

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A szöveti transzglutamináz szerepének vizsgálata a
fehér zsírszövet barnulási folyamatában és a
beige adipociták működésében**

Fedor-Lénárt Kinga

Témavezető: Dr. Mádi András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt-és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A szöveti transzglutamináz szerepének vizsgálata a fehér zsírszövet barnulási folyamatában és a beige adipociták működésében

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: **Fedor-Lénárt Kinga**
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris, Sejt- és
Immunbiológiai doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Kvell Krisztián, PhD

Dr. Törőcsik Dániel, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

Dr. Ambrus Attila, PhD

Dr. Kvell Krisztián, PhD

Dr. Törőcsik Dániel, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2022. 03. 23. 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a kinga.lenart@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022.03.22. 16:00 óráig.

A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. BEVEZETÉS

Az emberi test figyelemre méltóan képes idomulni a belső és külső változásokhoz, mint például a táplálkozási állapothoz, a környezeti hőmérséklet ingadozásához, a fertőzések bekövetkeztéhez, a cirkadián ritmus felborításához és az öregedés folyamatához. Ezek az adaptációs folyamatok megkövetelik a metabolizmus dinamikus átprogramozását a perifériás szövetekben. A hideg expozíció például a vázizomzat és a zsírszövet metabolikus adaptációját váltja ki azáltal, hogy ilyenkor ezek a szövetek a hőenergia biztosítása érdekében a zsírsav-oxidációra váltanak. Ezen alkalmazkodási folyamat fontos eleme a rendkívül dinamikus zsírszövet, amely környezeti változások hatására gyors átalakulásra képes, és sejtjei megfelelő módon koordinálják az energia tárolását és oxidációját. Tartósan fennálló pozitív energiamérleg esetén a lipidraktározó fehér zsírszövet egyrészt sejtjei térfogatának növelésével (hipertrófia), másrészt az adipociták számának emelésével (hiperplázia) gyarapítja térfogatát, amely végül elhízáshoz vezethet. A ma már népbetegségnek tekinthető elhízás tehető felelőssé számos életminőséget romboló járulékos betegség gyakoriságának emelkedéséért, mint például a 2-es típusú cukorbetegség, a máj szteatózisa, atheroszklerózis és magas vérnyomás. Ezen betegségek kezelésére kiváló stratégia lehetne a zsírszövet tömegének csökkentése egy létező természetes mechanizmus célzott gyógyszeres aktiválásával. Ez a folyamat a fehér zsírszövet barnulása, mely során a hideg környezetre adott adaptív válaszként egy hőtermelésre specializálódott adipocita típus jelenik meg és aktiválódik a szervezet termotoleranciájának biztosítása érdekében. Ezek az úgynevezett 'beige' (színük után: bézs) sejtek tulajdonságaikban ugyan hasonlítanak a barna zsírsejtekre, így zsírraktáraikat szintén hőtermelésre fordítják, de azért mégsem egyeznek meg velük teljesen. Mivel a beige zsírsejtek fejlődése erősen indukálható, ezért napjainkban különös hangsúlyt kap ez a sejtípus, mint az új elhízás elleni terápiás beavatkozások vonzó celluláris célpontja. Ehhez fel kell tárni a beige irányú sejt differenciálódási folyamatok teljességét, amelyeket manipulálva csökkenteni lehetne a fehér zsírszövet tömegét. Különös figyelem fordul tehát a differenciálódási folyamatok szabályozására képes új fehérjék vizsgálatára; a korábbi irodalmi adatok alapján ilyen lehet a szöveti transzglutamináz is. A dolgozatban bemutatásra kerülő vizsgálataink szerint ez az enzim fontos szerepet játszik a barnulási folyamatban, így jövőbeli gyógyszeres aktiválása esetleg hatékony célpont lehetne az elhízás és járulékos betegségeinek kezelésében.

1.1. A zsírszövetek típusai: fehér, barna, beige és pink adipociták

A zsírszövetnek az emlősökben kétféle anatómiailag is elkülönülő formája található meg: a nagyobb tömegű, sztrómás vaszkuláris frakciójában különböző sejttípusokat tartalmazó fehér zsírszövet, amely raktározott energiája éhezés vagy stressz hatására mobilizálódva ATP termelésre fordítódik; és a sokkal kisebb tömegű barna zsírszövet (BAT), mely alacsonyabb szintű raktározás mellett, egyedülálló módon képes zsírtartalmát hőtermelésre fordítani a nem didergésszerű termogenezisnek nevezett folyamat során. A sejtek barna színe a citokróm C nagy mennyiségének köszönhető ebben a mitokondriumokban igen gazdag szövetben. Hőtermelésük kiváltója az, hogy a barna zsírszövet sejtei sokkal több olyan mitokondriumot tartalmaznak, melyekben az elektrontranszportlánc működése szétkapcsolódik az oxidatív foszforilációtól, így bennük proton visszaáramlás történik a mitokondrium mátrixába. Ennek következtében a lebomló zsírokból nem keletkezik energiát raktározó ATP, hanem ehelyett energiatartalmuk hő formájában szabadul fel. A hőtermelő képességért a mitokondrium belső membránjában található szétkapcsoló protein 1 (UCP-1) felelős. Rágcsálókban felfedezték a zsírszövet harmadik típusát is, mely fehér zsírszövetben jelenik meg hideg környezetre vagy adrenerg kezelésre adott adaptív válaszként, biztosítva a szervezet termotoleranciáját. Ezek a színük után úgynevezett „beige” vagy „brite” sejtek, bifunkcionális fenotípust képviselnek, hiszen tulajdonságaikban hasonlítanak a barna zsírszövetekre, és zsírraktáraikat szintén hőtermelésre fordítják. A „klasszikus barna” adipocitákkal ellentétben az érett, stimulálatlan beige zsírszövet alacsonyabb szinten fejezik ki a hőtermeléshez szükséges géneket. Ha a termogénikus jel megszűnik, fehér-szerű, úgynevezett „masked beige” zsírszövet maradnak vissza *in vivo*. Az UCP1 indukció külső ingerektől való függése a beige zsír fontos megkülönböztető jellemzője. A beige adipociták rendkívüli plaszticitást mutatnak, a szervezet igényeinek megfelelően képesek ki-be kapcsolni hőtermelő programjukat. Mind a barna, mind a beige sejtek a mitokondriális és termogénikus gének hasonló alapprogramját fejezik ki. A csecsemők interszkapuláris barna zsírszövege nagymértékben hasonlít a rágcsálók klasszikus barna zsírszövegeire. Ezek alapján a beige sejtek két funkcióra programozottak egyedien: termogénikus ingerek hiányában képesek energiaraktározásra, viszont teljes mértékben képesek a hőtermelés beindítására, amikor erre megfelelő jeleket kapnak. Érdekes módon, egér modellekben a klasszikus barna zsír elvesztése a beige zsír kompenzációs indukcióját váltja ki, ilyen módon is biztosítva a fiziológiás testhőmérsékletet és a diéta okozta elhízással szembeni rezisztenciát, ami funkciójukat tekintve barna és a beige adipociták jelentős átfedésére utal.

Az elmúlt évek intenzív kutatásai az adipociták egy további, negyedik típusát is azonosították; az úgynevezett pink zsírszövetet. A pink adipociták tejszetréciós alveoláris sejtek, amelyek

terhesség és szoptatás során a fehér zsírsejtek transzdifferentiálódásából származhatnak. Ezekre a sejtekre jellemzők a citoplazmatikus lipidcseppek, apikális felületükön mikrovillusok találhatóak, kerek és nagyméretű sejtmagjuk centrálisan helyezkedik el, továbbá robusztus, durva endoplazmatikus retikulummal (RER), Golgi-komplexszel és tejtartalmú granulátumokkal rendelkeznek. A laktáció utáni fázisban a pink zsírsejtek fehér és barna zsírsejteké alakulnak át és bizonyítékok támasztják alá a fehér-pink transzdifferentiálódás, a pink-barna transzdifferentiálódás és a reverzibilis barna-myoeptiheliális sejtkonverzió hipotézisét, ami ismételten bizonyítja a zsírszövetre jellemző rendkívüli és intenzív plaszticitást.

1.2. A beige zsírsejtek hőtermelésének indukálása

Fiziológiásan a hideg expozíció $\beta 3$ -adrenerg stimuláció révén indukálja a barnulási folyamatot a fehér zsírszövetben (WAT). A szimpatikus idegrendszer norepinefrint (NE) választ ki, amely kötődik a sejtfelszíni $\beta 3$ -receptorhoz, ezt követően az intracelluláris jelátviteli kaszkádok a trigliceridek szabad zsírsavakká (FFA) történő lebomlásához vezetnek. Az FFA aktiválja az UCP1 -et, amely az ATP szintézisétől szétkapcsolt légzést eredményez. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a katekolaminok mellett számos keringő hormon kapcsolódik a beige adipociták aktiválásához, mint például a trijód-tironin (T3), a máj epesavai, a 'Fibroblast growth factor 21' (FGF21), az 'Atrial natriuretic peptide' (ANP) és a 'B-type natriuretic peptide' (BNP), valamint a kardiotropin-1. Ezeken túlmenően a vázizomzat által a testmozgás hatására kibocsátott irizin nevű hormon szintén képes kiváltani a fehér zsírszövet barnulását. Ezek a ligandok a megfelelő receptoraikon keresztül különböző és gyakran átfedő mechanizmusok révén váltják ki a barnulási folyamatot. Az epesavak például aktiválják a 'G-protein-coupled bile acid receptor 1' (GPBAR1) receptorfehérjét, amely viszont az intracelluláris T3 képződését elősegítő dejodináz enzimet indukálja. A beige adipociták aktiválása tehát a fehér zsírszövet „barnulása”, hőtermelésének indukálása, mely folyamat esetleges célzott/gyógyszeres aktiválása a népbetegségként jelentkező elhízás és járulékos betegségei kezelésében bevethető hatékony célpont lehetne.

1.3. Az anyagcsere szervezetszintű vizsgálata indirekt kalorimetriával

Az emberek energiafelhasználásának értékelése eredetileg a hőtermelés számszerűsítésére (azaz a közvetlen kalorimetriára) összpontosított, mivel a termodinamika első törvénye azt jósolta, hogy a fiziológiai folyamatokban elhasznált összes energia hőként oszlik el a hőstabilitás és az elhanyagolható energiatárolás körülményei között. Egy ilyen technikailag nagy kihívást jelentő eljárást azonban hamarosan kiváltották azok a módszerek, amelyek a hőtermelés mértékét az oxigénfogyasztás és a szén-dioxid termelés alapján számítják ki a klasszikus Weir-egyenlet szerint:

$\text{hőtermelés (kJ/kg)} = 4,186 \times [3,9 \times \text{elfogyasztott O}_2 \text{ (L)} + 1,11 \times \text{termelt CO}_2 \text{ (L)}]$.

Az oxigénfogyasztás és a szén-dioxid-termelés mérésével az indirekt kalorimetria valós idejű adatokat szolgáltat az energiafelhasználásról, az alvás és nyugalmi fázis anyagcseréjének, a táplálék hőtermelésre kifejtett hatásának és a fizikai aktivitás energiaköltségének detektálására. Fontos, hogy az ilyen mérések az energiaszubsztrátumok hasznosításáról is információt nyújtanak. Az indirekt kalorimetria használata értékes eszköz lehet az elhízás kezelésében személyre szabott beavatkozások esetén, nem szabad azonban megfedkezünk arról, hogy az anyagcsere szabályozásának módja egyénenként nagyon eltérő lehet.

1.4. A szöveti transzglutamináz biológiai funkciói

Ahogy a zsírszövetekről szerzett ismereteink egyre gyűlnek, úgy nő az esély az obezitás és a vele kapcsolatos betegségek új és hatékony terápiájának kidolgozására. Olyan sejtdifferenciálódási folyamatok feltárására van szükség, melyeket befolyásolva aktiválni lehetne a beige adipocitákat, és ezáltal csökkenteni a fehér zsírszövet tömegét. Ehhez a génexpresszió szabályozására képes fehérjék további vizsgálatára van szükség. Ilyen fehérje lehet a szöveti transzglutamináz (TG2, EC 2.3.2.13) amely extracellulárisan és intracellulárisan is kimutatható multifunkcionális fehérje. Bizonyos sejtípusok esetén lokalizálódhat a sejtmagban, a mitokondriumban vagy a plazmamembránban is. Fehérje keresztkötő és guanozin-5'-trifoszfát (GTP) hidrolizáló aktivitással is rendelkezik. Ca^{2+} jelenlétében a TG2 nem képes megkötni a GTP-t, így nyílt konformációt vesz fel, amely kovalensen keresztköti a fehérjéket, és transzamidáz-aktivitás révén izopeptid kötések hoz létre a glutamin és a lizin oldalláncai között. GTP-hez kötött formában azonban a TG2 zárt konformációt vesz fel, és GTPázként működhet, viszont ilyenkor nem rendelkezik keresztkötő aktivitással. Ezenkívül a TG2 fehérje-diszulfid izomeráz és protein-kináz aktivitással is rendelkezhet. A TG2 különféle biológiai folyamatokban vesz részt, például a citoszkeleton szabályozásában, a sejtadhézió

kialakításában és a sejthalál folyamatában katalitikusan aktív, vagy csak interakciós partnerként. Számos tanulmány kapcsolta a TG2 funkcióit különféle típusú betegségekkel, például a rákkal, a 2-es típusú cukorbetegséggel, neurodegeneratív rendellenességekkel és a lisztérzékenységgel.

