

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Fedor-Lénárt Kinga

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

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	4
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. A zsírszövet funkciói.....	10
3.2. A zsírszövetek lokalizációja.....	11
3.3. A zsírsejtek típusai: fehér, bama, beige és pink adipociták	14
3.4. A fehér versus termogén adipocita típusok kialakulása.....	16
3.5. A beige zsírsejtek aktivációját kiváltó faktorkok, és a hőtermelés indukálása	18
3.6. Az anyagcsere szervezetszintű vizsgálata indirekt kalorimetriával.....	19
3.7. A szöveti transzglutamináz biológiai funkciói.....	20
3.8. Szöveti transzglutamináz hiányos egérmodellek	21
3.9. A szöveti transzglutamináz G fehérje funkciója.....	22
3.10. A szöveti transzglutamináz szerepe a mitokondriumok működésében.....	22
3.11. A mitokondriumok dinamikája.....	23
3.12. A mitokondriumok minőségellenőrzése.....	25
4. Célkitűzés.....	27
5. Anyagok és módszerek.....	28
5.1. Kísérleti állatok.....	28
5.1.1. Akut hidegkezelés.....	28
5.1.2. Fenilefrin és CL-316,243 kezelés.....	28
5.2. Indirekt kalorimetria.....	28
5.3. Az artériás vényomás mérése.....	29
5.4. A vér metabolikus paramétereinek meghatározása	29
5.5. Laktát dehidrogenáz és a kreatin-kináz B kimutatása	30
5.6. Az Uncoupling protein 1 hisztokémiai kimutatása	30
5.7. Preadipocita izolálás és beige irányú differenciáltatás	31
5.8. <i>In vitro</i> sejtproliferációs vizsgálat: Szulforodamin B teszt.....	31
5.9. mRNS izolálás és reverz transzkripció.....	32
5.10. Valós idejű kvantitatív RT-qPCR.....	32
5.11. Western blot.....	33
5.12. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata lézerpásztázó citometriával	35

5.13. Oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérése	35
5.14. NADH dehidrogenáz aktivitás mérése	36
5.15. A sejtek ATP és NADH szintjeinek meghatározása.....	36
5.16. Reaktív oxigén szabadgyökök detektálása	36
5.17. Elektron mikroszkópia.....	37
5.18. Immuncitokémia.....	37
5.19. Aminosavak mérése a sejtek felülúszóiból.....	40
5.20. Teljes RNS szekvenálás.....	40
5.21. Szabad trijód-tironin meghatározása.....	41
5.22. Statisztikai analízis	41
6. Eredmények.....	42
6.1. A transzglutamináz hiányos egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek és hidegkezelés során alacsonyabb hatékonysággal mobilizálják gonadális zsírszövetet.....	42
6.2. A TG2 ^{-/-} egerek gonadális zsírszöveve kevésbé barnul be hidegkezelés hatására.....	43
6.3. A TG2 ^{+/+} és a TG2 ^{-/-} egerek táplálékfogyasztása nem különbözött.....	45
6.4. Fenilefrin kezelés hatására lecsökkent a TG2 ^{-/-} állatok fizikai aktivitása és hőtermelése	47
6.5. Fenilefrin kezelést követően a TG2 ^{-/-} egerek respirációs hányadosa szignifikánsan alacsonyabb a TG2 ^{+/+} állatokhoz képest.....	49
6.6. Az $\alpha 1$ adrenerg agonista kezelés alacsonyabb laktát szintet eredményez a TG2 ^{-/-} egerek vérében.....	53
6.7. A fenilefrin kezelés nem csökkentette a TG2 ^{-/-} egerek farki vérnyomását	55
6.8. Az $\alpha 1$ -adrenerg agonista kisebb mértékű szövetkárosodást okoz a TG2 ^{-/-} egerekben	57
6.9. A TG2 ^{-/-} gonadális zsírszövetből izolált preadipociták beige irányú differenciációja hasonló volt a TG2 ^{+/+} sejtekéhez.....	59
6.10. A mitokondriális fehérje komplexek és az UCP1 expressziója, valamint a mitokondriális dehidrogenázaktivitás, a NADH és ATP tartalom szignifikánsan alacsonyabb a TG2 ^{-/-} adipocitákban.....	63
6.11. A mitokondriális membránpotenciál szignifikánsan alacsonyabb a TG2 ^{-/-} preadipocitákban és beige zsírsejtekben	65
6.12. A TG2 ^{-/-} preadipociták és beige zsírsejtek hipometabolikusak a TG2 ^{+/+} sejtekhez képest.....	68
6.13. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint TG2 ^{+/+} és TG2 ^{-/-} preadipociták mitokondriumainak száma és morfológiája nem különbözik	70
6.14. A TG2 ^{-/-} beige adipociták szignifikánsan több fragmentált mitokondriummal rendelkeznek, mint a TG2 ^{+/+} sejtek	72

6.15. A mitokondriális hasadási és fúziós fehérjék vizsgálata megerősíti, hogy TG2 hiányában a sejtek szignifikánsan több fragmentált mitokondriumot tartalmaznak.....	75
6.16. A TG2 ^{-/-} és TG2 ^{+/+} preadipociták és beige sejtek aminosav termelése és fogyasztása	77
6.17. A tiroid hormont bontó DIO3 expressziója magasabb a TG2 ^{-/-} sejtekben	80
6.18. TG2 hiányában csökken a zsírsavak, aminosavak és a koenzim A transzportja a mitokondrium mátrixába	83
7. Megbeszélés.....	86
8. Összefoglalás.....	98
9. Summary.....	100
10. Az értekezés új megállapításai.....	102
11. Irodalomjegyzék.....	103
11. Tárgyszavak.....	125
12. Keywords.....	125
13. Köszönetnyilvánítás	126
14. Publikációs lista.....	128
.....	129
15. Függelék.....	130

1.Rövidítések

AC	adenilát-cikláz
ACC	acetyl-CoA-karboxiláz
AMPK	adenozin-monofoszfát aktivált protein kináz
AR	adrenoreceptor
BAT	barna zsírszövet
BNIP3	BCL2 interakciós fehérje 3
BP	vérnyomás
C	koleszterol
CK-MB	kreatin-kináz
CL	CL-316,243
CLAMS	indirekt kalorimetriás monitorozó rendszer
CPT1	karnitin-palmitoil-transzferáz 1
CXCL1	C-X-C motívum kemokin ligandum 1
DIO3	jódtironin-dejodináz 3
DMSO	dimetilszulfoxid
DRP1	dinaminnal kapcsolatos fehérje 1
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
ETC	elektrontranszport lánc
FC	fold change
FFA	szabad zsírsav
fT3	T3 szabad frakció
GONAT	gonadális zsírszövet
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
GTP	guanozin-trifoszfát
HCS	high-content screening
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein
HR	pulzus
HSL	hormon szenzitív lipáz
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin
III-UQCRC2	ubikinol-citokróm C reduktáz 2. alegység

II-SDHB	szukcinát-dehidrogenáz vas-kén alegység
KO	mutáns fenotípus
LDH	laktát-dehidrogenáz
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
log2FC	fold change érték kettes alapú logarimusa
MFF	mitokondriális hasadási faktor
MEF	egér embrionális fibroblaszt
MFN2	mitofuzin 2
OCR	oxigénfogyasztási ráta
OPA1	otikai atrófia 1, mitokondriális dinamin
pAMPK	foszforilált adenzin-monofoszfát aktivált protein kináz
PDI	fehérje-diszulfid-izomeráz
PGC1 α ,	peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor- γ koaktivátor 1 α
PLC_1	foszfolipáz C
PREF1	preadiocita faktor1
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RER	respirációs kvóciens
ROD	relatív optikai denzitás
ROS	reaktív oxigénszármazékok
rT3	reverz trijód-tironin
SCAT	szubkután zsírszövet
SLC	oldott molekulát hordozó
SRB	szulforodamin B
T2	dijód-tironin
T3	trijód-tironin
T4	tiroxin
TBP	farki vérnyomás
TBX1	T-boksz transzkripció faktor
TCA	triklór-ecetsav
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
TG	triglicerid
TG2	szöveti transzglutamináz

TG2 ^{-/-}	homozigóta recesszív (mutáns genotípus)
TG2 ^{+/+}	homozigóta domináns (vad genotípus)
THRA	tiroid hormon receptor alfa
TMEM26	transzmembrán fehérje 26
TNFRSF9	TNF receptor szupercsalád tag 9
TOM20	külső mitokondriális membrán transzlokáz
TRPV1	transiens receptor potenciális kationcsatorna V. alcsalád 1
UCP1	mitokondriális szétkapcsoló fehérje
V-ATPSA	ATP szintáz, alfa alegység
VCO ₂	szén-dioxid termelés
VO ₂	oxigén fogyasztás
WAT	fehér zsírszövet
WT	vad típusú
XTOT	teljes fizikai aktivitás a ketrec 'X' tengelysíkján mérve

2. Bevezetés

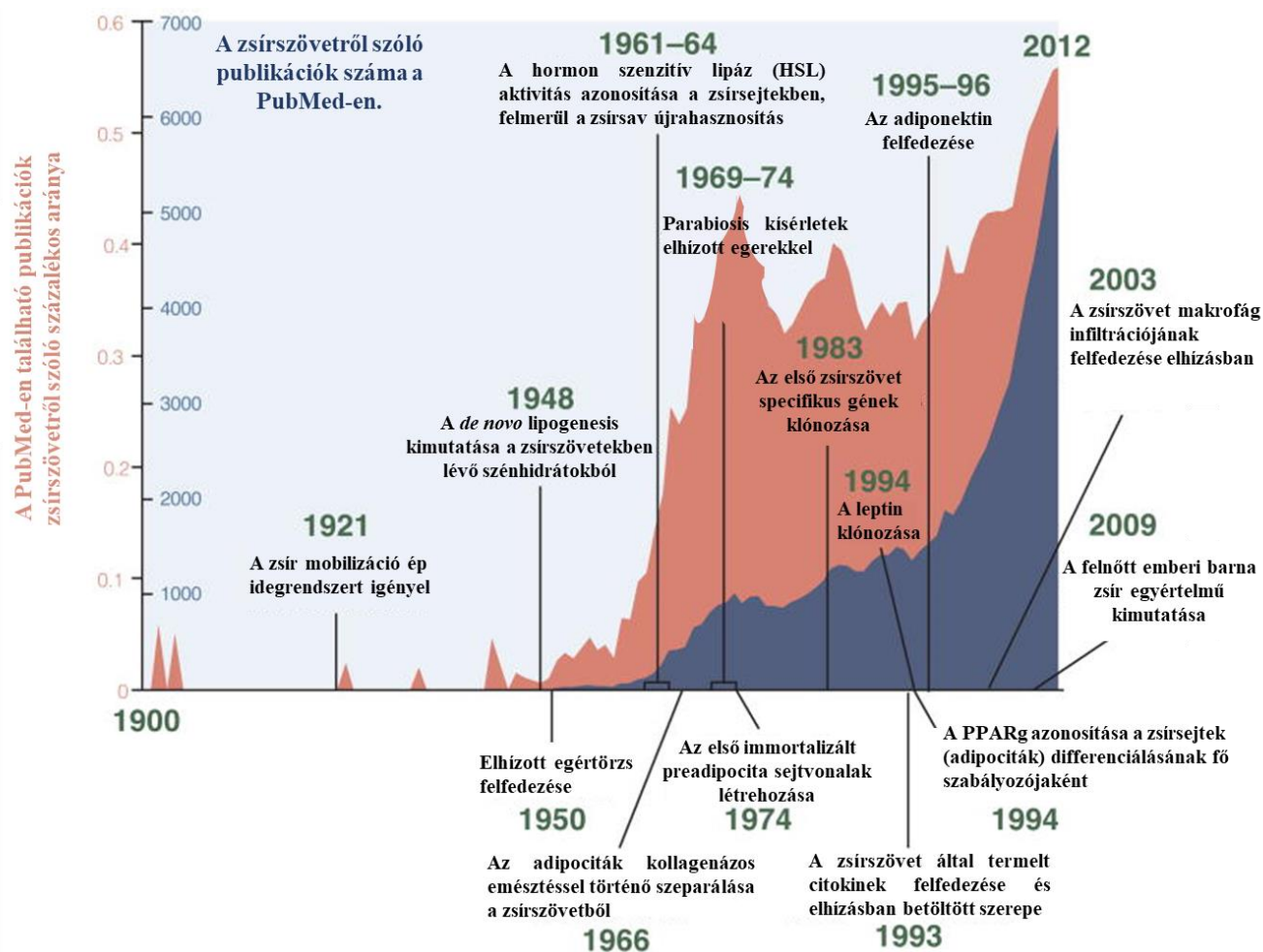
Az emberi test figyelemre méltóan képes idomulni a belső és külső változásokhoz, mint például a táplálkozási állapothoz, a környezeti hőmérséklet ingadozásához, a fertőzések bekövetkeztéhez, a cirkadián ritmus felborításához és az öregedés folyamatához. Ezek az adaptációs folyamatok megkövetelik a metabolizmus 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 [1]. 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, ateroszklerózis és magas vérnyomás. A barna zsírszövet egy termogén szerv, amely aktiválása ígéretes stratégia lehet az energiafelhasználás hőtermelésen keresztül történő növelésére. A barna zsírszövet különleges funkciójaért az UCPI fehérje felelős, amelyet szétkapcsoló fehérjének neveznek, hiszen működésének hatására proton visszaáramlás történik a mitokondrium mátrixába a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció szétkapcsolásával. Ennek következtében a lebomló zsírokból nem keletkezik energiát raktározó ATP, hanem energiatartalmuk hő formájában szabadul fel. Az obezitás és az ahhoz társuló 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 befolyásolva 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 (TG2). 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.

3. Irodalmi áttekintés

A zsírszövet egy rendkívül összetett szerv, mely jelentős hatással van fiziológias és patofiziológias folyamatokra. Az 1940-es évek végéig a zsírszövetet csupán a kötőszövet egyik formájaként jellemezték, amely sejtjei lipidcseppeket tartalmaznak. A szervezet anyagcseréjéhez fűződő kapcsolatát csak évekkel később írták le, amikor felfedezték, hogy a zsírszövet fontos szerepet játszik a tápanyagok homeosztázisában: táplálkozást követően a kalóriatárolás helyszíne, valamint éhezés során a keringésbe jutó szabad zsírsavak forrása. Az 1980-as évek végétől az 1990-es évek közepéig fedezték fel a zsírszövet eredetű szérumszintező faktorokat: az adipont [2], a TNF- α -t [3] és a leptint [4]. Ettől kezdve az energia homeosztázis középpontjában álló zsírszövetet endokrin szervnek tekintik, ami lendületbe hozta a zsírszövet fejlődési, működési és kórélettani szempontok szerinti szisztematikus vizsgálatát (1. ábra).

A tudományos érdeklődés azonban akkor lendült fel igazán a zsírsejtek irányában, amikor egyre szélesebb körben kezdtek el foglalkozni a világméretűen elterjedt elhízás problémájával, mely számos életminőséget romboló járulékos betegség gyakoriságának növekedéséért tehető felelőssé, mint például a cukorbetegség, az ateroszklerózis és a magas vérnyomás. Eljött ugyanis a történelemben elsőként az a fordulópont, amikor az alultápláltságon túl már a túltápláltság is globális problémává vált; napjainkra mintegy 1,9 milliárd embert tartanak elhízottként számon [5].



1. ábra: A zsírsejt biológiája iránti érdeklődés növekedése 1900 és 2012 között

A zsírbiológiai kutatás fontos eseményeit a megjelenés dátuma jelzi. Az ábra Evan D. Rosen és Bruce M. Spiegelman közleménye alapján készült [6].

3.1. A zsírszövet funkciói

Minden eukarióta élőlény, az élesztőgombától egészen az emberig, képes kalóriát tárolni lipid cseppek formájában, azonban csak a gerincesek rendelkeznek erre specializált sejtekkel, amelyeket zsírsejteknek vagy adipocitáknak nevezünk [7]. Ez idáig tisztázatlan, hogy vajon az alacsonyabb rendű szervezetek zsírtároló sejtjei, mint például a *Drosophila melanogaster* lárvá zsírteste vagy a *Caenorhabditis elegans* lipideket tároló bélsejtjei olyan szerkezetekre utalnak-e, melyek valóban homológok a gerincesek zsírsejtjeivel, vagy egyszerűen csak a konvergens evolúció eredményei, és főként toxikus zsírmolekulákat tárolnak. Molekuláris szinten azonban

találtak hasonló feladatokat végrehajtó ortológ, zsírtárolásért felelős géneket a férgekben, legyekben és emlősökben [8].

A túlzott testzsír kozmetikai és pszichológiai terhe miatt, nem is beszélve az anyagcserével kapcsolatos megbetegedésekről, elhízás esetén az adipociták talán az egyik legzavaróbb, nem-rosszindulatú sejtípusok a testben. Tekintettel erre, nem volt nehéz figyelmen kívül hagyni az egészséges zsírszövet számos előnyét. Vitathatatlanul minden élőlény legfontosabb biológiai feladata az energia homeosztázis fenntartása és a reprodukció, a zsírszövet pedig elválaszthatatlanul fonódik össze mindkettővel. Az adipozitás és a reprodukció kapcsolata meglehetősen összetett: a zsírszövet tápanyagokat és hormonális jeleket biztosít, amelyek mind a férfiaknál, mind a nőknél szabályozzák a hipotalamusz-hipofízis-nemi mirigy tengelyét és fordítva, a szaporodás blokkolása sok fajban növeli az adipozitást [9]. Ezen túlmenően, a zsírszövetnek fontos mechanikai tulajdonságai is vannak. Védi az érzékeny szerveket, valamint puhává teszi a nagyfokú igénybevételnek kitett testrészeket. Fontos szerepet játszik a vízi emlősök áramvonalassá tételében és a test hőszigetelését is biztosítja. A szubkután (bőr alatti) és viscerális (zsigeri) zsírdepók hasonló eloszlást mutatnak a sarkvidéki és trópusi emlősökben [10]. Számos szerepe mellett azonban messzemenőig a zsírszövetek legfontosabb funkciója az, hogy fő szabályozója a szervezet energia egyensúlyának és a táplálkozási homeosztázisnak. Kiemelendő tehát, hogy az intenzív kutatások eredményeként az elmúlt néhány évben jelentősen megváltozott a szemléletmódunk, különösen a zsírsejtek osztályozásában és abban, ahogyan látjuk a zsírszövetek kialakulását.

