zvířata byla následně zařazena do 2 různých experimentů:

V **8-týdenní reverzi** byly myši náhodně rozděleny do třech pokusných skupin ($n = 10-12$ na skupinu) a krmeny 8 týdnů ad libitum jednou z následujících diet: cHF dietou, cHF dietou doplněnou o 0,5% chenodeoxycholovou kyselinu (CDCA), nebo cHF dietou doplněnou o 1% CDCA.

Během 6. týdne intervence podstoupilo 5 zvířat z každé skupiny orální **glukózový toleranční test** (OGTT). V 8. týdnu byla zvířata usmrcena (mezi 8:30 a 10:30 hod.) a vzorky plazmy, svalů, jater, epididymálního a podkožního tuku byly zamraženy pro pozdější analýzy. **Obsah triglyceridů** byl stanoven v játrech a svalu m. gastrocnemius. V plazmě byla určena **hladina triglyceridů, volných mastných kyselin, cholesterolu, glukózy, inzulinu, adiponectinu, a jaterních enzymů**. Dále byl stanoven obsah triglyceridů a cholesterolu v trusu.

Při **3-týdenní reverzi** byla zvířata po 4 měsících krmění vysokotukou dietou rozdělena do experimentálních skupin ($n = 8$ na skupinu) a po následující 3 týdny podrobena následujícímu dietnímu režimu: (1) krmění cHF ad libitum; (2) krmění cHF doplněnou o 1% CDCA ad libitum; a (3) pair-feeding cHF dietou (**PF**, tj. příjem potravy těchto zvířat byl omezen na množství diety sežrané skupinou na 1% CDCA diet. Jako 4. skupina byla zařazena zvířata krměná od odstavu STD dietou ($n = 7$). V tomto konkrétním experimentu byla tělesná hmotnost a spotřeba potravy kontrolována 4-krát týdně. Mezi 15. a 17. dnem intervence byla zvířata podrobena měření na **nepřímé kalorimetrii**. Po třech týdnech byly myši usmrceny a vzorky hnědé tukové tkáně, podkožní a epididymální bílé tukové tkáně byly zamraženy pro další analýzy. Později byly tyto tkáně analyzovány metodami **imunohistochemie, real-time kvantitativní PCR a imunoblotováním**.

Publikace B

Za účelem ověření výsledků tohoto projektu bylo provedeno hned několik experimentů, všechny však sledovaly stejné schéma. 2-měsíční myši samci byli vystaveni po 2 týdny krmění cHF dietou a následně po 5 nebo 15 týdnů jednomu ze 4 následujících dietních režimů: (1) cHF dieta, *ad libitum*; (2) cHF doplněná koncentrátem ω -3 vícenenasycených mastných kyselin ($46\% \text{ wt.wt}^{-1}$ DHA, $14\% \text{ wt.wt}^{-1}$ EPA, produkt EPAX 1050 TG, EPAX, Ålesund, Norsko) nahrazujícím $15\% \text{ wt.wt}^{-1}$ lipidů v dietě (cHF+F), *ad libitum*; (3) cHF+CR, tj. cHF s kalorickou restrikcí (CR - množství diety bylo ve srovnání se zvířaty krměnými ad libitum sníženo o $10\% \text{ wt.wt}^{-1}$); (4) cHF+F+CR (tj. cHF doplněná ω -3 koncentrátem, s 10% kalorickou restrikcí).

Ve 4. týdnu proběhly v jednotlivých experimentech **orální glukózový toleranční test, nepřímá kalorimetrie a sledování fyzické aktivity**. V 5. týdnu byl zvířatům odebrán vzorek plazmy v systém a hladovém stavu pro **stanovení metabolické flexibility**. Po 5 nebo 15 týdnech byla zvířata usmrcena a vzorky plazmy a některých tkání byly zamraženy pro pozdější analýzy.

Zároveň proběhly během disekce některé ex vivo analýzy, konkrétně **stanovení oxidace mastných kyselin** ve svalu m. gastrocnemius a m. soleus a **stanovení syntézy mastných kyselin** v epididymální tukové tkáni. V **čerstvě izolovaných adipocytech** z epididymálního tuku byla rovněž změřena oxidace mastných kyselin a dále **mitochondriální oxidační kapacita**. Z části zvířat (n=8) byla připravena **kultura primárních hepatocytů**, v níž byla druhý den rovněž stanovena oxidace mastných kyselin.

Publikace C

6-týdenní samci kmenů B6/J a AJ byli v klecích po 3 drženy alespoň jeden týden v termoneutralní teplotě (30 °C). Následně byla část myši (n = 9 zvířat každého kmene) ponechána v termoneutralitě jako kontroly, zatímco zbytek zvířat byl přesunut na 2 nebo 7 dní do 4 °C (n = 9, respektive n = 6 od každého kmene). Myši byly krmeny STD dietou.

Večer, 40 hodin před disekcí, byla zvířata injikována solným roztokem v deuterium oxidu (9 mg.ml⁻¹ NaCl, 99.9% ²H₂O; dávka [ml] – hmotnost myši [g] x 0.7 x 0.05) za účelem dosažení 5% obohacení tělní vody o ²H₂O. Myši následně dostávaly 5% ²H₂O jako pitnou vodu, aby se hladina ²H v jejich těle stabilizovala.

Na konci experimentu byly myši v ranních hodinách usmrceny a vzorky plazmy a tkání se zamrazily pro další použití. V plazmě byla později určena **koncentrace lipidů** a bílá tuková tkáň byla použita pro **histologickou analýzu** a **analýzu genové exprese**. Z dalšího alikvotu epididymálního tuku byly purifikovány triglyceridy a tyto vzorky pak byly spolu s kontrolními plazmami odeslány do laboratoře Johna G. Jonese na University of Coimbra. Během své stáže na této instituci jsem pak v těchto vzorcích pomocí **nukleární magnetické rezonance** stanovoval **obohacení triglyceridů o ²H**.

