

# Cellular and molecular aspects of weight regulation: the adipose tissue

Citation for published version (APA):

Bouwman, F. G. (2015). *Cellular and molecular aspects of weight regulation: the adipose tissue*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20150619fb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2015

## DOI:

[10.26481/dis.20150619fb](https://doi.org/10.26481/dis.20150619fb)

## 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

The purpose of this thesis was to value in general the application of proteomics in the field of nutrigenomics and more specifically, to apply proteomics to learn more about the complex regulation of human body weight and the role of the adipose tissue therein.

In **Chapter 1** a general introduction to this thesis is presented. Part of planning a nutrigenomics experiment is the selection of the target tissue that is the most informative with regard to the applied omics technique.

**Chapter 2** provides information on proteomics applied to various biological samples from an extended fasting study. PBMCs appear to represent the best material for biomarker discovery. Although the plasma proteome shows the highest within-subject variability, the PBMC proteome shows the lowest between-subject variability. Therefore, PBMCs are the preferred material for proteomics studies in nutrigenomics. In the field of nutrition research, between-subject variation of omics applications is often bigger than the within-subject variation. As shown in chapter 2, figure 3, it even is possible to “fingerprint” the individual subjects based on the between-subject variation in proteomics data. This variation may therefore mask the true biological effect of the study on the proteome. Random Forests (RF) analysis performed on the entire dataset revealed that changes in the level of the RhoGDI2 protein of PBMC and plasma ApoA4 levels were the two most obvious biomarkers of an extended fasting. RF-analysis of multiplex immunoassay data revealed leptin and MMP-3 as biomarkers for extended fasting. It was concluded that an antibody based analysis is superior when plasma proteins are analyzed. However, in that case, proteins and their isoforms that are not represented in the antibody set could be missed.

In **Chapter 3** we have applied our self-designed proteomics subtraction approach to search for protein changes in the *in vivo* adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects, who underwent an intervention of 5 weeks of a very low calorie diet followed by 3 weeks of a normal diet. On average, the loss of 9.5 kg of the body weight was largely contributed by the loss of fat mass (7.1 kg). Various parameters of adiposity and lipid metabolism changed significantly. Proteomic analysis revealed 6 significantly changed proteins. Fructose-bisphosphate aldolase C (two isoforms) and tubulin- $\beta$ 5 changed in the same direction in all subjects. Therefore, these proteins are biomarkers for the weight loss-maintenance intervention. Further, identified proteins indicate a reduced intracellular scaffolding of GLUT4 (ALDOC, TUBB5, ANXA2) and an increased handling of fatty acids (FABP4). An improved inflammatory profile of the adipose tissue (ApoA1, AOP1) and a change in fat droplet organization (vimentin) were also found. The correlation between changes in the intensities of protein spots and parameters of adiposity or lipid metabolism points to a link between aldo-ketoreductase 1C2 (AKR1C2) and adiposity, which was followed-up in a genetic association study of long term weight gain (Chapter 7). Correlations were also detected between FABP4 and

parameters of lipid metabolism, and between proteins for beta-oxidation (HADH, ACADS, ACAT1) and plasma free fatty acids levels. Altogether, our findings underscore the potential value of *in vivo* proteomics for human intervention studies. Moreover, they show that physiologic parameters are related to the molecular metabolism of adipose tissue.

In **Chapter 4** we went deeper into the molecular pathways related to glucose and fatty acid handling to investigate more specifically what happens in the adipose tissue after caloric restriction and return to a balanced diet. The proteomic systems view of the cell molecular metabolism revealed that HADH, catalase, fatty acid translocase, fatty acid transporter protein 3, adipose triglyceride lipase, FABP4, aldolase C, tubulin- $\beta$ 5, and annexinA2 changed significantly in relative abundance over the intervention. Perilipin B showed the highest up-regulation (10x,  $p=0.058$ ). It has been suggested that this protein associates with newly entered fatty acids at the cell membrane, after their conversion to triglycerides. An increased GLUT4 translocation was observed, which was mediated by phosphorylation of annexin A2 at tyrosine-24. Together, our findings suggest that after weight loss by calorie restriction and a short period of weight maintenance, adipocytes have increased their capacity for glucose and fatty acid uptake. "The adipocytes scream for fat after weight loss". This may generate a potential risk for weight regain after weight loss.