3.2. A zsírszövetek lokalizációja

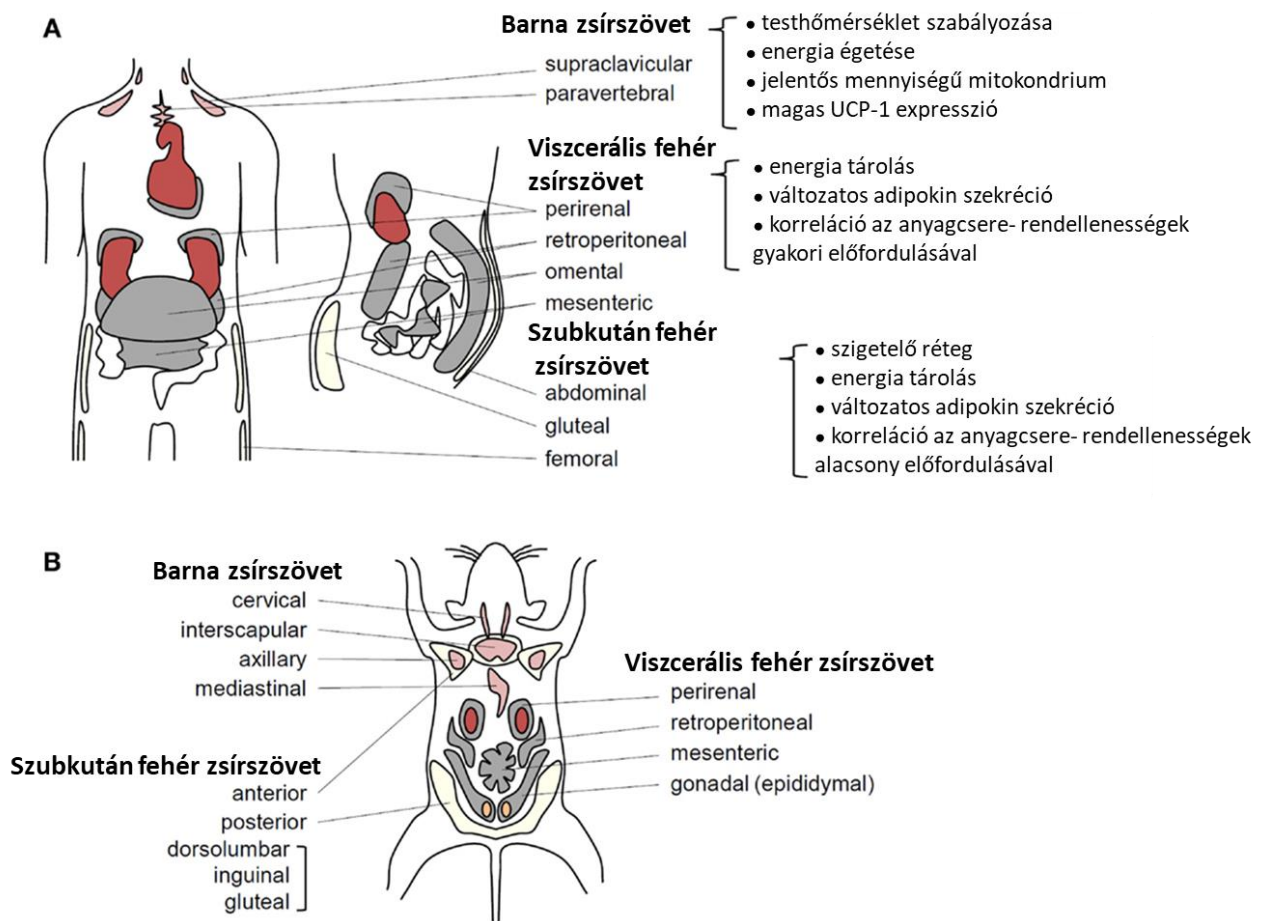
A zsírszövetek felhalmozódása tekintetében több specifikus zsírdepót definiálunk a szervezetben. A legelterjedtebb osztályozási séma megkülönbözteti a szubkután és a viscerális (zsigeri) zsírt, nagyrészt azért, mert az utóbbi már feltárt kapcsolatban áll ismert anyagcsere-betegséggel. Míg az előbbi bizonyos esetekben nem korrelál [11], addig más tanulmányok szerint akár fordítva is korrelálhat az egyes betegségek kockázatával [12,13]. Valójában a zsigeri *versus* szubkután séma túlságosan leegyszerűsített, mivel úgy tűnik, hogy egyértelmű különbségek vannak a névlegesen viscerális depók között is, mint például a perigonadális, a mesenterikus és a retroperitoneális zsírpárnák között. A gonadális zsírszövet az egyik legnagyobb zsírraktár a rágsálókban, mely a hímek heréi (epididimális) és a nőstények petefészkei körül (periovárium) található. A gonadális zsírszövetről kimutatták, hogy a

szubkután zsírhoz képest többet expresszál Ppar γ -ból és Srebp1c-ből, valamint egy másik kulcsfontosságú adipogén transzkripció faktorból, a CCAAT enhanszer-kötő fehérje alfa-ból (C/EBP-alfa) [14].

Jelentős regionális különbségeket ismerünk a zsírsejtek funkcióinak olyan aspektusaiban, mint az adipokin szekréció, a lipolízis és a triglicerid szintézis sebessége [15]. Két hipotézist is javasoltak ennek a jelenségnek a magyarázatára: egyrészt a különböző zsírraktáraknak egyedi beidegződésük van, valamint sajátos kapcsolataik a keringéssel. Például a zsigeri zsír vénás elvezetése a portális keringésbe jut, így a máj a zsíryanagcsere melléktermékeiben és az adipokinekben dúskál. A másik lehetséges magyarázat szerint a depó-specifikus különbségeket autonóm mechanizmusok váltják ki az adipociták fiziológiájában. Ezek az elképzelések természetesen nem zárják ki egymást, de további bizonyítékokat tártak fel a sejtek autonóm különbségeinek alátámasztására. A preadipociták például expresszálják a származási depójukra specifikus géneket, és azonos körülmények között továbbra is jellegzetesen viselkednek az izolálás és passzálás után [15,16]. Ezt transzplantációs vizsgálatokkal közvetlen tesztnek vetették alá; a zsigeri zsír szubkután helyzetbe helyezése nagyon csekély hatást fejt ki, azonban a bőr alatti zsír transzplantációja a zsigeri rekeszbe csökkenti az adipozitást és javítja a glükóz homeosztázist [17]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy belső különbségek vannak a zsírdepók között.

A rágszálók zsírraktárai nem egyeznek meg teljesen a humán zsírraktárakkal, azonban jelentős topológiai hasonlóságokat mutatnak, amelyek révén anatómiailag egymásnak megfeleltethetők (2. ábra). Az egerek és az emberek is rendelkeznek barna zsírsejtek interszkapuláris vagy nyaki depóival. Míg bizonyos irodalmi adatok alapján a gonadális zsírszövet raktárak csak a felnőtt rágszálókra jellemzők [18], addig más publikációban beszámolnak arról, hogy a gonadális zsírszövet nőknél a méhhez és petefészkekhez, férfiaknál a mellékheréhez és a heréhez kapcsolódik [19], mely alapján arra következtethetünk, hogy emberekben is jelen van ez a zsírdepó. Szakirodalmi adatok arra utalnak, hogy az egerek gonadális zsírszöve, a humán vizszerális zsírszövetnek feleltethető meg, míg az egerek inguinális fehér zsírszöve az emberben a szubkután zsírhoz hasonlítható [20]. Génexpressziós profilozási vizsgálat feltárta, hogy az egerek interszkapuláris barna zsírszövetének molekuláris jellemzői egyedülállóak, míg az egerek bebarult elülső szubkután és gonadális zsírszövet-raktárai jobban hasonlítanak az emberek szupraklavikuláris BAT-depójához [18]. Az emberi zsírszövet szövettani és elektronmikroszkópos jellemzői megegyeznek az egér eredetű megfelelőikkel [21,22]. Irodalmi

adatok alapján megállapítható az is, hogy az egerekből nyert információk jelentős részben vonatkoztathatók az adott humán zsírdepóra [23].



2. ábra: A zsírszövetek anatómiai elhelyezkedése egerekben és emberekben

Az ábra Choe, S. S. és munkatársai publikációja alapján készült [24].

A zsírszövet kialakulásának időzítése fajonként eltér. A rágcsálóknál a fehér zsírszövet nagyrészt a születés után jelenik meg, bár érzékeny módszerek segítségével már a 16–17. embrionális napon láthatók a szubkután régióban a zsírspecifikus markerek kifejeződése, és egy nappal azután lipiddel töltött szubdermális adipociták is kimutathatók [25,26]. A zsigeri zsír később fejlődik ki, és a posztnatális 7. napra válik láthatóvá. Érdekes módon azonban elkötelezett prekursor sejtek még a születés utáni epididimális zsírban sem mutathatók ki a posztnatális 4. napon [27]. Embereknél azonban nyilvánvaló fehér zsírfejlődés tapasztalható a terhesség 14. hetére, bár a pontos időzítés bizonyos mértékben függhet a magzat méretétől

[28,29]. A humán szervezetben az adipociták nagyjából 8%-a újul meg évente, míg ez szám egerekben 0,6% egyetlen nap alatt [30,31].

3.3. A zsírsejtek 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 sejtípusokat tartalmazó fehér zsírszövet, amely raktározott energiája éhezés vagy stressz hatására mobilizálódva ATP termelésre fordítódik; és a sokkal kisebb tömegű barna zsírszövet, mely alacsonyabb szintű raktározás mellett, egyedülálló módon képes zsírtartalmát hőtermelésre fordítani a nem didergéses termogenezisnek nevezett folyamat során [6]. A sejtek barna színe a citokróm C nagy mennyiségének köszönhető ebben a mitokondriumokban igen gazdag szövetben. Hőtermelésük kiváltója az, hogy a barna zsírszövet sejtjei 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 energiataartalmuk hő formájában szabadul fel [32]. A hőtermelő képességért a mitokondrium belső membránjában található szétkapcsoló protein 1 (UCP-1) felelős. Rágcsálókban írták le először a zsírsejtek harmadik típusát is, mely fehér zsírszövetben jelenik meg hideg környezetre vagy adrenerg kezelésre adott adaptív válaszként, biztosítva a szervezet termotoleranciáját [33-38]. Ezek a színük után úgynevezett „beige” vagy „brite” sejtek, bifunkcionális fenotípust képviselnek, hiszen tulajdonságaikban hasonlítanak a barna zsírsejtekre, és zsírraktáraikat szintén hőtermelésre fordítják, de mégsem egyeznek meg velük teljesen [39,40]. A „klasszikus barna” adipocitákkal ellentétben az érett, stimulálatlan beige zsírsejtek alacsonyabb szinten fejezik ki a hőtermeléshez szükséges géneket. Ha a termogenikus jel megszűnik, fehér-szerű, úgynevezett „masked beige” zsírsejtek 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 fiziológias körülmények változásának következtében. Mind a barna, mind a beige sejtek a mitokondriális és termogenikus gének hasonló alapprogramját fejezik ki [39]. A csecsemők interszkapuláris barna zsírszövege nagymértékben hasonlít a rágcsálók klasszikus barna zsírára [41]. Összehasonlítva a valódi klonális barna és beige adipocitákat, úgy tűnik, hogy a beige sejtekhez képest a klasszikus barna zsírsejteknek magasabb alap UCP-

1 expressziója és emelkedett szétkapcsolt légzése van hormonális stimuláció előtt. A beige adipocitáknak másfelől van egy alap UCP-1 expressziója és szétkapcsolt légzése, mellyel a fehér zsírsejtek nem rendelkeznek. Azonban hidegkezeléssel vagy β -adrenerg agonistával való stimuláció megemeli az UCP-1 kifejeződését a beige adipocitákban egy olyan szintre, ami a barna zsírsejtekben is látható. Ezek alapján a beige sejtek két funkcióra programozottak egyedien: termogenikus ingerek hiányában képesek energiaraktározásra, viszont teljes mértékben képesek a hőtermelés beindítására, amikor erre megfelelő jeleket kapnak [39]. Érdekes módon, egér modellekben a klasszikus barna zsír elvesztése a beige zsír kompenzációs indukcióját váltja ki, ilyen módon is biztosítva a fizioiógias testhőmérsékletet és a diéta okozta elhízással szembeni rezisztenciát, ami funkciójukat tekintve barna és a beige adipociták jelentős átfedésére utal [42].

Az elmúlt évek intenzív kutatásai az adipociták egy további, negyedik típusát is azonosították; az úgynevezett pink zsírsejteket [43,44]. A pink adipociták tejszékreciós 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-myoeitheliális sejtkonverzió hipotézisét [44], ami ismételten bizonyítja a zsírszövetre jellemző rendkívüli és intenzív plaszticitást (3.ábra).

	fehér	barna	beige	pink
Fenotípus				
Funkció	- energia raktározás - szigetelés és védelem - endokrin funkciók: éhségérzet és jóllakottság szabályozása, energia és glükóz homeosztázis	- nem-didergésses termogenezis az UCP-1 fehérjén keresztül	- krónikus hidegkezelés által indukált - bifunkcionális: energiatárolás és hőtermelés az UCP-1-en keresztül	- fehér zsírsejtek transzdifferentiálódásából származhatnak terhesség és szoptatás alatt - tej szekréció a laktációs időszak alatt

3. ábra: Az adipociták színei - fehér, barna, beige és pink

A zsírsejtek tipikus fenotípusos megjelenése és funkciói. Az ábra Julia Zinngrebe és munkatársai közleménye alapján készült [45].

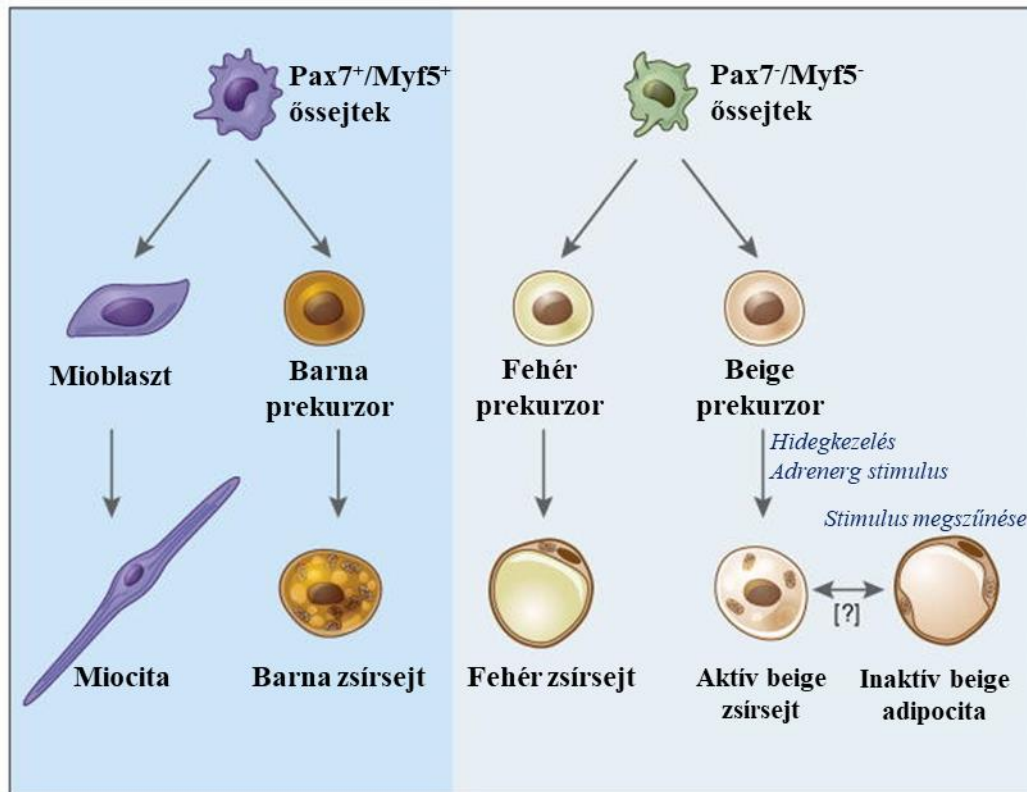
Evolúciós szempontból pontosítva, a barna zsírsejtek az eutheria (méhlepényes) emlősökben fordulnak elő; minden más gerinces, beleértve az erszényes és kloákás emlősöket is, csak fehér zsírszövettel rendelkezik [46]. Érdekes módon, a protoendotermikus emlősök, melyek testhőmérséklete követi környezetük hőmérsékletét, szintén rendelkeznek barna zsírszövettel, mely lehetővé teszi számukra, hogy szelektíven fenntartsák az endotermiát, miközben vemhesek vagy utódaikról gondoskodnak [47]. Emberben felnőtt korra lecsökken a barna zsír tömege, viszont az újszülöttek még jelentős barna zsírszövet raktárakkal rendelkeznek. Ez addig biztosítja megfelelő testhőmérsékletüket, amíg hőszabályozási képességük teljesen ki nem alakul.

3.4. A fehér versus termogén adipocita típusok kialakulása

Mind a 'Myogenic factor 5' (Myf5) -pozitív mind Myf5-negatív eredet különböző mértékben járul hozzá a zsírsejtek prekursor sejtkecszetéhez az egyes depókban; úgy tűnik, hogy az anterior szubkután zsírszövetben és retroperitoneális zsírszövetben (és a BAT-ban is) a Myf5-pozitív származási prekursorok előnyösen adipocitákká válnak, míg az inguinális zsírszövetben, a gonadális zsírszövetben és a mezenterialis zsírszövetben, a Myf5-negatív eredetű prekursorai szelektíven differentiálódnak [48]. A barna és beige zsírsejtek fejlődését

tanulmányozó átfogó vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a beige adipociták nem ugyanazokból a 'Paired box 7' (Pax7) és 'Myogenic factor 5' (Myf5) fehérjéket kifejező miogén eredetű őssejtekből származnak, amelyek klasszikus barna zsírszövetet eredményeznek [49] (4. ábra). A beige zsírsejtek biogenezisét, amelyet beige adipogenezisnek is neveznek, a külső hatások, például hideg, adrenerg stimuláció, vagy hosszú távú 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma' (Ppar γ) magreceptor agonistákkal végzett kezelés váltja ki. A beige zsírsejtek eredete sokrétű; a gonadális zsírszövetben keletkezhetnek olyan prekursorokból, amelyek a 'Platelet-derived growth factor receptor alfa' (PDGFR α), CD34-et és a 'Spinocerebellar ataxia type 1' (SCA1) fehérjéket expresszálnak [50-52]. Ezen kívül beige zsírsejtek a lágyéki fehér zsírszövet Myf5-negatív prekursoraiból is keletkezhetnek, azonban ezeknek a zsírsejteknek egy csoportja Myf5-pozitív prekursorokból származnak [52]. A közelmúltban leírták, hogy egyes beige zsírsejtek 'Myosin heavy chain 11' (MYH11) fehérjét tartalmaznak, amely a simaizomsejtek szelektív markere [53]. Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a beige zsírsejtek eredete különbözik a klasszikus barna zsírsejtektől. A beige adipociták másik jellemzője a rendkívüli fenotípusos plaszticitást mutató képesség, valamint kialakulásuk jelentős mértékben indukálható a megfelelő prekursor sejtekből kiindulva. Bizonyítékok vannak arra nézve is, hogy az érett fehér zsírsejtek specifikus faktorok hatására beige adipocitákká változhatnak [54,55]. További vita tárgyát képezi, hogy ez a jelenség vajon valódi transzddifferenciálódást jelent-e, azaz a fehér zsírsejtek közvetlen átalakulását beige zsírsejtekké, vagy ezek olyan beige adipocitáknak felelnek meg, amelyek már korábban is ott találhatók a fehér zsírsejtek között [56]. A barna zsírszövet fejlődésének számos transzkripciós szupresszorát azonosították, köztük van az egy családba tartozó 'Retinoblastoma protein' (pRB) és p107, valamint a 'Receptor-interacting protein 140' (RIP140). A pozitív transzkripciós szabályozók közé tartoznak a 'Forkhead box C2' (FOXO2) és a 'PR domain containing 16' (PRDM16) fehérjék is. A PRDM16 fontos szerepet tölt be a barna zsírsejtek differenciálódásában, hiányában nincs barna irányú sejt differenciálódás. Ez a fehérje képes bekapcsolni a barna zsírszövetre nézve szelektív gének teljes készletét, miközben kikapcsolja több fehér zsírszövet specifikus gén expresszióját [57,58]. A PRDM16 számos fontos adipogénikus transzkripciós faktorról lép kölcsönhatásba, mint például a 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha' (PGC-1 α) és a PGC-1 β is, valamint a PPAR α , PPAR γ és a 'CCAAT enhancer binding protein beta' (C/EBP β). A PRDM16 elindítja a hidegkezelés és β -adrenerg stimulus által kiváltott, cAMP-függő hosszú távú termogenezist, amely során barna irányú sejt differenciálódás mellett a szövetek vaszkularizációja is fokozódik. A folyamat során a PGC-1 α expressziója megemelkedik, és kölcsönhatásba lép az 'Interferon

Regulatory Factor 4' (IRF4) és a PPAR γ fehérjékkel, így mitokondriális biogenezist indukál, és kulcsszerepet játszik a nem didergésses hőtermelés aktiválásában.



