

# Lipid droplet coat proteins, skeletal muscle lipid metabolism & insulin sensitivity

## Citation for published version (APA):

Bosma, M. (2013). *Lipid droplet coat proteins, skeletal muscle lipid metabolism & insulin sensitivity*. Uitgeverij BOXPRESS.

## Document status and date:

Published: 01/01/2013

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# SUMMARY & SAMENVATTING

## SUMMARY

Western style diets, excess calorie intake and low physical activity levels have resulted in a strong increase in the prevalence of obesity. This obesity epidemic is currently affecting more than one in ten of the world's population and the epidemic is still expanding dramatically in adults as well as in children. Obesity is associated with a range of comorbidities. One of the major complications of obesity is impaired glucose tolerance, which may deteriorate towards type 2 diabetes. Impaired glucose tolerance is characterized by insulin resistance - an impaired ability of the hormone insulin to stimulate glucose disposal by skeletal muscle and liver and to inhibit hepatic glucose production - and a reduced secretion of insulin by the pancreas. This reduced glucose tolerance may deteriorate towards type 2 diabetes, which is characterized by  $\beta$ -cell dysfunction and hyperglycemia, reflecting the disability of the pancreatic  $\beta$ -cells to compensate for the peripheral insulin resistance. Approximately 90 percent of type 2 diabetics are overweight. Yet, the fact that 'only' approximately 30 percent of obese people have type 2 diabetes indicates that genetic and/or epigenetic predisposition plays an important role in the etiology of obesity-associated insulin resistance and progression towards type 2 diabetes.

The skeletal muscle accounts for more than 80 percent of the postprandial whole body glucose uptake and therefore plays an important role in glucose homeostasis. Skeletal muscle lipid levels – intramyocellular lipids (IMCL) – correlate negatively with insulin sensitivity in a sedentary population and hence were considered predictive for insulin resistance and causative in obesity-associated insulin resistance. However, endurance athletes also have high IMCL levels despite being highly insulin sensitive, which indicates that not the level of IMCL accumulation *per se*, but rather the characteristics of this intramyocellular fat determine whether it negatively affects insulin signaling.

Upon entrance of the cell, fatty acids can be converted to different types of lipids for storage. Triacylglycerol (TAG) consists of three fatty acids bound to a glycerol molecule and is considered the most neutral and harmless type of intracellular lipid storage. The majority of the IMCL that is stored in muscle cells of endurance-trained athletes consists of TAG. Besides, fatty acids can be converted to lipid intermediates like diacylglycerol (DAG), ceramides and fatty acyl-CoAs. These lipid intermediates can impair insulin signaling, which is referred to as lipid-induced insulin resistance and lipotoxicity. Intramyocellular lipids are mainly stored in lipid droplets, the organelles for fat storage. Initially, these lipid droplets were considered to merely serve as fat depots, but since the discovery in the nineties of proteins in the lipid droplet coat that regulate lipid droplet dynamics and lipid metabolism, lipid droplets are seen as highly dynamic organelles that play a very important role in the regulation of intracellular lipid storage and lipid metabolism.

This thesis focuses on two lipid droplet coat proteins: the perilipins (PLINs) 2 and 5. The perilipin family was the first characterized group of lipid droplet coat proteins, but their

function is mainly studied in adipose tissue and liver. The general goal of the research presented in this thesis was to investigate the potential role of these lipid droplet coat proteins in the regulation of skeletal muscle lipid metabolism and the protection against lipid-induced insulin resistance by creation of synthesis- and storage capacity for lipids. This thesis project encompasses a series of cell, animal and human studies - as well as a combination of *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* techniques.

**Chapter 2** gives an overview and interpretation of the recent literature on the relationship between intramyocellular lipid storage and insulin resistance. This review focuses on the evidence from human studies, in combination with supporting mechanistic information obtained from cell- and animal studies. Evidently, lipid accumulation in skeletal muscle is an important parameter in the development of obesity-associated type 2 diabetes. Accumulation of the lipid intermediates diacylglycerol, ceramides and fatty acyl-CoAs is associated with insulin resistance. However, the results of the human studies are inconsistent. Moreover, increased levels of these intermediates in skeletal muscle do not necessarily result in insulin resistance. Rather, the results of the array of human studies performed to date indicate that there are different routes towards lipid-induced insulin resistance. Besides augmented synthesis and accumulation of lipid intermediates, probably also the intracellular localization – in lipid droplets or in/near membranes – and lipid metabolism (lipid turnover) are of importance.

