

A novel, cold-inducible Adenylyl Cyclase 3 (*Adcy3*) isoform ensures brown adipose tissue homeostasis and glucose metabolism in mice

INAUGURAL-DISSERTATION



zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sajjad Khani
geboren in Ahar

4 Zusammenfassung

In braunem Fettgewebe (BAT) wird die bei der Oxidation von Fettsäuren und Glukose entstehende Energie, von der Atmungskette entkoppelt, als Wärme freigesetzt. Diese Fähigkeit zur Wärmeentwicklung, auch „zitterfreie Thermogenese“ genannt und der daraus resultierende Kalorienverbrauch bieten einen innovativen Ansatz für neuartige Therapien von Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen, wie dem Diabetes mellitus Typ 2. Diese Arbeit zielte darauf ab, das epigenetische und transkriptomische Profil des braunen Fettgewebes *in vivo* auf neue Regulatoren und ihre mechanistische Rolle bei der zitterfreien Thermogenese zu untersuchen.

Die Trimethylierung des Histon H3 an seinem Aminosäurerest Lysin 4 (H3K4me3) kennzeichnet die Transkriptions-Start-Stelle (TSS) von aktiven Genen während der Transkription. Wir konnten hier zeigen, dass sich diejenigen H3K4me3 Domänen, die sich über einen besonders ausgeprägten genomischen Bereich erstrecken - die sogenannten „breiten H3K4me3 Domänen“ – spezifisch in der Nähe von TSS von BAT-Regulator-Genen befinden und diese „breiten H3K4me3 Domänen“ somit, von der Genexpression unabhängig, Gene mit hoher Relevanz für die Regulation des braunen Fettgewebes und seiner Funktion anzeigen. Wir führten eine *in silico* Analyse zur Identifizierung neuer regulatorischer Gene und Signalwege basierend auf der Ausprägung von „broad H3K4me3 Domänen“ durch und konnten mittels dieses Ansatzes neuartige BAT Signalwege voraussagen. Interessanterweise führten eine hochkalorische Diät und die damit einhergehende Adipositaserkrankung in Mäusen zu einer Reduktion der Breite der H3K4me Domänen, während die Integration von Transkriptom und H3K4me3 Profilen mittels Chromatin Immunopräzipitation - Sequenzierung (ChIP-Seq) keine veränderte Genexpression aufzeigten.

Darüber hinaus zeigte sich, dass eine kurzzeitige Kälteexposition mit Anstieg der Thermogenese im BAT zu einer Induktion oft genintern lokalisierter, alternativer Promotoren und Promoter-assoziiertes alternativer Transkriptionsereignisse (ATI) führte. Diese ATIs zeigten sich vornehmlich in Genen des cAMP Signalwegs, wie beispielsweise dem *Adcy3*, *Ppargc1a*, *Pde1c*, *Pde4d*, *Pde7b* und *Akap2* Gen. So konnte beispielsweise in aktiviertem BAT ein alternatives Transkript der Adenylatcyclase 3 (*Adcy3-AT*) detektiert werden, welches für ein N-terminal trunkiertes ADCY3-AT Protein kodiert, welches nur in ausdifferenziertem und thermogen aktivem BAT vorhanden war.

Mittels *in vitro* und *in vivo* Analysen führten wir daraufhin eine funktionelle Charakterisierung der Rolle des ADCY3 Proteins, sowie der spezifisch induzierten ADCY3-AT Isoform im BAT durch. Die gewebsspezifische Deletion sowohl von ADCY3 als auch der ADCY3-AT Isoform im Fettgewebe mittels Cre/LoxP Technologie (*Adcy3*-AddKO Mäuse) führte zu einer spezifischen Reduktion der Energieabgabe. Eine genomweite Transkriptionsanalyse zeigte zudem eine Induktion von cGMP- und Calciumsignalwegen im BAT der *Adcy3*-AddKO Mäusen. Interessanterweise führte die konstitutive Deletion der ADCY3-AT Isoform mittels CRISPR-Cas9 Technologie (*Adcy3* Δ AT Mäuse) zu einer verminderten Aktivität von cGMP- und Calciumsignalwegen, was auf eine gegensätzliche Regulatorfunktion von ADCY3-AT und ADCY3 in diesem Signalweg hindeutet. Dieses wurde auch durch Experimente mittels Seahorse Technologie in primären braunen Adipozyten gestützt, bei denen eine Defizienz der ADCY3-AT Isoform zu einem spezifischen Anstieg der oxidativen Kapazität in diesen Zellen führte.