4. ábra: Az adipociták különböző prekursor sejtekből differenciálódnak

A fehér és beige adipociták Pax7/Myf5⁻ őssejtekből származnak, különböző prekursor sejteken keresztül. A beige adipociták hideg vagy adrenerg stimuláció hatására aktiválódnak. A hideg és/vagy adrenerg kezelés megszűnése után ezek a sejtek inaktívvá válnak és felveszik a „fehér” adipocita morfológiáját. A klasszikus barna zsírsejtek ezzel szemben Pax7⁺/Myf5⁺ őssejtekből származnak, így fejlődéstanilag ezek az adipociták közelebb állnak a vázizom sejtekhez. Az ábra Evan D. Rosen és Bruce M. Spiegelman közleménye alapján készült [6].

3.5. A beige zsírsejtek aktivációját kiváltó faktorok, és a hőtermelés indukálása

Fiziológiásan a hideg expozíció β 3-adrenerg stimuláció révén indukálja a barnulási folyamatot a fehér zsírszövetben [59,60]. A szimpatikus idegrendszer norepinefrint (NE) választ ki, amely kötődik a sejtfelszíni β 3-receptorhoz, ezt követően az intracelluláris jelátviteli kaszkádok a trigliceridek szabad zsírsavakká (FFA) történő lebomlásához vezetnek [61]. Az FFA aktiválja

az UCP1 -et, amely az ATP szintézisétől szétkapcsolt légzést eredményez [62]. 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 [63]. Ezeken túlmenően a vázizomzat által a testmozgás hatására kibocsátott irizin nevű hormon szintén képes kiváltani a fehér zsírszövet barnulását [64]. 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 [65]. 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.

3.6. 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. Az 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:

$$\text{hőtermelés (kJ/kg)} = 4,186 \times [3,9 \times \text{elfogyasztott O}_2 \text{ (L)} + 1,11 \times \text{termelt CO}_2 \text{ (L)}] \text{ [66].}$$

Az oxigénfogyasztás és a szén-dioxid-termelés méréseivel 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 [67] (1. táblázat). Az indirekt kalorimetria használata értékes eszköz lehet az elhízás kezelésében személyre szabott beavatkozások esetén, nem szabad azonban megfelelkezünk arról, hogy az anyagcsere szabályozásának módja egyénenként nagyon eltérő lehet [68].

A zsírok és szénhidrátok metabolizált százalékos aránya, a respirációs hányados (RER) értékei alapján		
RER	zsír (%)	szénhidrát (%)
0,7	100	0
0,75	83	17
0,8	67	33
0,85	50	50
0,9	33	67
0,95	17	83
1	0	100

1. táblázat: A respirációs hányados (RER) (CO_2 -termelés/ O_2 -felvétel) a szénhidrátokból és a lipidekből történő általános energiafelhasználás relatív hozzájárulásának közvetett meghatározására szolgál. A magas RER érték (1,0) túlnyomórészt szénhidrátok hasznosulását jelzi, míg az alacsony RER érték (0,7) a lipidek oxidációjára utal [67,69].

3.7. 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 egy extracellulárisan és intracellulárisan is kimutatható multifunkcionális fehérje. Bizonyos sejtípusok esetén lokalizálódhat a sejtmagban, a mitokondriumban vagy a plazmamembránban is [70-74]. Fehérje keresztkötő és guanozin-5'-trifoszfát (GTP) hidrolizáló aktivitással is rendelkezik [75,76]. 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

kötéseket hoz létre a glutamin és a lizin oldalláncai között [77,78]. GTP-hez kötött formában azonban a TG2 zárt konformációt vesz fel, és GTPázként működhet, viszont ilyenkor nem rendelkezik keresztkötő aktivitással [79]. Ezenkívül a TG2 fehérje-diszulfid izomeráz [80] és protein-kináz aktivitással is rendelkezhet [81,82]. A TG2 különféle biológiai folyamatokban vesz részt, például a citoszkeleton szabályozásában, a sejtadhézió kialakításában és a sejthalál folyamatában katalitikusan aktív, vagy csak interakciós partnerként [73, 83-86]. Számos tanulmány kapcsolta a TG2 funkcióit különféle típusú betegségekkel [87], például a rákkal [88-90], a 2-es típusú cukorbetegséggel [91], neurodegeneratív rendellenességekkel [92-96] és a lisztérzékenységgel [97].

3.8. Szöveti transzglutamináz hiányos egérmodellek

A TG2 komplex biológiai szerepének vizsgálatára irányuló stratégiák között szerepel a TG2 aktivitását gátolni képes kis molekulák alkalmazása [83,98,99], valamint a TG2 szubsztrátjainak és interakciós partnereinek azonosítása és jellemzése [83,100,101]. 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 [102], a másik viszont egy TG2-loxP knock-in egér modell, amely módszer Cre rekombinázt expresszáló állatokkal való keresztezés után lehetővé tette mindkét allél inaktiválását [103]. 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 [102,103]. A súlyos különbségek hiányának legvalószínűbb magyarázata, hogy emlősök szöveteiben más transzglutaminázok képesek kompenzálni a TG2 elvesztését [72]. 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 [104-106], és szükséges az NB4 promielocita sejtek neutrofil irányú differenciálódásához, valamint a baktériumok ezen sejtek általi elpusztításához [107,108]. A TG2 eltávolítása tökéletlen sebgyógyuláshoz [109] és autoimmunitás kialakulásához vezethet [110], továbbá glükóz intoleranciát és hiperglikémiát okozhat [111].

3.9. A szöveti transzglutamináz G fehérje funkciója

GTP kötött zárt konformációban, a TG2 működhet G fehérjeként ($G\alpha$), amely az $\alpha 1B$ -adrenoreceptorról ($\alpha 1B$ -AR) [112,113], az oxitocin receptorról [114,115], a tromboxán $A2\alpha$ receptorról [116], és a follikulus stimuláló hormon receptorról [117] továbbíthat jelet [118]. A TG2 G-fehérje funkcióját számos sejttypusban (pl. szív- és simaizomsejtekben, fibroblasztokban, endoteliális sejtekben, hepatocitákban) leírták [119]. Általánosságban elmondható, hogy a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) kölcsönhatásba lépnek a heterotrimer G fehérjékkel; azonban a TG2/ $G\alpha$ a kalretikulinnal ($G\beta$) képez heterodimert [113,118], amely 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/ $G\alpha$ disszociál a $G\beta$ -ról, majd közvetlenül aktiválja a foszfolipáz C δ 1-et (PLC δ 1), amely inozitol-trifoszfát felszabaduláshoz és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedéséhez vezet [120-122]. Ezen kívül a TG2/ $G\alpha$ más jelátviteli utakat is szabályozhat, beleértve az adenilát cikláz (AC) aktivitását [123] és a nagy vezetőképességű Ca^{2+} -aktivált K^{+} csatornák közvetlen aktiválását vaszkuláris simaizomsejtekben [124]. A TG2/ $G\alpha$ szignál akkor szűnik meg, amikor a GTP-áz aktivitás révén a GTP GDP-re hidrolizálódik és a TG2/ $G\alpha$ újra összekapcsolódik a $G\beta$ -val [113].

3.10. 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) a citokróm-oxidáz (IV. komplex), és az ATP-szintáz (V. komplex) hibás diszulfidkötés-képzésében rejlik [125]. 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 [126]. Más sejttípusoknál kimutatták, hogy a TG2 szerepet játszik az elektrontranszportlánc és az energiatermelés homeosztázisának fenntartásában. A TG2 deléciója a légzési lánc I. és II. komplex einek jelentős deregulációját és az ATP termelés csökkenését okozta egér embrionális fibroblasztokban (MEF) [71,127-129].

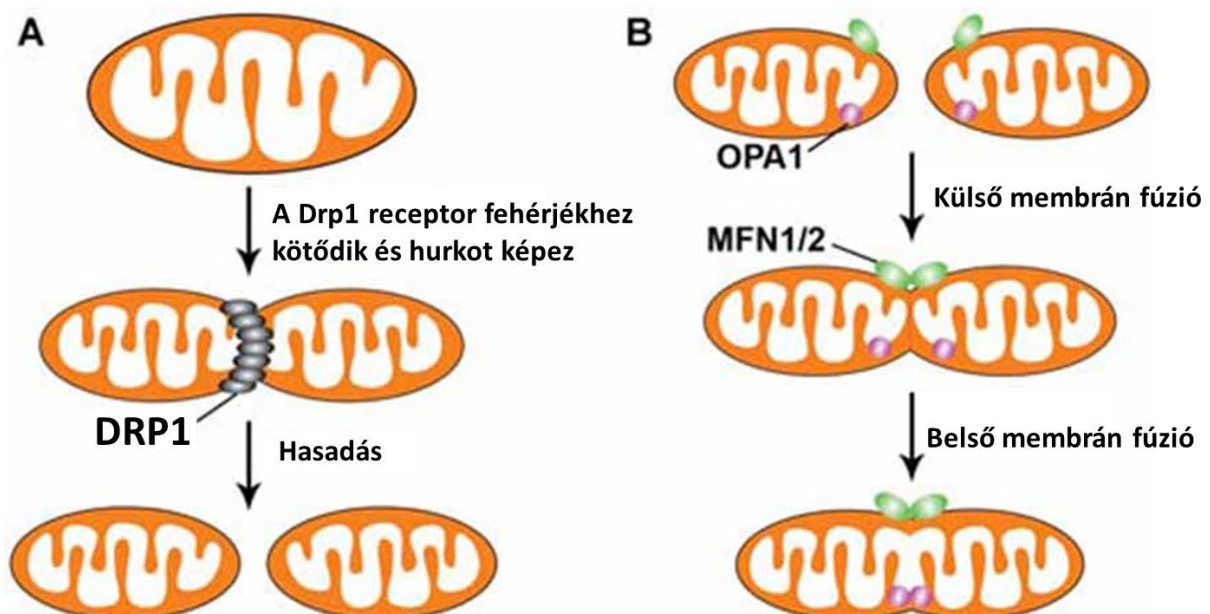
3.11. A mitokondriumok dinamikája

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 [130,131]. Rendkívül dinamikus organellek, melyek fúziós és hasadási eseményeken, továbbá transzport folyamatokon és lebomláson is keresztül mehetnek, 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 patológiás folyamatban felfedezhető, többek között neurodegeneratív betegségekben, izomsorvadásban, szarkopéniában, öregedésben és olyan anyagcsere betegségekben, mint például 2-es típusú cukorbetegség vagy elhízás [130-132]. A mitokondriumok fragmentálódása gyakran összefügg a mitokondriális funkció romlásával, súlyos stresszhatások, például a mitokondriális membránpotenciál elvesztése, az ATP szint csökkenése esetén [133-135], valamint apoptózis során [136,137] 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 [138-150]. A mitokondriumok fúziója hozzájárul a mitokondriális mátrix komponenseinek hálózaton belüli eloszlásához, növeli a mitokondriális hálózat homogenitását és komplementációt is biztosít [136]. 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 [151].

A mitokondriális dinamika négy fő fehérje-mediátora a dinamin guanozin-trifoszfátázok (GTPázok) családjának tagjai: a mitofuzin 1 és 2 (MFN1 és 2), az optikus atrófia 1 (OPA1) fehérje és a dinamin-kapcsolt protein 1 (DRP1) [152]. A DRP1 szinte teljes egészében a citoszolban lokalizálódik, egészenaddig, amíg hasadást indukáló hatásra a mitokondrium külső membránjában található DRP1 receptor fehérjék bármelyikéhez kötődik, oligomerizálódik, és egy hurkot képezve kettéosztja a mitokondriumot [152,153]. Az osztódási helyeket egy transzmembrán fehérje, a mitokondriális hasadási fehérje 1 (FIS1) jelöli ki [140, 154-157]. A mitokondriális hasadási faktor (MFF) kölcsönhatásba lép a FIS1 fehérjével, és adapterként szolgál, amely rekrutálja a DRP1-et a polimerizációs folyamat elősegítésére [156]. A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a hasadáshoz az MFF szükséges, azonban a FIS1 nélkülözhető [156,158]. 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 (5. ábra).



5. ábra: Mitokondriális hasadás és fúzió

(A) *A hasadás folyamata. A dinamin-kapcsolt protein 1 (DRP1) szabályozza a mitokondriális hasadást, amely két lépésből áll: először, megfelelő szignál hatására a DRP1 a citoszolból a mitokondriális külső membránban található receptor fehérjéhez kötődik; majd a mitokondriumon megjelenő kezdeti befűződés mentén sorakoznak fel úgy, hogy egy, a mitokondriumot átölelő gyűrűt képeznek, amely egyre szorosabbra húzódik, és végül egy mitokondrium két egységre történő szétválasztásához vezet.* **(B)** *A fúzió folyamata. A mitofuzin 1 és 2 (MFN1/2) a külső mitokondriális membránban, az optikus atrófia 1 (OPA1) a belső mitokondriális membránban szervezik a mitokondriális fúziót. A két mitokondrium külső membránjainak fúzióját az MFN1/2-közvetíti, majd az OPA1 irányítja a belső membránok fúzióját. A mitokondriális fúzió hosszúkás morfológiájú és erősen összekapcsolt mitokondriumok kialakulásához vezet. Az ábra Cai, Q. & Tammineni, P. közleménye alapján készült [159].*

3.12. A mitokondriumok minőségellenőrzése

A mitokondriális homeosztázist két ellentétes folyamat finom koordinációja őrzi meg: mitokondriális biogenezis, mely az új mitokondriumok létrehozásáért felelős és a mitofágia, amely a sérült mitokondriumok eltávolításában játszik szerepet [160]. Mivel a mitokondriumok nem hozhatók létre *de novo*, ezért a már meglévő organelumokból keletkeznek új mitokondriumok, egy többlépcsős folyamat révén, amely fúziós és hasadási eseményeket is magában foglal. A mitokondriális biogenezis a mitokondriális DNS (mtDNS) replikációját, az mtDNS által kódolt gének transzkripcióját és transzlációját, valamint a foszfolipidek és nukleáris kódolású fehérjék mitokondriális importját foglalja magában [161,162]. A mitokondriális biogenezis egy olyan szigorúan szabályozott folyamat, amely tehát mind a mitokondriális, mind a nukleáris tényezők aktivitásától is függ. A mitokondriális fehérjék túlnyomó többsége nukleáris kódolású, ezért az új organelumok létrehozásához szükség van a nukleáris és mitokondriális gének szinkronizált transzkripciójára és transzlációjára is. Például a légzési lánc komplexeinek kialakításához szükség van mind a nukleáris, mind a mitokondriális kódolású termékekre. Ezeknek a komplexeknek az egyensúlyhiánya proteotoxikus stresszhez vezet [163]. A mitokondriális biogenezis térbeli és időbeli szabályozását számos transzkripciós faktor közvetíti a különböző ingerekre adott válaszként. Ilyen hatások lehetnek különböző intracelluláris jelek és számos környezeti inger, például a tápanyagok elérhetősége, növekedési faktorok, hormonok és toxinok jelenléte, valamint

hőmérséklet és oxigénszint ingadozások. A mitokondriális biogenezis fő szabályozója a PGC1 α , amely számos más, a folyamatban szintén résztvevő transzkripciós faktor interakciós partnere [164-166]. Ezek közé tartoznak a nukleáris légzési faktorok (NRF1 és NRF2), az ösztrogénhez kapcsolódó receptorok (ERR- α , - β és - γ) és a nukleáris faktorról, az eritroid 2-vel kapcsolatos 2. faktor (NRF2/NFE2L2), amelyek a mitokondriális biogenezist szabályozó komplex transzkripciós hálózat részét képezik [165,167]. A mitokondriális minőségellenőrzés első lépése a károsodott mitokondriumok felismerése, amelyek alacsony mitokondriális membránpotenciálja a PTEN-indukálta putatív kináz 1 (PINK1) fehérje felhalmozódását eredményezi [136]. A PINK1 kináz aktivitásával a citoszolikus Parkin (Parkinson juvenile disease protein 2) mitokondriális transzlokációját és aktivációját váltja ki, amivel megkönnyíti a diszfunkcionális egységek autofágiás eliminációját [168-170]. A mitokondriális biogenezis és a mitofágia közötti koordináció finomhangolásában számos további fehérje vesz részt. Ilyen például a metabolikus szenzorként működő AMP-aktivált protein-kináz (AMPK), amely nagy energiaigény esetén aktiválódik, és szintén szerepet játszik a mitokondriális biogenezis PGC-1 α általi szabályozásában. Ezenkívül a p53, a genotoxikus stresszválasz fő szabályozója, részt vesz az energia homeosztázis fenntartásában. A p53 nem csak a sejtmagban, hanem a mitokondriumokban is működik, és transzkripció-függő és független módon befolyásolja a mitokondriumok működését. Az általa közvetített hatásokat elsősorban a mitokondriális biogenezis indukciója és az autofágia modulálása közvetíti [171]. Mivel a mitokondriális fúzió és hasadás kulcsfontosságú események, ezért nem meglepő, hogy ezek a dinamikus morfológiai átmenetek szabályozzák a sejtek sorsával kapcsolatos döntéseket is. Ezen folyamatok molekuláris szabályozásának feltárása döntő módon járul hozzá számos betegség, köztük a neurodegeneratív elváltozások és a metabolikus szindróma megértéséhez.