Increased lipid supply to muscle is considered to be one of the explanations for the increased intramyocellular lipid storage in obese individuals. Storage of lipids in lipid droplets may prevent that lipid intermediates interfere with the insulin signaling cascade in/near the cell membranes. The capacity for lipid storage in intramyocellular lipid droplets and the abundance of lipid droplet coat proteins may therefore determine interindividual variation in sensitivity for the development of insulin resistance in situations of increased lipid supply. Fasting and consumption of a high fat diet are two human models for increased fatty acid supply to the muscle. In **chapter 3** the effects of fasting for 60 hours and consumption of a high fat diet for three weeks on intramyocellular lipid accumulation, insulin sensitivity and the expression of lipid droplet coat proteins are discussed. Fasting resulted in a pronounced increase in plasma free fatty acid levels, intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance. However, a larger increase in lipid storage in intramyocellular lipid droplets upon fasting was associated with a lower reduction in insulin sensitivity. This phenomenon was not apparent in the high fat diet intervention, which indicates that the protective role of lipid storage capacity in lipid droplets is specifically of importance under acute conditions of high lipid supply. PLIN2 and PLIN5 levels were not increased after fasting, in contrast to animal studies. In both interventions, PLIN2 levels correlated positively with intramyocellular lipid content in lipid droplets.

Increased fatty acid uptake, reduced oxidative capacity and disturbances in intramyocellular lipid metabolism have been suggested as explanations for lipotoxicity resulting in insulin resistance. In **chapter 4**, intramyocellular lipid metabolism was

## Summary

explored in skeletal muscle of obese individuals with type 2 diabetes compared with BMI- and age-matched control subjects. Lipid metabolism was investigated *ex vivo* in muscle biopsy tissue and *in vitro* in cultured muscle cells (myotubes). These muscle cells are cultured from satellite cells and therefore mainly represent the genetic profile of the donor. With this study set up we were able to investigate both acquired disturbances in skeletal muscle lipid metabolism as a consequence of lifestyle and diabetes development and genetic differences in lipid metabolism that could potentially explain the susceptibility for type 2 diabetes development. *Ex vivo* fatty acid oxidation and incorporation of fatty acids into TAG were lower in type 2 diabetics compared with control subjects. In contrast, *in vitro* fatty acid oxidation was similar in myotubes established from diabetics and controls. Similar to the *ex vivo* findings, *in vitro* incorporation of fatty acids into TAG was significantly lower in the type 2 diabetics. Fatty acid uptake was similar in the two groups. These results show that a reduced capacity for storage of fatty acids in the form of TAG is an inherent characteristic of the diabetic muscle cell.

These first chapters indicate that an increased capacity for storage of fatty acids in the form of TAG is associated with higher insulin sensitivity. Lipid droplet coat proteins are involved in the regulation of intracellular lipid storage. Yet, little is known about the role of lipid droplet coat proteins in skeletal muscle. **Chapter 5** shows that PLIN2 facilitates neutral lipid storage in skeletal muscle. PLIN2 is essential for intramyocellular TAG storage; knockdown of PLIN2 in cultured myotubes by means of siRNA resulted into lower TAG levels, reduced incorporation of fatty acids into TAG and a lower number of lipid droplets. Overexpression of PLIN2 *in vitro* in cultured myotubes and *in vivo* in rat tibialis anterior muscle resulted in increased intramyocellular neutral lipid storage while insulin sensitivity was improved. In conclusion, PLIN2 facilitates the storage of potentially toxic fatty acids in the form of neutral TAG hence improving insulin sensitivity.

**Chapter 6** describes the subcellular localization of PLIN5. PLIN5 not only localizes to lipid droplets, but also to mitochondria. Skeletal muscle PLIN5 content correlates with markers for oxidative capacity. Unilateral overexpression of PLIN5 overexpression in rat tibialis anterior muscle resulted in increased intramyocellular lipid content and increased fatty acid oxidation. **Chapter 7** builds on the previous chapter and further identifies effects of PLIN5 overexpression – in comparison with effects of PLIN2 – on skeletal muscle lipid accumulation, insulin sensitivity and gene expression profiles. Both PLIN2 and PLIN5 overexpression resulted in increased neutral intramyocellular lipid content without negatively impacting on insulin sensitivity. Interestingly, as opposed to the effects of PLIN2 overexpression, overexpression of PLIN5 promoted expression of a cluster of genes under control of PPAR $\alpha$  and PGC1 $\alpha$  involved in fatty acid catabolism and mitochondrial oxidation. This suggests a role for PLIN5, either directly or indirectly, in mediating skeletal muscle oxidative gene expression.