Výsledky a diskuse

Publikace A: Účinky kyseliny chenodeoxycholové (CDCA) na energetickou rovnováhu a aktivaci tukové tkáně.

V souladu s literaturou (Watanabe, et al. 2006; Watanabe, et al. 2012) jsme při 8-týdenním podávání 0,5% a 1% CDCA pozorovali reverzi dietou indukované obezity u myši vystavených po 4 měsíce dietě s vysokým obsahem tuků. V závislosti na dávce CDCA byly zlepšeny i parametry citlivosti k inzulinu a glukózové tolerance (vyjádřené např. jako plocha pod glykemickou křivkou při orálním glukózovém tolerančním testu). V literatuře jsou tyto účinky připisovány stimulaci hnědé tukové tkáně žlučovými kyselinami skrze membránový receptor TGR5. Nicméně srovnání růstových křivek a dat o příjmu potravy v našem případě naznačilo, že nejvýraznější pokles hmotnosti nastává během přechodného snížení spotřeby potravy v průběhu prvního týdne po začátku podávání CDCA.

Provedli jsme proto druhý, kratší (4-týdenní) pokus s reverzí dietou indukované obezity podáváním 1% CDCA v potravě. Tentokrát byla ovšem zahrnuta i pair-fed skupina (PF) krmená kontrolní vysokotukovou dietou v množství odpovídajícím příjmu potravy zvířat krmených dietou s přídatkem CDCA. Srovnání kontrolní, CDCA a PF skupiny umožnilo odlišit účinky CDCA

zprostředkované omezením příjmu potravy od těch, jež by mohly být způsobeny přímo aktivací hnědé tukové tkáně.

Hmotnostní úbytek byl stejný u PF i CDCA skupiny. Stanovení množství UCP1 proteinu v hnědé tukové tkáni však odhalilo určité zvýšení u CDCA skupiny jež nebylo možno vysvětlit změnami v příjmu potravy. Imunohistochemická analýza odhalila mírně zvýšené množství UCP1- pozitivních buněk rovněž v podkožní bílé tukové tkáni. Srovnání stimulovatelnosti hnědé a podkožního tuku ale naznačuje výrazně větší význam pochodů v hnědé tukové tkáni.

Stanovení energetického výdeje metodou nepřímé kalorimetrie neodhalilo žádné zvýšení metabolického obratu v souvislosti s aktivací hnědé tuku. V případě respiračního kvocientu ukázalo srovnání CDCA a PF skupiny nevýraznou tendence k pálení lipidů u CDCA zvířat. V souladu s naším předpokladem jsme prokázali roli CDCA při aktivaci hnědé tuku a při spouštění "hnědnutí" podkožního bílého tuku. Tyto efekty mohou mít význam při zachování štíhlého fenotypu v delším časovém horizontu, což je ovšem pod rozlišovací schopností metody nepřímé kalorimetrie. Většina okamžitých efektů je způsobena spíše přechodným snížením příjmu potravy během habituace na nový typ diety, což je jev, jež nebyl v předchozích pracích plně doceněn.

Publikace B: Kombinace ω -3 vícenenasycených mastných kyselin a mírné kalorické restrikce při prevenci dietou indukované obezity

Zatímco příjem potravy s vysokým obsahem tuku vede u myši již během 6 týdnů k rozvoji obezity, jak suplementace potravy ω -3 vícenenasycenými mastnými kyselinami, tak 10% kalorická restrikce, zejména však kombinace těchto dvou přístupů rozvoj obezity brzdí, nebo mu zcela brání. To je spojeno se zlepšením glukózové tolerance (snížená plocha pod glykemickou křivkou při glukózovém tolerančním testu), inzulínové senzitivity (nižší HOMA index) i metabolické flexibility (větší rozdíly v lipidémii a glykémii mezi systém a hladovým stavem).

Analýza genové exprese odhalila specificky v epididymální bílé tukové tkáni synergistické navýšení množství mRNA u markerů mitochondriální biogeneze (PGC-1 α , Nrf, CyOX3), oxidace mastných kyselin (Ppara, Vlcad, Lcad), ale i syntézy mastných kyselin (Fas) a glyceroneogeneze (Pepck), zatímco množství Ucp1 zůstává nízké. To ukazuje na zvýšený katabolismus lipidů v plně spážených mitochondriích, což bylo potvrzeno i biochemickými měřeními oxidace ¹⁴C-značeného palmitátu a oxidační kapacity mitochondrií s použitím kyslíkové elektrody (viz *Obrázek 1* v Příloze). Vzniklé ATP může být naopak spotřebováno procesy zvýšené lipogeneze - dochází zde tedy patrně k prázdnému substrátovému cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin (Flachs, et al. 2013).

Paralelně dochází působením kombinované intervence v epididymálním tuku k proměně profilu lipidových mediátorů odvozených od vícenenasycených mastných kyselin. Synergisticky je navýšena zejména hladina neuroprotektinu D1 a 15-deoxyprostaglandinu J2, které působí protizánětlivě. Kombinace kalorické restrikce a ω -3 vícenenasycených mastných kyselin tedy vykazuje široké spektrum účinků projevujících se zejména v epididymální tukové tkáni zvýšeným katabolismem lipidů.

Publikace C: Chladem indukované změny v bílé a tukové tkáni myši v závislosti na kmenu

Analýza změn metabolismu myších kmenů AJ a B6 během 2 až 7-denní chladové expozice prokázala postupnou adaptaci na nízké teploty. Příjem potravy se více než zdvojnásobil a v bílé tukové tkáni byla nastartována masivní lipolýza ve snaze pokrýt zvýšené náklady na termogenezi. Množství volných mastných kyselin v plazmě bylo po 2 dnech v chladu sníženo vlivem vyšší spotřeby lipidů, zatímco po 7 dnech se opět normalizovalo či ještě zvýšilo následkem nadále stimulované lipolýzy. Tyto výkyvy byly výraznější u kmene AJ, což ukazuje na vyšší metabolickou flexibilitu těchto zvířat.

