

# The role of the skeletal muscle in the early onset of the metabolic syndrome : a nutrigenomics approach

## Citation for published version (APA):

de Wilde, J. (2010). *The role of the skeletal muscle in the early onset of the metabolic syndrome : a nutrigenomics approach*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20101217jw>

## Document status and date:

Published: 01/01/2010

## DOI:

[10.26481/dis.20101217jw](https://doi.org/10.26481/dis.20101217jw)

## 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

## Summary

The metabolic syndrome (MetS) is a cluster of metabolic abnormalities which includes obesity and insulin resistance. Since the increasing prevalence of the MetS will have major economic and societal consequences there is an urgent need for better intervention and treatment strategies. Until now, the underlying mechanisms of the MetS are still unclear and more molecular research is necessary. One of the factors responsible for the increasing prevalence of the MetS is an increased dietary fat intake. Therefore, it is essential to obtain a comprehensive view of molecular profiles under high fat diet (HFD) conditions. Examining the effects of a specific nutrient, food component or diet at the gene, protein and metabolite levels is defined as nutrigenomics. The aim of the research described in this thesis was to characterize molecular changes in the skeletal muscle, which is a tissue of major importance in the metabolism of dietary fat, in the early onset of the MetS. Specifically, changes at the gene, protein and metabolite level were studied in the mouse skeletal muscle under influence of HFD conditions.

The effects of a short-term HFD on the mouse muscle transcriptome were studied in **chapter 2**. By performing microarray analysis we found that genes involved in a variety of biological processes including fat metabolism were up-regulated by the HFD. This transcriptional up-regulation was more pronounced at day 3 than week 4. However, protein levels of markers for oxidative phosphorylation were increased in muscle of 4-week HFD mice. These results indicate that expression of genes involved in fat metabolism tends to decrease over time, whereas protein levels are maintained. The skeletal muscle of human insulin resistant subjects is characterized by a reduced fat oxidative capacity and impaired mitochondrial function. Therefore, we hypothesized that after an early positive adaptation, a continued transcriptional down-regulation of genes related to fat metabolism will result in reduced fat oxidative capacity in the long run.

In **chapter 3** we combined extensive characterization of physiological changes with muscle transcriptomics. The 8-week HFD induced obesity impaired whole-body insulin sensitivity and reduced insulin sensitivity of heart, visceral fat depots and muscle. Furthermore, plasma leptin was increased and plasma adiponectin was decreased in HFD mice as compared with LFD mice. Microarray analysis revealed that the HFD induced a small, but consistent up-regulation of genes involved in fat metabolism. As markers for  $\beta$ -oxidation, TCA cycle and oxidative phosphorylation were not affected by this 8-week HFD, we speculated that fat oxidative capacity was still sufficient to handle the increased fat load. Indeed, in **chapter 4** we observed that fat oxidative capacity was not affected by an 8-week HFD. After 20 weeks however, an adaptive increase of lipid oxidative capacity was found in muscle of HFD

mice as compared to LFD mice. The HFD impaired insulin sensitivity and thus as such these findings do not confirm our expectations based on the results from **chapter 2**. Altogether, under HFD conditions the mouse skeletal muscle is characterized by a metabolic adaptation, i.e. increased fat oxidative capacity. Despite this metabolic adaptation the occurrence and progression of insulin resistance cannot be prevented. Therefore, it is unlikely that a HFD contributes to insulin resistance by impairing skeletal muscle fat oxidative capacity.