4. Célkitűzés

Kutatócsoportunk a TG2 sokrétű biológiai szerepének tanulmányozásával foglalkozik. Korábban a humán barna zsírszövetben hatszoros TG2 génexpressziót mutattak ki a fehér zsírszövethez képest [172], 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 hidegtűrésben betöltött szerepének vizsgálata egér modellben
- 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 G α 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 vizsgálata

5. Anyagok és módszerek

5.1. Kísérleti állatok

A C57BL/6J genetikai háttérrel rendelkező $TG2^{-/-}$ egereket [102] 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.

5.1.1. Akut hidegkezelés

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 [173].

5.1.2. Fenilefrin és CL-316,243 kezelés

A kísérletekhez 6db $TG2^{+/+}$ kontroll és 6db $TG2^{-/-}$ 18 hetes hím egeret használtunk fel. Az állatok testtömegének lemérése után intraperitoneálisan 60 nM/g testtömeg fenilefrint (specifikus $\alpha 1$ -AR agonista, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) [174] vagy CL-316,243-at (specifikus β -AR agonista, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) injektáltunk [175]. Az egereket túlaltattuk, kardiális punktuációval vért vettünk, majd a kinyert szérumot -80 °C-on tároltuk.

5.2. 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 [176]. Az összes állat túlélte a kísérletet és teljesen felépült.

5.3. Az artériás vérnyomás mérése

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 [177,178].

5.4. A vér metabolikus paramétereinek meghatározása

A vércukor-koncentrációt a korábban leírtak szerint mértük [111]. 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 [179,180]. 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 5db TG2^{+/+} és 5db TG2^{-/-} 18 hetes hím egér szérummintáiból.

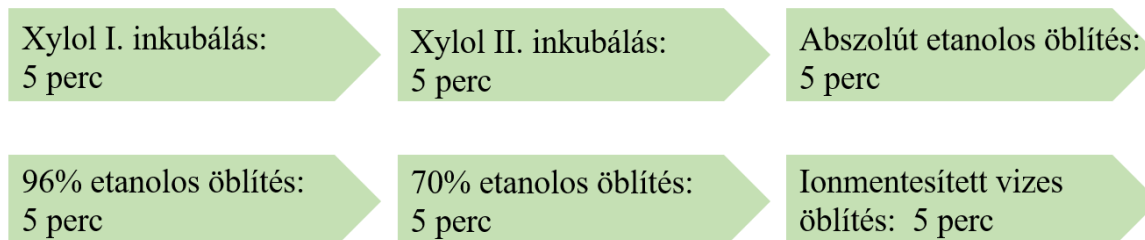
5.5. Laktát dehidrogenáz és a kreatin-kináz B kimutatása

Az LDH aktivitást UV-kinetikus módszerrel határoztuk meg [181], míg a CK-MB aktivitást immunobjektív UV kinetikai módszerrel mértük Cobas-501 analizátoron (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) [182,183]. Az LDH izoenzimeket Hydragel ISO-LDH-on választottuk el elektroforézissel, és az izoenzimek mennyiségét denzitometriával határoztuk meg (Sebia Hydrasys, Sebia, Lisses, Franciaország) [184]. Az egyes LDH izoformák aktivitását az összaktivitás értékének a denzitometriás meghatározás során nyert mennyiségek arányainak megfelelő osztásával kaptuk meg.

5.6. Az Uncoupling protein 1 hisztokémiai kimutatása

A zsírszövet minták szövettani vizsgálatát a következő protokoll alapján végeztük (6. ábra).

A paraffinba ágyazott zsírszövet mintákból készült metszetek deparaffinálása



6. ábra: A paraffinba ágyazott zsírszövet minták deparaffinálásának protokollja

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-konjugált kecskében termeltetett anti-nyúl IgG-vel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Az UCP1 expresszióját FluoView 1000 konfokális mikroszkóp (Olympus, Tokyo, Japan) segítségével vizsgáltuk [185], majd az UCP1 expresszióját Fiji képelemző szoftver (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) segítségével határoztuk meg [186,187].

5.7. 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 tápfolyadékos mosás következett, majd a sejteket 6 lyukú Falcon sejtenyésző 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 a sejteket TRIzolban (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) és 1x-es denaturáló pufferben gyűjtöttük be 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 [188].

5.8. *In vitro* sejtproliferációs vizsgálat: Szulforodamin B teszt

A preadipociták proliferációját szulforodamin B (SRB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) festéssel vizsgáltuk [189]. A sejteket 8-lyukú lemezen tenyésztettük (Corning Incorporated, Durham, NY), majd 50%-os triklór-ecetsavban fixáltuk (végkoncentráció: 10%), amit 1 órán át tartó 4 °C-on történő inkubálás követett. A sejtenyésző lemezeket desztillált vízzel mostuk 5 alkalommal, majd 0,4% (m/V) 1 %-os ecetsavas szulforodamin B oldattal festettük 10 percen át. A nem kötődött festéket 1 %-os ecetsavval, ötször ismételt mosással távolítottuk el. A kötött festéket 10 mM-os Tris bázisban oldottuk fel, majd az abszorbanciát 515 nm hullámhosszon spektrofotométerrel mértük (BioTek Instruments, Winooski, VT). A zsírsejtek átlagos méretét és a teljes zsírtartalom mérését a Fiji képelemző szoftver (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) segítségével határoztuk meg [186].

5.9. mRNS izolálás és reverz transzkripció

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).

5.10. Valós idejű kvantitatív RT-qPCR

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). Az alkalmazott primerek és Taqman™ esszék listáját a 2. és 3. táblázat tartalmazza. A génexpressziót $\Delta\Delta C_P$ módszerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a ciklofilin A (PPIA) háztartási génre normalizáltuk. A felhasznált primer párok szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza.

Gén név	Forward Primer (5'–3')	Reverz Primer (5'–3')
Pref1	CGGGAAATTCTGCGAAATAG	TGTGCAGGAGCATTCGTACT
Ucp1	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
Tbx1	TTTGTGCCCCGTAGATGACAA	CTCGGCCAGGTGTAGCAG
Tnfrsf9	CGTCTGTGACCCCTGGAC	CACGTCCTTCTCCGTGGT
Tmem26	CTGCTCAACCTCTTGCTGGT	AAGATGGCCGGAGAAAGC
Ciklofilin A	CATACAGGTCCTGGCATCTTGTC	AGACCACATGCTTGCCATCCAG

2. táblázat: SYBR Green módszert alkalmazva az RT-qPCR reakciókban használt primerpárok [192].

Gén név	Esszé
Slc25a45	Mm00460303_m1
Dio3	Mm00548953_s1
Slc25a42	Mm01349122_m1
Slc25a47	Mm01327900_m1
Bnip3	Mm00833810_g1
Cxcl1	Mm04207460_m1
Trpv1	Mm01246302_m1
Ciklofilin A (PPIA)	Mm02342430_g1

3. táblázat: Taqman™ génexpressziós esszék listája

5.11. Western blot

A begyűjtött 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 Immobilone PVDF membránra (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 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 perces TTBS-sel történő mosási lépéseket követően torma 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 [190] (1.51k verzió, National Institutes of Health, Bethesda, MD) denzitometráltuk. Normalizáló fehérjeként a β -AKTIN-t alkalmaztunk. Az általunk használt elsődleges és másodlagos antitestek listáját a 4. táblázat tartalmazza.

Antitest	Alkalmazott hígítás	Forgalmazó
β -AKTIN	1:5000	Sigma Aldrich (#A2066)
DIO3	1:1000	Invitrogen (#PA5-67961)
UCP1	1:1000	Sigma Aldrich (#SAB1404511)
TOM20	1:1000	Abcam (#ab56783)
SLC25A45	1:1000	Invitrogen (#PA5-42418)
SLC25A42	1:1000	Invitrogen (#PA5-107022)
PGC1 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (#D1112)
foszfo-AMPK α (Thr172)	1:1000	Cell Signaling (#2535)
OXPHOS	1:1000	Abcam (#ab110411)
OPA1	1:1500	Novus Biologicals (#NB110-55290)
MFN2	1:1000	Sigma Aldrich (#WH0009927M3)
MFF	1:1000	Proteintech (#17090-1-AP)
DRP1	1:1000	BD Biosciences (#611112)
Anti-nyúl IgG, HRP konjugált másodlagos antitest	1:10000	Advansta (R-05072-500)
Anti-egér IgG, HRP konjugált másodlagos antitest	1:10000	Advansta (R-05071-500)

4. táblázat: A Western blot vizsgálatokhoz használt antitestek és azok hígításai

5.12. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata lézerpásztázó citometriával

A preadipocitákat és a differenciáltatott beige sejteket 8 lyukú Ibidi lemezekken (Ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Németország) tenyésztettük, melyeket előzetesen kollagénnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) vontunk be a gyártó utasításait követve. A sejtmagokat 2 µg/ml DAPI-val jelöltük, továbbá kontrollként a DAPI mellett 10 uM 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 × (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.

5.13. 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 lemezekken tenyésztettük és differenciáltattuk. A mérés során meghatároztuk a sejtek alapszintű oxigén fogyasztását 30 percen keresztül, bármilyen stimuláló vagy gátlószer hozzáadása nélkül. Ezt követően 2 µmol oligomycin-t (Enzo Life Sciences, Farmingdale, N.Y.) adtunk a sejtekhez, így blokkolva az ATP-szintáz aktivitását, mellyel a protoncsorgásos légzést vizsgáltuk. Végül 10 µmol antimycin A-t adtunk a sejtekhez (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mely a mitokondriális membránpotenciál gátlásáért felelős, ezáltal a mérés esetleges mitokondriális oxidációtól független zajsztípus volt meghatározható. Az antimycin hozzáadása után az utolsó mérési adatokat minden mérés esetén kivontuk, és ezt követően 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. Az ábrázolt értékek a fehérjemennyiségre történő normalizálás utáni átlag értékek.

5.14. NADH dehidrogenáz aktivitás 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 [191]. 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 [192,193].

5.15. A sejtek ATP és NADH szintjeinek meghatározása

A relatív ATP-tartalmat az ATP Bioluminescence Assay Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) alkalmazásával határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A relatív NADH-tartalmat NAD / NADH kvantitációs kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használatával mértük a gyártó utasításainak megfelelően. Az ATP és NADH szinteket a fehérjetartalomra normalizáltuk, melyet a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) segítségével határoztunk meg.

5.16. Reaktív oxigén szabadgyökök detektálása

A preadipociták és differenciáltatott beige sejtekben képződő indukált reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) termelését kemilumineszcenciás módszerrel mértük L-012 festék (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmazásával. A sejtek 100 µl felülúszójához 5 µl L-012-t (100 µM), majd ezt követően 2 µl phorbol 12-mirisztát-13-acetátot (PMA) (100 nM) adtunk és 5 percig inkubáltuk. Ezután 10 másodperces időközönként kemilumineszcencia-mérést végeztünk Synergy Multi-Mode mikrolemez-olvasóval (BioTek Instruments, Winooski, VT).

A preadipociták és differenciáltatott beige zsírsejtek reaktív endogén ROS termelését szintén kemilumineszcenciás módszerrel mértük diklór-dihidrofluorescein-diacetát (DHCFDA) festék alkalmazásával (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) [194]. A sejtekhez lyukanként, 2 µl DHCFDA festéket (200 µM) tartalmazó 100 µl médiumot adtunk, 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a mérést Synergy Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) alkalmazásával végeztük el. Pozitív kontrollként 100 µM

hidrogén-peroxid kezelést alkalmaztunk ugyanazon kísérleti körülmények között. A reakciók során képződött ROS által generált fény képződését relatív lumineszcencia egységekben (RLU) regisztráltuk és BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) segítségével mért fehérjekoncentrációs szintre normalizáltuk [195,196].

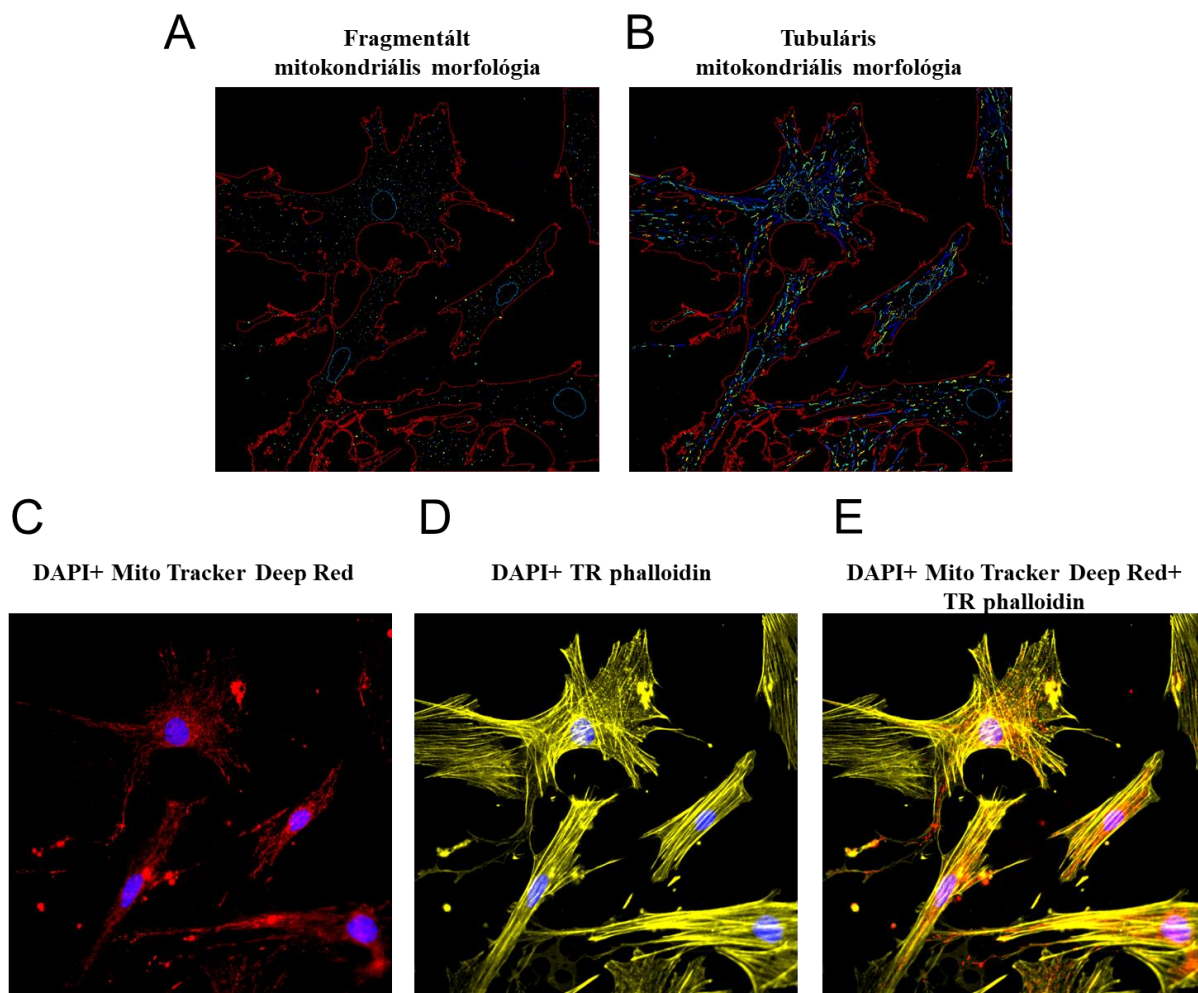
5.17. Elektron mikroszkópia

A sejtek elektronmikroszkópos vizsgálatát az irodalomban leírtak szerint végeztük [197], kisebb módosításokkal. A centrifugálással nyert preadipocita pelletet 3%-os glutáraldehidet (EMS, Hatfield, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok) és 5% szacharózt tartalmazó 0,1 M-os kakodilát (EMS) pufferben fixáltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. 0,1 M-os kakodilát oldattal történő mosást követően a sejteket ozmifikáltuk 1% ozmium tetroxidban (OsO_4), majd felszálló alkoholsorban dehidratáltuk. A mintákat Durcupan ACM gyantába ágyasztuk (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Németország), majd kapszulázást követően ultravékony metszeteket készítettünk Leica EM UC7 ultramikrotómmal (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Németország). A standard kontrasztózást uranil-acetát (EMS) és Reynolds-féle ólom citrát oldattal végeztük. A metszeteket JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL Ltd., Akishima, Tokió, Japán) vizsgáltuk és Olympus Veleta CCD kamerával (Olympus, Sinjuku, Tokió, Japán) fényképeztük. A metszetek a Debreceni Egyetem Anatómiai Szövet- és Fejlődésbiológiai Intézet Molekuláris Anatómiai Képkalkotó és Elektronmikroszkópos Szolgáltató Laboratóriumában készültek. A morфомetriai értékelést az ImageJ szoftver segítségével végeztük és mindkét fenotípus ($\text{TG2}^{-/-}$ és $\text{TG2}^{+/+}$) legalább 60 különböző sejtjének elektronmikroszkópos képét elemeztük. A beige adipocitákat magas triacilglicerol tartalmuk miatt technikai okokból nem tudtuk elektron mikroszkóppal vizsgálni.

5.18. Immuncitokémia

A fluoreszcens mikroszkóppal végzett mérésekhez a sejteket 96 lyukú lemezekben növesztettük. Kontrollként a sejteket 10 μM 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 [198]. 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 [199] (7. ábra).



7. ábra: A fragmentált és tubuláris mitokondriális morfológia megkülönböztetésére megjelölt objektumok

(A) Reprezentatív ábra a fragmentált morfológiájú mitokondriumok megjelölésével. **(B)** Reprezentatív ábra a tubuláris morfológiájú mitokondriumok megjelölésével. **(C)** Reprezentatív ábra a sejtek DAPI és Mito Tracker Deep Red, **(D)** DAPI és TR phalloidin, valamint **(E)** DAPI, Mito Tracker Deep Red és TR phalloidin festéséről.

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.

5.19. Aminosavak mérése a sejtek felülúszóiból

A sejtenyészlet felülúszóiból 200 µl-es mintát vittünk egy Nanosep3K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) méretkizárásos centrifugális oszlopra annak érdekében, hogy az aminosavakat elválasszuk a nagyobb molekulatömegű fehérjéktől és molekuláktól. A mintákat centrifugáltuk (5 min, 4°C, 14000 rpm), és az átfolyásokat kémiai derivatizálásnak vetettük alá AccQ-tag-derivatizáló reagens (Waters Corporation, Milford, MA) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. 10 µl mintát összekevertünk 20 µl AccQ-tag derivatizáló reagenssel és 70 µl borát pufferrel (pH 8,8), majd 55°C-on 10 percig inkubáltuk [200]. A derivatizált aminosavakat UPLC-UV analízisnek vetettük alá 1x és 10x hígítások alkalmazásával. A folyadékkromatográfiás elválasztást Acquity H-class UPLC rendszeren (Waters Corporation, Milford, MA) hajtottuk végre, amelyet Empower 3 szoftver (Waters Corporation, Milford, MA) vezérelt. A derivatizált aminosavakat AccQ-tag Ultra C18 oszlopon (1,7 µm; 2,1x100 mm, Waters Corporation, Milford, MA) választottuk el, amelyet Acquity in-line szűrő (0,2 µm; 2,1 mm, Waters Corporation, Milford, MA) védett. Az áramlási sebességet 43°C-on 0,6 ml/percre állítottuk. A PDA detektort 260 nm-re állítottuk. A vizsgálatokhoz 1 µl mintát injektáltunk, minden minta esetében két párhuzamost alkalmazva. Az aminosavak mennyiségének meghatározásához 6 pontos kalibrációs egyeneseket készítettünk 2,5-25 pmol/µl koncentráció tartományban a 20-féle proteinalkotó aminosavak keverékének felhasználásával. Az aminosavak mennyiségi analízisét Empower 3 szoftver (Waters Corporation, Milford, MA) segítségével végeztük el. A méréseket a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Proteomikai Szolgáltató Laboratóriumában végeztük el.