Charakteristickým průvodním jevem chladové adaptace je i indukce UCPI v hnědé tukové tkáni a v některých buňkách určitých bílých tukových dep. Tento jev byl pozorován i v našem případě na úrovni mRNA. Na úrovni proteinu však byla mnohem výraznější indukce UCPI u myšičího kmene B6 než u zvířat AJ, což je překvapivé, protože v literatuře je větší citlivost k noradrenalinu přisobována naopak kmenu AJ (Collins, et al. 1997; Xue, et al. 2005). Naše výsledky, které bude ještě nutné podpořit dalšími analýzami (např. noradrenalinovým testem na nepřímé kalorimetrii), naznačují, že syntéza UCPI u AJ myši je nějakým způsobem narušena. Výsledek může být závislý na zkoumaném depu nebo myšičím podkmenu, což může částečně vysvětlovat rozdíl mezi našimi a publikovanými výsledky.

Chladová expozice stimuluje lipolýzu v bílé tukové tkáni, včetně epididymálního depa. Naším cílem bylo potvrdit existenci prázdného substrátového cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin za těchto podmínek a potvrdit tak fyziologický význam tohoto procesu. To se nám podařilo pomocí měření inkorporace ^3H do nově vzniklých triglyceridů. Syntéza triglyceridů je zvýšena po 7 (nikoli však po 2) dnech chladové expozice u obou kmenů, více však u AJ zvířat (viz *Obrázek 2* v Příloze). To ukazuje, že proces re-esterifikace uvolněných mastných kyselin je flexibilně regulovatelný a že může být spojen s vyšší odolností AJ myši k dietou indukované obezitě.

Závěry

Na základě získaných dat lze formulovat následující závěry týkající se jednotlivých specifických cílů práce:

1) Žlučová kyselina CDCA působí proti rozvoji obezity a metabolického syndromu u myši krměných dietou s vysokým obsahem tuků. Navrhovaný mechanismus s přímým zapojením stimuluje hnědé tukové tkáně může být odpovědný za dlouhodobé uchování štíhlého fenotypu. Hlavní část okamžitého efektu podávání CDCA ovšem závisí na přechodném poklesu příjmu potravy.

2) Účinky CDCA na stimulaci UCPI nezávisle na příjmu potravy byly pozorovány i v podkožní bílé tukové tkáni. Počet běžových buněk indukovaných v podkožním tuku je však v porovnání s kapacitou hnědé tukové tkáně velmi malý. Příspěvek běžových buněk k celotělové energetické homeostáze je tedy v tomto případě spíše zanedbatelný.

3) Kombinované působení mírné kalorické restrikce a ω -3 nenasycených mastných kyselin potlačuje nepříznivé projevy příjmu potravy s vysokým obsahem tuku. Dochází přitom k

synergistické indukci katabolismu lipidů a oxidativní fosforylace specificky v epididymálním bílém tuku. Vzniklé ATP může být spotřebováno paralelně stimulovanými anabolickými procesy, jako je syntéza triglyceridů. Do regulace těchto procesů je zapojena složitá síť transkripčních faktorů a lipidových mediátorů odvozených od vícenenasycených mastných kyselin.

4) Chladová expozice vyvolává mobilizaci energetických zásob ve všech tukových depech. Zároveň je v hnědé tukové tkáni (a v menší míře i v podkožním bílém tuku) indukovaná exprese UCP1. Zvýšený obsah mRNA pro UCP1 ovšem odpovídá vyššímu obsahu proteinu pouze u B6 myši, zatímco u AJ zvířat je reakce na chlad omezená. Tento výsledek je v rozporu s tradičním pohledem na AJ myši jakožto zvířata s vyšší citlivostí k adrenergní stimulaci. Podrobnější osvětlení rozporných dat bude vyžadovat další studium.

5) Regulovatelnost prázdného substrátového cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin byla demonstrována jak u zvířat vystavených chladu, tak i u myši pod kombinovaným vlivem kalorické restrikce a ω -3 vícenenasycených mastných kyselin. Po 7 (ale ne po 2) dnech chladové expozice je syntéza mastných kyselin i triglyceridů zvýšena jak u B6, tak u AJ zvířat, přičemž efekt u AJ myši je výraznější. Tento proces může být spojen s tvorbou nových bílých adipocytů nebo se zvýšenou potřebou pufovat neesterifikované mastné kyseliny v plazmě. Větší flexibilita u AJ zvířat může souviset s jejich nižší náchylností k obezitě a příbuzným poruchám.

Životopis

Narozen 31.10.1985 v Ivančicích (Jihomoravský kraj)

Vzdělání: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Ph.D. studium živočišné fyziologie 2010-2015

Výzkumný projekt: Význam tukové tkáně pro celotělový energetický metabolismus

RNDr. studium (v návaznosti na projekt Mgr. studia) 2010-2011

Mgr. studium buněčné a vývojové biologie 2008-2010

Diplomová práce: Vztah n-3 polynenasycených mastných kyselin a senzorů energetického stavu buňky (AMPK a SIRT1)

Bc. studium biologie (ukončeno s červeným diplomem) 2005-2008

Bakalářská práce: Role mitochondrií v inzulínové rezistenci

Profesní zkušenosti

STAR postdok na Wenner-Gren Institute, University of Stockholm a v Novo Nordisk, Kodaň od dubna 2015

2-měsíční stáž na University of Coimbra, Portugalsko
květen-červen 2014

Pregraduální a postgraduální student v Oddělení biologie tukové tkáně na Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i.
2006-2015

Plakátová sdělení na konferencích 47th Annual Meeting of EASD, Lisabon 2012, Keystone Symposium: Nuclear Receptors and Friends, Alpbach 2013