1.5. Szöveti transzglutamináz hiányos egérmodellek

A TG2 komplex biológiai szerepének vizsgálatára irányuló stratégiák között szerepel a TG2 aktivitását gátolni képes kis molekulák alkalmazása, valamint a TG2 szubsztrátjainak és interakciós partnereinek azonosítása és jellemzése. Ezen túlmenően, két TG2 knock-out (KO) egérmodellt hoztak létre eltérő módszerek alkalmazásával. Az egyiket a keresztkötő aktív helyet tartalmazó 5-ös és 6-os exonok deléciójával állították elő, a másik viszont egy TG2-loxP knock-in egér modellt, amely módszer Cre rekombinázt expresszáló állatokkal való keresztezés után lehetővé tette mindkét allél inaktiválását. A TG2 multifunkcionalitását figyelembe véve meglepő, hogy a TG2 homozigóta deléciója nem okoz letális fenotípust. A TG2^{-/-} egerek életképesek és termékenyek, normál testsúlyra és méretre nőnek fel, anélkül, hogy nyilvánvaló rendellenességek mutatkoznának a fejlődésükben és a szervfunkcióikban. A súlyos különbségek hiányának legvalószínűbb magyarázata, hogy emlősök szöveteiben más transzglutaminázok képesek kompenzálni a TG2 elvesztését. A KO modellek részletes vizsgálata azonban feltárta, hogy a TG2 részt vesz az apoptotizáló és a fagocita sejtek közötti kölcsönhatásban a szövetek integritásának biztosítása érdekében, és szükséges az NB4 promielocita sejtek neutrofil irányú differenciálódásához, valamint a baktériumok ezen sejtek általi elpusztításához. A TG2 eltávolítása tökéletlen sebgyógyuláshoz és autoimmunitás kialakulásához vezethet, továbbá glükóz intoleranciát és hiperglikémiát okozhat.

1.6. A szöveti transzglutamináz G fehérje funkciója

GTP kötött zárt konformációban, a TG2 működhet G fehérjeként (Gh α), amely az α 1B-adrenoreceptorról (α 1B-AR), az oxitocin receptorról, a tromboxán A 2α receptorról, és a follikulus stimuláló hormon receptorról továbbíthat jelet. Általánosságban elmondható, hogy a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) kölcsönhatásba lépnek a heterotrimer G fehérjékkel; azonban a TG2/Gh α a kalretikulinnal (Gh β) képez heterodimert, amely azonban a heterotrimer G fehérjékhez hasonlóan működik. A receptor aktivációját követően a TG2 fehérjén a GDP GTP-re cserélődik, és a G fehérje funkció aktiválódik. A GTP-hez kötött TG2/Gh α disszociál a Gh β -ről, majd közvetlenül aktiválja a foszfolipáz C δ 1-et (PLC δ 1), amely inozitol-trifoszfát

felszabaduláshoz és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedéséhez vezet. Ezen kívül a TG2/Gh α más jelátviteli utakat is szabályozhat, beleértve az adenilát cikláz (AC) aktivitását és a nagy vezetőképességű Ca^{2+} -aktivált K^{+} csatornák közvetlen aktiválását vaszkuláris simaizomsejtekben. A TG2/Gh α szignál akkor szűnik meg, amikor a GTP-áz aktivitás révén a GTP GDP-re hidrolizálódik és a TG2/Gh α újra összekapcsolódik a Gh β -val.

1.7. A szöveti transzglutamináz szerepe a mitokondriumok működésében

A szakirodalomban leírt *in vivo* eredmények alapján, fiziológias körülmények között a TG2 fehérje-diszulfid-izomerázként (PDI) is működhet, és kimutatták, hogy ezen aktivitásán keresztül hozzájárul a mitokondriális légzési lánc komplexeinek megfelelő összeszerelődéséhez. Ismert, hogy a TG2-hiányos egerek károsodást mutatnak a mitokondriális energiatermelésben, melyet a fizikai megterhelést követően csökkent ATP-szint bizonyít a szívizomzatban. Ez a defektus fenotípusosan tükröződik az állatok ATP-függő motoros izommunkájának drámai csökkenésében. Az ilyen fenotípus mögött meghúzódó molekuláris mechanizmus a NADH-ubikinon-oxidoreduktáz (I. komplex), a szukcinát-ubikinon-oxidoreduktáz (II. komplex) és a citokróm-oxidáz (IV. komplex), és az ATP-szintáz (V. komplex) hibás diszulfidkötés-képzésében rejlik. A legújabb adatok azt mutatják, hogy a TG2 aktivitása nemcsak a légzési lánc komplexek összeszerelődését tudja módosítani, hanem a kritikus gének, köztük a PGC-1 α és a citokróm C átírását is, amelyek fontosak a mitokondriumok működése és biogenezise szempontjából. Más sejttípusoknál kimutatták, hogy a TG2 szerepet játszik az elektrontranszportlánc és az energiatermelés homeosztázisának fenntartásában. A TG2 deléciója a légzési lánc I. és II. komplexeinek jelentős deregulációját és az ATP termelés csökkenését okozta egér embrionális fibroblasztokban (MEF).

1.8. A mitokondriumok dinamikája

A mitokondriumok központi szerepet töltenek be az eukarióta sejtek anyagcseréjében. Olyan kulcsfontosságú folyamatok zajlanak bennük, mint a légzés, az oxidatív anyagcsere, hozzájárulás a Ca^{2+} homeosztázisához, a Krebs-ciklus, a zsírsavak lebontása, antivirális jelátvitel, az öregedés és az apoptózis. Rendkívül dinamikus organellek, melyek fúziós és hasadási eseményeken, továbbá transzport folyamatokon és lebomláson is keresztülmehetnek, mely folyamatokat összefoglalóan „mitokondriális dinamikának” nevezzük. Ezen dinamikus folyamatok mindegyike kritikus fontosságú az egészséges mitokondriális populáció fenntartása érdekében, ezért a mitokondriumok minőségének folyamatos ellenőrzése elengedhetetlen a

celluláris homeosztázis fenntartásához. Tekintettel a mitokondrium központi metabolikus funkcióira, nem meglepő, hogy a mitokondriális dinamika és a bioenergetika kölcsönösen befolyásolják egymást. A mitokondriális dinamika diszregulációja működésképtelen mitokondriumok felhalmozódásához vezet, amely számos patológias folyamatban felfedezhető, többek között neurodegeneratív betegségekből, izomsorvadásban, szarkopéniában, öregedésben és olyan anyagcsere betegségekből, mint például 2-es típusú cukorbetegség vagy elhízás. A mitokondriumok fragmentálódása gyakran összefügg a mitokondriális funkció romlásával, súlyos stresszhatások, például a mitokondriális membránpotenciál elvesztése, az ATP szint csökkenése esetén, valamint apoptózis során döntően ez a morfológia figyelhető meg. Vannak azonban olyan események is, amikor a mitokondriális hálózat teljes fragmentációjára van szükség: ilyen folyamatok zajlanak a sejtosztódás során az utódsejtek mitokondriális öröklődésének biztosítására, valamint a posztmitotikus sejtek, például az idegsejtek és a kardiomiociták differenciálódása során, továbbá a mitofágia és a sejthalál útvonalak szabályozási folyamataiban. A mitokondriumok fúziója hozzájárul a mitokondriális mátrix komponenseinek hálózaton belüli eloszlásához, növeli a mitokondriális hálózat homogenitását és komplementációt is biztosít. A fúzió kulcsfontosságú mechanizmus, amellyel a mitokondriumok meg tudják menteni a hálózat sérült egységét. A mitokondriumok elongációja növelheti a mitokondriális aktivitást, valamint védelmet nyújthat az autofágiával szemben. A mitokondriális dinamika négy fő fehérje-mediátora a dinamin guanozin-trifoszfátázok (GTPázok) családjának tagjai: a mitofuzin 1 és 2 (MFN1 és 2), az optikus atrofia 1 (OPA1) fehérje és a dinamin-kapcsolt protein 1 (DRP1). A DRP1 szinte teljes egészében a citoszolban lokalizálódik, egészen addig, amíg hasadást indukáló hatásra a mitokondriumkülső membránjában található DRP1 receptor fehérjék bármelyikéhez kötődik, oligomerizálódik, és egy hurkot képezve kettéosztja a mitokondriumot. Az osztódási helyeket egy transzmembrán fehérje, a mitokondriális hasadási fehérje 1 (FIS1) jelöli ki. A mitokondriális hasadási faktor (MFF) kölcsönhatásba lép a FIS1 fehérjével, és adapterként szolgál, amely rekrutálja a DRP1-et a polimerizációs folyamat elősegítésére. A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a hasadáshoz az MFF szükséges, azonban a FIS1 nélkülözhető. Ez a meglepő tény arra utalhat, hogy léteznek más fehérjék, amelyek felülírhatják a FIS1-et, és alternatív receptorokként működhetnek az MFF és a DRP1 számára. A DRP1-től eltérően, az MFN1, az MFN2 és az OPA1 a mitokondriumokban lokalizálódnak: az MFN1 és az MFN2 a külső mitokondriális membránban helyezkednek el úgy, hogy az N- és a C-terminálisuk egyaránt a citoszol felé nézzen, az OPA1 pedig a belső mitokondriális membránban található.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk a TG2 sokrétű biológiai szerepének tanulmányozásával foglalkozik. Korábban a humán barna zsírszövetben hatszoros TG2 génexpressziót mutattak ki a fehér zsírszövethez képest, ami arra enged következtetni, hogy az enzim fontos szerepet játszhat a zsírszövet hőtermelő funkciójában.

Ezek alapján vizsgálataink megválaszolandó kérdései és jelentősebb céljai a következők voltak:

- A TG2 egér modell hidegtűrésében betöltött szerepének vizsgálata
- Feltárni, hogy milyen molekuláris mechanizmusokon keresztül vehet részt a TG2 a zsírszövet barnulásában
- Megvizsgálni, hogy a TG2^{-/-} egerek hogyan reagálnak különböző adrenerg stimulusokra a TG2^{+/+} állatokhoz képest
- Összefüggéseket kimutatni a TG2 Ghα funkciója és metabolikus szerepe között
- A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták és beige adipociták összehasonlító vizsgálatai (génexpresszió, lézer pásztázó citometria, funkcionális vizsgálatok Seahorse méréssel, immuncitokémiai és fehérje szintű vizsgálatok)
- A TG2 mitokondriális működésben és ezáltal a termogenezis fokozásában betöltött szerepének azonosítása

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és kezeléseik

A C57BL/6J genetikai háttérrel rendelkező TG2^{-/-} egereket és a TG2^{+/+} alomtársaikat heterozigóta szülők pároztatása után genotipizálással azonosították. Az egereket a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Kísérleti Állatházában kontrollált körülmények között 12-12 óra sötét-világos ciklusokat váltva, egyenletes hőmérsékleten (22 ± 1 °C-on) az ivóvízhez és táplálékhoz szabad hozzáférést biztosítva, normál diétán tartottuk. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által jóváhagyott engedélyek alapján (engedélyek száma: 14/2010 / DEMÁB és 1/2014/DEMÁB) végeztük.

Vizsgálatainkhoz 6db TG2^{+/+} és 6db TG2^{-/-} állatot használtunk fel. Az akut hidegkezelés során a 16 hetes hím egereket 4°C-on (hidegszobában) tartottuk minimális almon, táplálék nélkül, de szabad 4°C-os ivóvíz hozzáféréssel. Az állatok rektális testhőmérsékletét 30 percenként mértük és addig tartottuk őket a hidegben, amíg testhőmérsékletük az etikailag elfogadható 30 °C körüli értékig le nem csökkent. Az állatok testtömegének lemérése után intraperitoneálisan 60 nM/g testtömeg fenilefrin (specifikus $\alpha 1$ -AR agonista, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) vagy CL-316,243-at (specifikus β -AR agonista, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) injektáltunk. Az egereket túlaltattuk, kardiális punktuációval vért vettünk, majd a kinyert szérumot -80 °C-on tároltuk.