Differential gel electrophoresis followed by identification of proteins by mass spectrometry (MS) is a commonly used protein profiling method. However, observed changes in protein abundance can be explained in multiple ways, one of which is by the protein turnover rate. In order to easily and rapidly obtain information on both the identity and turnover of individual proteins, in **Chapter 5** we applied a combination of protein labeling with L-(ring-2,3,4,5,6- $^2$ H $_5$ ) phenylalanine and MALDI-TOF MS. While the spectrum reveals the identity of a protein, mass isotopomer profile provides information about the rate of protein labeling as a measure of synthesis or turnover. Using this approach on mature 3T3-L1 adipocytes, cytoskeleton proteins appeared to be slowly metabolized, whereas components of the extracellular matrix (ECM), in particular collagen type I alpha 1 (COL1A1) and collagen type I alpha 2 (COL1A2), showed rapid accumulation of newly synthesized proteins. Both proteins appeared to be renewed in the same ratio as they are present in collagen fibers, i.e. 2:1 (COL1A1:COL1A2). In addition, functionally related proteins like collagen-processing enzymes, were also readily labeled. From those findings we concluded that 'resting' mature adipocytes spend much of their energy on the maintenance of the ECM.

It is crucial to have specific proteins identified by proteomics as biomarkers for defined conditions or as components of biological processes and pathways. In **Chapter 6** we point out that one needs to be careful with assigning differential expression of proteins to specific experimental conditions, and regarding them as markers for those conditions. We critically reviewed

differentially expressed proteins from comparative proteomic studies identified by 2-DE followed by MS, especially with MALDI technique. Based on 66 of those studies, a list of 44 proteins was presented as generally detected proteins regardless of species, *in vivo* or *in vitro* conditions, tissues and organs, and experimental objective. The enriched functions linked to these generally detected proteins reveal that there are some common biological features beyond technical limitations. Cellular stress response can be the universal reason as to why these proteins are generally expressed differentially. Using those proteins as biomarkers for cellular processes other than stress response should be done with caution. In future proteomic studies more profound approaches should be applied to look beyond these proteins to find specific biomarkers.

In **Chapter 7** we studied the genetic background for long term weight gain over a 10-year period. In men the allelic distribution of FTO rs9939609, ACE rs4340 and AKR1C2 rs12249281 differed significantly between the weight stable and weight gainers group. Also an interaction between FTO rs9939609 and ACE rs4340 in men was observed. In women the allelic distribution of MMP2 rs1132896 differed between the weight stable and weight gainers group. The A allele of FTO was associated with a 1.99x higher risk of gaining weight in men, while in women the C allele of MMP2 was associated with a 2.50x higher risk of weight gain,. This chapter also demonstrated that proteomics studies can be useful for the selection of candidates in genetic association analysis. AKR1C2, which was found differentially expressed in adipocytes during weight loss-maintenance (Chapter 3), has shown to be involved in the genetic background of long term weight gain.

**Chapter 8** provides a general discussion based on the experimental studies presented in this thesis. The pros and cons of proteomics in nutritional studies are discussed and suggestions and guidelines are presented for further research.

The results of this thesis broaden the methodological applications of proteomics, including subtraction proteomics for the enrichment of cell type-specific proteome analysis, and protein isotopomer-labeling to obtain information on protein turnover by mass spectrometry. At the same time a warning is issued against misinterpretation of differentially expressed proteins. Using proteomics to study adipose tissue or adipocytes, a systems view was generated of the cell molecular metabolism, intervention biomarkers were detected, correlations were revealed between changes in cellular proteins and physiologic parameters, and candidate genes for genetic association studies were identified. In conclusion, the research of this thesis contributes to the methodological and cell metabolic knowledge for better understanding of the complex role of adipose tissue and adipocytes in the context of weight regulation.