Ústní prezentace na 11th Biennial ISSFAL Congress, Stockholm 2014

Další činnost

Člen redakční rady popularizačního časopisu Vesmír (od 2014) a autor 35 popularizačních článků v tomto časopise

Člen autorského týmu pro přípravu úloh Biologické olympiády kategorií A a B a lektor letního odborného soustředění talentovaných biologů a chemiků, autor přípravného textu Biologické olympiády (Fila J, Kodejš K, Mikát M., Nunváf J, Smyčka J, Synek P, Zouhar P (2013): Komunikace. ČZU, Praha, 2013. ISBN 978-80-213-2386-5)

Oceněný soutěžící v popularizační soutěži Famelab a následně spolupracovník Britské rady na poli popularizace vědy

Seznam všech impaktovaných publikací

1. Teodoro JS*, **Zouhar P***, Flachs P, Bardova K, Janovska P, Gomes AP, Duarte FV, Varela AT, Rolo AP, Palmeira CM, Kopecký J. Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *International Journal of Obesity*, 2012, Vol. 38, 2, p. 216-223. **IF = 5.386**

* Tito autoři přispěli k práci rovným dílem.

2. Flachs P, Rühl R, Hensler M, Janovská P, **Zouhar P**, Kús V, Macek Jílková Z, Papp E, Kuda O, Svobodová M, Rossmeisl M, Tsenov G, Mohamed-Ali V, Kopecký J. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia*, 2011, Vol. 54, 10, p. 2626-2638. **IF = 6.814**
-

3. *Publication under preparation* The different propensity to obesity in two strains of mice is related to the cold-induced rate of fatty acid re-esterification in their epididymal adipose tissue.

Abstract

Adipose tissue plays a crucial role in nutrient and energy homeostasis. At the time of worldwide pandemy of obesity and consequent metabolic syndrome, a great effort is made to find new treatments with potential to preserve insulin sensitivity, or even counteract development of obesity and type 2 diabetes. There are three principal possibilities how the adipose tissue biology can contribute to this goal: 1) induction of UCP1-dependent energy dissipation in brown adipose tissue; 2) conversion of white adipose depots to brown-like tissue (i.e. “browning”); and 3) stimulation of UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue.

This thesis is based on two published works and one article under preparation. Generally, it is focused on three different approaches targeting the above mentioned processes in adipose tissue of laboratory mouse: 1) diet supplementation with bile acids; 2) combination treatment of ω -3 polyunsaturated fatty acids and calorie restriction; and 3) cold exposure.

In the experiments with administration of bile (specifically chenodeoxycholic) acid to mice, we confirm specific induction of UCP1 in both brown and subcutaneous white adipose tissue, as well as reversion of obesity in the response to the treatment. Nevertheless, most of the acute beneficial effects are mediated by transiently decreased food intake, while elevated thermogenesis in brown fat may play role rather in long term.

Combination of calorie restriction and feeding by ω -3 polyunsaturated fatty acids proves to counteract deleterious effects of high fat feeding due to UCP1-independent stimulation of lipid catabolism in epididymal white adipose tissue without consequent recruitment of brown adipose tissue. The excessive energy is probably consumed by consequently stimulated synthesis of triglycerides and/or fatty acids.

The phenomenon of inducible futile cycling was confirmed also in epididymal adipose tissue of mice exposed to cold for 7 days. The rate of triglyceride synthesis was especially high in animals of AJ strain (in comparison to B6 strain), which are known for their resistance to dietary obesity. Flexible futile cycling thus may contribute to protection of AJ metabolism in conditions of high-fat feeding.

Despite the fact that both white adipose tissue browning and UCP1-independent induction of futile cycling probably fail to influence whole body energy expenditure, but they can exert beneficial effects in buffering plasma and tissue fatty acids levels, and thus preventing impairment of glucose tolerance.

Theoretical introduction

Adipose tissue plays a crucial role in storage of energy in form of non-toxic triglycerides. At least two types of adipose tissue can be distinguished according to their morphology and function: White adipose tissue (WAT) consists of unilocular adipocytes with small content of mitochondria. In comparison to other tissues, metabolic activity of WAT is relatively low. It serves primarily to storage of lipids, but produces also numerous signaling molecules, which influence metabolism of many other organs.

In mammals, so called brown adipose tissue (BAT) does exist as well. It consists of multilocular adipocytes with high content of uncoupling protein 1 (UCP1). This tissue is designed to rapid combustion of stored lipids, while UCP1 is able to dissipate the energy in form of heat. BAT plays crucial role in adaptation to cold environment. It can be found in most of the mammalian species - recently it was identified even in adult humans. It is activated by sympathetic nervous system in response to cold and some other stimuli (maybe also the low-protein diet). Even a small amount of activated BAT exerts high metabolic turnover (due to UCP1) and increase whole-body energy expenditure (Cannon and Nedergaard 2004). Induction of UCP1 in BAT is therefore one of promising therapeutic targets in counteracting of obesity and connected metabolic disorders.

In rodents exposed to adrenergic stimulation, multilocular UCP1-positive adipocytes were observed even in some classical white depots (typically in subcutaneous WAT). These cells are called "brite" (brown-in-white) and the process of their recruitment is called "browning" of WAT. Metabolic turnover of brite cells is also very high; nevertheless, their contribution to whole-body energy expenditure is rather secondary to the thermogenesis in BAT.

Besides norepinephrine, UCP1 in BAT and browning WAT can be induced by numerous other compounds, namely thyroid hormones, natriuretic peptides, bile acids, irisin, FGF21, some neuropeptides etc (see review (Bonnet, et al. 2013; Villarroya and Vidal-Puig 2013)). These compounds are investigated due to their potential to influence energy balance and counteract obesity.