Insulin-sensitizing strategies may involve adaptations in intramyocellular lipid droplet dynamics. In **chapter 8** the effects of an endurance training program on intramyocellular lipid storage and PLIN protein expression are described. Eighteen male type 2 diabetics and twenty BMI- and age-matched normoglycemic controls exercise-trained for 12 weeks.

Intramyocellular lipid content was modestly increased after the training period, while the skeletal muscle protein content of PLIN2 and PLIN5 was doubled.

In conclusion, the findings described in this thesis indicate that creating intramyocellular neutral lipid storage capacity protects against obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle. Both PLIN2 and PLIN5 increase intramyocellular neutral lipid storage space without negatively impacting on insulin sensitivity, at least on the short term. Given the beneficial effects of increasing neutral lipid storage capacity in skeletal muscle, further research into nutraceutical and pharmacological strategies to improve PLIN function and LD dynamics is promising with respect to metabolic health.

## SAMENVATTING

Het veranderde voedingspatroon, overmatige calorie-inname en de verminderde fysieke activiteit hebben de afgelopen decennia geresulteerd in een sterke toename in de prevalentie van obesitas. Momenteel leidt een op de tien volwassenen wereldwijd aan obesitas en deze epidemie is nog altijd exponentieel aan het toenemen. Obesitas is geassocieerd met een scala aan comorbiditeiten, waaronder type 2 diabetes.

Een verminderde glucosetolerantie is een voorstadium van type 2 diabetes en wordt gekenmerkt door insulineresistentie; een verminderde gevoeligheid van weefsels voor het hormoon insuline – insuline faciliteert de opname van glucose in de perifere weefsels waaronder de spier en remt de glucose productie in de lever – en een verlaagde secretie van insuline door de pancreas. Deze verminderde glucose tolerantie kan zich uiteindelijk ontwikkelen richting type 2 diabetes, wat gekenmerkt wordt door verhoogde glucose niveaus in het bloed doordat het lichaam de glucosespiegels niet meer voldoende kan reguleren. Ongeveer 90 procent van de type 2 diabetes patiënten heeft overgewicht. Echter, ‘slechts’ 30 procent van de personen die lijden aan obesitas heeft type 2 diabetes, wat impliceert dat genetische aanleg zeer waarschijnlijk een rol speelt bij de ontwikkeling van type 2 diabetes.

De skeletspieren zijn verantwoordelijk voor 80 procent van de postprandiale glucose opname in het lichaam en spelen daarom een belangrijke rol bij de glucosehuishouding. Vetstapeling in de spier wordt in verband gebracht met de ontwikkeling van insulineresistentie. Obesitas gaat gepaard met vetstapeling in de spier als gevolg van verhoogde vetzuurniveaus in de bloedbaan en een verminderde vetopslagcapaciteit in het vetweefsel. Echter, ook duurgetrainde atleten hebben een grote mate van vetopslag in de spieren, terwijl atleten juist zeer insulinegevoelig zijn, wat suggereert dat niet de mate van vetstapeling, maar de eigenschappen van dit vet bepalen of het de insulinesignalering hindert.

Vetzuren kunnen in de cel worden opgeslagen in verschillende vormen. Triacylglycerol (TAG) bestaat uit een glycerol molecuul met daaraan 3 vetzuren gebonden en wordt beschouwd als de meest neutrale en onschadelijke vorm van intracellulaire vetopslag. De spiercellen van duurgetrainde atleten bevatten veel TAG. Daarnaast kunnen vetzuren omgezet worden in onder andere diacylglycerol (DAG), ceramiden en vetzuur-CoAs, de zogeheten lipidintermediären. Deze lipidintermediären kunnen de insulinesignalering negatief beïnvloeden, wat omschreven wordt als lipid-geïnduceerde insulineresistentie en lipotoxiciteit. Vetten (lipiden) in de spiercel zijn voor het merendeel opgeslagen in lipidendruppels, de organellen voor vetopslag. Initieel werd aangenomen dat deze lipidendruppels enkel dienen als vetdepots, maar sinds de ontdekking in de jaren '90 van eiwitten op de lipidendruppel die de dynamiek van lipidendruppels en het vetmetabolisme reguleren, worden deze lipidendruppels gezien als dynamische organellen die een zeer belangrijke rol spelen in de regulatie van vetopslag en vetmetabolisme.

