

Chapter 7

Summary / Samenvatting

7

Summary

Obesity and overweight are both conditions of excessive/abnormal fat accumulation and are leading risk factors for many metabolic diseases, such as insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. The principal site of fat accumulation in the body is adipose tissue, the organ traditionally defined as a quiescent energy reservoir. Nowadays, adipose tissue has gained interests as an endocrine organ since its secretory function reflects adaptability to an altered systemic metabolic status. In addition to white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT) is another specialized adipose tissue that, in contrast to WAT, utilizes energy substrates for metabolic heat production, a crucial cold-defense mechanism to maintain body temperature in neonates and small mammals. After the rediscovery of active BAT in adult humans, activation of BAT is considered one of the promising therapeutic targets to increase energy expenditure for combating the global obesity pandemic.

Fat distribution physiologically shows a sexually dimorphic pattern: men store fat predominantly in visceral (intra-abdominal) WAT depots, resulting in an apple-shaped body, whereas women accumulate fat principally in subcutaneous WAT depots, e.g. gluteofemoral region, resulting in a pear-shaped body contour. In addition, women of reproductive age have a lower incidence of metabolic diseases than age-matched men. However, after menopause, women are more susceptible to visceral obesity (the male pattern of fat accumulation), which is linked to an increased incidence of metabolic diseases. Sex differences in BAT abundance and function are also reported. In general, women and female rodents have a higher BAT mass and/or greater BAT activity than men and male rodents. Altogether, human and rodent studies pinpoint protective effects of estrogens on energy balance and metabolic risk factors, while androgens in general have a negative effect on metabolic risk factors.

Apart from sex steroids, glucocorticoids (GCs; cortisol for humans and corticosterone for rodents), which are adrenal steroid hormones principally secreted in response to stress, have also been implicated in the control of energy metabolism and hence metabolic risk factors. The main function of endogenous GCs is to supply glucose for vital organs through many mechanisms, including inhibition of glucose uptake by WAT. Sustained elevated GC levels or chronic exposure to exogenous GCs, such as synthetic corticosteroids, result in many metabolic adverse effects, including weight gain, truncal obesity, insulin resistance, and poor glycemic control. However, whether the adverse effects of GCs are expressed in a sex-dependent manner is unclear. The general aim of this thesis therefore is to broaden our understanding of sex differences in adipose tissue function.

Chapter 1 is a general introduction of this thesis and describes 1) basic knowledge of adipose tissue biology, including adipogenic programming, lipid metabolism in adipocytes, secretory function of WAT, and thermogenic function of BAT; 2) roles of sex and stress steroids on the distribution and function of adipose tissue; and 3) a general concept of body thermoregulation which is important for an understanding of BAT thermogenesis.

In **Chapter 2**, the effects of a high dose of corticosterone on systemic glucose homeostasis and adipose tissue adaptation were studied in male and female mice. Upon corticosterone treatment, male mice had nonfasting hyperglycemia, which resembles the pathognomonic sign of steroid-induced diabetes in humans. Female mice, in contrast, remained normoglycemic throughout the two weeks of treatment. However, both sexes showed normal fasting glucose levels and profoundly elevated fasting insulin levels, indicative of insulin resistance. Stable isotope-labeled glucose techniques were utilized during the glucose tolerance test and confirmed that female mice had a higher basal glucose clearance rate than male mice upon corticosterone treatment. WAT and BAT depots were enlarged by corticosterone treatment in both sexes, but female mice manifested more metabolically protective adaptations than males, i.e., more hyperplastic WAT morphology and higher serum adiponectin levels. *In vitro* studies in white and brown adipocyte cell lines suggested that the increased adiponectin level in female mice was likely driven by an elevated insulin level rather than a direct effect of corticosterone treatment.