Increase of energy expenditure is not the only way how adipose tissue contributes to preservation of metabolic health. WAT buffers plasma lipid levels, which influences insulin sensitivity of other organs. This process requires high flexibility of lipolysis and triglyceride synthesis (i.e. fatty acid esterification). Despite its relatively low metabolic activity, WAT can effectively regulate plasma lipid levels and local adiposity. Modulation of WAT activity (regardless UCP1) is therefore the other possible therapeutic target by prevention and treatment of metabolic syndrome.

Aims of the thesis

The general goal of the thesis was to investigate several possible approaches to modulation of energy balance, namely by influencing metabolic fluxes in both BAT and WAT. The main focus was on specific role of stimulated mitochondrial function, UCP1- dependent energy dissipation and UCP1-independent substrate futile cycling.

Specific aims were the following:

1) to verify the expected stimulatory action of bile acid CDCA on brown adipose tissue recruitment in mouse, and to evaluate contribution of the increased energy expenditure to whole-body energy balance;

2) to investigate possible effects of CDCA on "browning" of susceptible WAT depots, and to learn whether the "brite" adipocytes can significantly increase whole-body energy expenditure;

3) to study the potential of calorie restriction and ω -3 PUFA to counteract deleterious consequences of high-fat feeding, and to characterize the mechanisms of beneficial influence of the treatment with respect to probable involvement of mitochondria in WAT;

4) to characterize the model of cold adaptation of two strains of mice (AJ and B6) differing in their propensity to obesity and associated disorders; to investigate BAT recruitment and scWAT browning in these animals;

5) to test the involvement of triglyceride / free fatty acid futile cycling in WAT in resistance to obesity using the above murine model, while stimulating metabolism of the mice by cold exposure; to compare this model with effects of combination treatment of ω -3 PUFA and calorie restriction.

Experimental design and methods

All the presented studies are based on animal experiments and, when possible, supplemented by results obtained using primary cell culture models (Publication B). C57BL/6J mice were obtained from the Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred in our animal facility for several generations (Publications A and B). The mice were weaned onto standard laboratory chow diet (**STD**; energy density 13.0 kJ.g⁻¹, ~35.2% wt.wt⁻¹ of lipids, extruded R/M-H diet, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Germany). In cold exposure experiments (Publication C), C57BL/6JBomTacmice (**B6 mice**) were directly ordered from Taconic (Denmark) and A/JOlHsd mice (**AJ mice**) from Harlan (UK).

With the exception of publication C, animals were maintained at 20 °C on a 12:12-hr light-dark cycle with free access to water and (unless otherwise stated) to food. Mice were single-caged during the experiments. Body weight and food intake were monitored weekly.

Publication A

2-month-old male mice were subjected to the high-fat-diet feeding (**cHF** - composite high-fat diet; energy density 22.8 kJ.g⁻¹, ~35.2% wt.wt⁻¹ of lipids, mainly corn oil (Kuda, et al. 2009)) for another 4 months to induce obesity and its comorbidities. After that, two different reversal experiments were conducted:

In **8-week reversion experiment**, animals were randomly divided into 3 experimental groups (n = 10-12 per group) and fed for next 8 weeks ad libitum by respective experimental diet: the cHF diet, the cHF diet supplemented with 0.5% chenodeoxycholic acid (0.5% CDCA, wt.wt⁻¹), or the cHF diet supplemented with 1% CDCA (1% CDCA, wt.wt⁻¹).

During the 6th week of the intervention 5 animals from each group were subjected to oral **glucose tolerance test** (OGTT). At the end of 8th week, animals were dissected in random fed state (between 8:30 and 10:30 am) and samples of blood, liver, epididymal and dorsolumbar WAT were collected for further analysis. Later **triglyceride content** was evaluated in liver and gastrocnemius muscle. **Levels of triglycerides, free fatty acids, cholesterol, glucose, insulin, adiponectin, and hepatic enzymes** were determined in plasma. Moreover, **feces** were also collected for analysis of triglyceride and cholesterol content.

In **3-week reversion experiment**, mice after 4-month cHF feeding were randomly divided into 3 groups (n = 8 per group) and assigned for 3 weeks to one of the following: (1) cHF; (2) cHF supplemented with 1% CDCA; and (3) pair-fed cHF (**PF**, i. e. food intake of this group was limited to that of animals on 1% CDCA diet. As a 4th group, animals fed STD diet since weaning were also included (n = 7). In this particular experiment, body weight and food intake were measured 4-times a week. Between 15th and 17th day of the treatment, **indirect calorimetry** was performed. After 3 weeks, animals were dissected as in previous experiment and samples of BAT, epididymal and subcutaneous WAT were collected. Later, those tissues were analyzed using **immunohistochemistry, real-time quantitative PCR and immunoblotting**.

Publication B

Several experiments were conducted in order to certify the results; nevertheless all of them followed the same scheme: 2-month-old male mice were habituated to cHF diet for 2 weeks and then assigned for 5 or 15 weeks to following treatments: (1) cHF, *ad libitum*; (2) cHF supplemented with long chain ω-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentrate (46% wt.wt⁻¹ DHA, 14% wt.wt⁻¹ EPA, product EPAX 1050 TG, EPAX, Ålesund, Norway) replacing 15% wt.wt⁻¹ of dietary lipids (cHF+F), *ad libitum*; (3) cHF+CR, i. e. cHF with calorie restriction (CR - the ration of diet was reduced by 10% wt.wt⁻¹ in comparison to animals fed *ad libitum* with the diet); (4) cHF+F+CR (i. e. cHF supplemented with ω-3 PUFA concentrate, 10% calorie restriction).