The most common fatty acid in Western style diets is palmitic acid. To get more insight in the effects of palmitic acid on muscle cells we performed *in vitro* studies with the C2C12 cell line as a model. By using two-dimensional gel electrophoresis we identified adipophilin (Adfp) as the strongest regulated protein in cells exposed to palmitic acid (**chapter 5**). Adfp is one of the proteins of the PAT family (Perilipin, Adfp, TIP47, S3-12 and OXPAT) which is involved in coating the triglyceride-containing lipid core of lipid droplets. Further *in vitro* experiments revealed that cells treated with oleic acid have higher Adfp protein levels, higher cellular triglyceride levels, but less impairment of the insulin signaling pathway than cells treated with palmitic acid. *In vivo*, we found that Adfp protein expression is influenced by muscle type with higher levels in muscle types with a more oxidative character. This was especially evident under HFD conditions. Additionally, we found that when mice are fed a HFD with a higher unsaturated vs. saturated fatty acid ratio, Adfp protein expression in muscle is increased which was accompanied by indications for better insulin sensitivity. Based on these results we hypothesize that Adfp protein expression in muscle is involved in maintaining insulin sensitivity. A possible *in vitro* approach to test this hypothesis can be the use of RNA interference to knock down the expression of Adfp. For *in vivo* studies DNA electroporation to increase Adfp expression or a combination of both methods could be a possible approach.

Cellular membranes such as the mitochondrial membrane maintain and regulate ionic gradients, potential differences and uptake of substrates such as fatty acyl CoAs. In **chapter 2** we demonstrated that a 4-week HFD increases the saturation of skeletal muscle phospholipids which was especially evident in phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). PC and PE are the predominant phospholipids in the mitochondrial membrane. The fatty acid composition and the saturation degree of phospholipids are of great importance for proper membrane function. Increased saturation of membrane phospholipids reduces fluidity of the membrane which interferes with membrane-bound processes. It is conceivable that an increase in mitochondrial membrane phospholipid saturation interferes with mitochondrial function and thereby skeletal muscle metabolic function. This hypothesis was examined in **chapter 4**. The 8-week HFD increased the saturation degree of muscle mitochondrial phospholipids, but skeletal muscle mitochondrial function

was comparable in HFD and LFD mice. The 20-week HFD however, increased the amount of n-6 polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle mitochondrial phospholipids. The increased unsaturation index was accompanied by an increased fat oxidative capacity. Interestingly, this increased unsaturation did not improve pyruvate-stimulated respiration in HFD mice. These results indicate it is not the mitochondrial phospholipid composition *per se* that influences mitochondrial function.

Several factors including aging, exercise and alterations in muscle innervations are known to induce fiber type transitions. That a HFD can also induce a fiber type conversion was shown in **chapter 2**. A 3-day HFD as well as a 4-week HFD increased the expression level of genes and protein that are markers for the more oxidative fiber types. These results indicate that the skeletal muscle morphologically adapts to a HFD by the transition to a more oxidative character *via* a transcriptional mechanism. Data presented in **chapter 6** revealed that this up-regulation is not maintained in the long run. Both the 8-week and 20-week HFD did not, or minimally, affect the expression of genes that are known to be markers for the more oxidative fiber types. Thus, the HFD-induced transcriptional up-regulation of oxidative fiber type markers is an early and rapid response.

A major strength of transcriptomics is that all genes active in the tissue under investigation can be identified. As such, genes that were formerly not related to a particular tissue can be identified as shown in **chapter 6**. By performing microarray analyses we found that the *Dkk3*, *Hoxd8*, *Hoxd9* and *Tbx1* genes, which are known for their critical role in embryogenesis, are detectably and differentially expressed in the gastrocnemius, quadriceps and soleus muscles of adult mice. The expression of these genes was not influenced by the HFD. Little is known about the function of these embryogenic genes in adult muscle tissue. It may be possible that these genes are involved in maintaining the identity of the muscle groups. To obtain more information about the function of these genes the development of tissue-specific knock-out mouse models for the indicated genes could be a possible approach in an attempt to determine their function.

To conclude, under HFD conditions the skeletal muscle is characterized by changes at the mRNA, protein and lipid metabolite level pointing to an adaptive response to increase the fat oxidative capacity. Because adaptations at the molecular level could be confirmed at the functional level, results described in this thesis are a unique example of how molecular research can be successfully integrated with more functional-based research such as mitochondrial respirometry.