Sex differences in BAT prevalence and activity are reported to be likely caused by a stimulatory effect of estrogens and/or an inhibitory effect of androgens on BAT, or a stimulatory effect of estrogens on the central nervous system that regulates BAT thermogenesis. To uncover if molecular mechanisms contribute to the sexual dimorphism in BAT function, RNA-sequencing was performed to identify sex differences in the murine BAT transcriptome. The data presented in **Chapter 3** show that sex differences in BAT gene expression were evident for genes encoding proteins involved in cellular structure, cell-cell contact, and cell adhesion. Interestingly, ovariectomy significantly affected while orchietomy marginally influenced expression levels of the identified genes. Moreover, *in silico* upstream regulator analysis supported that 17 β -estradiol (E2), progesterone, and dihydrotestosterone were among the top significant upstream regulators for these sex-differentially expressed genes. Direct effects of progesterone were further tested in primary cultures of brown adipocytes and it was found that progesterone inhibited expression of some identified genes, as well as common brown adipocyte markers. This inhibitory effect of progesterone is likely mediated by the glucocorticoid receptor rather than the progesterone receptor. Furthermore, although primary brown adipocytes were maintained in a

similar sex steroid milieu, basal expression of many sex-differentially expressed genes remained higher in female adipocytes than in male adipocytes, suggesting intrinsic roles of sex origin of the cells.

When housed under general laboratory conditions, female rodents have a higher thermogenic capacity in BAT than their male counterparts. However, this difference is diminished upon cold exposure in which BAT thermogenesis is maximally activated. This finding indicates that a difference in thermal perception might underlie the sex-dependent thermogenic responses, which we studied subsequently in both mouse and human. **Chapter 4** describes that female mice prefer a higher ambient temperature than male mice, especially when physical activities are generally low. Of interest, gonadectomy in adult mice did not alter this sex-specific thermal preference, indicating that the neural control of thermal sensation is sex-dependently regulated by factors other than gonadal factors or that the neural circuit has been determined prior to puberty.

It is documented that males and females pose many differences in the thermoregulatory system. One of the principal determining factors is sexual dimorphism in body composition. Women (or female rodents) have a larger body-surface-area/mass ratio than men (or male rodents) that hence leads to a higher rate of net heat loss and greater thermal demand in females. Apart from the sex-dependent physical property, women also perceive a temperature lower than the thermoneutral zone colder and less comfortable than men, as is shown by the study in **Chapter 5**. This study shows that women start shivering at a higher temperature (a quantitative measure for cold sensation) than men during a gradually cold exposure protocol by a temperature-controlled water-perfused blanket. Interestingly, subgroup analysis which matches the body-surface-area/mass ratio between men and women did not alter the sex-dependent shivering temperature, suggesting that body composition is not the sole factor for sex differences in thermoregulation.

Finally, **Chapter 6** discusses the findings in this thesis that broaden our understanding of sex differences in the control of adipose tissue function. However, further studies are required to complete this complex picture of sexual dimorphisms in adipose tissue biology and energy metabolism in general.

Samenvatting

Een toegenomen opslag van vetten in vetweefsel leidt tot overgewicht of, in meer extreme mate, obesitas. Overgewicht is een risicofactor voor metabole ziekten zoals insuline resistentie en diabetes mellitus type 2. Tot voor kort werd aangenomen dat het vetweefsel een relatief passief orgaan is met als enige functie de opslag van vet. We weten nu echter dat vetweefsel één van de meest actieve endocriene organen is, het scheidt namelijk diverse factoren uit en reflecteert daarmee veranderingen in de metabole status van het lichaam. Naast het bekende wit vetweefsel, bestaat er ook bruin vetweefsel. Waar wit vetweefsel voornamelijk een grote rol speelt in de opslag van vetten, is bruin vetweefsel gespecialiseerd in het verbranden van vetten om warmte te produceren. Dit proces wordt thermogenese genoemd en is cruciaal bij neonaten en kleine zoogdieren om de lichaamstemperatuur op peil te houden. Nog niet zo lang geleden is aangetoond dat ook volwassenen bruin vetweefsel hebben en sindsdien wordt activering van bruin vetweefsel beschouwd als een veelbelovende methode in de strijd tegen overgewicht.

De vetverdeling verschilt tussen mannen en vrouwen: mannen hebben over het algemeen meer buikvet terwijl vrouwen meer onderhuids vet hebben. Een toename in lichaamsgewicht resulteert daarom bij mannen in een zogenaamde ‘appelvorm’ en bij vrouwen in een ‘peervorm’. Dit verschil in vetverdeling verklaart ook voor een deel waarom vrouwen voor de menopauze, de periode waarin er een groot verschil is tussen mannen en vrouwen in de hoeveelheid en type geslachtshormonen, beschermd zijn tegen metabole ziekten. Echter na de menopauze neemt bij vrouwen de hoeveelheid buikvet over het algemeen toe, een effect dat correleert met een toename in de incidentie van metabole ziekten.