3.2. Indirekt kalorimetria

Az indirekt kalorimetriás vizsgálatokhoz a CLAMS (Columbus Instruments Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System, Columbus, OH) nevű berendezést alkalmaztunk, amely lehetővé teszi különböző fiziológiai paraméterek nem invazív, 24 órás, automatizált detektálását. A mérésekhez 6db TG2^{+/+} kontroll és 6db TG2^{-/-} 18 hetes hím egeret használtunk fel. Az állatokat egyesével helyeztük a metabolikus ketrecekbe, ahol 4 egymást követő napon át, 12-12 óra sötét-világos ciklusokat váltva, szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C-on), ivóvízhez és táplálékhoz szabad hozzáférést biztosítva, normál diétán tartottunk. A méréseket a kezdeti 18–20 óra után 8 perces időközönként végeztük. Az első 24 óra volt az akklimatizációs időszak, amikor az egerek hozzászoktak az új környezetükhöz. Az akklimatizációs periódust kontroll mérés követte 24 órán át kezelés nélkül. Ezután az egereket intraperitoneálisan injektáltuk 60

nM/g testtömeg fenilefrin vagy CL-316,243 agonistával, és metabolikus paramétereiket további 24 órán át követtük. Az összes állat túlélte a kísérletet és teljesen felépült.

3.3. Az artériás vérnyomás mérése és metabolikus paraméterek vizsgálata vérben

Az indirekt kalorimetriás kísérletet alapul véve, egy akklimatizációs napon, majd egy kezelés nélküli kontroll napon, végül fenilefrin kezelést követően mértük az állatok vérnyomását CODA Standard Tail-cuff (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT) nem-invazív módszer segítségével. Az éber egerek farkára pneumatikus pulzusérzékelővel felszerelt mandzsetta került, melynek segítségével meghatároztuk az állatok vérnyomását és szívfrekvenciáját.

A vércukor-koncentrációt a korábban leírtak szerint mértük. Az egerek vérplazmájából szérum mintákat állítottunk elő, amelyet kardiális punktuációval gyűjtöttünk 13 órával a fenilefrin kezelést követően. Az összkoleszterin (C), az alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin (LDL-C), a nagy sűrűségű lipoprotein koleszterin (HDL-C), a triglicerid (TG) és a laktát szintjét kolorimetriás enzimvizsgálatokkal határoztuk meg a gyártó utasításai szerint (Cobas6000, Roche Ltd., Mannheim, Németország), míg a szabad zsírsavakat (FFA) standard laboratóriumi méréssel vizsgáltuk. Az inzulintartalmat egér inzulin ELISA Kit alkalmazásával detektáltuk (Mercodia, Uppsala, Svédország), a glükagonszintet a Glucagon EIA Kit (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Darmstadt, Németország) segítségével mértük, mindkét esetben a gyártó utasításai szerint 5 db TG2^{+/+} és 5 db TG2^{-/-} 18 hetes hím egér szérummintáiból.

3.4. Laktát dehidrogenáz és a kreatin-kináz B kimutatása

Az LDH aktivitást UV-kinetikus módszerrel határoztuk meg, míg a CK-MB aktivitást immunobjektív UV kinetikai módszerrel mértük Cobas-501 analizátoron (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). Az LDH izoenzimeket Hydragel ISO-LDH-on választottuk el elektroforézissel, és az izoenzimek mennyiségét denzitometriával határoztuk meg (Sebia Hydrasys, Sebia, Lisses, Franciaország). Az egyes LDH izoformák aktivitását az összaktivitás értékének a denzitometriás meghatározás során nyert mennyiségek arányainak megfelelő osztásával kaptuk meg.

3.5. Az UCP1 hisztokémiai kimutatása

A deparaffinálást követően a metszeteket megfestettük antiUCP1 elsődleges antitesttel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 6 órán át szobahőmérsékleten (1:500 hígításban), majd inkubáltuk 1 órán át Alexa Fluor 488 kecskében termeltetett anti-nyúl IgG-vel (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA). Az UCP1 expresszióját FluoView 1000 konfokális mikroszkóp (Olympus, Tokyo, Japan) segítségével vizsgáltuk, majd az UCP1 expresszióját Fiji képelemző szoftver (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) segítségével határoztuk meg.

3.6. Preadipocita izolálás és beige irányú differenciáltatás

Az egerek gonadális zsírszövetét steril körülmények között preparáltuk ki. A zsírt (sztrómás vaszkuláris frakciókat) centrifugacsőben 1 ml PBS-be helyeztük, és 80 µl kollagenáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) törzsoldatot (120 U/ml) adtunk hozzá. Ezután időnként rázogatva 1 órán át tartó inkubálás következett 37 °C-on, majd tápfolyadékkal töltöttük föl a centrifugacsövet és centrifugáltunk (10 min, 1300 rpm). Végül még egy tápfolyadékmosás következett, majd a sejteket 6 lyukú Falcon sejttenyésztő lemezekbe (Corning Incorporated, Durham, NY) helyeztük. A sejteket 100% konfluenciáig növesztettük DMEM-F12 tápfolyadékban, mely tartalmazott 10% FBS-t, 1% antibiotikumot/antimikotikumot (penicillin/streptomycin), 33 µM biotint, és 17 µM pantotén savat (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A sejtek differenciálódását 2 napig indukáltuk 0,5 mM isobutil-metil-xantin, 125 nM indometacin, 2 µg/ml dexametazon, 850 nM inzulin, 1 nM T3 (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) és 0,5 µM rozigitazon (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) hozzáadásával. A 3. naptól a 9. napig olyan DMEM-F12 differenciáltató médiumban tartottuk a sejteket, mely 10% FBS-t, 850 nM inzulint, 1 nM T3-t és 0,5 µM rozigitazont tartalmazott. Végül TRIzolban (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) és 1x-es denaturáló pufferben gyűjtöttük be a sejteket RNS és fehérje izolálásához. A differenciáltatott sejtek egy részét begyűjtés előtt FBS nélkül 10 µM arterenollal, 10 µM CL-316,243-mal, 10 µM fenilefrinnel vagy 10 µM forszkolinnal is kezeltük 4 órán át (Altshuler-Keylin et al. 2016).

3.7. mRNS izolálás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív RT-qPCR

A preadipocitákból és differenciáltatott beige sejtekből TRIzol reagens segítségével teljes RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatása szerint (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). A minták RNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg (NanoDrop, Erlangen, Németország). A reverz transzkripcióhoz (RT) a mintákat 100ng/µl-re hígítottuk és -20°C-on tároltuk. Ezt követően az RNS-t templátként felhasználva cDNS-t szintetizáltunk nagy kapacitású cDNS RT kit segítségével, a gyártó leírásának megfelelően (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A preadipocitákból és differenciáltatott beige sejtekből nyert minták esetén 3-3 biológiai paralell mérést végeztünk, minden egyes minta esetében három technikai párhuzamossal dolgoztunk. A génexpresszió szintjeit RT-qPCR módszerrel határoztuk meg, SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) alkalmazásával vagy FAM-MGB-vel jelölt TaqMan próbák segítségével (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), Roche Light Cycler 480 készülékben (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A génexpressziót $\Delta\Delta C_P$ módszerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a ciklofillin A (PPIA) háztartási génre normalizáltuk.

3.8. Western blot

A fagyasztott mintákat 2x Laemmli pufferben (125 mM TRIS/HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol) hőkezeltük (5 perc, 100°C), majd Branson Sonifier 450 készülékkel szonikáltuk (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, CT) (2 perc, maximális intenzitás és cikluskontroll 40%), amit ismét hőkezelés (5 perc, 100 °C) és végül centrifugálás követett (15 perc, 14 000 g). A fehérjéket 10% vagy 12%-os SDS-PAGE géleken választottuk szét és PVDF membránra blottoltuk. A blottolás után a membránokat 4%-os sovány tejjel TTBS-ben (150mM NaCl, 25mM Tris/HCl pH=7,5, 0,01% Tween 20) blokkoltuk (1 óra, szobahőmérséklet). Az elsődleges antitestet 4 °C-on egy éjszakán át hagytuk a membránokon. A háromszor 20 percig TTBS-sel történő mosási lépéseket követően torna peroxidáz (HRP)-konjugált egér, illetve nyúl-ellenes IgG másodlagos antitesttel (Bio-Rad) inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten egy órán át. Az inkubáció után ismét háromszor 20 perces TTBS-sel történő mosás következett, végül a vizsgálni kívánt fehérjéket a kemilumineszcencia elvén alapuló Pierce™ ECL technikával, Western Blotting Substrate (Advansta, San Jose, CA) előhívó folyadékkal, röntgenfilmen (AGFA, Mortsel, Belgium) tettük láthatóvá. A filmeket automata Kodak Medical X-ray Processor készülék segítségével hívtuk elő (Carestream Health, Rochester, N.Y.). A sávokat a nyílt forráskódú ImageJ szoftverrel (1.51k verzió, National Institutes of Health, Bethesda, MD) denzitometráltuk. Normalizáló fehérjeként β -AKTIN-t alkalmaztunk.

3.9. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata lézerpásztázó citometriával

A preadipocitákat és a differenciáltatott beige sejteket 8 lyukú Ibidi lemezekben (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Németország) tenyésztettük, melyeket előzetesen kollagénnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) bevontuk. A sejtmagokat 2 μ g/ml DAPI-val jelöltük, továbbá

kontrollként a DAPI mellett 10 μ M antimicint (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) adtunk a sejtekhez. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálatára MitoTracker Deep Red festéket alkalmaztunk (Thermo Scientific, Waltham, MA) 300 nM végkoncentrációban. A gerjesztési hullámhossz 405 nm és 633 nm volt, és a keletkező fluoreszcens jeleket $40\times$ (NA 0,75) objektív segítségével 4 detektáló csatornába gyűjtöttük (kék, Long Red, 570Sp és Open csatornába). A fluoreszcens képalkotáshoz a sejtekről felvételeket készítettünk az iCys Research Imaging Cytometer (Thorlabs Imaging Systems, Sterling, VA) segítségével.

3.10. Oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérése

A sejtek oxigénfogyasztását (oxygen consumption rate, OCR) és a pH változásokat, az úgynevezett extracelluláris savasodás mértékét (extracellular acidification rate, ECAR) XF96 oximéter (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA) alkalmazásával vizsgáltuk. A sejteket 96-lyukú XF96 lemezekben tenyésztettük és differenciáltattuk. A mérés során meghatároztuk a sejtek alapszintű oxigén fogyasztását 30 percen keresztül. Ezt követően 2 μ M oligomycin-t (Enzo Life Sciences, Farmingdale, N.Y.) adtunk a sejtekhez, így blokkolva az ATP-szintáz aktivitását, mellyel a protoncsorgós légzést vizsgáltuk. Végül 10 μ M antimicin A-t adtunk a sejtekhez (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mely a mitokondriális membránpotenciál gátlásáért felelős, ezáltal a mérés esetleges mitokondriális oxidációtól független zajszintje volt meghatározható. Az oxigénfogyasztási rátát az egyes lyukakban megtalálható fehérje mennyiségére normalizáltuk, melyet BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) alkalmazásával mértünk meg a gyártó utasításai szerint.

3.11. NADH dehidrogenáz aktivitásának és a sejtek ATP és NADH tartalmának mérése

A 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tesztet a sejtek NADH dehidrogenáz aktivitásának meghatározására végeztük el. A sejteket 12 lyukú lemezekben tenyésztettük (Corning Incorporated, Durham, NY), majd a konfluens tenyészethez 0,5 mg/ml MTT hozzáadása után 120 perces 37 °C-on történő inkubálás következett. A felülúszót leszívtuk, majd a formazán kristályok oldására DMSO-t használtunk. A fotometriás mérést Synergy Multimode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) alkalmazásával végeztük 540 nm-en.

A relatív ATP-tartalmat az ATP Bioluminescence Assay Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) által határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A relatív NADH-tartalmat NAD / NADH kvantitációs kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használatával mértük

a gyártó utasításai szerint. Az ATP és NADH szinteket a fehérjetartalomra normalizáltuk, melyet a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) segítségével határoztunk meg.