5.20. Teljes RNS szekvenálás

A globális transzkriptómadatok vizsgálatához nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenálási elemzést végeztünk Illumina szekvenáló platformon, az irodalomban leírtak szerint [201]. A szekvenálást a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában végezték. 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.

5.21. Szabad trijód-tironin meghatározása

A szabad trijód-tironin (fT3) koncentrációját a sejtfelülűszókból duplikátumokban mértük Cobas ECLIA kit (Roche Dignostics, Mannheim, Németország) segítségével, Elecsys 2010 analizátorral (Roche Dignostics, Mannheim, Németország) a gyártó útmutatásai szerint [202,203]. A méréseket a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében végezték el.

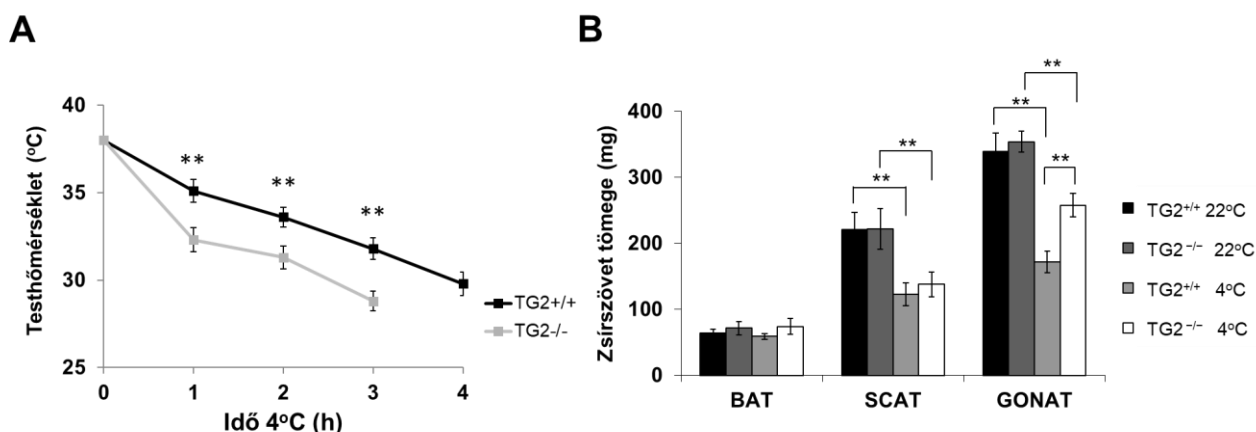
5.22. Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciák meghatározását GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Calofornia, Amerikai Egyesült Államok) és Microsoft Excel 14.0 programokkal végeztük. A statisztikai szignifikanciát két csoport között - kezelt és kontroll csoport - párosítatlan kétszélű Student t-tesztel 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.

6. Eredmények

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

Összhangban a korábbi eredményekkel [102,111] a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerek táplálkozási szokásai nem különböztek és testtömegük is hasonlónak bizonyult. Ennek megfelelően a vizsgálatainkhoz felhasznált, normál étrenden tartott 16 hetes hím egerek interszkapuláris barna, szubkután fehér és gonadális fehér zsírszöveteinek 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 **(8/A ábra)**. Annak felderítése érdekében, hogy a zsírdepók milyen mértékben járulnak hozzá a TG2^{-/-} egerek testhőmérsékletének alakulásához, 3 óra akut hideg expozíció után izoláltuk interszkapuláris barna, szubkután fehér és gonadális fehér zsírszöveteiket, 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 **(8/B ábra)**.



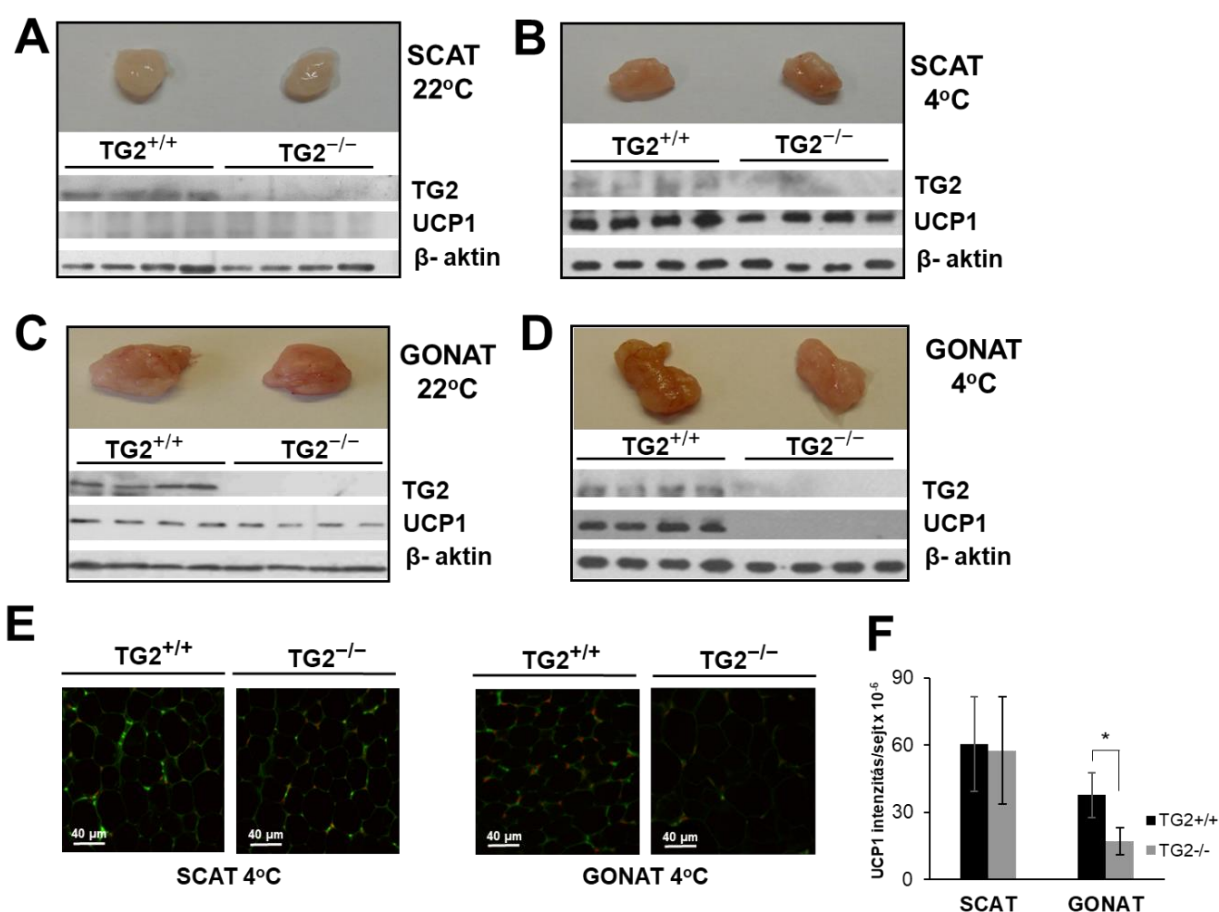
8. ábra: A TG2 hiányos egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek és alacsonyabb hatékonysággal mobilizálják gonadális zsírjukat hidegkezelés során

(A) A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerek testhőmérsékletének csökkenése 4 °C-os hidegkezelés hatására; (n=6). (B) TG2^{+/+} és TG2^{-/-} állatok barna (BAT), szubkután (SCAT) és gonadális (GONAT) fehér zsírszöveteinek tömege 22 °C-on és 4 °C-os hideg expozíciót követően (n=6). A szignifikancia számításokhoz t-tesztet végeztünk. Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. **p<0,01

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

Mivel az UCP1 szétkapcsoló fehérje kiemelkedő szerepet játszik a termotolerancia szabályozásában, munkacsoportunk fehérjeszinten vizsgálta expresszióját a barna zsírszövetben [204]. Miután megfigyeltük, hogy a csökkent hidegtűrés nem magyarázható a barna zsírszövet hiányos működésével a TG2^{-/-} egerekben, a fehér zsírszövet barnulására fordítottuk figyelmünket. Meglepő módon, míg a szubkután zsírszövet hasonlóan barnult 3 óra hideg expozíció során mindkét egértörzsben (9/A és 9/B ábra), a TG2^{-/-} egerek gonadális zsírszövete kevésbé barnult be hidegkezelés hatására (9/C és 9/D ábra). Nem detektáltunk UCP1 fehérje expressziót a 22°C-on tartott állatok szubkután zsírszövetében (9/A ábra), azonban a hidegnek való kitettség egyformán indukálta TG2^{-/-} és TG2^{+/+} egerekben is a kifejeződését (9/B ábra). 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 (9/C ábra). A törzsek UCP1 fehérje-expressziójának csökkenése a gonadális

zsírszövetben annyira szembetűnő volt hideg expozíció után, hogy az immunoblotokon a $TG2^{-/-}$ szövetben kimutatási határ alá esett (9/D ábra). Fontos megjegyezni, hogy a hidegkezelt $TG2^{-/-}$ egerek gonadális zsírszövege valamennyi UCP1-et expresszált, mivel immunhisztokémiával detektálni tudtuk (9/E ábra); azonban a $TG2^{-/-}$ adipociták átlagos UCP1 intenzitása megközelítőleg a fele volt a $TG2^{+/+}$ gonadális zsírsejtekben kimutatott értékeknek (9/F ábra).



9. ábra: A $TG2^{-/-}$ egerek gonadális zsírszövege kevésbé barnul be hidegkezelés hatására

(A-D) Szubkután és gonadális zsírszövet minták és azok Western-blottokon lévő TG2, UCP1 és β -AKTIN-tartalmának reprezentatív képei láthatók ($n = 4$) (A) A $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ egerek szubkután zsírszövege 22°C-on és (B) 3 órán át tartó 4°C-os hidegkezelés után. (C) A $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ egerek gonadális zsírszövege 22°C-on és (D) 3 órán át tartó 4°C-os hidegkezelést követően. (E) Az UCP1 kimutatását $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ állatok szubkután és gonadális zsírszövegeiben hidegkezelés után immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópiával készült képeket ImageJ program segítségével elemeztük. Az ábrán

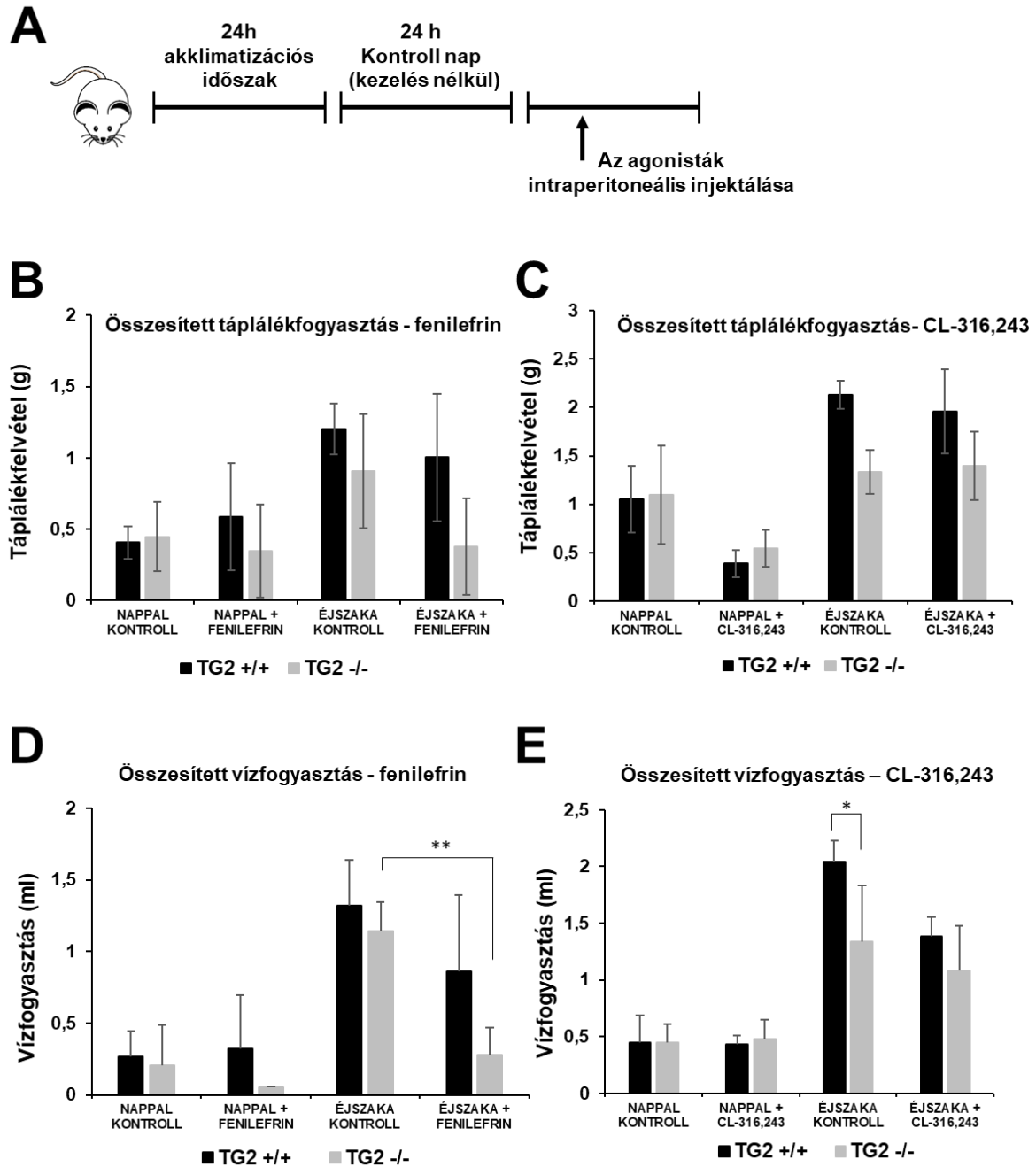
reprezentatív felvételek láthatók, ahol a zöld szín jelzi az UCPI-et, a sejtmagok propidium-jodiddal történő jelölése pedig pirossal látható. A méretarány 40 μm -nek felel meg ($n=5$). **(F)** Szubkután és gonadális zsírsejtek UCPI fluoreszcens intenzitása $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ állatokban hidegkezelés után ($n=3$). A szignifikancia számításokhoz t -tesztet alkalmaztunk. Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában adtuk meg. $*p<0,05$

A fehér zsírszövet barnulási mechanizmusa magában foglalja a hőtermelő beige sejtek aktiválódását a β -adrenoreceptor (β -AR) jelátviteli útvonalon [205]. Ugyanakkor a β -AR-hiányos egerek hideg expozícióra reagálva képesek fokozni fehér zsírszövetük termogén funkcióját [206], ami más járulékos jelátviteli útvonalak létezésére is utal. Mivel az egerek szérum mintáiban magas noradrenalin-szintet mértünk hidegkezelés után [204], feltételeztük, hogy esetleg ilyen mechanizmus lehet az $\alpha 1$ -AR aktiválása. A α - és β -AR jelátvitel közötti esetleges kapcsolatot a szakirodalomban más modell rendszerekben már korábban leírták [207], 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 sejttypusban (pl. szív- és simaizomsejtekben, fibroblasztokban, endoteliális sejtekben, hepatocitákban) ismert [119], 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 [208] illetve kontrollként specifikus β -AR agonistával CL-316,243-mal [209]. Ezután különböző metabolikus paramétereiket (táplálék és vízfogyasztás, hőtermelés, O_2 fogyasztás, CO_2 termelés, respirációs hányados (RER) indirekt kalorimetriás módszerrel vizsgáltuk.

6.3. A $TG2^{+/+}$ és a $TG2^{-/-}$ egerek táplálékfogyasztása nem különbözött

A kísérletek sematikus ábrázolását a **10/A ábra** mutatja. Az állatok táplálék bevitelében nem volt különbség a törzsek között a kísérletek egyik periódusában sem (**10/B és 10/C ábra**). Érdekes módon a $TG2^{-/-}$ egerek kevesebb vizet fogyasztottak fenilefrin injektálást követően az éjszakai periódusában a kontroll nap éjszakai periódusához képest; ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy amikor értékeiket a megfelelő $TG2^{+/+}$ értékekkel hasonlítottuk össze, eltéréseket nem észleltünk (**10/D ábra**). Ezen túlmenően a $TG2^{-/-}$ egerek kevesebb vizet ittak

a kontroll nap éjszakai periódusában a CL-316,243 kísérlet során (**10/E ábra**), amelyet a fenilefrin vizsgálatoknál nem tapasztaltunk; fiziológiailag azonban ez kielégítő lehetett számukra, mivel nem volt jelentős hatása a vizsgált fiziológiai paraméterekre.