In 4th week, several tests were performed in individual experiments, **specifically oral glucose tolerance test, indirect calorimetry, and monitoring of physical activity**. In 5th week of treatment, plasma was collected during fast/fed transition in order to **evaluate metabolic flexibility**. Animals were dissected in random fed state after 5 or 15 weeks of the treatment. Samples of plasma, liver, gastrocnemius muscle, BAT, epididymal and subcutaneous WAT were collected for further analysis. In individual 5-week experiments some ex vivo analysis were performed immediately during dissection, namely **assay for evaluation of fatty acid oxidation** in whole gastrocnemius and soleus muscles, and analysis of fatty acid synthesis in epididymal WAT. In freshly **isolated adipocytes** from epididymal WAT, **fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative capacity** was measured. Moreover, **primary hepatocyte cultures** was isolated from subgroup of the animals (n = 8 per group) using liver perfusion technique. In these hepatocytes, fatty acid oxidation rate was determined.

Publication C

6-week-old male mice of B6/J and AJ strain were co-caged in groups of three and kept in thermo neutral temperature (30 °C) at least for 1 week. Thereafter, some animals were maintained as controls in thermoneutrality (9 mice of each strain), whereas others were transferred to 4 °C and left in this condition for two or seven days (9 or 6 mice of each strain, respectively). Mice were fed by STD diet during the whole experiment.

In the evening, 40 hrs prior to dissection, mice were injected with saline in deuterium oxide (9 mg.ml⁻¹ NaCl, 99.9% ²H₂O; loading dose [ml] – body weight of mouse [g] x 0.7 x 0.05) in order to reach 5% ²H₂O enrichment of body water. Mice were then offered 5% ²H₂O in drinking water to stabilize the ²H level in body liquid. This protocol was repeated twice, the second times, only two groups (mice from thermoneutrality and after 7 days of cold exposure) were used and ²H₂O was injected 4 days before dissection.

At the end of the experiment, mice were dissected in the morning in random fed state and blood and fat depots were collected. **Plasma lipid levels and gene expression** in epididymal WAT were evaluated as well as **UCP1 protein content** in BAT subcutaneous WAT. Samples of epididymal WAT and plasma aliquots were then sent to laboratory of our Portuguese collaborator John Jones (CNC, University of Coimbra). During my fellowship in this institution, I purified triglycerides from eWAT and determined **²H enrichment of glycerol and fatty acyl moiety** of these triglycerides.

Results and discussion

Publication A: Effects of chenodeoxycholic acid (CDCA) on energy balance and adipose tissue activation

In accordance with literature (Watanabe, et al. 2006; Watanabe, et al. 2012), obesity of dietary obese mice were reversed after 8 weeks of administration of 0.5% or 1% CDCA in the diet in dose dependent manner. Similarly, insulin resistance and glucose tolerance (expressed as area under glycemic curve during oral glucose tolerance test) were also improved by CDCA. This was previously attributed to direct stimulation of BAT by bile acids (via TGR5 receptor). However,

comparison of growth curves and food intake data indicated that most significant drop in body weight occurs during transient decrease in food intake during first weeks of treatment.

In order to distinguish effects of BAT activation and decreased food intake, we performed another shorter (4-week) experiment, which included group fed by diet supplemented by 1% CDCA, as well as pair fed (PF) group fed by control high fat diet in the same amount as the CDCA group had eaten.

The decrease in body weight was the same in both CDCA and PF groups. Nevertheless, assessment of UCPI protein content in BAT revealed some food intake-independent effects of CDCA. Moreover, immunohistochemistry data indicated slightly increased amount of UCPI-positive cells in subcutaneous WAT as well. The comparison of magnitude of effects in BAT and WAT suggests more important role of BAT.

Energy expenditure measured by indirect calorimetry was not different between CDCA and PF groups, whereas respiratory quotient was slightly decreased in CDCA animals suggesting shift towards lipid oxidation. In accordance with our assumption, we demonstrated recruitment of BAT and "browning" of subcutaneous WAT in animals fed by diet supplemented with CDCA. These effects may play role in preservation of lean phenotype in long term. However, the acute effects of CDCA on body weight is rather caused by transient decrease of food intake during habituation to new diet. This probable explanation was not appreciated in previous works.

Publication B: Combination of ω -3 polyunsaturated acids and mild calorie restriction in prevention of diet-induced obesity

High fat diet feeding results in mice in induction of obesity during the 6-week experiment. On the other hand, 10% calorie restriction, diet supplementation with ω -3 PUFA, and especially the combination of both treatments counteract the development of obesity. This effect is connected with ameliorated glucose tolerance (decreased area under glycemic curve during glucose tolerance test), insulin sensitivity (decreased HOMA index) and metabolic flexibility (increased differences in lipidaemia and glycaemia during fast/fed transition).

Analysis of gene expression revealed synergistic induction of the following markers specifically in epididymal white adipose tissue: markers of mitochondrial biogenesis (PGC-1 α , Nrf, CyOX3), fatty acid oxidation (Ppar α , Vlcad, Lcad), and also fatty acid synthesis (Fas) and glyceroneogenesis (Pepck), while content of Ucp1 remained low. This result suggests the induced lipid catabolism in fully coupled mitochondria, which was confirmed also by biochemical assessment of ¹⁴C-labeled palmitate and oxidation capacity of mitochondria measured by oxygen electrode (see *Figure 1* in Appendix). The resulted ATP can be consumed by parallelly increased lipogenesis, i.e. the energy is wasted in futile metabolic cycling of triglycerides and free fatty acids (Flachs, et al. 2013).

Concurrently, profile of PUFA-derived lipid mediators in epididymal white adipose tissue is also changed by combination treatment resulting in higher proportion of anti-inflammatory regulators. Especially, levels of neuroprotectin D1 and 15-deoxy prostaglandin J2 are synergistically elevated. The combination of mild calorie restriction and ω -3 PUFA exerts broad spectrum of effects triggering lipid catabolism in epididymal white adipose tissue.