3.12. Immuncitokémia

A fluoreszcens mikroszkóppal végzett mérésekhez a sejteket 96 lyukú lemezekben növesztettük. Kontrollként a sejteket 10 μ M antimicin elektrontranszport inhibitorral kezeltük, majd a mitokondriumokat 300 nM MitoTracker Deep Red festékkel (Thermo Scientific, Waltham, MA) jelöltük. Ezt követően sejteket PBS-ben mostuk és 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig, majd 1% Triton X-100 PBS oldatban 10 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. A sejteket 1% BSA-PBS oldatban 1 órán át blokkoltuk, majd az aktin szálak festésére TexasRed-X Phalloidint használtunk (1: 150 hígításban, Thermo Fisher, Waltham, MA) 1 órán át 4 °C-on. A sejtmagokat DAPI (1:10 hígítás, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) festéssel vizualizáltuk, amit kétszer 10 perc PBS-es mosás követett. Ezt követően az adipocitákat az Opera Phenix High Content Screening rendszer részét képező, Harmony 4.6 szoftverrel elemeztük (Perkin-Elmer, Waltham MA). Minden lyuk esetében 25 területről készítettünk felvételt mindhárom csatornán, melynek eredményeként összesen 2400 területről készültek képek a 96 lyukú lemezen fluoreszcens (nem konfokális) mikroszkópos technikával. Ezt követően a nyers képeket Ilastik szoftverrel pixel osztályozásnak vetettük alá. A mitokondriumokat a MitoTracker Red csatorna képeiről tubuláris és fragmentált osztályokba soroltuk. Ezen túlmenően, a szoftvert felhasználtuk a sejtmag szegmentálására a DAPI csatornán, illetve a fókuszon kívüli és citoplazma területek szegmentálására a TexasRed Phalloidin csatornán. Az így kapott szegmentálást exportáltuk és a CellProfiler szoftverrel elemeztük az objektumok tulajdonságait. Az elemzésekhez azok a sejtek feleltek meg, melyek területe nem volt átfedésben a fókuszon kívüli objektumokkal. Abban az esetben, ha a fókuszon kívüli terület a sejt területével átfedett, a sejtet és a hozzá tartozó összes szegmentált objektumot – beleértve a sejtmagot, citoplazmát és a mitokondrium osztályokat – kizártuk az elemzésből.

3.13. Teljes RNS szekvenálás

A globális transzkriptómadatok vizsgálatához nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenálási elemzést végeztünk Illumina szekvenáló platformon, az irodalomban leírtak szerint (Tóth et al 2020). A mitokondriális funkciókkal és a barnulási folyamattal kapcsolatos géneket BATLAS

(<http://green-l-12.ethz.ch:3838/BATLAS/>) és PROFAT (<http://ido.helmholtz-muenchen.de/profat/>) segítségével választottuk ki.

3.14. Szabad trijód-tironin meghatározása

A szabad trijód-tironin (fT3) koncentrációját a sejtfelülűszókból duplikátumokban mértük Cobas ECLIA kit (Roche Dagnostics, Mannheim, Németország) segítségével, Elecsys 2010 analízátorral (Roche Dagnostics, Mannheim, Németország) a gyártó ajánlásai szerint (Kazerouni et al. 2012).

3.15. Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciák meghatározását GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Calofoornia, Amerikai Egyesült Államok) és Microsoft Excel 14.0 programokkal végeztük. A statisztikai szignifikanciát két csoport között - kezelt és kontroll csoport - párosítatlan kétszélű Student t-teszttel határoztuk meg. Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A varianciaanalízis során Tukey tesztet alkalmaztunk. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM (mintaközép hibája) vagy $\pm$ SD formában adtuk meg. A szignifikáns eltérést * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ értékeknél állapítottuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A transzglutamináz hiányos egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek és hidegkezelés során alacsonyabb hatékonysággal mobilizálják gonadális zsírsíkjukat

Összhangban a korábbi eredményekkel a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerek táplálkozási szokásai nem különböztek és testtömegük is hasonlóan bizonyultak. Ennek megfelelően a vizsgálatainkhoz felhasznált, normálétrenden tartott 16 hetes hím egerek interszkapuláris barna, szubkután fehér és gonadális fehér zsírszövetek tömege is közel azonos volt 22°C-on. Megfigyeltük azonban, hogy ugyanolyan mennyiségű zsírszövet egerekben nem tudta hasonlóan támogatni a fiziológiai funkciókat alacsony hőmérséklet által kiváltott stresszes körülmények között. A 4°C-os hideg expozíció hatására, a TG2^{-/-} egerek rektális testhőmérséklete már az első óra végére szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{+/+} társaikhoz képest és 3 óra elteltével az etikailag még elfogadható 28,8 ± 0,57°C-ra csökkent. Ezzel szemben a TG2^{+/+} állatok továbbra is 31,8 ± 0,61°C rektális testhőmérsékletet tudtak fenntartani és az csak 4 órás kezelés után csökkent 38°C-ról mintegy 30°C-ra. Annak felderítése érdekében, hogy a zsírdepók milyen mértékben járulnak hozzá a TG2^{-/-} egerek test hőmérsékletének alakulásához, 3 óra akut hideg expozíció után izoláltuk interszkapuláris barna, szubkután fehér és gonadális fehér zsírszöveteket, és összehasonlítottuk azok tömegét a TG2^{+/+}, valamint a kezeletlen egerekből izolált szövetekkel. A szövetek tömegének lemérése után nyilvánvalóvá vált, hogy a TG2^{-/-} egerek a hidegkezelés során a TG2^{+/+} állatokhoz hasonlóan használták fel barna és szubkután fehér zsírsíkjukat, és utóbbinak megközelítőleg a felét veszítették el a 3 órás kezelés hatására. Ezzel szemben, a TG2^{-/-} állatok szignifikánsan kevesebbet veszítettek gonadális zsírszövetükből a TG2^{+/+} állatokhoz képest, akik esetében az is mintegy felére csökkent.

4.2. A TG2^{-/-} egerek gonadális zsírszövete kevésbé barnul be hidegkezelés hatására

Míg a szubkután zsírszövet hasonlóan barnult 3 óra hideg expozíció során mindkét egértörzsben, a TG2^{-/-} egerek gonadális zsírszövete kevésbé barnult be hidegkezelés hatására. Az UCP1 fehérje expressziója jelentős mértékben különbözött a két törzs gonadális zsírszövetében. 22°C-on kimutatható volt mind a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egértörzsben, alacsonyabb expresszióval a TG2^{-/-} gonadális zsírszövetben, összehasonlítva a TG2^{+/+} értékkel.

A β-AR-hiányos egerek hideg expozícióra reagálva képesek fokozni fehér zsírszövetük termogén funkcióját, ami más járulékos jelátviteli útvonalak létezésére is utal. Mivel az egerek szérumban magas noradrenalin-szintet mértünk hideg kezelés után, feltételeztük, hogy ilyen mechanizmus lehet az α1-AR aktiválása. A α- és β-AR jelátvitel közötti esetleges

kapcsolatot a szakirodalomban más modell rendszerekben már korábban leírták, amelyekben a TG2 mint esetleges G fehérje fontos szerepet játszhat. Ha ez így van, akkor az $\alpha 1$ -AR aktiválásának a hidegtűréstől eltérő fiziológiai különbségeket kell feltárnia a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egértörzsek között is. Habár a TG2 G-fehérje funkciója számos sejttípusban (pl. szív- és simaizomsejtekben, fibroblasztokban, endoteliális sejtekben, hepatocitákban) ismert, jelentőségét még nem vizsgálták alaposan *in vivo*. A TG2/Gha esetleges fiziológiai szerepének igazolására a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egereket intraperitoneálisan injektáltuk a specifikus $\alpha 1$ -AR agonista fenilefrinnel illetve kontrollként specifikus β -AR agonistával CL-316,243-mal. Ezután különböző metabolikus paramétereiket (táplálék és vízfogyasztás, hőtermelés, O₂ fogyasztás, CO₂ termelés, respirációs hányados (RER) indirekt kalorimetriás módszerrel vizsgáltuk.

4.3. Fenilefrin kezelést követően a TG2^{-/-} egerek respirációs hányadosa szignifikánsan alacsonyabba TG2^{+/+} állatokhoz képest

Az egerek VO₂ értékei a nappali és éjszakai periódusában megegyeztek a kezelések nélküli kontroll napon. A fenilefrin mindkét genotípus esetében a VO₂ szint csökkenését okozta, ami jelentősebb mértékű volt a TG2^{-/-} állatoknál. A TG2^{+/+} egerek visszaállították a normál értéket a kezelés utáni nappali perióduson belül, azonban a TG2^{-/-} egerek VO₂-értéke alacsonyabb maradt. Ezzel szemben a CL-316,243 kezelése VO₂ kismértékű növekedését idézte elő mindkét genotípusban, azonban egymáshoz nagyon hasonló módon az összes vizsgált időszakban, amikor egymással hasonlítottuk össze őket. Kiszámítottuk a fenilefrin kezelés előtti és utáni nappali és éjszakai időszakok összesített VO₂ értékeit, és azt találtuk, hogy a TG2^{+/+} egerek értékei változatlanok maradtak. Bár a TG2^{-/-} állatok VO₂ értéke alacsonyabb volt a kezelés után, mind a nappali, mind az éjszakai időszakban, korrelált a megfelelő kontroll periódusokkal. Nem volt szignifikáns különbség, amikor a TG2^{-/-} egerek O₂ fogyasztását hasonlítottuk össze a TG2^{+/+} egerek értékeivel. Eközben a CL-316,243 kezelés nem okozott szignifikáns változást a törzsek teljes VO₂ értékeiben. A VO₂ értékekhez hasonlóan az egerek VCO₂ értékei a nappali és az éjszakai kontroll periódusban egyaránt megegyeztek. A fenilefrin kezelés a törzsek VCO₂ szintjének csökkenését egyforma módon váltotta ki, majd az értékek fokozatosan emelkedni kezdtek a normálnak tekinthető szintre. A TG2^{-/-} egerek esetében a VCO₂ szint azonban alacsonyabb maradt a kezelés után a kontroll időszakhoz képest. Érdekes módon a CL-316,243 kezelés nem befolyásolta a törzsek VCO₂ értékeit, amelyek változatlanok maradtak a kontroll naphoz képest. Kiszámítottuk a fenilefrin kezelés előtti és utáni nappali és éjszakai időszakok teljes VCO₂ értékét is, amely a TG2^{+/+} egerek esetében változatlanok maradtak. Habár a VO₂-

höz hasonlóan, a $TG2^{-/-}$ állatok VCO_2 értékei is alacsonyabbak voltak mind a nappali, mind az éjszakai időszakokban a fenilefrin-kezelést követően, azonban a megfelelő kontroll periódusokhoz képest nem volt szignifikáns különbség, amikor összehasonlítottuk őket a $TG2^{+/+}$ egerek értékeivel. A VO_2 esetéhez hasonlóan a CL-316,243 kezelés nem okozott szignifikáns változást a törzsek totál VCO_2 értékeiben sem. A $TG2^{-/-}$ és $TG2^{+/+}$ egerek respirációs hányadosa (RER értékei: VCO_2/VO_2) a fenilefrin-kezelés előtti kontroll napon a nappali és éjszakai periódusában egyaránt nagyon hasonlóak voltak. Az intraperitoneálisan injektált 60 nM/g testtömeg fenilefrin abszorpciója után a törzsek RER értékei hasonlóan módon csökkentek szignifikánsan a nappali időszak első részében a kezelést követően, igazolva az $\alpha 1$ -AR agonista hatásosságát. Míg azonban a $TG2^{+/+}$ egerek RER értéke a nappali periódus második felében folyamatosan növekedni kezdett, és a következő éjszakai időszakban elérte a kezelés előtt kimutatott szintet, addig a $TG2^{-/-}$ állatok RER értéke továbbra is alacsony maradt. Ennek eredményeként a mérési nap éjszakai periódusában a $TG2^{-/-}$ egerek RER értéke szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a $TG2^{+/+}$ állatokhoz képest. Az intraperitoneálisan beadott CL-316,243 abszorpciója után, a nappali periódus első részében mindkét törzs RER értéke azonnal lecsökkent, bizonyítva a CL-316,243 fiziológiai hatását. Ezt követően, a nappali időszak második felében egyenletesen növekedni kezdtek az értékek. Következésképpen elmondható, hogy a RER értékek mindkét genotípus esetén jelentősen alacsonyabbak voltak a CL-316,243 kezelést követően az éjszakai periódusban a kontroll naphoz képest, azonban a $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ állatok RER értékei nem különböztek.