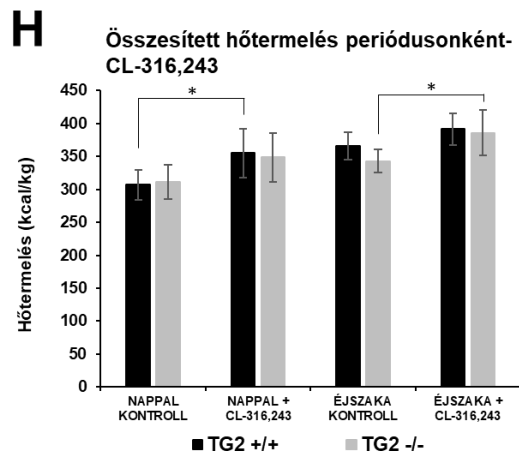
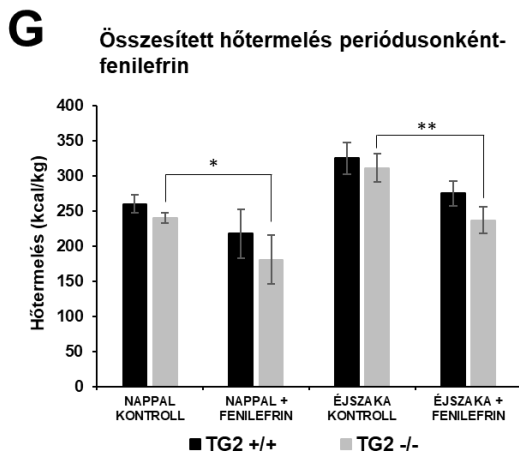
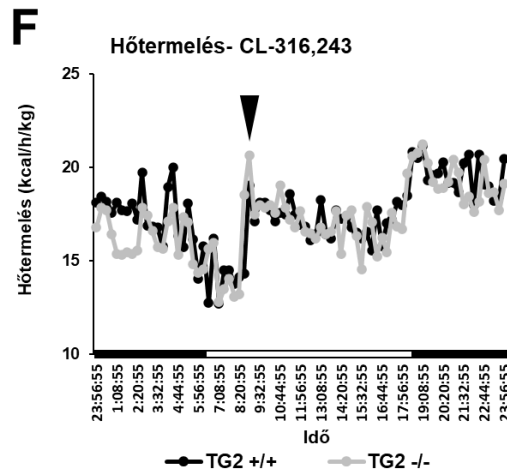
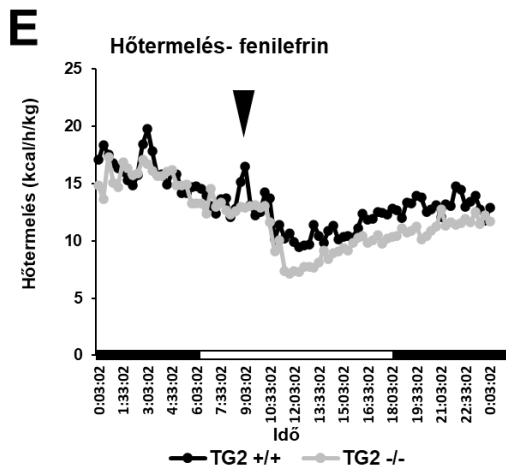
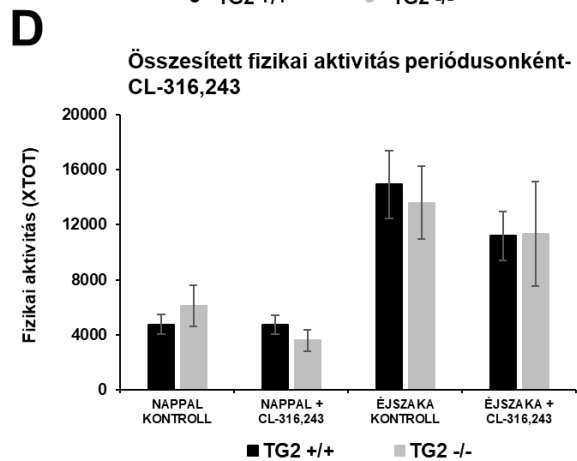
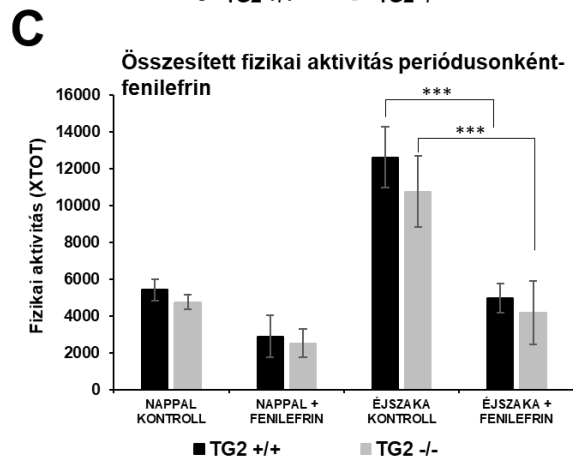
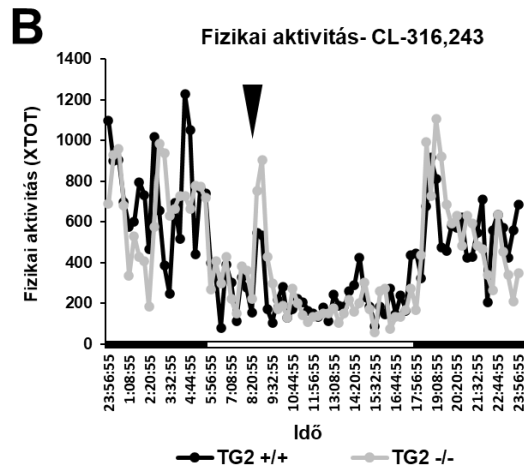
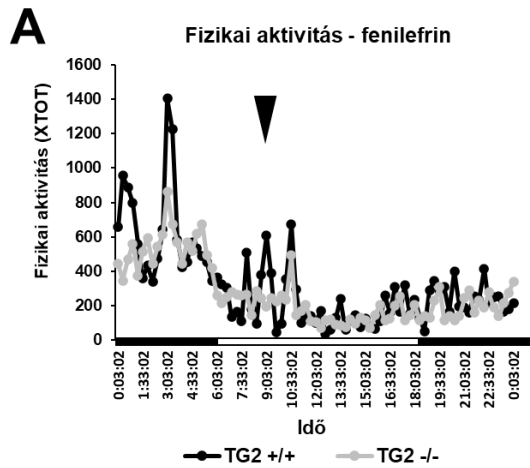


10. ábra: Az egerek táplálékfogyasztása nem különbözött a kísérletek során, azonban a fenilefrin kezelés után a TG2^{-/-} egerek kevesebb vizet fogyasztottak az éjszakai periódusban a kontroll naphoz képest

(A) A kísérletek sematikus ábrázolása, ahol az akklimatizációs napot egy kezelés nélküli kontroll nap követett, majd a harmadik napon az egereket intraperitoneálisan injektáltuk 60 nM/ testtömeg fenilefrinnel vagy CL-316,243 agonistával. **(B,C)** Az egerek táplálék és **(D,E)** vízfogyasztása a kontroll napon és a fenilefrin **(B,D)** valamint CL-316,243 **(C,E)** kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. Több csoport összehasonlításához kétutas ANOVA tesztet végeztünk. A varianciaanalízis során Tukey post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. ($n=6$) * $p < 0,05$
** $p < 0,01$

6.4. Fenilefrin kezelés hatására lecsökkent a TG2^{-/-} állatok fizikai aktivitása és hőtermelése

Az egerek fizikai aktivitása nem különbözött a kontroll napokon egyik kísérlet során sem **(11/A-D)**. A fenilefrin intraperitoneális injektálása hasonlóan hatott a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} állatokra **(11/A és C)**, és mindkét törzs fizikai aktivitásának jelentős csökkenését okozta az éjszakai periódusban a kontroll naphoz képest, amely egyébként az egerek fizikailag aktív időszaka **(11/C ábra)**. Érdekes módon azonban a CL-316,243 kezelés nem befolyásolta az egerek aktivitását **(11/B és D ábra)**. A törzsek azonos mennyiségű hőt termeltek a kontroll napon **(11/E–H ábra)**; a fenilefrin-kezelés azonban a mérési napon csak a TG2^{-/-} egerekben csökkentette az összesített hőtermelést a kontroll naphoz képest **(11/G ábra)**. Továbbá, a CL-316,243 kezelés után a TG2^{+/+} egerek megnövelték a hőtermelésüket a nappali periódusban, a TG2^{-/-} állatok pedig a sötét periódusban a mérési napon a kontroll nap adott szakaszához képest, azonban fontos megjegyezni, hogy nem találtunk szignifikáns eltéréseket a törzsek között, amikor egymással hasonlítottuk össze a hőtermelésüket a vizsgált időszakokban **(11/F, H ábra)**.



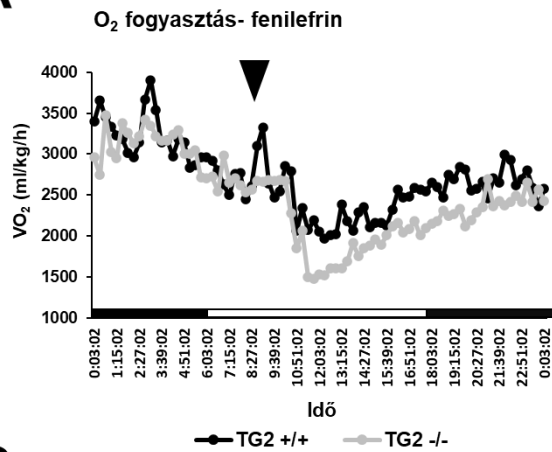
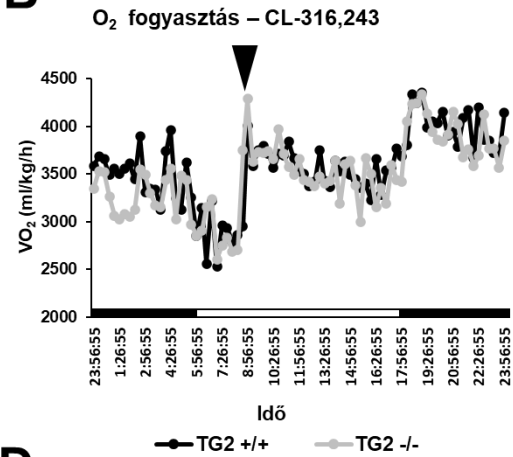
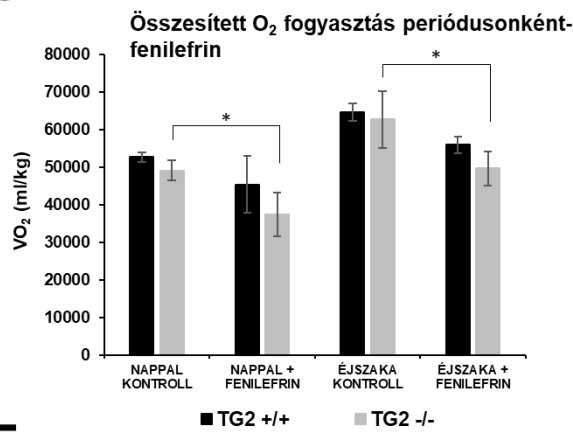
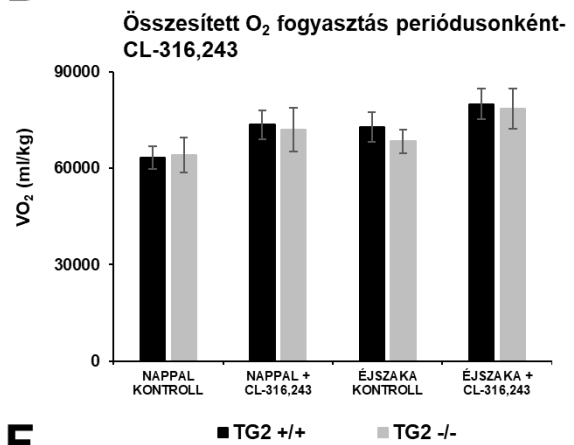
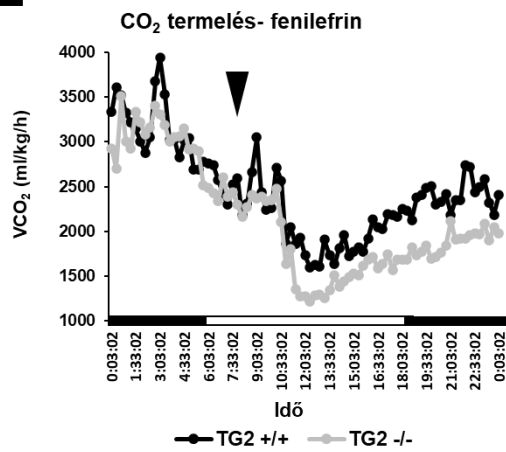
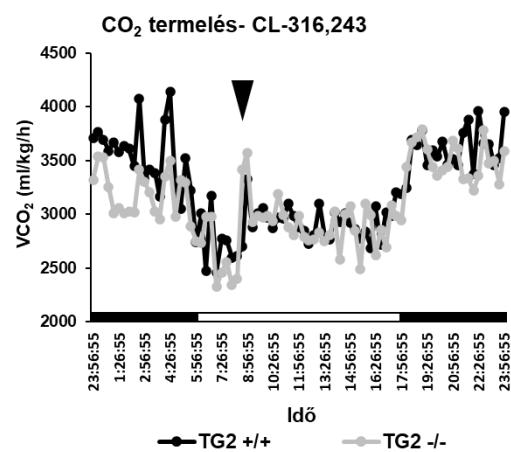
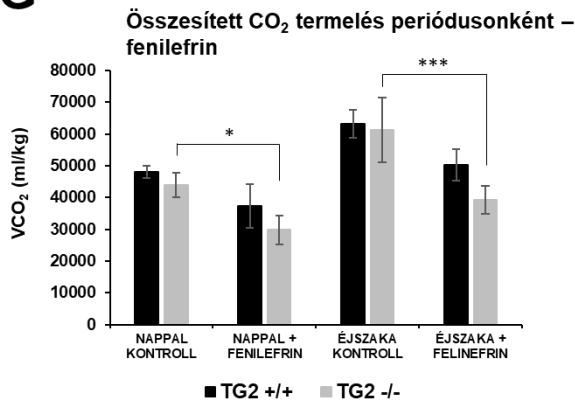
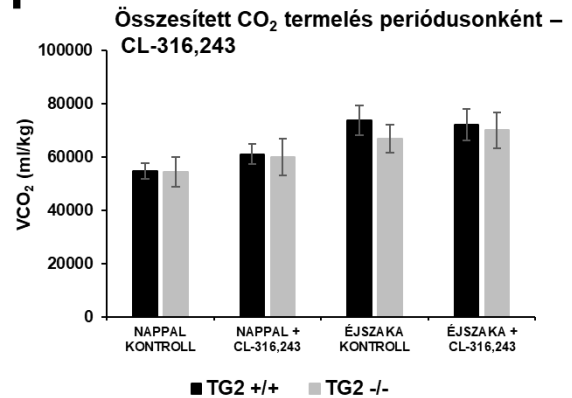
11. ábra: Fenilefrin kezelés hatására lecsökkent a TG2^{-/-} állatok fizikai aktivitása és hőtermelése

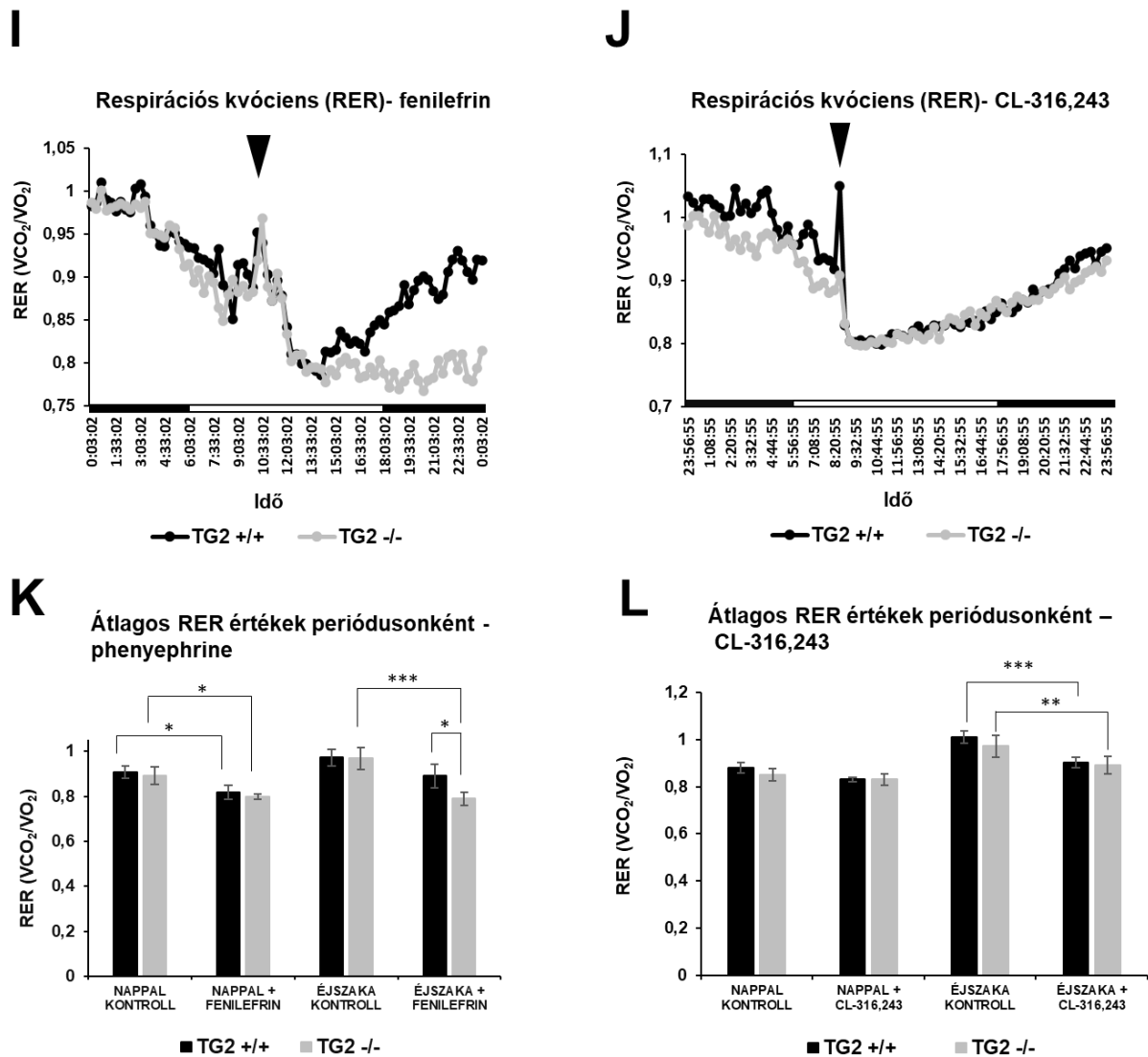
(A-D) Az egerek fizikai aktivitása a kontroll napon és a fenilefrin **(A,C)** valamint CL-316,243 **(B,D)** kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. **(E-H)** Az egerek hőtermelése a kontroll napon és a fenilefrin **(E,G)** valamint CL-316,243 **(F,H)** kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. A nyilak mutatják azt az időpontot (9:00 órakor), amikor az agonistákat intraperitoneálisan (60 nM/testtömeg (g)) injektáltuk. A nappali (□) és az éjszakai (■) periódusokat az „x” tengelyek jelzik **(A,B és E,F)**. Több csoport összehasonlításához kétutas ANOVA tesztet végeztünk. A varianciaanalízis során Tukey post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. (n=6) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

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

Az egerek VO₂ értékei a nappali és éjszakai periódusában megegyeztek a kezelések nélküli kontroll napon **(12/A – D ábra)**. 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 **(12/C ábra)**. Ezzel szemben a CL-316,243 kezelés a VO₂ kismértékű növekedését idézte elő mindkét genotípusban, azonban egymáshoz nagyon hasonló módon az összes vizsgált időszakban, amikor egymással hasonlítottuk össze őket **(12/B és 12/D ábra)**. Kiszámítottuk a fenilefrin kezelés előtti és utáni nappali és éjszakai időszakok összesített VO₂ értékeit, és azt találtuk, hogy a TG2^{+/+} egerek értékei változatlanok maradtak **(12/A és C ábra)**. 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 **(12/C ábra)**. Eközben a CL-316,243 kezelés nem okozott szignifikáns változást a törzsek teljes VO₂ értékeiben **(12/D ábra)**. A VO₂ értékekhez hasonlóan az egerek VCO₂ értékei a nappali és az éjszakai kontroll periódusban egyaránt megegyeztek **(12/E – H ábra)**. 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 (**12/E és 12/G ábra**). Érdekes módon a CL-316,243 kezelés nem befolyásolta a törzsek VCO₂ értékeit, amelyek változatlanok maradtak a kontroll naphoz képest (**12/F, H ábra**). 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 VCO₂ 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 (**12/G ábra**). A VO₂ esetéhez hasonlóan a CL-316,243 kezelés nem okozott szignifikáns változást a törzsek total VCO₂ értékeiben sem (**12/H ábra**). A TG2^{-/-} és TG2^{+/+} egerek respirációs hányadosa (RER értékei: VCO₂/VO₂) a fenilefrin-kezelés előtti kontroll napon a nappali és éjszakai periódusában egyaránt nagyon hasonlóak voltak (**12/I és K**). 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 (**12/I ábra**). Ennek eredményeként a mérési nap éjszakai periódusában a TG2^{-/-} egerek RER értéke szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a TG2^{+/+} állatokhoz képest (**12/I és 12/K**). 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 (**12/J ábra**). 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 (**12/L ábra**).