Naast een verschil in de verdeling van wit vetweefsel tussen mannen en vrouwen is er ook een verschil in bruin vetweefsel tussen de geslachten. Vrouwen en vrouwelijke ratten en muizen - dieren die veelvuldig voor metabool onderzoek worden gebruikt - hebben over het algemeen meer en actiever bruin vetweefsel dan mannen en mannelijke ratten en muizen. Diverse studies hebben aangetoond dat oestrogenen (vrouwelijke geslachtshormonen) een positief effect en androgenen (mannelijke geslachtshormonen) een negatief effect hebben op de vet- en energiehuishouding.

Niet alleen geslachtshormonen, ook glucocorticosteroiden hebben een effect op de vet- en energiehuishouding. Glucocorticosteroiden zijn hormonen die onder invloed van stress door de bijnieren worden afgescheiden opdat vitale weefsels voldoende glucose krijgen, onder andere door de glucose opname door wit vetweefsel te remmen. Langdurig verhoogde glucocorticosteroid concentraties zorgen voor diverse metabool ongewenste effecten zoals gewichtstoename,

toename van de hoeveelheid buikvet en insuline resistentie. Het is niet bekend of mannen en vrouwen verschillend reageren op deze effecten van glucocorticosteroiden.

Het overkoepelende doel van dit proefschrift is om meer inzicht te krijgen in de geslachtsgebonden verschillen in de functionaliteit van het vetweefsel. **Hoofdstuk 1** is een algemene introductie en geeft een overzicht van de basale kennis van wit en bruin vetweefsel en -cellen. Daarnaast behandelt dit hoofdstuk de effecten van geslachtshormonen en glucocorticosteroiden op de vetverdeling en de functies van vetcellen. Dit hoofdstuk geeft eveneens een beschrijving van de processen die betrokken zijn bij de regulatie van de lichaamstemperatuur, hetgeen belangrijk is om de thermogene activiteit van bruin vetweefsel te begrijpen.

De geslachtsgebonden effecten van glucocorticosteroiden op het vetweefsel en de glucosehuishouding worden beschreven in **hoofdstuk 2**. Mannelijke en vrouwelijke muizen werden gedurende twee weken behandeld met een hoge dosis van het knaagdier-specifieke glucocorticosteroid corticosteron. De mannelijke muizen kregen onder invloed van corticosteron in de niet gevaste toestand een verhoogde bloedsuikervaarde, maar opmerkelijk genoeg werd dit niet waargenomen in de vrouwelijk muizen. In gevaste toestand hadden zowel de mannelijke als de vrouwelijke muizen na corticosteron behandeling een normale bloedsuikervaarde met een verhoogde plasma insuline concentratie: een indicatie dat corticosteron in beide geslachten insuline resistentie induceert. Met behulp van stabiele isotopen van glucose werd vervolgens aangetoond dat de glucose klaring na corticosteron behandeling hoger is in vrouwelijke dan in mannelijke muizen. In beide geslachten resulteerde corticosteron behandeling in een toename van wit en bruin vetweefsel. In vrouwelijk muizen ging deze toename gepaard met metabool relatief gunstige modificaties zoals een verhoogde plasma adiponectine concentratie. *In vitro* experimenten toonden vervolgens aan dat de verhoogde adiponectine concentratie waarschijnlijk het gevolg is van de hoge insuline spiegels en niet zozeer een direct effect is van corticosteron.

Geslachtsgebonden verschillen in bruin vetweefsel worden waarschijnlijk veroorzaakt door een stimulerend effect van oestrogenen en/of een remmend effect van androgenen op de activiteit van dit vetweefsel. Het is bijvoorbeeld bekend dat oestrogenen de thermogenese stimuleert via een effect op het centrale zenuwstelsel. Om de moleculaire mechanismen te achterhalen die betrokken zijn bij de geslachtsgebonden verschillen in bruin vetweefsel is de gen expressie van dit vetweefsel van mannelijke en vrouwelijke muizen onderzocht met behulp van RNA sequencing. De data die in **hoofdstuk 3** worden gepresenteerd laten zien dat genen die coderen voor eiwitten betrokken bij de cellulaire structuur, cel-cel contacten en de celadhesie meer tot expressie komen in bruin vetweefsel van