Publication C: Strain-dependent cold-induced changes in brown and white adipose tissue

Analysis of metabolic changes in mice of AJ and B6 strains during 2 to 7-day cold exposure demonstrated gradual adaptation of animals to lower temperatures. Food intake was more than doubled and lipolysis in white adipose tissue was massively induced in order to cover elevated costs of thermogenesis. Free fatty acid plasma level was decreased after 2 days in cold (due to higher lipid oxidation), but normalized or even increased after 7 days (due to continually stimulated lipolysis). These fluctuations were more pronounced in AJ strain suggesting higher metabolic flexibility of AJ animals.

Prolonged cold exposure leads to induction of UCP1 in BAT and recruitment of brite cells in some WAT depots. This effect was observed also in our experiment at mRNA level. On the other hand, UCP1 protein was largely induced rather in B6 than in AJ animals, despite the fact that AJ strain is thought to be more sensitive to adrenergic stimulation (Collins, et al. 1997; Xue, et al. 2005). Our results, which are going to be tested by further analyses, suggest impairment of UCP1 proteosynthesis in AJ mice. The observed finding can depend on the fat depot or murine substrain, which may partially explain the discrepancy between our and previous results.

The cold exposure stimulates lipolysis in WAT, including epididymal WAT. Our goal was confirmation of existence and physiological relevance of triglyceride/free fatty acid futile metabolic cycling in these conditions. This was achieved using NMR analysis of ^2H incorporation into newly synthesized triglycerides. Triglyceride synthesis was elevated after 7 (but not after 2) days of cold exposure in both strains, but especially in AJ animals (see *Figure 2* in Appendix). This result indicates the flexibility and adaptability of free fatty acid reesterification and possible link to obesity resistance of AJ animals.

Conclusion

Following conclusions could be made, corresponding to the specific aims of the thesis:

1) Bile acid CDCA exerts protective effects against development of obesity and metabolic syndrome. However, direct induction of BAT thermogenesis is involved only partially. The main effect depends on the transient decrease in food intake. The increase in BAT thermogenesis is probably involved in the maintenance of lean phenotype.

2) Food intake-independent effect of CDCA on UCP1 recruitment was observed also in subcutaneous WAT. However the number of brite cells induced in subcutaneous WAT was small in comparison to the content of brown adipocytes in BAT. Thus, the effect of the brite cells induced in subcutaneous WAT on whole body energy balance is probably small.

3) Combination treatment using calorie restriction and ω -3 PUFA exhibits high potential to counteract deleterious consequences of high-fat feeding. The treatment leads to induction of lipid catabolism and mitochondrial oxidative phosphorylation specifically in epididymal WAT. The resulted ATP may be consumed due to consequent stimulation of anabolic processes such as

triglyceride synthesis. Complex network of transcription factors and PUFA-derived lipid mediators is likely to be involved in regulation of these processes.

4) Cold exposure stimulates mobilization of lipid stores in all adipose depots. Consequently, UCP1 gene expression is triggered in BAT, and to smaller extent also in subcutaneous WAT. Surprisingly, this induction is reflected at the UCP1 protein levels only in B6 mice, while both depots of AJ mice exhibit only limited increase of UCP1. This result is in conflict with traditional view of AJ mice as animals extremely prone to adrenergic stimulation of UCP1-mediated thermogenesis. This discrepancy may be partially explained by the fact that previous studies focused largely on the UCP1 gene expression at the mRNA level, evaluated UCP1 gene expression in different adipose depots, or maybe even used different substrain(s) of the mice.

5) The inducibility of triglyceride / free fatty acid futile cycling was demonstrated both in animals on combination treatment of ω -3 PUFA and calorie restriction, and on mice exposed to cold. After 7 days (but not 2 days) of cold exposure, fatty acid and triglyceride synthesis is induced in epididymal WAT of both B6 and AJ animals, while this effect is more pronounced in AJ mice. This process may be related to new white cell formation and/or requirements for buffering plasma NEFA in association with differential propensity to obesity and associated metabolic disorder in B6 and AJ mice.

Curriculum vitae

Born at 31.10.1985 in Ivančice (South Moravian Region)

Education: Faculty of Science, Charles University of Prague

Ph.D. study of animal physiology 2010-2015

Research project: Importance of adipose tissue metabolism for whole-body energy balance

RNDr. study (in relation to M.Sc. project) 2010-2011

M.Sc. study of cellular and developmental biology 2008-2010

Thesis: Relation between n-3 polyunsaturated fatty acids and cellular sensors of energetic state (AMPK and SIRT1)

B.Sc. study of biology (graduated with honours) 2005-2008

Thesis: Role of mitochondria in insulin resistance

Professional experience

STAR postdoc at Wenner-Gren Institute, University of Stockholm and at Novo Nordisk since April 2015

2-month internship at University of Coimbra, Portugal
May-June 2014

undergraduate and Ph.D. student at Dept. of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology CAS
2006-2015

Posters at 47th Annual Meeting of EASD, Lisbon 2012 and Keystone Symposium: Nuclear Receptors and Friends, Alpbach 2013

Oral presentation at 11th Biennial ISSFAL Congress, Stockholm 2014

Other activities

Member of editorial board of Vesmír journal (since 2014) and author of 35 popularizing articles

Author of exercises for Czech Biology Olympiad, categories A and B (2008-2014); lecturer at Summer camps for talented biologists and chemists (2009-2013), author of preparatory text of Biology Olympiad (Fila J, Kodejš K, Mikát M., Nunváf J, Smyčka J, Synek P, Zouhar P (2013): Komunikace. ČZU, Praha, 2013. ISBN 978-80-213-2386-5)

Awarded participant in Famelab competition and subsequently cooperator of British council in the area of popularizing science

List of scientific publications

1. Teodoro JS*, **Zouhar P***, Flachs P, Bardova K, Janovska P, Gomes AP, Duarte FV, Varela AT, Rolo AP, Palmeira CM, Kopecký J. Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *International Journal of Obesity*, 2012, Vol. 38, 2, p. 216-223. **IF = 5.386**

* These authors contributed equally to this work.