# Samenvatting



Dit proefschrift heeft als doel om de rol van het vetweefsel en de vetcellen te bestuderen in relatie tot gewichtsregulatie bij de mens. Daarbij is proteomics gebruikt als centrale analyse-strategie. In die zin heeft dit proefschrift ook als doel om het belang van proteomics binnen het gebied van de nutrigenomics aan te tonen.

**Hoofdstuk 1** bevat de algemene inleiding tot dit proefschrift. Het laat onder meer zien, dat bij het opzetten van een nutrigenomics experiment de selectie van het te bestuderen weefsel van groot belang is. In principe moet het weefsel gekozen worden dat, in combinatie met de gebruikte omics techniek, de meeste informatie oplevert.

**Hoofdstuk 2** geeft informatie over proteomics analyses van verschillende lichaamsmaterialen afkomstig van proefpersonen na langdurig hongeren. In het voedingsonderzoek wordt bij omics-toepassingen vaak een grote variatie tussen de proefpersonen waargenomen. Het is zelfs mogelijk om met de variatie in proteomics data een 'vingerafdruk' van proefpersonen te maken (figuur 3). Deze variatie kan het werkelijke biologische effect overschaduwen. Het plasma proteoom laat de meeste variatie tussen proefpersonen zien, terwijl het PBMC proteoom de laagste variatie tussen proefpersonen laat zien. Om die reden zijn PBMCs het meest te prefereren materiaal voor proteomics studies in nutrigenomics. Random Forests (RF) analyse uitgevoerd op de gehele dataset toont aan, dat veranderingen van de eiwitten RhoGDI2 in PBMCs en plasma concentraties van ApoA4 de meest duidelijke biomarkers zijn voor langdurig hongeren. RF analyse van multiplex immunoassay data wijst leptine en MMP-3 aan als biomarkers voor langdurig hongeren. Verder kwamen wij tot de conclusie, dat een analyse gebaseerd op antilichamen superieur is aan 2D-electroforese indien plasma eiwitten worden bestudeerd. Men moet zich wel realiseren, dat isovormen die niet worden herkend door de antilichamen, hierdoor kunnen worden gemist.

In **hoofdstuk 3** hebben wij onze zelf-ontwikkelde proteomics substractie methode gebruikt in de zoektocht naar eiwit-veranderingen in het *in vivo* proteoom van proefpersonen met overgewicht of obesitas. Deze proefpersonen ondergingen gedurende 5 weken een zeer laag calorie dieet gevolgd door een 3 weken durend energie-neutraal dieet. Gemiddeld was het totale gewichtsverlies 9.5 kg, waarvan het grootste gedeelte vetmassa (7.1 kg) was. Zoals te verwachten waren er voor en na het dieet significante verschillen waar te nemen in diverse parameters van vetzucht en het vetmetabolisme. Daarnaast laat proteomics analyse significante verschillen in zes eiwitten zien. De eiwitten fructose-difosfaat-aldolase C (twee isovormen) en tubuline- $\beta$ 5 veranderen voor alle proefpersonen in dezelfde richting, respectievelijk een verlaging en een verhoging. Om deze reden kunnen deze twee eiwitten worden beschouwd als biomarkers voor soortgelijke interventies. Verder suggereren andere geïdentificeerde eiwitten (ALDOA, TUBB5 en ANXA2) een verminderde verankering van GLUT4 in de cellen en een verhoogd transport van vetzuren