A**B****C****D****E****F****G****H**



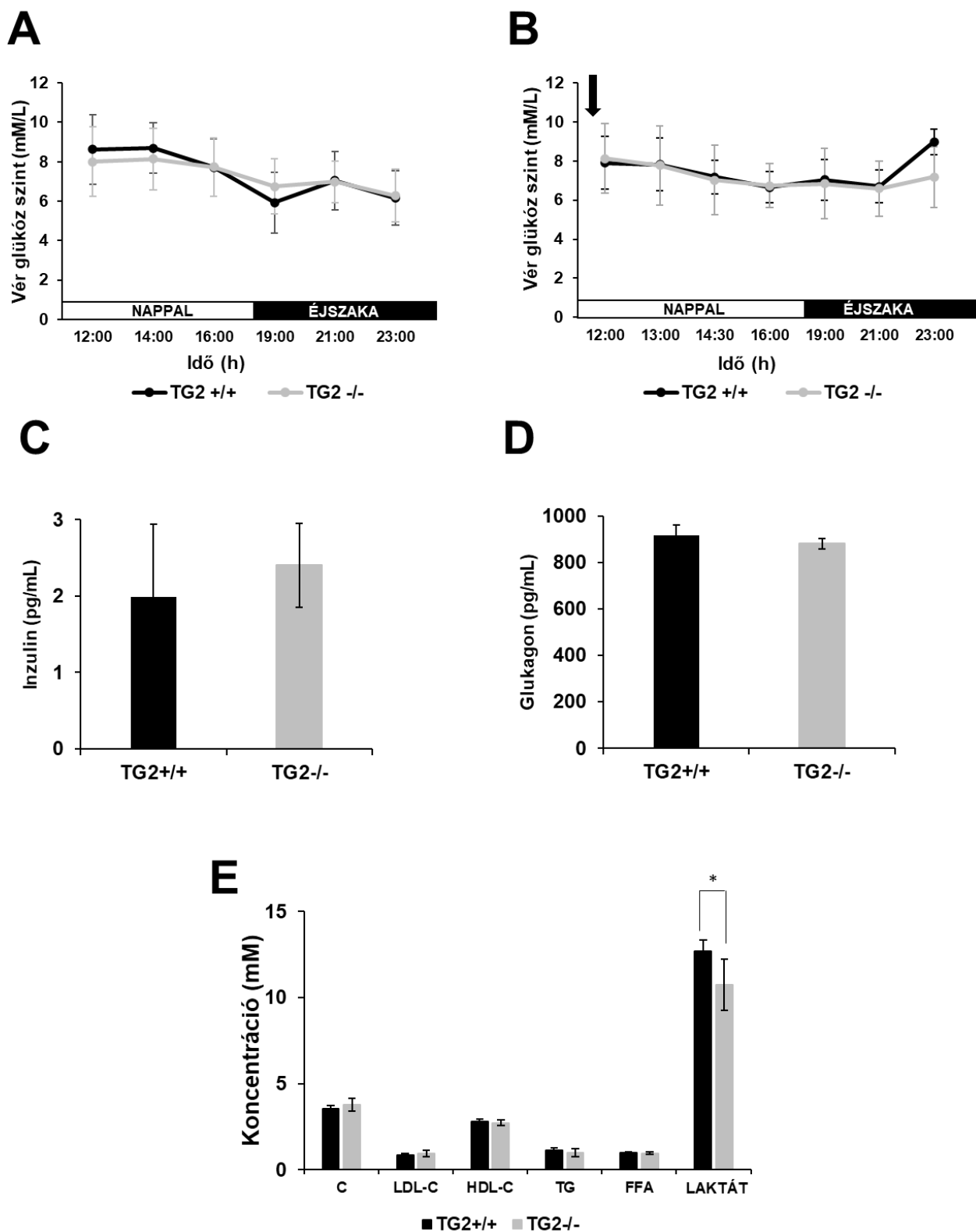
12. ábra Fenilefrin kezelés hatására lecsökkent a $TG2^{-/-}$ egerek O_2 fogyasztása és CO_2 termelése, aminek következtében a respirációs hányados (RER) szignifikánsan alacsonyabb

(A-D) Az egerek O_2 fogyasztása a kontroll napon és a fenilefrin (A,C) valamint CL-316,243 (B,D) kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. (E-H) Az egerek CO_2 fogyasztása a kontroll napon és a fenilefrin (E,G) valamint CL-316,243 (F,H) kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. (I-L) Az egerek respirációs hányadosa a kontroll napon és a fenilefrin (I,K) valamint CL-316,243 (J,L) kezeléseket követően a nappali (9:03-tól 18:00-ig) és éjszakai (18:00-tól 06:00-ig) periódusokban. A nyilak mutatják azt az időpontot (9:00 órákor), amikor az agonistákat intraperitoneálisan (60 nM / testtömeg (g)) injektáltuk. A nappali ($\square$) és az éjszakai ($\blacksquare$) periódusokat az „x” tengelyek jelzik (A-B, E-F és I-J). Több csoport összehasonlításához kétutas ANOVA tesztet végeztünk.

*A varianciaanalízis során Tukey post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. (n=6) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$*

6.6. Az $\alpha 1$ adrenerg agonista kezelés alacsonyabb laktát szintet eredményez a TG2^{-/-} egerek vérében

Indirekt kalorimetriás mérésekkel csak az $\alpha 1$ adrenerg agonista fenilefrin kezelést követően találtunk különbségeket TG2 hiányában, ezért a fenilefrin hatását vizsgáltuk tovább a vér egyes metabolikus értékeit mérve. A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} állatok vércukorszintje a kontroll napon mind a nappali, mind az éjszakai időszakban azonos volt (**13/A ábra**), és a fenilefrin adása sem vezetett változásokhoz (**13/B ábra**). Az egerek szérum mintáiban vizsgált inzulin és glukagon szintek is hasonlóak voltak a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egerek szérummintáiban az $\alpha 1$ adrenerg kezelés után (**13/C és 13/D ábra**). Továbbá a szérumban mért lipid frakciók: a koleszterin (C), az alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin (LDL-C), a nagy sűrűségű lipoprotein koleszterin (HDL-C), a triglicerid (TG) és a szabad zsírsav (FFA) koncentrációi sem voltak eltérők a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} állatokat összehasonlítva a fenilefrin kezelést követően (**13/E ábra**). Érdekes módon azonban, a laktát koncentrációja szignifikánsan magasabbnak adódott a TG2^{+/+} egerek szérum mintáiban a TG2^{-/-} egerekhez képest a fenilefrin kezelést követően (**13/E ábra**).



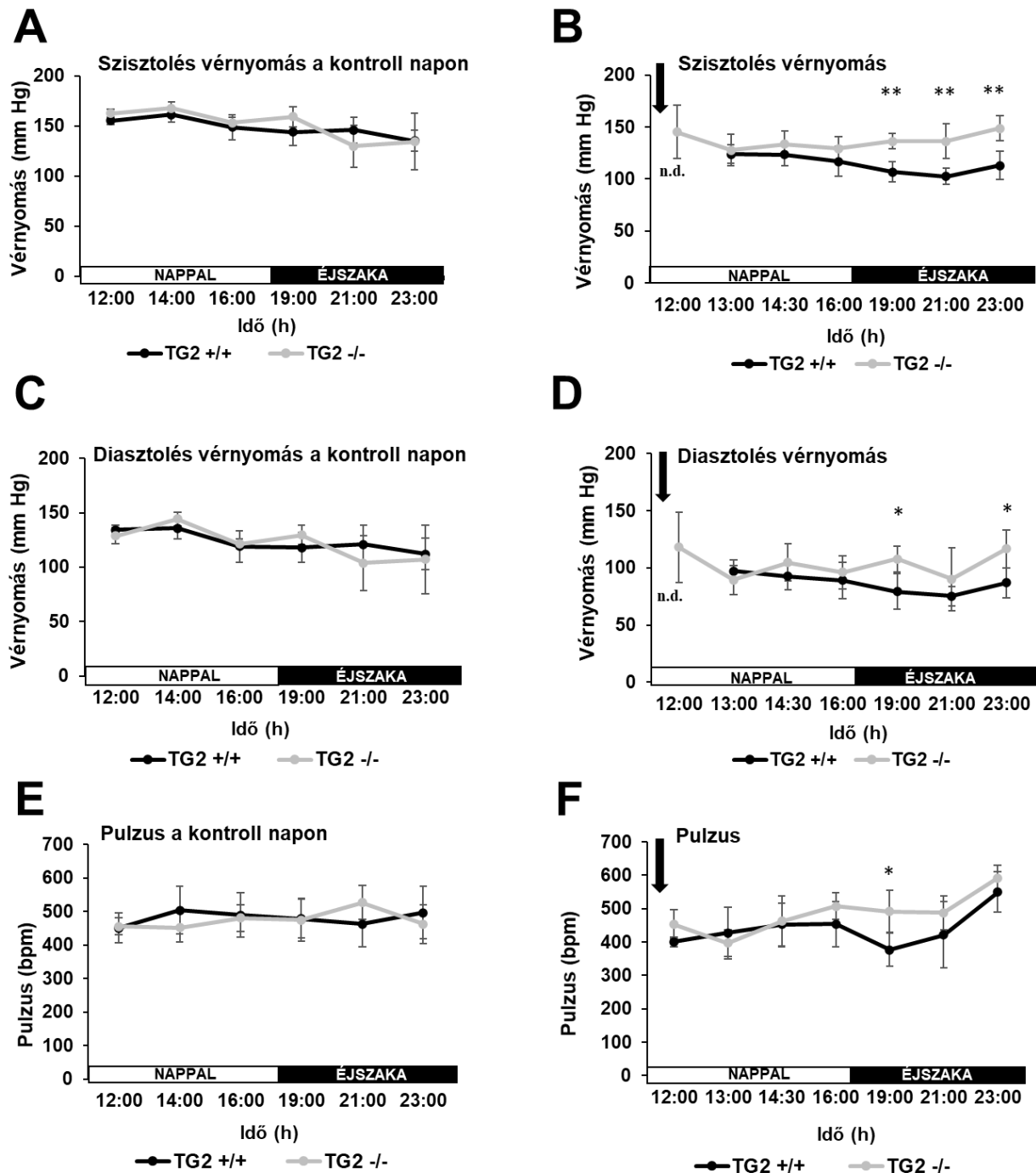
13. ábra $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ szérum mintájában vizsgált metabolikus paraméterek fenilefrin kezelést követően

(A) A $TG2^{+/+}$ and $TG2^{-/-}$ állatok vércukorszintje a kezelés nélküli kontroll napon és (B) fenilefrin kezelés után. A nappali (□) és az éjszakai (■) periódusokat az „x” tengelyek jelzik (A-

B) A nyíl a fenilefrin injektálásának időpontját mutatja. **(C)** Az inzulin koncentrációja a $TG2^{+/+}$ és a $TG2^{-/-}$ egerek szérummintáiban 13 órával a fenilefrin kezelés után. **(D)** A glukagon koncentrációja a $TG2^{+/+}$ és a $TG2^{-/-}$ egerek szérummintáiban 13 órával a fenilefrin kezelés után. **(E)** Az egerek szérum lipid- és laktátkoncentráció-értékei 13 órával a fenilefrin-kezelés után. C: koleszterin, LDL-C: alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin, HDL-C: nagy sűrűségű lipoprotein koleszterin, TG: triacilglicerol, FFA: szabad zsírsav. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. (n=5)
* $p < 0,05$

6.7. 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 **(14/A, C, E ábra)**. 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 **(14/B és 14/C)**. 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 **(14/B és 14/D)**. 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 **(14/B ábra versus 14/A; 14/D ábra versus 14/C ábra)**. 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 **(14/E, F ábra)**.



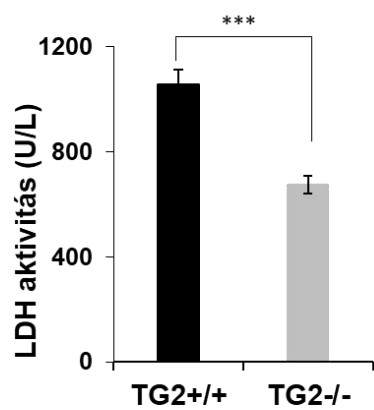
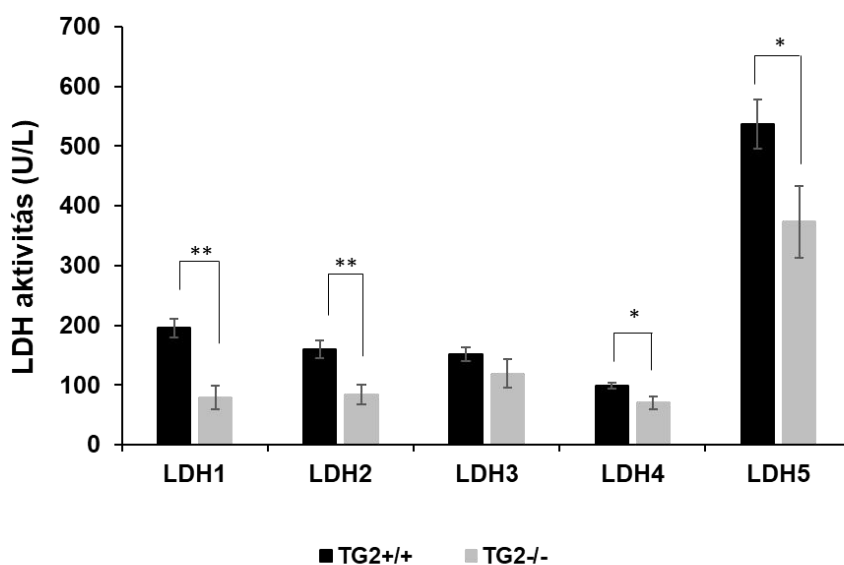
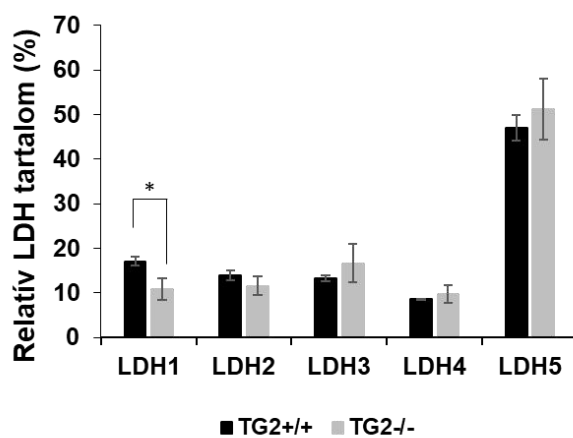
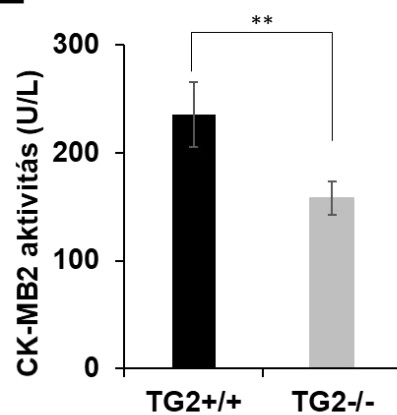
14. ábra A fenilefrin kezelés nem csökkentette a $TG2^{-/-}$ egerek farki vérnyomását ellentétben a $TG2^{+/+}$ állatokkal

(A) Az egerek szisztolés vérnyomása a kontroll napon és (B) a fenilefrin injektálást követően. (C) Az állatok diasztolés vérnyomása a kontroll napon és (D) a fenilefrin oltást követően. (E) A $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ egerek pulzusa a kontroll napon és (F) az $\alpha 1$ -adrenerg agonistával történő injektálás után. A nappali ($\square$) és az éjszakai ($\blacksquare$) periódusokat az „x” tengelyek jelzik. A nyilak

*a fenilefrin injektálásának időpontját mutatják. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. (n=5) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$*

6.8. Az $\alpha 1$ -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 **(15/A ábra)**. A szérum LDH izoenzimék 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 **(15/B és 15/C ábra)**. A TG2^{-/-} / TG2^{+/+} arányt, tehát a relatív LDH tartalmat vizsgálva elmondható, hogy az LDH2, LDH4 és LDH5 aránya hasonló volt a genotípusok között **(15/D ábra)**. Azonban ez a relatív érték az LDH1 izoenzim esetén, ami a szívizom károsodás markere, szignifikánsan magasabb volt a TG2^{+/+} mintákban **(15/D ábra)**. 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 $\alpha 1$ -adrenerg agonista kisebb mértékű szívizom károsodást vált ki TG2^{-/-} egerekben, mint a TG2^{+/+} genotípusban **(15/E ábra)**.