# Samenvatting

## Samenvatting

Het metabool syndroom (MetS) is een verzameling van metabole aandoeningen zoals obesitas en insuline resistentie. Het MetS komt wereldwijd steeds meer voor en dit heeft grote economische en maatschappelijke gevolgen zoals bijvoorbeeld een stijging van de medische kosten. Er is dan ook een dringende behoefte aan zowel betere preventieve als aan betere behandelingsstrategieën. Aangezien de onderliggende oorzaken van het MetS nog steeds onduidelijk zijn is meer moleculair onderzoek noodzakelijk. Eén van deze oorzaken is een verhoogde inname van vetrijke voeding. Om inzicht te krijgen in de effecten die een vette voeding heeft op het lichaam is het dus essentieel om onderliggende moleculaire veranderingen die veroorzaakt worden door een verhoogde vetinname in kaart te brengen. Het bestuderen van de effecten van een nutriënt of specifiek dieet op gen, eiwit of metaboliet niveau wordt gedefinieerd als nutrigenomics. Het doel van het onderzoek in dit proefschrift was het bestuderen van moleculaire veranderingen in de skeletspier, die een belangrijke rol speelt in het vetmetabolisme, tijdens de vroege ontwikkeling van het MetS. Daarvoor zijn muizen blootgesteld aan een vetrijk dieet en zijn veranderingen op gen, eiwit en metaboliet niveau in de skelet spier geanalyseerd.

In **hoofdstuk 2** zijn de korte termijn effecten van een vetrijk dieet op het transcriptoom van de spier bestudeerd. Deze studie toonde aan dat de expressie van meer dan duizend genen veranderd was na zowel 3 dagen als 4 weken vetrijke voeding. Deze genen konden worden gerelateerd aan verschillende biologische processen waaronder het vetmetabolisme. De verhoogde expressie van genen betrokken bij het vetmetabolisme was sterker na 3 dagen dan na 4 weken. Echter, het eiwit niveau van markers voor oxidatieve fosforylering was verhoogd na 4 weken vetrijke voeding. Deze resultaten suggereren dat de expressie van genen die een rol spelen in het vetmetabolisme afneemt in de tijd, terwijl eiwitniveaus gehandhaafd blijven. De skeletspier van mensen met insuline resistentie wordt gekenmerkt door een verminderde vet oxidatieve capaciteit en een verstoorde mitochondriële functie. Het is dus mogelijk dat na een vroege positieve adaptatie een voortdurende verlaging van de transcriptie van genen betrokken bij vetmetabolisme leidt tot een verminderde vet oxidatieve capaciteit op de lange termijn.

Een vetrijk dieet heeft niet alleen moleculaire effecten op het spiertranscriptoom, maar veroorzaakt ook veranderingen in de fysiologie. In **hoofdstuk 3** zijn beide aspecten bestudeerd na een dieetinterventie van 8 weken. Deze studie toonde aan dat muizen na een vetrijk dieet van 8 weken obees zijn en een verminderde insuline gevoeligheid hebben. De plasmawaarde van leptine was verhoogd en die van adiponectine was verlaagd in de hoog vet gevoede muizen. Ondanks deze

fysiologische veranderingen had het vetrijke dieet een minimaal effect op het transcriptoom van de spier. Wel vonden we een kleine, maar duidelijk toename van de expressie van genen die een rol spelen bij het vetmetabolisme. Echter, het vetrijke dieet veroorzaakte geen veranderingen in markers voor  $\beta$ -oxidatie, citroenzuurcyclus en oxidatieve fosforylering. Deze resultaten suggereren dat de vet oxidatieve capaciteit voldoende was voor de verhoogde vet aanvoer. Deze hypothese werd onderzocht na dieetinterventies van 8 en 20 weken zoals beschreven in **hoofdstuk 4**. Na 8 weken vonden we dat de vet oxidatieve capaciteit van vetrijk gevoede muizen vergelijkbaar was met de vet oxidatieve capaciteit van controle muizen. Echter, na 20 weken vonden we een verhoogde capaciteit voor vetoxidatie in muizen blootgesteld aan een vetrijk dieet. Aangezien het vetrijke dieet een verminderde insuline gevoeligheid veroorzaakte komen deze bevindingen niet overeen met onze verwachtingen gebaseerd op de resultaten beschreven in **hoofdstuk 2**.