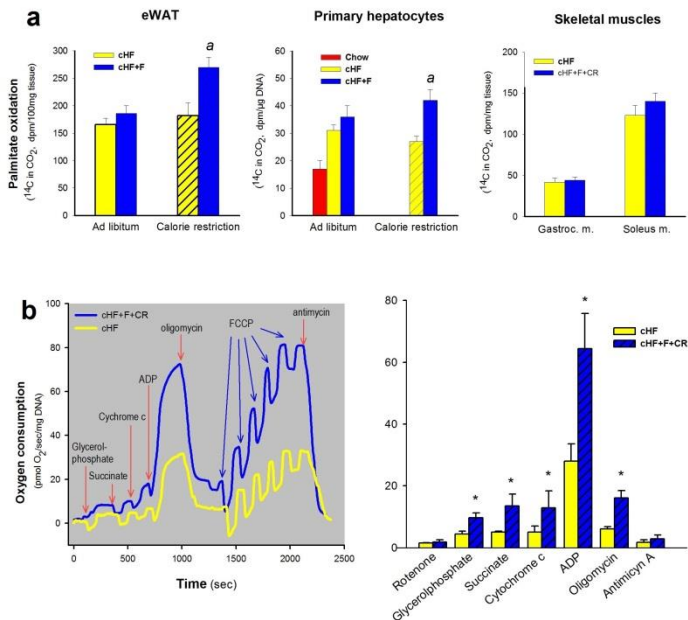
2. Flachs P, Rühl R, Hensler M, Janovská P, **Zouhar P**, Kús V, Macek Jilková Z, Papp E, Kuda O, Svobodová M, Rossmeisl M, Tsenov G, Mohamed-Ali V, Kopecký J. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia*, 2011, Vol. 54, 10, p. 2626-2638. **IF = 6.814**

3. *Publication under preparation* The different propensity to obesity in two strains of mice is related to the cold-induced rate of fatty acid re-esterification in their epididymal adipose tissue.

Seznam literatury / List of references

- Bonet, M. L., P. Oliver, and A. Palou
2013 Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1831(5):969-85.
- Cannon, B., and J. Nedergaard
2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84(1):277-359.
- Collins, S., et al.
1997 Strain-specific response to beta 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology* 138(1):405-13.
- Flachs, P., et al.
2013 Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* 1831(5):986-1003.
- Kuda, O., et al.
2009 n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 52(5):941-51.
- Villarroya, F., and A. Vidal-Puig
2013 Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 17(5):638-43.
- Watanabe, M., et al.
2006 Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439(7075):484-9.
- Watanabe, M., et al.
2012 Bile acid binding resin improves metabolic control through the induction of energy expenditure. *PLoS One* 7(8):e38286.
- Xue, B., et al.
2005 Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol* 25(18):8311-22.

Příloha / Appendix



Obrázek 1: Oxidační kapacita mitochondrií v odpovědi na ω -3 mastné kyseliny a kalorickou restrikci

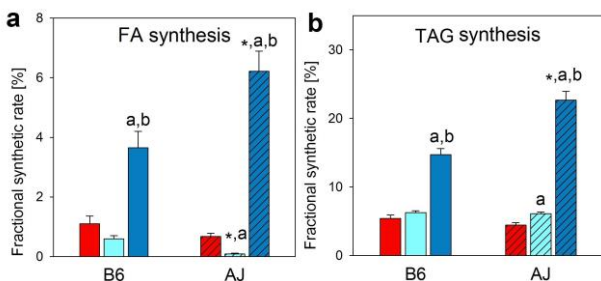
- a) Oxidace palmitátu v epididymálním tuku, primárních hepatocytech a kosterních svalech
 b) Výsledky respirometrie s vysokým rozlišením: Reprezentativní křivky spotřeby kyslíku včetně titrace odpřahovače FCCP; průměrné hodnoty respirace po přidání uvedených substrátů a inhibitorů.

^a* Průkazný rozdíl ve srovnání s cHF skupinou (ANOVA).

Figure 1: Mitochondrial oxidative capacity in response to ω -3 PUFA and calorie restriction

- a) Palmitate oxidation in epididymal fat, primary hepatocytes, soleus and gastrocnemius muscles
 b) Results of high resolution respirometry: Representative curves of oxygen consumption including titration of uncoupler FCCP; means of oxygen consumption in conditions of given substrates and inhibitors.

^a* Significant difference compared with cHF (ANOVA).



Obrázek 2: Indukce substrátového cyklování triglyceridů a volných mastných kyselin v epididymálním tuku

- Syntéza mastných kyselin počítaná z obohacení methylu mastných kyselin v triglyceridech z epididymálního tuku o ^2H 40 hodin po injekci $^2\text{H}_2\text{O}$;
- Syntéza triacylglycerolů počítaná z obohacení glycerolu v triglyceridech z epididymálního tuku o ^2H 40 hodin po injekci $^2\text{H}_2\text{O}$;

* průkazný rozdíl (t-test) ve srovnání s druhým kmenem; ^a průkazný rozdíl ve srovnání s termoneutralní kontrolou příslušného kmene; ^b průkazný rozdíl ve srovnání se skupinou vystavenou po 2 dny chladu.

Figure 2: Induction of triglyceride / free fatty acid futile cycling in epididymal fat

- Rate of fatty acid (FA) synthesis calculated from ^2H enrichment of methyl in fatty acyl moiety of triglycerides from epididymal fat 40 hrs after $^2\text{H}_2\text{O}$ injection;
- Rate of triacylglycerol (TAG) synthesis calculated from ^2H enrichment of glycerol moiety in triglycerides from epididymal fat 40 hrs after $^2\text{H}_2\text{O}$ injection;

* significant difference (t-test) compared with other strain; ^a significant difference compared with thermoneutral group of the respective strain; ^b significant difference compared with group 2d-cold-exposed of the respective strain.