4.4. A fenilefrin kezelés nem csökkentette a $TG2^{-/-}$ egerek farki vérnyomását

Az állatok farki vérnyomását és pulzusát ugyanabban az időpontban mértük az akklimatizációs napon és a kezelés nélküli kontroll napon. A harmadik napon az egereket intraperitoneálisan injektáltuk 60 nM/ testtömeg (g) fenilefrinnel. Összehasonlítva a $TG2^{+/+}$ és a $TG2^{-/-}$ egerek farki vérnyomását (TBP) és pulzusát (HR), azt találtuk, hogy mindkét paraméter értéke egyaránt nagyon hasonló volt a kezelés előtti kontroll napon. Érdekes módon, a fenilefrin injektálása után 30 perccel, az első mérési időpontban nem tudtuk detektálni a $TG2^{+/+}$ egerek szisztolés és diasztolés vérnyomását, ezzel szemben a $TG2^{-/-}$ állatok vérnyomásának mérése sikeres volt. Emellett, míg az egértörzsek vérnyomás értékei hasonlóak voltak a nappali periódusban az $\alpha 1$ adrenerg agonista adása után, addig az éjszakai időszakban a szisztolés vérnyomás értékei, valamint a három mért diasztolés nyomás közül kettő, szignifikánsan alacsonyabbak voltak a $TG2^{+/+}$ állatokban, összehasonlítva a $TG2^{-/-}$ egerekkel. Ennek eredményeként a $TG2^{-/-}$ egerek

vérnyomás értékei változatlanok maradtak a fenilefrin kezelés után, míg a TG2^{+/+} állatoké alacsonyabb volt az éjszakai periódusban a kontroll naphoz képest. Ezen kívül nem észleltünk eltéréseket az állatok pulzus értékeiben, sem a kontroll napon, sem pedig a fenilefrin oltás után, kivéve a kezelést követő éjszakai periódus második mérési időpontjában, amikor a TG2^{+/+} egerek pulzusa alacsonyabb szintet mutatott.

4.5. Az α 1-adrenerg agonista kisebb mértékű szövetkárosodást okoz a TG2^{-/-} egerekben

A fenilefrin kezelés után 13 órával nyert TG2^{+/+} egerek szérummintái szignifikánsan magasabb LDH aktivitást mutattak a TG2^{-/-} állatokhoz képest. A szérum LDH izoenzimek agaróz gél elektroforetikus elválasztása után a denzitometriás értékelés azt mutatta, hogy az öt izoenzim közül négy (LDH1, LDH2, LDH4 és az LDH5) nagyobb mennyiségben volt jelen a TG2^{+/+} mintákban a TG2^{-/-} szérumokhoz képest. A TG2^{-/-}/TG2^{+/+} arányt, tehát a relatív LDH tartalmat vizsgálva elmondható, hogy az LDH2, LDH4 és LDH5 aránya hasonló volt a genotípusok között. Azonban ez a relatív érték az LDH1 izoenzim esetén, ami a szívizom károsodás markere, szignifikánsan magasabb volt a TG2^{+/+} mintákban. Mivel szívizom károsodást követően jelentősen emelkedik a szérumban mérhető kreatin-kináz (CK-MB) aktivitás, így megvizsgáltuk annak szintjét a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egerek mintáiban. A TG2^{+/+} állatok esetén szignifikánsan magasabb kreatin-kináz szintet mértünk a TG2^{-/-} állatokhoz képest, ami alátámasztja, hogy az α 1-adrenerg agonista kisebb mértékű szívizom károsodást vált ki TG2^{-/-} egerekben, mint a TG2^{+/+} genotípusban.

4.6. A TG2^{-/-} és TG2^{+/+} gonadális zsírszövetből izolált preadipociták beige irányú differenciációja hasonló volt

A TG2^{-/-} állatok alacsonyabb hidegtűrő képességének további vizsgálatára a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egerek gonadális fehér zsírszövetéből sztromális vaszkuláris frakciókat (SVF) izoláltunk és beige irányú adipogén sejt differenciálásnak vetettük alá. Miután a sejtek elérték a 90% -os konfluenciát, 2 napig indukciós tápfolyadékot használtunk, majd a preadipocitákat a differenciációs tápfolyadékban tartottuk. 14 napon belül a sejtek multilokuláris lipidcseppeket halmoztak fel, és a preadipociták fibroblaszt-szerű alakjából az *in vitro* differenciált adipociták jellegzetes fenotípusát mutatták. Hasonló proliferációs képességet figyeltünk meg a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} preadipociták esetében, és eredményeink alapján a beige adipociták azonos mennyiségű lipidet halmoztak fel és zsírcsepp méretük sem volt eltérő. A differenciáltatás sikerességét preadipocita és beige marker gének expressziójának mérésével vizsgáltuk. A

preadipocita markernek tekintett 'Preadipocyte factor 1' (Pref1) kifejeződésében nem észleltünk szignifikáns különbséget a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} preadipocitákat összehasonlítva, továbbá ennek expressziója egyformán lecsökkent a beige differenciáltatás előrehaladtával mindkét genotípusban, függetlenül az adrenerg kezelésektől. A differenciáltatás végén a beige marker gének kifejeződése, az Ucp1, Tbx1, Tnfrsf9 és Tmem26 mindkét genotípusban szignifikánsan emelkedett. Az Ucp1 és Tbx1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az TG2 hiányában. Eredményeink arra utalnak, hogy a beige differenciálódás fenotípusosan hasonló sejteket eredményezett TG2 jelenlétében és hiányában.

4.7. A mitokondriális fehérje komplexek és az UCP1 expressziója alacsonyabb a TG2^{-/-} beige adipocitákban az adrenerg kezeléstől függetlenül

A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} beige adipociták mitokondriumainak összehasonlításához megvizsgáltuk az UCP1 és a mitokondriális fehérje komplexek alegységeinek az expresszióját. Az UCP1 kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige adipocitákban a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Megállapítottuk, hogy a mitokondriális II. komplex (II-SDHB: szukcinát-dehidrogenáz vas-kén alegység), a III. komplex (III-UQCRC2: ubikinol-citokróm C reduktáz 2. alegység) és az V. komplex (V-ATPSA: ATP szintáz, alfa alegység) fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige adipocitákban a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a beige adipociták TG2 hiányában azért különbözhetnek, mert eltérő preadipocitákból differenciálódnak. Ezért megvizsgáltuk az UCP1 és a mitokondriális fehérje komplexek expresszióját a preadipocitákban is. Meglepő módon az UCP1 kifejeződését detektáltuk preadipocitákban is, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} sejtekben. Az a figyelemre méltó megfigyelés, miszerint a preadipociták beige vagy barna differenciálódási markert fejezhetnek ki, már ismert az irodalomból. Ezenkívül a mitokondriális III. komplex expressziója a TG2-hiányos preadipocitákban is alacsonyabb volt, míg a II. komplex és az V. komplex esetében nem volt szignifikáns különbség a TG2^{+/+} preadipocitákhoz képest. Vizsgáltuk a mitokondriális dehidrogenázok aktivitását is, amelyek a funkcionális mitokondriumok metabolikus aktivitásának mutatói. A mitokondriális dehidrogenáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt mind a preadipocitákban, mind a beige sejtekben TG2 hiányában. Eredményeink arra utaltak, hogy a mitokondriális elektrontranszport funkciója már a TG2^{-/-} preadipocitákban, és következésképpen a differenciált beige zsírsejtekben is, több ponton hibás lehet. Megvizsgáltuk a preadipociták és a beige adipociták ATP és NADH termelését, és mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk a TG2 hiányos

fenotípusokban. A csökkent ATP és NADH termelés a mitokondriális diszfunkció okozta csökkent energiatermelésre utalt.

4.8. A mitokondriális membránpotenciál szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige zsírsejtekben

A preadipociták és a beige adipociták mitokondriális membránpotenciáljának vizsgálatához lézer-pásztázó citometriát (LSC) alkalmaztunk. A mitokondriumokat Mitotracker Deep Red festékkel, a sejtmagokat DAPI-val festettük. A MitoTracker Deep Red mitokondriális retenciója a mitokondriális membrán potenciáljától függ, és ezért megjósolható, hogy magasabb a megnövekedett oxidatív foszforiláció-értékkel (OXPHOS) rendelkező sejtekben. Annak igazolására, hogy csak ép sejtek képesek felvenni a MitoTracker festéket, pozitív kontrollként antimicin A elektrontranszport-gátlót használtunk. Megállapítottuk, hogy a MitoTracker Deep Red fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} preadipocitákban és a beige zsírsejtekben a TG2^{+/+} sejtekhez képest. A mitokondriumok fontos szerepet játszanak a sejtek redox állapotának szabályozásában. Amikor a mitokondriális elektrontranszportlánc (ETC) előállítja az elektrokémiai protongradienst az ATP-szintézishez, az gyakran bizonyos mértékű ROS termeléséhez vezethet. A mitokondriális ROS termelés fő forrásai az I. és III. komplexben található ubikinon helyek. Fontos megjegyezni, hogy éppen ezen komplexek fehérje-expressziójában figyeltünk meg különbségeket. Erre való tekintettel tanulmányoztuk a preadipociták és a beige zsírsejtek endogén és teljes ROS termelését. Érdekes módon, míg az ETC megváltozott szerkezete és funkciója várhatóan megemeli a ROS szintet, mi nem ezt tapasztaltuk. Mind az endogén, mind a totál ROS termelés alacsonyabb volt a TG2^{-/-} mitokondriumokban, ami alacsonyabb mitokondriális aktivitásra utal a TG2^{+/+} sejtekhez képest.

4.9. A TG2^{-/-} preadipociták és beige zsírsejtek hipometabolikusak a TG2^{+/+} sejtekhez képest

Az oxigénfogyasztás mértéke az elektron transzportlánc aktivitásának indikátora, ezért a preadipociták és a differenciált beige adipociták funkcionális kapacitásának tesztelésére mértük a mitokondriális oxigénfogyasztást (OCR). A TG2^{-/-} preadipocitákban és beige adipocitákban szignifikánsan alacsonyabb bazális és proton csorgásos légzést figyeltünk meg a TG2^{+/+} sejtekhez viszonyítva. Ezzel párhuzamosan, a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige zsírsejtekben szignifikánsan alacsonyabb extracelluláris savasodási arányt (ECAR) detektáltunk a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Ezenkívül az OCR / ECAR arány bazális körülmények között szintén

alacsonyabb volt a TG2-hiányos sejtekben a kontroll preadipocitákhoz és beige adipocitákhoz viszonyítva, jelezve, hogy a TG2^{+/+} sejtek az energiatermeléshez az oxidatív foszforilációt részesítették előnyben a glikolízissel szemben. A sejtek energetikai fenotípus elemzése azt mutatta, hogy mind a TG2^{+/+} preadipocitákat mind pedig a TG2^{+/+} beige zsírsejteket kifejezett glikolitikus és oxidatív anyagcsere jellemez, amit a TG2^{-/-} sejtekhez viszonyított magas extracelluláris savasodás és oxigénfogyasztási ráta jelez, és ezért „energetikus” sejtnek definiáltuk őket. Ezzel szemben eredményeink határozottan arra utalnak, hogy TG2 hiányában a sejtek hipometabolikusak.

4.10. A TG2^{-/-} beige adipociták szignifikánsan több fragmentált mitokondriummal rendelkeznek, mint a TG2^{+/+} sejtek

Eredményeink alapján felvetettük a kérdést, hogy a TG2^{-/-} beige adipocitákban milyen típusú mitokondriális morfológia várható a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Mivel a TEM során kapott ultravékony metszetek nem mindig alkalmasak a mitokondriális hálózat összetettségének megállapítására, és kísérleteink során csupán a preadipociták vizsgálatát tette lehetővé, ezért fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk a mitokondriumok morfológiáját és a mitokondriális hálózat szerkezetét. Mindkét genotípusban a dominánsan jelenlévő mitokondriális morfológia a tubuláris forma volt a preadipocitákban és a beige adipocitákban is. Bár a fragmentált / tubuláris mitokondriumok aránya nem különbözött a preadipocitákban, a TG2^{-/-} beige zsírsejtekben szignifikánsan több fragmentált mitokondriumot azonosítottunk a TG2^{+/+} kontroll sejtekhez képest.