vrouwelijk muizen dan in dat van mannelijke muizen. Het verwijderen van de ovaria had een sterk effect op de expressie van deze genen, maar het verwijderen van de testes had geen of slechts marginaal invloed. In silico analyses toonden aan dat de expressie van de gevonden genen onder andere wordt gereguleerd door het oestrogeen 17β -estradiol en het androgeen dihydrotestosteron, maar dat tevens progesteron een rol speelt. De effecten van het vrouwelijk geslachtshormoon progesteron op vetweefsel en vetcellen zijn slechts in beperkte mate onderzocht. Daarom werd besloten om het effect van progesteron in meer detail te onderzoeken. Celkweek experimenten met primaire bruine vetcellen geïsoleerde uit muizen toonden aan dat progesteron de expressie van enkele van de geïdentificeerde genen onderdrukt. Daarnaast onderdrukt progesteron ook enkele klassieke markers van bruin vetweefsel, een effect dat zeer waarschijnlijk wordt bewerkstelligd door de glucocorticosteroid receptor en slechts in mindere mate door de progesteron receptor. Opvallend was dat bruine vetcellen geïsoleerd uit vrouwelijke muizen nog steeds een ander expressie patroon lieten zien dan de cellen uit mannelijke muizen, ondanks dat ze dagenlang in hetzelfde medium werden gekweekt. Dit suggereert dat niet alleen geslachtshormonen, maar ook het geslacht zelf een rol speelt in de geslachtsgebonden verschillen van bruin vetweefsel.

Het is gebruikelijk om laboratorium muizen bij circa 22 °C te huisvesten. Bij deze temperatuur heeft bruin vetweefsel van vrouwelijke muizen een hogere thermogene activiteit dan bruin vetweefsel van mannelijke muizen. Dit verschil verdwijnt echter wanneer de muizen worden blootgesteld aan een lage temperatuur zoals 4 °C, wat een gebruikelijke methode is om de thermogene activiteit van bruin vetweefsel te verhogen. Blijkbaar zorgt een verschil in perceptie van temperatuur voor een verschil in de thermogene activiteit van bruin vetweefsel van mannelijke en vrouwelijke muizen. Het is te verwachten dat een dergelijk verschil ook tussen mannen en vrouwen bestaat. Dit proefschrift bevat een tweetal studies waarin dit verschil werd bestudeerd. **Hoofdstuk 4** beschrijft een studie waarin werd gevonden dat vrouwelijk muizen een hogere omgevingstemperatuur prefereren dan mannelijke muizen, met name gedurende de inactieve fase. Gonadectomie (het verwijderen van de ovaria bij vrouwelijke muizen en de testes bij mannelijke muizen) had hierop geen effect, wat suggereert dat verschillen in neuronale netwerken die de gevoeligheid voor temperatuur reguleren niet afhankelijk zijn van geslachtshormonen. Het is echter ook mogelijk dat het verschil tussen de geslachten al is aangelegd voordat de pubertijd begint. Het onderzoek in **hoofdstuk 5** werd uitgevoerd met gezonde vrijwilligers die door middel van een koelvest werden blootgesteld aan een geleidelijke verlaging van de omgevingstemperatuur. Deze studie toont aan dat vrouwen een bepaalde temperatuur over het algemeen als kouder en minder

comfortabel beschouwen dan mannen. Eén van de factoren die betrokken zou kunnen zijn bij dit verschil tussen mannen en vrouwen is de lichaamscompositie. In vergelijking met mannen hebben vrouwen relatief meer lichaamsoppervlakte per lichaamsgewicht wat resulteert in netto meer verlies van warmte. Een verschil in lichaamsoppervlakte verklaarde echter niet de waargenomen verschillen tussen mannen en vrouwen. Het kan daarom geconcludeerd worden dat de lichaamscompositie niet de enige factor is die het verschil in temperatuur gevoeligheid tussen mannen en vrouwen verklaart.

Tot slot worden in **hoofdstuk 6** de resultaten en conclusies uit dit proefschrift besproken. Alhoewel de studies uit dit proefschrift opheldering hebben gegeven omtrent geslachtsgebonden verschillen in de functionaliteit van het vetweefsel en vetcellen, is het ook duidelijk dat er nog verder onderzoek nodig is om meer inzicht te krijgen waarom het vetweefsel, de vetcellen en de energiehuishouding verschilt tussen mannen en vrouwen.