In dit proefschrift staan twee lipidendruppel-eiwitten centraal: de perilipines (PLIN) 2 en 5. De perilipine familie was de eerste groep eiwitten gekarakteriseerd als lipidendruppel-eiwitten, maar de functie van deze eiwitten is tot op heden voornamelijk bestudeerd in vetweefsel en lever. De algemene doelstelling van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het inventariseren van de potentiële rol van deze lipidendruppel-eiwitten in de regulatie van het vetmetabolisme in de spier en de bescherming tegen insuline resistentie door middel van het creëren van synthese- en opslagcapaciteit voor lipiden. Dit proefschrift is gebaseerd op een translationele benadering, het is een combinatie van cel, dier- en, humane studies alsmede *in vivo*, *ex vivo* en *in vitro* technieken.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht en interpretatie van de recente literatuur op het gebied van de relatie tussen vetstapeling in de spier en insulineresistentie gegeven. Hierin staan de resultaten van humane studies centraal, maar ook de voorgestelde mechanismen ter verklaring van de relatie tussen vetstapeling in de spier en insulineresistentie worden besproken aan de hand van de uitkomsten van cel- en dierstudies. Het is evident dat vetstapeling in de spier een belangrijke factor is in het ontstaan van obesitas-geassocieerde type 2 diabetes. Stapeling van lipidintermediären zoals diacylglycerol, ceramiden en vetzuur-CoAs wordt in verband gebracht met insulineresistentie. Echter, de resultaten van de humane studies geven geen consistent beeld. Bovendien leiden verhoogde concentraties van deze intermediären in de skeletspier niet noodzakelijk tot insulineresistentie. Er bestaan waarschijnlijk verschillende routes richting lipidgeïnduceerde insulineresistentie. Naast verhoogde vorming en stapeling van lipidintermediären spelen hoogstwaarschijnlijk ook de intracellulaire lokalisatie van deze intermediären – in lipidendruppels of in/nabij membranen – en het lipidenmetabolisme (lipidturnover) een rol.

Een verhoogde vet-toevoer naar de spier, door middel van verhoogde lipidenwaarden in het bloed, wordt beschouwd als een van de onderliggende verklaringen voor de toegenomen vetstapeling in de spier bij obesitas. Opslag van lipiden in lipidendruppels zou mogelijk kunnen voorkomen dat lipidenintermediären de insulinesignaleringscascade in de celmembranen hinderen. De capaciteit voor vetopslag in lipidendruppels in de spier en de mate van aanwezigheid van lipidendruppel-eiwitten zou daarom de interindividuele verschillen in gevoeligheid voor het ontwikkelen van insulineresistentie bij verhoogde vettoevoer kunnen verklaren. Twee modellen voor een verhoogde vettoevoer zijn vasten en een dieet rijk in vet. In **hoofdstuk 3** worden de effecten van vasten (60 uur) en consumptie van een dieet rijk in vet gedurende drie weken op vetstapeling in de spier, insulinegevoeligheid en expressieniveaus van lipidendruppel-eiwitten besproken. Vasten leidde tot sterk verhoogde vetzuurniveaus in de bloedbaan, vetstapeling in de spier en insulineresistentie. Echter, een grotere toename in de vetstapeling in lipidendruppels na vasten was geassocieerd met een verminderde inductie van insulineresistentie. Dit fenomeen was niet van kracht in de hoog vet-dieet interventie, wat impliceert dat de beschermende rol van de vetstapelingscapaciteit in lipidendruppels met name van kracht is in acute condities van verhoogde vettoevoer. PLIN2 en PLIN5



## Samenvatting

niveaus waren niet verhoogd na vasten in humaan spierweefsel, in tegenstelling tot de resultaten van dierstudies. In beide studies correleerden PLIN2 niveaus met de hoeveelheid vetstapeling in lipidendruppels.

Een verhoogde vetzuuropname, een verlaagde vet-oxidatieve capaciteit (afbraak van vetten voor energievoorziening) en verstoringen in het lipidenmetabolisme in de spiercel zijn gesuggereerd als verklaringen voor lipotoxiciteit resulterend in insulineresistentie. In **hoofdstuk 4** is het lipidenmetabolisme in de spier van obese personen met type 2 diabetes vergeleken met obese controle personen. In deze studie hebben we gekeken naar het lipidenmetabolisme in spierbiopten (*ex vivo*), maar ook in gekweekte spiercellen (*in vitro*). Deze spiercellen worden gekweekt vanuit satellietcellen en representeren daarom voornamelijk het genetische profiel van de donor. Met deze studieopzet konden we daarom kijken naar zowel verworven defecten in spier-lipidenmetabolisme als gevolg van de leefstijl en diabetesontwikkeling alsmede genetische verschillen in lipidenmetabolisme die potentieel de aanleg voor de ontwikkeling van obesitas-geassocieerde type 2 diabetes kunnen verklaren. *Ex vivo* hadden de type 2 diabetes een lagere vetzuur oxidatie en een lagere incorporatie van vetzuren in TAG in het spierweefsel. *In vitro* echter, was de vetzuur oxidatiecapaciteit gelijk in spiercellen van diabetes en de obese controles, terwijl de incorporatie van vetzuren in TAG zowel *ex vivo* als *in vitro* lager was in de groep diabetes. De vetzuuropname was gelijk in de twee groepen. Deze resultaten tonen aan dat een gereduceerde capaciteit voor het opslaan van vetzuren in de vorm van TAG een intrinsiek kenmerk is van de diabetes spiercel.