4.11. A mitokondriális hasadási és fúziós fehérjék vizsgálata megerősíti, hogy TG2 hiányában a sejtek szignifikánsan több fragmentált mitokondriumot tartalmaznak

A fluoreszcens mikroszkóppal megfigyelt fragmentációt fehérjeszinten tovább vizsgáltuk a mitokondriális fúzióért és hasadásért felelős fehérjék expressziójának mérésével. Nem láttunk szignifikáns különbségeket a fúziós (MFN2, OPA1) fehérje szintekben sem a preadipocitákban, sem a differenciált beige sejtekben a genotípusok között. Ugyanakkor a mitokondriális hasadási fehérjék (DRP1, MFF) vizsgálata után azt tapasztaltuk, hogy a mitokondriális hasadási faktor (MFF) expressziója szignifikánsan megemelkedett a TG2^{-/-} beige adipocitákban a vad típusú sejtekhez képest. Western blot eredményeink megerősítik a fluoreszcens mikroszkópos eredményeket, miszerint a mitokondriális fúziós folyamatok egyaránt dominánsabbak a preadipocitákban és a beige zsírsejtekben mindkét genotípusban. A

preadipocitákban a mitokondriális hasadási-fúziós folyamatok vizsgálata során nem tapasztaltunk különbséget sem a fluoreszcens mikroszkóppal végzett immuncitokémiai vizsgálatok során, sem pedig fehérjeszinten. Ugyanakkor, a TG2^{-/-} beige adipocitákban szignifikánsan több fragmentált mitokondriumot azonosítottunk a TG2^{+/+} sejtekhez képest, amit az MFF fehérje szignifikánsan magasabb expressziója is alátámasztott. Összességében kisebb, fragmentáltabb mitokondriumokat és megemelkedett mitokondriális hasadási folyamatokat mutattunk ki a TG2^{-/-} beige adipocitákban a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TG2 elvesztése megváltoztathatja a mitokondriális morfológiát és működést. Annak további tanulmányozására, hogy a fragmentáció befolyásolja-e a mitokondriális biogenezist, megvizsgáltuk a PGC1 α , az energia homeosztázis és a mitokondriális biogenezis fő szabályozójának expresszióját. Megállapítottuk, hogy a TG2^{-/-} beige sejtekben a PGC1 α expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt. Az irodalomból ismert, hogy szoros összefüggés van az AMPK aktiválása és a PGC-1 α zsírs sejtekben történő indukálása között. Megfigyeltük, hogy az AMPK foszforilációja csökkent a TG2^{-/-} preadipocitákban és a differenciált beige adipocitákban a TG2^{+/+} kontroll sejtekhez képest.

4.12. A tiroid hormon bontó DIO3 expressziója magasabb a TG2^{-/-} sejtekben

A kapott eredmények lehetséges magyarázatainak feltárása érdekében RNS-seq kísérleteket végeztünk, összehasonlítva a TG2^{-/-} és a TG2^{+/+} sejtek teljes génexpressziós profilját. Elemzésünk összesen 165 differenciálisan expresszált mitokondriális és barnulási gént tárt fel a beige adipocitákban, köztük 123 fel-regulált gént és 42 le-regulált gént. A TG2^{-/-} beige mintákban az fel-regulált gének gén ontológiai (GO: reaktom út) elemzése azt mutatta, hogy ezek a differenciálisan expresszált gének többek között a mitokondriális biogenezis és a tiroid-hormon aktivitás szabályozása szempontjából jelentősek. Tekintettel arra, hogy a tiroidhormon-aktivitás szabályozása volt az egyik legjelentősebb reaktomútvonal, megkíséreltük azonosítani, hogy a mely differenciálisan expresszálódó gének szabályozódnak a tiroid hormon receptor α (THRA) által. A kapott tiroid anyagcserével kapcsolatos gének közül azokat a fel- és le-szabályozottakat választottuk ki validálásra, amelyek irodalmi adatok alapján alátámaszthatja a barnulási és mitokondriális funkcióval kapcsolatos korábbi eredményeinket. A TG2^{-/-} beige mintákban az fel-regulált gének tekintetében a Bnip3 gént validáltuk, amely részt vesz a mitokondriális hasadás pozitív szabályozásában, amit már korábban megfigyeltünk a TG2^{-/-} beige adipocitákban. Elemeztük továbbá az elhízáshoz is asszociált Cxcl1 gént és a pajzsmirigy hormonok lebontásért felelős Dio3 gént kvantitatív valós idejű PCR-rel. A TG2^{-/-} beige

sejtekben le-regulált gének közül validálásra a mitokondriális működéshez kapcsolódó *Trpv1* és *Slc25a45* géneket választottuk ki. Az RNS-seq eredmények kísérleti validálása minden vizsgált gén esetében sikeres volt, megerősítve azt a feltételezést, hogy a tiroid metabolizmushoz kapcsolódó differenciálisan expresszáldó gének TG2 hiányában hozzájárulhatnak az alacsonyabb mitokondriális funkciókhoz. Fontos kiemelni, hogy eredményeink alapján a *Dio3* gén, amely az energia-anyagcserében fontos szerepet játszó pajzsmirigy hormonok hatását csökkenti, a TG2^{-/-} beige adipocitákban jelentősen magasabb szinten expresszáldódik.

A DIO3 katalizálja a pajzsmirigyhormon inaktiválását: a prohormon tiroxint (T4) részleges dejodinációval inaktív reverz trijód-tironinná (rT3) alakítja, a bioaktív hormont (T3) pedig dijód-tironinná (T2) alakítja át. A 3,5,3'-trijód-L-tironin, más néven T3, döntő szerepet játszik a fejlődéssel, a differenciálódással és az anyagcserével kapcsolatos különféle folyamatokban. Ezenkívül a T3 mind a sejtmagokban, mind a mitokondriumokban megtalálható, elősegítve a mitokondriális biogenezist. Megmértük a szabad T3 (fT3) koncentrációt a beige adipociták sejtfelülűszojájában. Fontos megjegyezni, hogy a T3-at a beige irányú differenciáltatás során a 0,2 nM végső koncentrációban alkalmazzuk. Megállapítottuk, hogy az fT3 koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige sejtek felülűszojájában a TG2^{+/+} kontroll mintákhoz képest, ami arra utalhat, hogy a magasabb szinten expresszáldó DIO3 annak egy részét lebontja ebben a sejt típusban. Ezt az elképzelést gén és fehérje expressziós eredményeink is alátámasztják, ahol azt találtuk, hogy a DIO3 expressziója szignifikánsan magasabb volt a TG2^{-/-} beige adipocitákban a TG2^{+/+} kontroll sejtekhez képest. A magasabb DIO3 expresszió és az alacsonyabb fT3 koncentráció összefüggése felveti annak lehetőségét, hogy ez az enzim hozzájárulhat a TG2^{-/-} beige genotípus alacsonyabb mitokondriális funkcióihoz.

4.13. TG2 hiányában csökken a zsírsavak, aminosavak és a koenzim A transzportja a mitokondrium mátrixába

A TG2^{-/-} beige mintákban a le-regulált gének gén ontológiai (GO: reaktom út) elemzése alapján, ezek a differenciálisan expresszáldó gének az aminosavak és származékaik metabolizmusához valamint a biológiai oxidáció folyamatához kapcsolódnak. RNS szekvenálási adatainkból azonosítottuk a differenciálisan expresszáldó gének közül azokat, amelyek mitokondriális transzport folyamatokért felelősek. Megtaláltuk az aminosavakat szállító mitokondriális 'solute carrier' (SLC) transzportereket, és érdekes módon ezek a le-szabályozott gének az acilkarnitin és a koenzim A transzportja révén szerepet játszanak a

zsírsav anyagcserében is. Az SLC25A45 transzporter lehet az egyik legrelevánsabb, mivel a TG2^{-/-} preadipocitákban is szignifikánsan alacsonyabb expresszióját figyeltük meg. Ez a hordozó fontos szerepet játszik az acilkarnitin, az ATP és az aminosavak transzportjában a belső mitokondriális membránon át a mitokondriális mátrixba. Fontos figyelembe venni, hogy ez a transzporter a tiroid anyagcserével kapcsolatos gének között is szerepel, mint egy differenciálisan expresszált, le-regulált gén a TG2^{-/-} beige sejtekben. Az SLC25A45 expresszió és tiroid anyagcsere összefüggését már leírták a szakirodalomban, amikor egy feltételezett tiroid válasz elemet találtak az Slc25a45 gén promóter régiójában. Az RNS szekvenálási adatok validálását kvantitatív valós idejű PCR-rel és Western blot-analízissel végeztük el, amelyek azt mutatták, hogy az SLC25A45 gén és fehérjeszint is szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} beige adipocitákban a vad típusú kontroll sejtekhez képest. Az SLC25A45 fontos ortológ génje az SLC25A47, amely szintén le-regulált a TG2^{-/-} adipocitákban, emellett alacsonyabb expressziót detektáltunk az SLC25A42 esetében is, amely a koenzim-A és az ADP mitokondriumba történő transzportjáért felelős, és ilyen módon fontos szerepet játszik az energiatermelésben és -hasznosításban is.

5. MEGBESZÉLÉS

Az elhízással szemben rezisztens egérmodellek a megemelkedett barna és beige zsírsejt aktivitáson keresztül egyértelműen jelezték, hogy a termogenezis aktiválása jelentős stratégia lehet az anyagcsere folyamatok egyensúlyának biztosításában, valamint az elhízás megelőzésében és kezelésében. Az UCP1 expressziójának csökkenése kóros következményekkel jár: az UCP1 pozitív sejtek hiánya transzgenikus egerekben fokozott hajlandóságot vált ki az elhízásra és a cukorbetegségre, és az UCP1 KO egerekben elhízás alakul ki még termoneutrális körülmények között is, ha magas zsírtartalmú étrenden tartják az állatokat. Korábbi vizsgálatok a TG2 up-regulációját mutatták ki emberi barna zsírszövetben a fehér zsírszövethez képest, ami felvetette a termogén funkcióban betöltött szerepének lehetőségét. Ennek feltárására hidegtűrési vizsgálatokat végeztünk, és megállapítottuk, hogy a TG2^{-/-} egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek, és alacsonyabb hatékonysággal mobilizálják gonadális zsírjukat hidegkezelés során, mint a TG2^{+/+} állatok. Eredményeink szerint a normál barna és szubkután fehér zsírszövet funkciói bizonyos mértékben támogatják a TG2^{-/-} állatokat szokatlanul alacsony hőmérsékleten; azonban a gonadális fehér zsírszövet korlátozott felhasználása fokozott hidegérzékenységhez vezetett. A TG2^{-/-} egerek gonadális zsírszöve kevesbé barnult be hidegkezelés hatására, ellenben a másik abundáns zsírdepóban, a szubkután zsírszövetben nem tapasztaltunk különbséget TG2 hiányában.

A zsírlebontás folyamata egyértelműen csökken a TG2^{-/-} gonadális zsírszövetben, ami a jelentősen megemelkedett noradrenalin szinttel és a szignálútvonalak esetleges kapcsolódása révén felveti annak lehetőségét, a TG2 G-fehérjeként működik ebben a zsírdepóban. Ennek vizsgálata érdekében először tanulmányoztuk az $\alpha 1$ és β -AR agonisták fiziológiai hatását az egerek metabolikus paramétereit mérve. A fenilefrin egy szimpatomimetikus amin, a noradrenalinhoz hasonló kémiai szerkezettel rendelkezik, ezért szelektíven kötődik az $\alpha 1$ -AR-okhoz és aktiválja azokat. Az $\alpha 1$ -AR-oknak három altípusa van, amelyek körülbelül 75%-ban homológok: $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ és $\alpha 1D$. Úgy tűnik, hogy a fenilefrin hasonlóan hat mind a három receptor altípusra. Ugyanakkor ismert, hogy a TG2 G α -fehérjeként működve tud kapcsolódni az $\alpha 1B$ -AR-hoz vagy az $\alpha 1D$ -AR-hoz, de az $\alpha 1A$ -AR-hoz nem.

A TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egereket összehasonlítva szembetűnő különbségeket találtunk a RER (CO₂-termelés és O₂-fogyasztás aránya) értékekben, különösen az éjszakai periódusban, néhány órával a fenilefrin kezelés után. A TG2^{+/+} állatok esetében a RER csökkent, majd fokozatosan növekedni kezdett kb. 0,8-ról az 1-hez közeli szintre, amelyet kontroll értéként detektáltunk

mindkét törzs esetében a kezelést megelőzően. Eközben a $TG2^{-/-}$ egerek RER-értéke a csökkenést követően nem kezdett növekedni, és a kezelés utáni éjszakai periódusban továbbra is alacsony maradt. Az éjszakai periódus általában az egerek aktív fázisa, de a RER értékek eltéréseiben ennek valószínűleg nincsen szerepe, mivel az állatok fizikai aktivitásában nem tapasztaltunk eltéréseket. Az agonistákkal történt kezelés utáni éjszakai periódusban mindkét törzs esetében hasonlóan csökkent a fizikai aktivitás és jelentősen alacsonyabb maradt.