ADCY3 und die trunkierte Isoform ADCY3-AT spielen über ihre Funktion in cGMP- und Calciumsignalwegen eine wichtige Rolle in der Regulation des Energieverbrauchs in braunem Fettgewebe. Angesichts steigender Prävalenzen von metabolischen Erkrankungen bietet die weitere Erforschung von *Adcy3* im BAT somit einen vielversprechenden und innovativen Ansatz bei der Entwicklung neuartiger Therapien gegen Fettleibigkeit.

5 Summary

The high capacity of brown adipose tissue (BAT) for uncoupled respiration and, concomitantly, caloric turnover, renders the notion of activated BAT into an innovative approach for combatting obesity and obesity-associated disorders such as type 2 diabetes. We here applied epigenomic and transcriptomic profiling in BAT to identify and functionally interrogate novel regulators of brown adipose tissue.

Trimethylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me3) is a posttranslational histone modification known to mark the transcription start sites (TSS) of genes. Using H3K4me3 occupancy analysis, we here show that the occurrence of those H3K4me3 domains that cover extended genomic spaces (so-called 'broad H3K4me3' or 'buffer domains') occur in proximity of TSS associated with BAT regulatory function. Using this unique feature of broad H3K4me3 which marks cell-type specific genes, we performed *in silico* prediction of novel BAT gene regulators and signaling pathways. Strikingly, dietary obesity elicits reduction in the breadth of H3K4me3 peak; however, integration of transcriptome and H3K4me3 chromatin immunoprecipitation coupled to sequencing (ChIP-Seq) profile revealed that H3K4me3 breadth reduction in obesity surprisingly do not drive concurrent alterations in gene expression.

Moreover, we found that cold-stress drives alternative promoter occurrence and, concomitantly, alternative transcriptional initiation (ATI) events within gene bodies. These ATI occur preferentially in cAMP pathway genes (i.e. *Adcy3*, *Ppargc1a*, *Pde1c*, *Pde4d*, *Pde7b*, *Akap2*) in brown adipocytes. For example, an alternative transcript of *Adcy3* (*Adcy3-AT*) encodes an aminoterminal truncated ADCY3-AT protein that is exclusively present in differentiated and thermogenically activated brown adipose tissue.

Adipose tissue-specific deletion of *Adcy3* and *Adcy3-AT* isoforms reduced energy expenditure in *Adcy3*-AdDKO mice; however, body weight, food intake, RER, and locomotor activity remained unaffected in HFD-fed mice. Genome-wide transcriptional analysis showed an induction of cGMP and calcium signaling pathways in adipose tissue-specific ablation of *Adcy3* and *Adcy3-AT*. Similarly, CRISPR-Cas9 mediated whole-body deletion of *Adcy3-AT* reduced energy expenditure in *Adcy3*ΔAT mice. However, in contrast to the deletion of both isoforms, cGMP and calcium signaling pathways were repressed in the genetic deletion of *Adcy3-AT*, suggesting a positive regulatory role for *Adcy3-AT* in mediation of energy expenditure.

Taken together, *Adcy3* and its truncated isoform *Adcy3-AT* significantly contribute to the regulation of energy expenditure, potentially via regulation of cGMP and calcium signaling pathways in brown fat. In view of the increasing prevalence of metabolic diseases, further research on *Adcy3-AT* offers a promising and innovative approach for the development of novel therapies against obesity.