De bovenstaande hoofdstukken laten zien dat een verhoogde capaciteit voor opslag van vetten in de vorm van TAG in lipidendruppels geassocieerd is met een hogere insulinegevoeligheid. Lipidendruppel-coatende eiwitten zijn betrokken bij het reguleren van intracellulaire vetopslag. Echter, er is nog weinig bekend over de rol van lipidendruppel-eiwitten in de skeletspier. In **hoofdstuk 5** is aangetoond dat het lipidendruppel-eiwit PLIN2 neutrale vetopslag in de spier faciliteert. PLIN2 is essentieel voor opslag van TAG in de spiercel; het verminderen van de PLIN2 eiwitniveaus in gekweekte spiercellen door middel van siRNA zorgde voor lagere TAG niveaus, verminderde incorporatie van vetzuren in TAG en een lager aantal lipidendruppels in de spiercellen. Verhogen van de aanwezigheid van PLIN2 *in vitro* in gekweekte spiercellen en *in vivo* in rat spier leidde tot verhoogde vetstapeling in de spiercel, terwijl de insulinegevoeligheid was toegenomen. In conclusie, PLIN2 faciliteert de opslag van potentieel toxische vetzuren in de vorm van het neutrale TAG en verbetert daardoor de insulinegevoeligheid.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de lokalisatie van PLIN5. Naast de aanwezigheid op de lipidendruppel, tonen wij aan dat PLIN5 ook aanwezig is in skeletspier mitochondriën. De hoeveelheid PLIN5 correleerde met markers voor oxidatieve capaciteit. Het verhogen van de aanwezigheid van PLIN5 in de spier door middel van genelectroporatie leidde tot een verhoogde vetstapeling in de spier en een verhoogde vetzuuroxidatie. **Hoofdstuk 7** geeft hieraan een vervolg. In dit hoofdstuk worden de effecten van PLIN5 overexpressie – een verhoogde aanwezigheid van PLIN5 in de skeletspier tibialis anterior – vergeleken met de

effecten van PLIN2 overexpressie op het niveau van stapeling van verschillende typen lipiden, insulinegevoeligheid en genexpressie profielen. Zowel overexpressie van PLIN2 als van PLIN5 verhoogden de stapeling van TAG in de spier en deze verhoogde vetstapeling leidde in beide gevallen niet tot verminderde insulinegevoeligheid. Een interessant contrast was echter, dan PLIN2 leidde tot een verlaagde expressie van genen betrokken bij vetzuuroxidatie, terwijl overexpressie van PLIN5 leidde tot een verhoogde expressie van genen betrokken bij vetzuuroxidatie en mitochondriële functie.

Strategieën ter verbetering van de insulinegevoeligheid, zoals training, zouden hand in hand kunnen gaan met een verbeterd lipidendruppelmetabolisme. In **hoofdstuk 8** worden de effecten beschreven van een trainingsprogramma van 12 weken (een combinatie van kracht- en duursport) in obese personen en type 2 diabeten op vetstapeling in de spier en het expressieniveau van een cluster lipidendruppel-eiwitten. De vetopslag in lipidendruppels in de spier was licht verhoogd na de trainingsperiode, terwijl de expressie van PLIN2 en PLIN5 was verdubbeld.

In conclusie, de resultaten van deze serie studies tonen aan dat het creëren van opslagcapaciteit voor neutrale lipiden beschermt tegen obesitas-geassocieerde insuline resistentie in de spier. Een verhoogde aanwezigheid van PLIN2 of PLIN5 leidt tot een verhoogde vetstapeling in lipidendruppels zonder de insulinegevoeligheid van de spier negatief te beïnvloeden. Verder onderzoek naar interventies die de PLIN functie en lipidendruppeldynamiek positief beïnvloeden - zoals farmacologische-, voedings- en bewegingsstrategieën - is daarom veelbelovend in het kader van de preventie en behandeling van type 2 diabetes.