Általánosan elfogadott, hogy a RER érték jelzi, hogy milyen energiaforrás-típus metabolizálódik előnyösen. 1,0 értéknél a tiszta glükóz oxidálódik, míg a 0,7-es érték a zsírsav oxidációt jelzi. Ennek megfelelően a $TG2^{+/+}$ és a $TG2^{-/-}$ egerek fenilefrin kezelés előtt főleg a szénhidrátok lebomlásából nyertek energiát, azonban a kezelést követően azonnal elkezdtek felhasználni a zsírsavakat. Érdekes azonban, hogy a $TG2^{-/-}$ állatok sokkal hosszabb ideig folytatták a zsírsavak lebontását, míg a $TG2^{+/+}$ egerek fokozatosan szénhidrátot kezdtek hasznosítani. A $TG2^{+/+}$ egerek vérplazmájának magasabb laktátszintje is valószínűleg azt jelzi, hogy több glükózt használtak fel, mint a $TG2^{-/-}$ egerek. A fenilefrin kezelés maximális 0,3-as skálán (0,7-től 1,0-ig) megfigyelt körülbelül 0,1-es különbsége a RER-értékekben eltérő metabolizmusra utal, holott az állatokat ugyanolyan étrenden tartottuk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az adrenerg receptor szignálban esetleg $G_{H\alpha}$ fehérjeként működő $TG2$ valamilyen módon szerepet játszhat a szénhidrát és a zsírsav oxidációja közötti egyensúly meghatározásában, de hiányában a zsírsavlebontás nem csökken, hanem éppen hogy emelkedik.

A CL-316,243-at, egy specifikus β_3 -AR agonistát alkalmaztunk az α_1 -AR agonista fenilefrin kontrolljaként. Ekkor a törzsek metabolikus paraméterei nagyon hasonlóak voltak, ami arra utalhat, hogy a $TG2$ -nek nincsen közvetlen szerepe a β_3 -AR által szabályozott jelátvitelben.

A fenilefrin egy erős vazokonstriktor, amely növeli a szív előterhelését anélkül, hogy a szív myocitáira bármilyen fontos közvetlen hatása lenne. A vaszkuláris baroreceptorok stimulálásával növelheti a vérnyomást, miközben lassú pulzusszámot tart. Így a fenilefrint általában normál szív működésű, de értágulat okozta klinikailag jelentős hipotenzióval rendelkező betegeknél alkalmazzák. A fenilefrin kifejezett érrendszeri káros hatásokat okozhat, beleértve mind a szisztolés, mind a diasztolés vérnyomás növekedését. Ennek vizsgálatára az egerek farki vérnyomását mértük. Megállapítottuk, hogy a $TG2^{-/-}$ állatok szisztolés és diasztolés vérnyomása egyaránt hasonló volt a $TG2^{+/+}$ egerek értékeihez hasonlítva a kezelés előtti kontroll napon. Fontos megjegyezni, hogy a fenilefrinről ismert, hogy a farki artériák összehúzódását okozza, ami lehetetlenné teszi a vérnyomás kimutatását addig, amíg a vegyület le nem bomlik. Valóban, nem tudtuk kimutatni a $TG2^{+/+}$ egerek vérnyomását az első mérési

időpontban, 30 perccel a fenilefrin kezelés után. Ezzel szemben, a farki vérnyomás minden vizsgált TG2^{-/-} állatban mérhető volt, melyek értéke összehasonlíthatónak bizonyult a kontroll napon detektált értékekkel. Ezek az eredmények TG2 hiányában a kaudális artériák alacsony fokú összehúzódására utalnak az első mérési időpontban.

Érszűkítő hatása miatt a fenilefrin súlyosnekrózist okozhat a szövetekben. Az LDH egy oldható citoplazmatikus enzim, amely felszabadul az extracelluláris térbe, amikor a plazmamembrán megsérül a nekrosis során. Az LDH aktivitás számszerűsítése a szérummintákban jelzi a szövetkárosodás mértékét, ezért a törzsek szérummintáiban mértük az LDH aktivitást, hogy összehasonlítsuk a fenilefrin kezelés által okozott nekrosis mértékét. Az össz LDH aktivitás mindkét törzsben kórosan magas volt a normál értékekhez képest 13 órával a kezelés után, de a TG2^{+/+} mintákban szignifikánsan magasabb volt a TG2^{-/-} szérum mintákhoz képest. A tetramer LDH kétféle alegységből áll, az LDH-M és az LDH-H fehérjékből. Ez a két alegység öt lehetséges izoenzimet (LDH1 - 5) képezhet, amelyek enzimatikusan hasonlóak, de eltérő szöveti eloszlást mutatnak. Következésképpen a különböző izoenzimek kóros szintű megjelenése a szérumban jelezheti, hogy mely szövetben vagy szervben történt a károsodás. Az LDH izoenzimek elektroforetikus szétválasztása és aktivitásuk számszerűsítése is azt mutatta, hogy a fenilefrin kezelés több szervben is károsodást okozott, azonban ezek jelentősebb mértékűek voltak a TG2^{+/+} egereknél. Az LDH1 a szívizom és a vese károsodására jellemző, az LDH2 a vese, az LDH4 az agy és a tüdő, míg az LDH5 a máj, valamint a vázizomzat károsodását jelzi. Ezeknek az izoenzimeknek a szintje magasabb volt a TG2^{+/+} egerekből származó mintákban, a TG2^{-/-} állatok mintáihoz képest. Amikor kiszámítottuk az egerek szérummintáinak relatív LDH izoenzim aktivitási értékeit, azt találtuk, hogy a többi izoenzimhez képest az LDH1 szint emelkedése volt a legjelentősebb a TG2^{+/+} mintákban a többi típushoz képest, ami arra utal, hogy a szervkárosodásban a legnagyobb a különbség szívizom esetén következett be. Annak megerősítésére, hogy a szívizomzat kevésbé károsodott a TG2^{-/-} állatokban, mértük a szérum mintákban a kreatin-kináz (CK-MB) aktivitását is, amely a szívizom károsodásának sokkal specifikusabb markere. Megállapítottuk, hogy a TG2^{-/-} állatoknál szignifikánsan alacsonyabb volt CK-MB aktivitása a TG2^{+/+} egerekhez képest. Bár adataink azt mutatják, hogy a fenilefrin kezelés után a szív súlyosabb károsodást szenvedett a TG2^{+/+} állatokban, fontos megjegyezni, hogy az egerek pulzus értékeiben nem volt eltérés, kivéve a kísérletek egyetlen mérési időpontját az éjszakai periódusban, ami arra utal, hogy a szívkárosodás nem okozott funkcionális rendellenességeket a vizsgált időszakban. Összességében ki kell emelni, hogy a TG2 szerepe a normális kardiovaszkuláris funkció fenntartásában még nem teljesen tisztázott. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a

TG2 működhet G fehérjeként a vaszkuláris simaizomsejtekben, azonban hasonló funkcióját a zsírszövetben nem igazolják.

Munkánk során a TG2-t olyan szabályozóként azonosítottuk, mely egerekben szövetspecifikus módon vesz részt a gonadális zsírszövet barnulási folyamatában. Hidegtűrési eredményeink alapján felmerült, hogy a TG2 működésével kapcsolatos szabályozási folyamatok az elhízás és az anyagcserezavarok farmakológiai beavatkozásainak lehetséges célpontjai közé sorolható. Korábbi szakirodalmi adatok beszámoltak arról, hogy a TG2 szabályozza az adipocita differenciálódást, így hatással lehet a beige sejtek kialakulására is.

Számos tanulmány leírta a TG2 mitokondriális homeosztázisban betöltött szerepét. A mitokondriális légzési lánc stabilizálásában betöltött funkciója mellett, modulálni tudja a kritikus gének, köztük a PGC-1 α és a citokróm C transzkripcióját is, amelyek fontos szerepet játszanak a mitokondriumok működésében és biogenezisében. További bizonyítékok vannak arról, hogy a TG2 szerepet játszhat egyes sejtek anyagcseréjében, például részt vesz a szívizomsejtek mitokondriumainak légzésfunkcióiban, mivel a TG2^{-/-} egerek súlyos defektust mutattak az ATP termelésében. Figyelembe véve ezeket a megállapításokat és a TG2-t a mitokondriumok homeosztázisával összekapcsoló bizonyítékokat, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a TG2 szerepét a gonadális zsírszövet eredetű beige adipociták adrenerg válaszában, tanulmányainkat az enzim adipociták anyagcseréjére gyakorolt hatására összpontosítva.

Ebből a célból preadipocitákat izoláltunk és differenciáltattunk TG2^{-/-} és TG2^{+/+} egerek gonadális zsírszövetéből, majd összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink alapján azonban a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} preadipociták proliferációs kapacitása azonos volt. Ezen túlmenően, a differenciált beige adipociták azonos mennyiségű lipidet tartalmaztak hasonló zsírcseppméretekkel. A beige marker gének expressziós profiljában nem volt különbség a két genotípus között, kivéve a Tbx1-et, amely alacsonyabb szinten expresszáldott a TG2^{-/-} differenciált sejtekben. A Tbx1 egy transzkripciós faktor, de pontos szerepe a beige adipocitákban még nem ismert. A differenciáltatott sejteket különböző adrenerg szerek hozzáadásával kezeltük, és érdekes módon a β -adrenerg útvonal aktivátor csak a TG2^{+/+} sejtekben növelte az Ucp1 expressziót, a TG2^{-/-} sejtekben viszont nem. Az adrenerg agonista kezeléseknek azonban nem volt jelentős hatása más beige marker gének expressziójára. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a TG2^{-/-} preadipociták a TG2^{+/+} sejtekhez hasonló hatékonysággal tudtak zsírcseppeket felhalmozni, viszont Ucp1 expressziójuk nem reagált a további β -AR stimulációra.

A mitokondriumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a hőtermelésben az UCP1 belső membránfehérje révén, amely szétválasztja a légzést az ATP-szintézistől, és ezért hő formájában energiadiSSIPációt vált ki, miközben serkenti a zsírsavak fokozott oxidációját. Az a figyelemre méltó megfigyelés, hogy egy preadipocita terminális beige differenciálódási markert, például UCP1-et fejez ki, már ismert az irodalomból. Az UCP1 fehérje expressziója alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige zsírsejtekben és a preadipocitákban, ami arra utal, hogy szignifikánsan alacsonyabb hőtermelő képességgel rendelkeznek a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Valójában az UCP1-függő hőtermelést tükröző protoncsorgásos légzés jelentősen csökkentett mind a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige sejtekben.

A csökkent energiatermelési kapacitást a szignifikánsan alacsonyabb NADH és ATP szint kimutatása igazolta a TG2^{-/-} preadipocitákban és a beige sejtekben, továbbá igazoltuk azt is, hogy a TG2 hiánya alacsonyabb mitokondriális membránpotenciálhoz vezet. Érdekes módon, míg az ETC megváltozott szerkezete és funkciója várhatóan növeli a ROS szintet, ennek ellenkezőjét tapasztaltuk, a ROS termelés jelentősen csökkent a TG2^{-/-} sejtekben, ami alacsonyabb szintű mitokondriális metabolizmusra utal. Más sejttypusoknál kimutatták, hogy a TG2 szerepet játszik az ETC és az energiatermelés homeosztázisának fenntartásában. A TG2 deléciója egerekben az I. és II. légzési komplexek szignifikáns deregulációját és az ATP termelés csökkenését okozta egér embrionális fibroblasztokban. Korábban kimutatták, hogy a TG2 PDI aktivitása fontos az ATP szintáz komplexben és az ETC egyéb kulcsfontosságú komponenseiben a diszulfid hidak kialakításához. Az alacsonyabb NADH- és ROS-szintekre vonatkozó eredményeink azonban arra utalnak, hogy a csökkent mitokondriális membránpotenciál és ATP-termelés esetleg a TG2^{-/-} mitokondriumokban rendelkezésre álló energiaforrások alacsony szintjének is köszönhető. Valójában a sejtek energiaprofiljának vizsgálata feltárta, hogy a TG2^{+/+} preadipocitákat és a beige adipocitákat kifejezett oxidatív és glikolitikus metabolizmus jellemezte, amit a megfelelő TG2^{-/-} sejtekhez képest magas OCR-szint és ECAR jelez, és ezért ezeket „energetikus” sejt-ként határoztuk meg. Ezzel szemben eredményeink arra utalnak, hogy a preadipociták és a beige adipociták hipometabolikusak a TG2 hiányában.