(FABP4). Nog andere eiwit-veranderingen duiden op een vermindering van de inflammatoire conditie van het vetweefsel (ApoA1, AOP1) en op een verandering in de intracellulaire organisatie van de vetdruppel (vimentine). Correlatie analyse laat een verband zien tussen de verandering in aldo-ketoreductase 1C2 (AKR1C2) en parameters van vetzucht. Deze bevinding was aanleiding voor een genetische associatie studie met gewichtstoename over de lange termijn (Hoofdstuk 7). Er werden ook correlaties tussen FABP4 en parameters van het vetmetabolisme gevonden. De laatste correlaties bestaan tussen eiwitten van de  $\beta$ -oxidatie (HADH, ACADS, ACAT1) en de vrije vetzuren concentratie in plasma. Al deze bevindingen benadrukken de potentiële waarde van *in vivo* proteomics bij humane interventie studies. Daarnaast laten de resultaten zien dat fysiologische parameters zijn verbonden met het moleculaire metabolisme van het vetweefsel.

In **hoofdstuk 4** wordt dieper ingegaan op de moleculaire pathways, die verband houden met het glucose- en vetzuur-metabolisme. Dit om meer specifiek te onderzoeken wat er gebeurt in het vetweefsel na een zeer laag calorie dieet, gevolgd door een gebalanceerd dieet. Proteomics analyse van het moleculaire metabolisme laat zien, dat de relatieve hoeveelheid van de eiwitten: HADH, CAT, FAT, FATP3, ATGL, FABP4, ALDOC, TUBB5 en ANXA2 significant verandert gedurende de interventie. Perilipine B laat de grootste vermeerdering zien (10x,  $p=0.058$ ). Er wordt verondersteld dat dit eiwit geassocieerd is met nieuw-opgenomen vetzuren, die bij het celmembraan worden omgezet in triglyceriden. Er werd ook een verhoogde GLUT4 translocatie naar het celmembraan waargenomen, gemedieerd door fosforylatie van annexine A2 op de tyrosine-24 positie.

Alles tezamen suggereren onze bevindingen, dat na gewichtsverlies door calorische restrictie en een korte periode van gewichtsbehoud, de vetcellen hun vermogen om glucose en vetzuren op te nemen verhogen. De vetcel 'schreeuwt als het ware' om vet na gewicht verlies. Dit lijkt een potentieel risico in te houden voor gewichtstoename na afvallen.

Differentiële gel elektroforese gevolgd door eiwit identificatie met behulp van massa spectrometrie (MS) is een veel gebruikte methode voor het in beeld brengen van eiwit-veranderingen in het proteoom. Maar de waargenomen eiwit-veranderingen kunnen op verschillende manieren worden verklaard, bijvoorbeeld door een verandering in de snelheid van aanmaak en afbraak van een eiwit. Om makkelijk en snel informatie over de eiwit identificatie en eiwit aanmaak te krijgen, hebben wij in **hoofdstuk 5** een combinatie van eiwit labeling met L-(ring-2,3,4,5,6- $^2$ H<sub>5</sub>) fenylalanine en MALDI-TOF-MS toegepast. Terwijl het spectrum de identiteit van het eiwit onthult, geeft het isotopomeer-profiel na verschillende tijden informatie over de snelheid van eiwit labeling, wat een maat is voor de eiwit aanmaak. Door deze toepassing te gebruiken op 3T3L1 vetcellen vonden wij, dat in volwassen vetcellen het cytoskelet een lange levensduur heeft, terwijl componenten van de

extracellulaire matrix (ECM) -vooral collageen type I  $\alpha 1$  (COL1A1) en collageen type I  $\alpha 2$  (COL1A2)- een snelle omzetting laten zien. Bovendien lijken beide eiwitten in dezelfde ratio van 2:1 (COL1A1:COL1A2) te worden aangemaakt als de ratio waarmee zij in collageen vezels voorkomen. Dit duidt op een gecoördineerde aanmaak. Ook functioneel gerelateerde eiwitten zoals collageen-processing eiwitten blijken een snelle omzetting te hebben. Hieruit valt te concluderen dat rustende, volwassen vetcellen veel energie besteden aan het onderhoud van hun ECM.