Samenvattend, tijdens een vetrijk dieet wordt de skeletspier van muizen gekenmerkt door een metabole aanpassing die een verhoging van de vet oxidatieve capaciteit veroorzaakt. Ondanks deze metabole aanpassing wordt een vermindering van de insuline gevoeligheid niet voorkomen. Het is dan ook onwaarschijnlijk dat een verstoorde vet oxidatieve capaciteit van de spier bijdraagt aan de ontwikkeling van verminderde insuline gevoeligheid tijdens vetrijke voeding, althans bij muizen.

Eén van de meest voorkomende vetzuren in een Westers dieet is palmitaat. Het effect van palmitaat op spiercellen is onderzocht in een *in vitro* model, de muizen C2C12 cellijn. Deze studie toonde aan dat Adipophilin (Adfp) het sterkst gereguleerde eiwit was in het 2-DE proteoom van spiercellen behandeld met palmitaat (**hoofdstuk 5**). Adfp behoort tot de PAT eiwit familie (Perilipin, Adfp, TIP47, S3-12 en OXPAT) die betrokken is bij het coaten van vetdruppeltjes. Ten op zichte van palmitaat verhoogde oleaat zowel het Adfp eiwit niveau als de hoeveelheid intracellulair vet in spiercellen. Echter, de insuline gevoeligheid was beter in cellen behandeld met oleaat dan in cellen die behandeld waren met palmitaat. *In vivo* vonden we dat het Adfp eiwit niveau samenhangt met het spiertype met een hoger niveau in de meer oxidatieve spieren. Dit kwam duidelijk naar voren in spieren van vetrijk gevoede muizen. Een aantal waarnemingen bij deze muizen sluit aan bij onze *in vitro* resultaten. Een vetrijk dieet bestaande uit een grotere hoeveelheid onverzadigde vetzuren verhoogde het Adfp eiwit niveau in de muizenspier. Tevens vonden we aanwijzingen voor een betere insuline gevoeligheid in muizen gevoed met een meer onverzadigd vetrijk dieet. Het is daarom mogelijk dat Adfp eiwit niveaus in de spier een rol spelen bij het handhaven van de insuline gevoeligheid. Deze hypothese kan *in vitro* getest worden door gebruik te maken van RNA interference, een techniek om de expressie van Adfp te verlagen. DNA electroporatie zou een optie zijn voor *in vivo* onderzoek.