A mitokondriumok folyamatosan fúzionálnak és szétválnak, ezek a fúzió és hasadás néven ismert folyamatok, melyek a mitokondriumok dinamikus hálózatát eredményezik. A mitokondriumok anyagcseréje a fúziós és hasadási folyamatok egyensúlyától függ. A fúzió tubuláris mitokondriális morfológiához vezet, míg a hasadás a mitokondriumok fragmentált szerkezetét eredményezi. A mitokondriális fragmentációra elsősorban a diszfunkcionális mitokondriumok elkülönítéséhez és eliminálásához van szükség. Az irodalomból ismert, hogy

TG2 hiányában a mitokondriumok fragmentációját figyelték meg egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekben. HCS eredményeink azt mutatták, hogy a tubuláris mitokondriális morfológia jellemzőbb mind a preadipocitákra, mind a beige sejtekre, azonban a TG2^{-/-} beige adipocitákban szignifikánsan magasabb a fragmentált mitokondrium frakciója a TG2^{+/+} kontrollokhoz képest. A jelenség mögött fontos molekuláris faktort tudtunk kimutatni, mivel szignifikánsan magasabb MFF expressziót detektáltunk TG2^{-/-} beige adipocitákban. Az MFF egy külső mitokondriális membránfehérje, amely komplexet képez a DRP1 GTPázsal, és elősegíti a mitokondriális fragmentációt. Ismeretes, hogy a mitokondriális fragmentáció a depolarizációval, a szignifikánsan csökkent légzési kapacitással és az ATP termelés csökkenésével járhat. Érdekes módon megváltozott mitokondriális morfológiát és funkcionalitást is kimutattak a több fragmentált és depolarizált mitokondriumot tartalmazó TG2^{-/-} MEF-ekben.

Annak érdekében, hogy többet tudjunk meg a kapott eredmények lehetséges magyarázatairól, RNS-seq méréseket végeztünk TG2^{+/+} és TG2^{-/-} beige sejtek teljes génexpressziós profiljának összehasonlítására. Hasonló vizsgálatokat korábban végeztek már MEF sejtekben, amelyek kimutatták, hogy a legtöbb differenciálisan expresszálandó gén a citoszeleonnal, az aktin szabályozással és az extracelluláris mátrix szabályozásával kapcsolatos klaszterekben volt jelentős. A mi vizsgálataink során a pajzsmirigyhormon által szabályozott útvonalak lehetséges eltéréseit találtuk, és a TG2^{-/-} beige sejtekben a DIO3 fel-regulációját azonosítottuk, ami inaktiválni tudja a differenciálódási médiumhoz adott T3-at. Megállapítottuk, hogy a DIO3 magasabb expressziójával párhuzamosan a szabad bioaktív fT3 koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige sejtek differenciációs tápközegeiben a TG2^{+/+} kontrollokhoz képest. A T3 döntő szerepet játszik a barnulási folyamat aktiválásában és a beige zsírsejtek differenciálódásában, erre való tekintettel a differenciálódási tápfolyadék standard komponense. Fontos hangsúlyozni, hogy a tápfolyadékhoz nem adtunk T4-et amelyből egyébként a DIO3 képes lenne T3-at előállítani. A magasabb DIO3 expresszió és az alacsonyabb fT3 koncentráció összefüggése felveti annak lehetőségét, hogy ez az enzim hozzájárulhat a TG2^{-/-} beige genotípus alacsonyabb mitokondriális funkcióihoz.

Ezen kívül 3 le-regulált mitokondriális SLC transzportert is azonosítottunk. A legfontosabb az Slc25a45, amely acilkarnitint, ATP-t és aminosavakat szállít a belső mitokondriális membránon keresztül a mitokondriális mátrixba, ahol fontos szerepet játszanak az energiatermelő folyamatokban. Az Slc25a45 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige sejtekben, ami valószínűleg alapvető jelentőségű lehet ezen sejtek hipometabolikus fenotípusának kialakulásában. Fontos hangsúlyozni, hogy az SLC25A45

expresszióját a T3 aktiválhatja, mivel génjének promoter régiójában feltételezett tiroid válaszelemet találtak, azaz a DIO3 által közvetített T3 inaktiváció hozzájárulhat az általunk megfigyelt leregulációjához. Az Slc25a45 egyik fontos ortológja az Slc25a47, amely szintén alacsonyabb mértékben expresszálódik a TG2^{-/-} beige adipocitákban. Továbbá kimutattuk a CoA és ADP mitokondriumokba történő transzportjáért felelős SLC25A42 alacsonyabb expresszióját is TG2 hiányos sejtekben, ami szintén hozzájárulhat ezek hipometabolikus karakterének kialakításához. Megfigyeléseink jelentőségét tovább növelheti az a tény is, hogy az SLC25A42-t nemrégiben egy barnulási markerként írták le, amely egerekben szükséges a termogenezis folyamatához.

Eredményeinkből kiindulva indokolt feltételeznünk, hogy a TG2 alapvető szerepet játszik mind a termogén kapacitás, mind a beige adipociták fejlődésének kontrollálásában. A TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} sejtek közötti különbségek nem az adrenerg agonistákra adott eltérő válaszokkal indokolhatók, hiszen már léteztek a preadipocitákban is. A TG2 hiánya a preadipocitákban károsodott mitokondriális funkciókat eredményez, melyeket a differenciálódási folyamat során sem tud ellensúlyozni csökkent tiroid érzékenysége révén. Ennek eredménye egy olyan típusú beige sejt megjelenése a gonadális zsírdépóban, melyben a mitokondriumok nem képesek a normális termogenezishez szükséges küszöbérték elérésére. Feltételezésünk szerint ez kulcs szerepet játszhat a TG2^{-/-} egerek általunk kimutatott csökkent hidegtűrő képességének kialakításában. A TG2 szerepének tisztázása a beige adipociták mitokondriális diszfunkciójának kialakulásában potenciális lehetőségeket kínálhat az elhízás és más anyagcserezavarok megelőzésében és kezelésükre irányuló intervenciók kidolgozásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a TG2 termogenezisben betöltött szerepét egér modellben tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a szöveti transzglutamináz hiányos egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek, és alacsonyabb hatékonysággal mobilizálják gonadális zsírsíkjukat hidegkezelés után a TG2^{+/+} alomtársaikhoz képest. Az alacsonyabb GONAT-mobilizációt nagy valószínűséggel a szövet gátolt barnulási folyamata okozta TG2^{-/-} egerekben, amelyeknél alacsonyabb a barnulási markerek, köztük az UCP1 expressziója.

A TG2 α és β -adrenerg jelátviteli útvonalak lehetséges kölcsönhatásában betöltött szerepét adrenerg agonisták injektálásával, indirekt kalorimetriás módszerrel vizsgáltuk. Az α -1 adrenerg agonista, fenilefrin hatására a TG2^{-/-} állatok respirációs hányadosa (RER) szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{+/+} egerek értékeihez képest, amely jelentősen eltérő anyagcsere folyamatokra utal. Eredményeink szerint az adrenerg receptor szignálútvonalon Gha fehérjeként működő TG2 szerepet játszhat a szénhidrátok és a zsírsavak oxidációja közötti egyensúly meghatározásában. Kimutattuk, hogy a fenilefrin vazokonstriktív hatása gyengébben jelentkezik a TG2^{-/-} állatok esetében, amely egyúttal alacsonyabb szintű szöveti nekrozist váltott ki bennük.

A kutatási programunk további célja volt, hogy a gonadális zsírszövetből izolált TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták és beige sejtek összehasonlító vizsgálatával kimutassuk, hogy milyen biokémiai mechanizmusokon keresztül vesz részt a TG2 a mitokondriumok működésében és ezáltal a termogenezis fokozásában. Igazoltuk, hogy a gonadális zsírszövetből izolált preadipociták beige irányú differenciálódása mindkét genotípus esetén sikeres volt. Megállapítottuk, hogy az UCP1 és egyes mitokondriális fehérje komplexek alegységeinek expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige sejtekben a TG2^{+/+} sejtekhez képest, ami arra utal, hogy a mitokondriális elektrontranszport funkciója a TG2^{-/-} preadipocitákban, és ebből adódóan a differenciált beige sejtekben is több ponton hibás. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a TG2 hiánya kisebb mitokondriális membránpotenciálhoz, és alacsonyabb ATP és NADH-tartalomhoz vezet, párhuzamosan a csökkentett oxigénfogyasztással a TG2^{+/+} kontroll sejtekhez képest. Emellett a ROS termelés is alacsonyabb volt a TG2^{-/-} sejtekben, ami szintén a mitokondriumaik alacsonyabb aktivitására utal. A sejtek energetikai fenotípus elemzésének vizsgálatával kimutattuk, hogy a TG2^{+/+} preadipocitákat és beige sejteket kifejezetten glikolitikus és oxidatív anyagcsere jellemzi, amit a TG2^{-/-} sejtekhez viszonyított magas extracelluláris savanyodás és oxigénfogyasztási ráta

jелез, és ezért „energetikus” sejtként definiáltuk őket. Ezzel szemben eredményeink határozottan arra utalnak, hogy TG2 hiányában a sejtek hipometabolikusak.

A mitokondriális hasadási és fúziós fehérjék immuncitokémiai és fehérje szintű vizsgálati eredményeink alapján leírtuk, hogy a tubuláris mitokondriális morfológia jellemzőbb mindkét sejtípus esetén; azonban a TG2^{-/-} beige adipocitákban a fragmentált mitokondriumok frakciói lényegesen magasabbak a TG2^{+/+} sejtekhez képest. Megállapítottuk azt is, hogy a mitokondriális biogenezist szabályozó, jól ismert koaktivátor PGC1 α és ezzel együtt a foszforilált AMP-aktivált protein-kináz fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} beige sejtekben. A preadipociták és differenciáltatott beige sejtek összehasonlító globális transzkriptóm vizsgálatával potenciális géneket azonosítottunk a TG2 hiány okozta mitokondriális különbségek magyarázatára. Igazoltuk, hogy a DIO3 fehérje meghatározó szerepet játszhat a TG2^{-/-} sejtek csökkent mitokondriális működésében. Ezen túlmenően leírtuk, hogy TG2 hiányában a zsírsavak, aminosavak és a koenzim A transzportja a mitokondrium mátrixba alacsonyabb hatékonyságú, ami hozzájárulhat a mitokondriumok alacsonyabb energiatermeléséhez. Eredményeink alapján a TG2 alapvető szerepet játszik a gonadális eredetű beige sejtek működésében és a termogenezis folyamatában. Munkánk jelentőségét tovább növeli, hogy eddig még nem végeztek hasonló szisztematikus vizsgálatokat TG2^{-/-} sejtípusokon. Az általunk bemutatott adatok a TG2-vel kapcsolatos szabályozási folyamatokkal egészítették ki az elhízás és a kapcsolódó anyagcsere-rendellenességek lehetséges célpontjainak listáját.

7. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/512/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fedor-Lénárt Kinga

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lénárt, K.**, Pap, A., Pórszász, R., Oláh, A., Fésüs, L., Mádi, A.: Transglutaminase 2 Has Metabolic and Vascular Regulatory Functions Revealed by In Vivo Activation of Alpha1-Adrenergic Receptor.
Int. J. Mol. Sci. 21 (11), 1-18, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21113865>
IF: 5.923
2. Mádi, A., Cuaranta-Monroy, I., **Lénárt, K.**, Pap, A., Mezei, Z. A., Kristóf, E., Oláh, A., Vámosi, G., Bacsó, Z., Bai, P., Fésüs, L.: Browning deficiency and low mobilization of fatty acids in gonadal white adipose tissue leads to decreased cold-tolerance of transglutaminase 2 knock-out mice.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1862 (12), 1575-1586, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.014>
IF: 4.966





További közlemények

3. Sebestyén, F., Póliska, S., Rácz, R., Bereczki, J., **Lénárt, K.**, Barta, Z., Lendvai, Á. Z., Tökölly, J.:
Insulin/IGF Signaling and Life History Traits in Response to Food Availability and Perceived
Density in the Cnidarian *Hydra vulgaris*.
Zool. Sci. 34 (4), 318-325, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2108/zs160171>
IF: 0.906
4. Tökölly, J., Bradács, F., Hóka, N., Kozma, N., Máté, M., Mucza, O., **Lénárt, K.**, Ősz, Z.,
Sebestyén, F., Barta, Z.: Effects of food availability on asexual reproduction and stress
tolerance along the fast-slow life history continuum in freshwater hydra (Cnidaria: Hydrozoa).
Hydrobiologia. 766 (1), 121-133, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-015-2449-0>
IF: 2.051

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,846

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,889**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2021.11.26.