Het is van evident belang om met behulp van proteomics specifieke eiwitten te kunnen identificeren en als zodanig aan te wijzen als biomarkers voor specifieke condities of als onderdeel van biologische processen en pathways. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat men voorzichtig moet zijn met het toewijzen van differentieel geëxprimeerde eiwitten aan bepaalde experimentele condities, en om dergelijke eiwitten te benoemen tot markers voor die condities. Wij hebben van vergelijkbare proteomics studies de differentieel geëxprimeerde eiwitten verzameld die geïdentificeerd zijn met behulp van 2-DE gevolgd door MS, vooral de MALDI methode. Gebaseerd op 66 studies is er een lijst opgesteld van 44 eiwitten die in bijna alle studies gedetecteerd werden, ongeacht de soort, *in vivo* of *in vitro* conditie, type weefsel, orgaan, en studie doel. Functie-analyse van deze algemeen gedetecteerde eiwitten laat zien, dat ze gemeenschappelijke biologische functies hebben, los van de technische beperkingen. De cellulaire stress reactie kan een reden zijn, waarom deze eiwitten zo vaak geïdentificeerd worden. Het betekent, dat men uitermate voorzichtig moet zijn bij het toewijzen van deze eiwitten als biomarkers aan cellulaire processen anders dan de stress reactie. In toekomstige proteomics studies zal verder dan deze eiwitten moeten worden gezocht met meer specifieke benaderingen om betrouwbare biomarkers te vinden.

In **hoofdstuk 7** bestuderen wij de genetische achtergrond op gewichtstoename gedurende een periode van 10 jaar. Bij mannen is de allel-verdeling van FTO rs9939609, ACE rs4340 en AKR1C2 rs12249281 significant verschillend tussen de gewicht-stabiele groep en de groep met gewichtstoename. Ook werd er een interactie tussen FTO rs9939609 en ACE rs4340 bij mannen waargenomen. Bij vrouwen is de allel-verdeling van MMP2 rs1132896 significant verschillend tussen de gewicht-stabiele groep en de groep met gewichtstoename. Het A allel van FTO is geassocieerd met een 1.99x hoger risico op gewichtstoename bij mannen, terwijl bij vrouwen het C allel van MMP2 geassocieerd is met een 2.50x hoger risico voor gewichtstoename. In dit hoofdstuk hebben we ook laten zien, dat proteomics studies kunnen worden gebruikt voor de selectie van kandidaat-genen voor genetische associatie analyses. Volgens de studie in dit hoofdstuk blijkt AKR1C2, dat differentieel geëxprimeerd is in vetcellen gedurende gewichtsverlies gevolgd door gewichtsbehoud (hoofdstuk 3), een bijdrage te

leveren aan de genetische achtergrond van gewichtstoename over een langere periode.

**Hoofdstuk 8** bevat een algemene discussie gebaseerd op de experimenten die in dit proefschrift zijn beschreven. De voor- en nadelen zijn benoemd, suggesties en richtlijnen zijn gegeven voor verder onderzoek.

De studies in dit proefschrift hebben bijgedragen aan de methodische toepassingen van proteomics, inclusief substractie-proteomics om tot een verrijking van het cel-specifieke proteoom te komen en eiwit isotopomeer labeling met massa spectrometrie voor het verkrijgen van informatie omtrent de snelheid van eiwit aanmaak. Tegelijkertijd hebben we gewaarschuwd voor het verkeerd interpreteren van algemene, differentieel geëxprimeerde eiwitten. Met het gebruik van proteomics om vetweefsel of vetcellen te bestuderen, is een systemisch overzicht gegenereerd van het moleculair cel-metabolisme, zijn interventie biomarkers gedetecteerd, zijn correlaties tussen veranderingen in cellulaire eiwitten en fysiologische parameters blootgelegd en zijn kandidaat genen voor genetische associatie studies geïdentificeerd. Geconcludeerd kan worden, dat het onderzoek van dit proefschrift een bijdrage heeft geleverd aan de methodologische en cel-metabolische kennis, waarmee de complexe rol van vetweefsel en vetcellen bij gewichtsregulatie beter kan worden begrepen.