Cellulaire membranen zoals het mitochondriële membraan spelen een rol bij het handhaven van de ion gradiënt en het potentiaal verschil en bij het transport van substraten. Na 4 weken vetrijke voeding vonden we een toename van verzadiging van fosfolipiden van de skeletspier (**hoofdstuk 2**). Dit was met name duidelijk in de fosfolipiden fosfatidylcholine en fosfatidylethanolamine. Deze fosfolipiden zijn de meest voorkomende fosfolipiden in het mitochondriële membraan. De vetzuursamenstelling en de mate van verzadiging van fosfolipiden zijn belangrijk voor het correct functioneren van het membraan. Des te hoger de verzadiging des te lager de vloeibaarheid van het membraan en des te lastiger membraangebonden processen, waaronder het transport van substraat, kunnen plaatsvinden. Het is dus mogelijk dat een toename in de verzadiging van de mitochondriële fosfolipiden de processen in de mitochondriële membraan en daarmee de mitochondriële functie van de skeletspier verstoort. Deze hypothese werd onderzocht in **hoofdstuk 4**. De studie toonde aan dat mitochondriële fosfolipiden meer verzadigd waren na een vetrijk dieet van 8 weken. Echter, mitochondriële functie in spierweefsel van vetrijk gevoede muizen was vergelijkbaar met die van controle muizen. Na 20 weken vetrijke voeding vonden we een toename van de hoeveelheid n-6 meervoudig onverzadigde vetzuren in mitochondriële fosfolipiden van de skelet spier. Deze verminderde mate van verzadiging ging samen met een toename van de vet oxidatieve capaciteit. Deze resultaten suggereren dat vetrijke voeding bij muizen leidt tot een adaptatie van de oxidatieve capaciteit via de verhoging van het gehalte n-6 meervoudig onverzadigde vetzuren in het mitochondriële membraan. Echter, deze studie toonde ook aan dat oxidatieve capaciteit voor koolhydraten in spieren van vetrijk gevoede muizen vergelijkbaar was met die van de controle muizen. Samenvattend kan daarom gesteld worden dat het niet alleen de samenstelling van het mitochondriële membraan is die mitochondriële functie beïnvloedt.

Verschillende factoren zoals veroudering en training kunnen een verandering van het vezeltype veroorzaken. In **hoofdstuk 2** lieten we zien dat ook een vetrijk dieet een dergelijke verandering kan veroorzaken. Zowel na 3 dagen als na 4 weken vonden we een verhoogde expressie van genen en eiwitten die markers zijn voor de meer oxidatieve vezeltypes. Deze bevindingen suggereren dat een transcriptioneel mechanisme verantwoordelijk is voor de morfologische adaptatie van de spier onder invloed van vetrijke voeding. Dat deze adaptie niet aanhoudt op de lange termijn werd aangetoond in **hoofdstuk 6**. Op 8 en 20 weken vonden we dat de genexpressie van markers van de meer oxidatieve vezeltypes niet of nauwelijks werd beïnvloed door het vetrijke dieet. Deze resultaten betekenen dat de verhoogde genniveaus van markers voor de meer oxidatieve vezeltypes vroege en snelle adaptaties zijn aan een vetrijk dieet.

Een groot pluspunt van transcriptomics is dat alle actieve genen in het te onderzoeken weefsel aangetoond worden. Hierdoor kunnen genen die voorheen niet gerelateerd werden aan een specifiek weefsel worden geïdentificeerd zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. Deze studie liet zien dat de *Dkk3*, *Hoxd8*, *Hoxd9* en *Tbx1* genen, die bekend zijn om de cruciale rol in embryogenese, detecteerbaar en verschillend tot expressie komen in de gastrocnemius, quadriceps en soleus spieren van volwassen muizen. Tevens toonden we aan dat de niveau's van deze vier genen niet verandert onder invloed van een vetrijk dieet. Tot op heden is weinig bekend over de functie van deze embryonale genen in volwassen spierweefsel. Mogelijk spelen deze genen een rol bij het bepalen van de identiteit van de verschillende spiertypen. Om meer informatie te verzamelen over de functie van deze genen is de ontwikkeling van knock-out muis modellen voor genoemde genen een mogelijke werkwijze.

Concluderend, tijdens een vetrijk dieet wordt de skelet spier gekenmerkt door veranderingen op gen, eiwit en vetmetabolietniveau die duiden op een adaptatie met als doel de vet oxidatieve capaciteit te verhogen. Deze moleculaire adaptaties werden bevestigd op het meer functionele niveau. De bevindingen in dit proefschrift zijn dan ook een uniek voorbeeld dat laat zien hoe moleculair onderzoek succesvol geïntegreerd kan worden met meer toegepast onderzoek zoals mitochondriële respiratiemetingen.