A**B****C****D****E**

15. ábra: A fenilefrin kezelés alacsonyabb fokú szövetkárosodást eredményez TG2^{-/-} egerekben összehasonlítva a TG2^{+/+} állatokkal, amelyet az LDH izoenzimek aktivitás értékei mutatnak

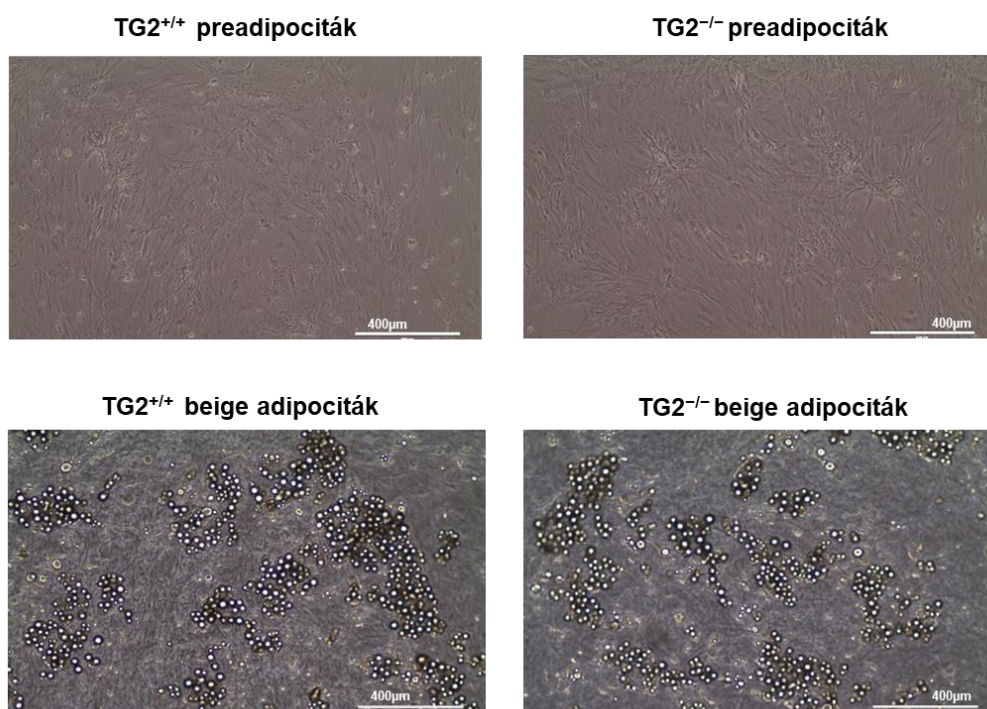
(A) Az össz laktát-dehidrogenáz izoenzim (LDH) enzim aktivitás értéke az egerek szérumban 13 órával a fenilefrin injektálás után. **(B)** A szérumban laktát-dehidrogenáz izoenzimek agaróz gél elektroforetikus elválasztása (LDH1-LDH5) (1–3 sáv TG2^{+/+}, 4–6 sáv TG2^{-/-}, 7. sáv: humán kontroll szérumban). **(C)** Az LDH izoenzimek aktivitása az egerek szérumban 13 órával a fenilefrin kezelést követően. **(D)** Relatív LDH izoenzim aktivitás értékek az egerek szérumban 13 órával a fenilefrin kezelés után. **(E)** Kreatin-kináz (CK-MB) aktivitása az egerek szérumban 13 órával a fenilefrin kezelés után. A szignifikancia számításokhoz *t*-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. (n=3) * *p* < 0,05 ** *p* < 0,01 *** *p* < 0,001

6.9. A TG2^{-/-} gonadális zsírszövetből izolált preadipociták beige irányú differenciációja hasonló volt a TG2^{+/+} sejtekéhez

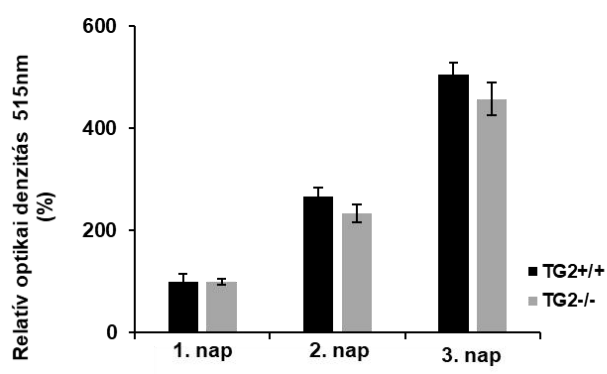
In vivo kísérleteink után a TG2 gonadális zsírszövet barnulásában betöltött szerepét *in vitro* kísérletekben vizsgáltuk tovább. A TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} egerek gonadális fehér zsírszövetéből sztromális vaszkuláris frakciókat (SVF) izoláltunk és beige irányú adipogén sejt differenciálásnak vetettük alá. Miután a sejtek elérték a 90% -os konfluenciát, 2 napig indukciós tápfolyadékot használtunk, majd a preadipocitákat a differenciációs tápfolyadékban tartottuk [188]. 14 napon belül a sejtek multilokuláris lipidcseppeket halmoztak fel, és a preadipociták fibroblaszt-szerű alakjából **(16/A ábra)** az *in vitro* differenciált adipociták jellegzetes fenotípusát mutatták **(16/A ábra)**. Hasonló proliferációs képességet figyeltünk meg a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} preadipociták esetében **(16/B ábra)**, és eredményeink alapján a beige adipociták azonos mennyiségű lipidet halmoztak **(16/C ábra)** fel és zsírcsepp méretük sem volt eltérő **(16/D ábra)**. A TG2 adrenerg válaszban betöltött szerepének vizsgálatához a differenciálódott beige adipocitákat 10 μM arterenollal, fenilefrinnel, CL-316,243-mal vagy forskolinnal kezeltük további 4 órán keresztül. A differenciáltatás sikerességét preadipocita és beige marker gének expressziójának mérésével vizsgáltuk **(16/E-I ábra)**. 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 [210,211], az Ucp1, Tbx1, Tnfrsf9 és Tmem26 mindkét genotípusban szignifikánsan emelkedett. Az Ucp1 és Tbx1 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az adrenergkezelés nélküli sejtekben, valamint adrenergkezelések hatására is TG2 hiányában. Az adrenerg kezelések után a Tnfrsf9 és a Tmem26 expressziója nem volt különböző a genotípusokban. Eredményeink arra utalnak, hogy a beige differenciálódás fenotípusosan mindkét sejtípusban hasonlóan ment végbe, és a beige adipociták adrenerg válasza részben különbözött TG2 hiányában.

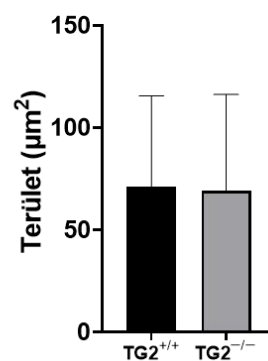
A



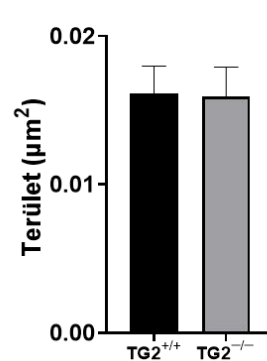
B



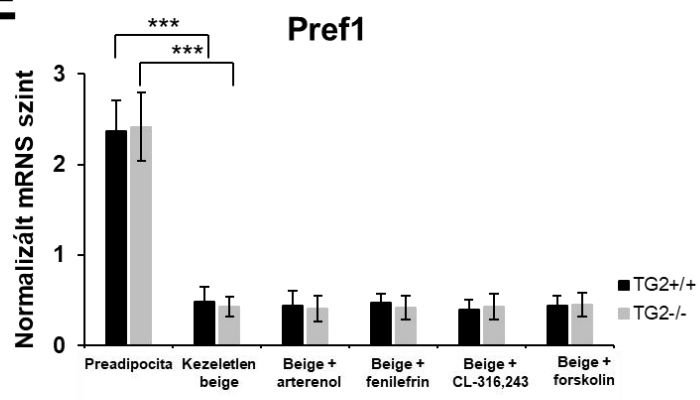
C

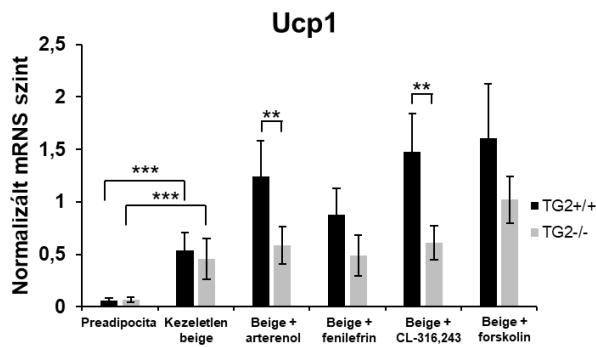
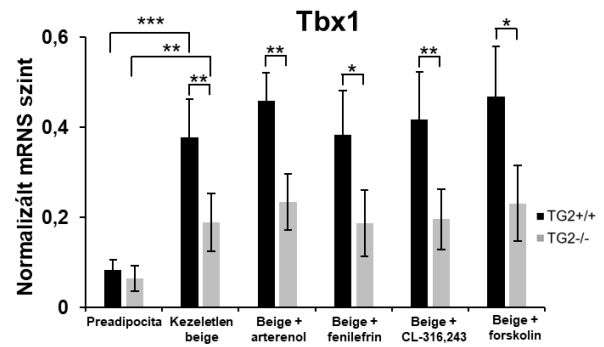
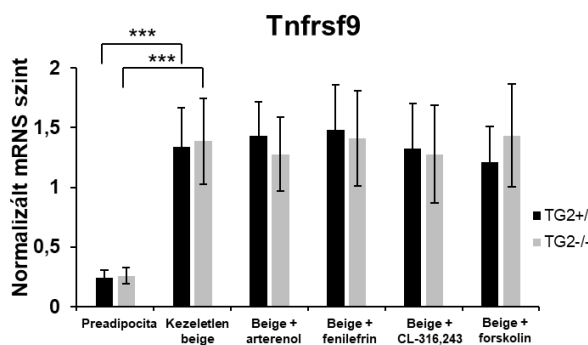
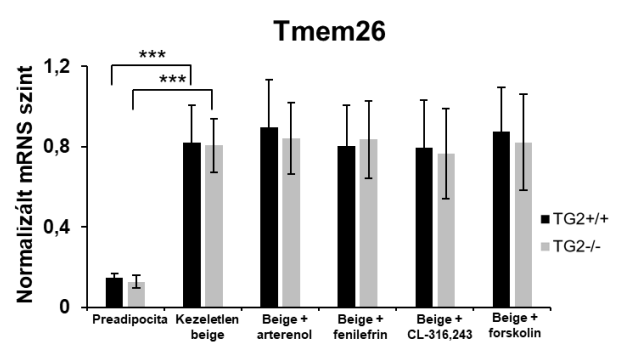


D



E



F**G****H****I**

16. ábra: A gonadális zsírszövetből izolált TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták beige irányú differenciálódása sikeres volt

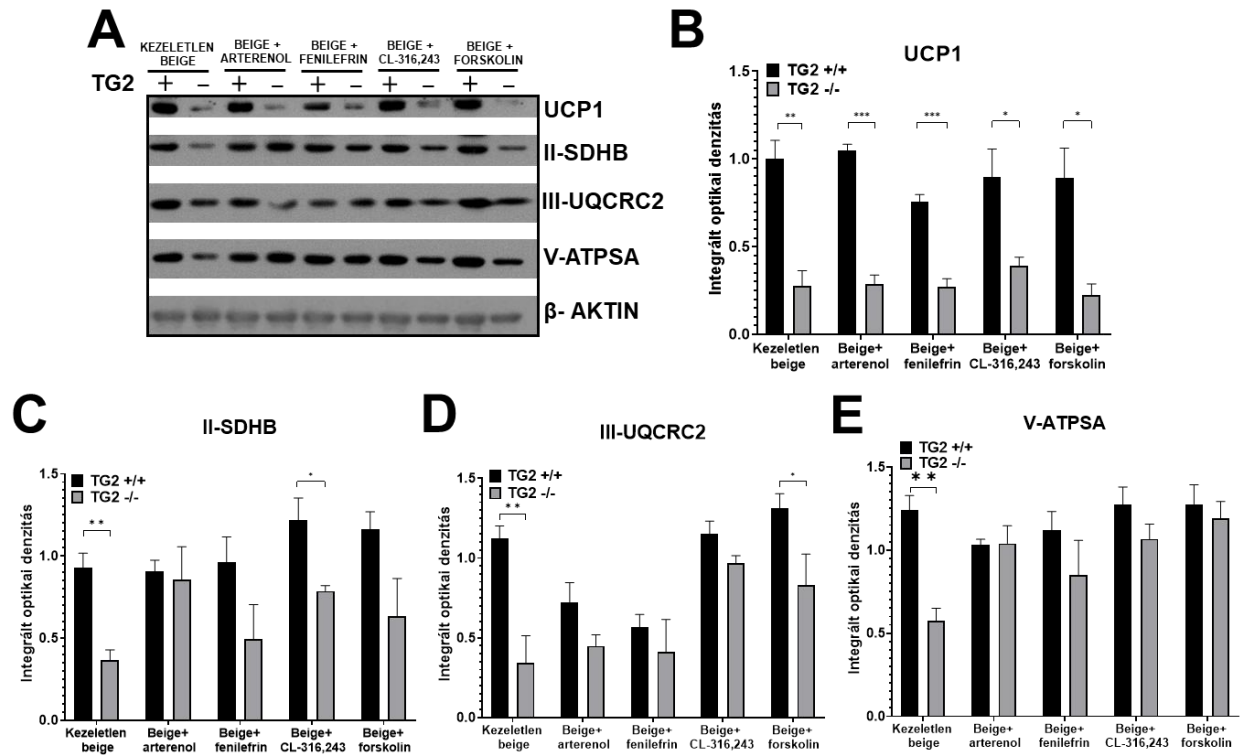
(A) A preadipociták és a differenciált beige sejtek reprezentatív fáziskontraszt mikroszkópos felvételei TG2^{+/+} és TG2^{-/-} genotípusban. A képeket az EVOS FL Cell Imaging alkalmazásával készítettük. A méretarány 400 μ m-t jelöl. (B) Szulforodamin B vizsgálatokat végeztünk a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták proliferációs képességeinek mérésére ($n = 3$). (C) A lipid cseppek mérete és (D) teljes zsírtartalma. (E-I) A preadipocita marker (*Pref1*) és a beige marker gének (*Ucp1*, *Tbx1*, *Tnfrsf9*, *Tmem26*) mRNA szintjének valós idejű qPCR elemzése (Light Cycler 96, Roche Diagnostics) preadipocitákban és differenciált beige adipocitákban. A differenciálódott sejteket 10 μ M arterenollal, fenilefrinnel, CL-316,243-mal vagy forskolinnal kezeltük 4 órán át a begyűjtés előtt. Az összes vizsgált gént ciklofilinre normalizáltuk. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. ($n=3$) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

6.10. A mitokondriális fehérje komplexek és az UCP1 expressziója, valamint a mitokondriális dehidrogenáz aktivitás, a NADH és ATP tartalom szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} adipocitákban

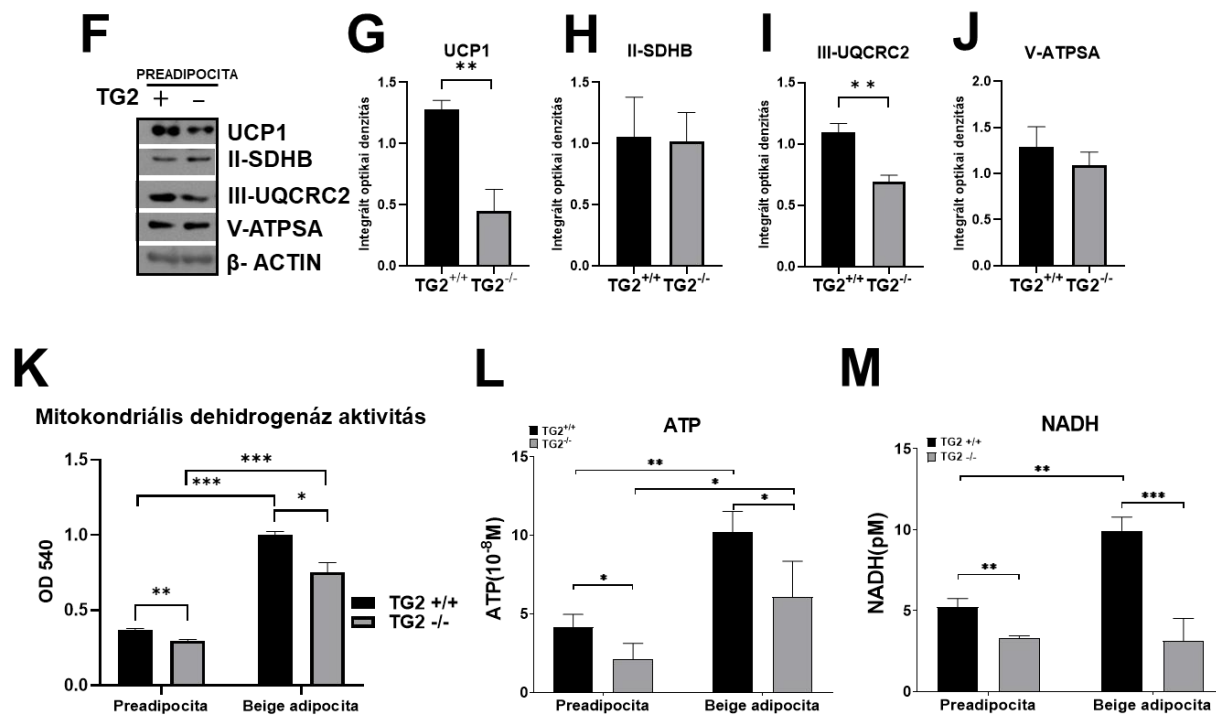
A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} beige sejtek mitokondriumainak összehasonlításához megvizsgáltuk az UCP1 és a mitokondriális fehérje komplexek alegységeinek az expresszióját **(17/A ábra)**. Az UCP1 kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} beige adipocitákban, valamint az adrenerg kezelések hatására is a TG2^{+/+} sejtekhez képest **(17/B ábra)**. 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, további adrenerg kezelések nélkül is **(17/C-E ábra)**. A II. komplex alacsonyabb expressziót mutatott TG2 hiányában a CL-316,243 kezelés után, míg a III. komplex esetében a forskolin csökkentette az expressziót a TG2^{-/-} sejtekben **(17/C, D ábra)**. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} beige zsírsejtek közötti különbségek nem voltak összefüggésben az adrenerg kezelésekre adott megváltozott válaszokkal, hiszen már a differenciált beige sejtekben is kimutattuk a fehérje expressziós különbségeket további adrenerg agonista kezelések nélkül is **(17/B-E ábra)**. 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 **(17/F-J ábra)**. Meglepő módon az UCP1 kifejeződését detektáltuk preadipocitákban is, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2^{-/-} sejtekben **(17/G ábra)**. Az a figyelemre méltó megfigyelés, miszerint a preadipociták beige vagy barna differenciálódási markert fejezhetnek ki, már ismert az irodalomból [212]. Ezenkívül a mitokondriális III. komplex expressziója a TG2-hiányos preadipocitákban is alacsonyabb volt **(17/I ábra)**, míg a II. komplex és az V. komplex esetében nem volt szignifikáns különbség a TG2^{+/+} preadipocitákhoz képest **(17/H, J ábra)**. 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 **(17/K ábra)**. 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 **(17/L, M ábra)**, és mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk a TG2 hiányos

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

BEIGE ADIPOCITÁK



PREADIPOCITÁK



17. ábra A mitokondriális fehérje komplexek és az UCP1 expressziója, valamint a mitokondriális dehidrogenáz aktivitás, a NADH és ATP tartalom szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige adipocitákban

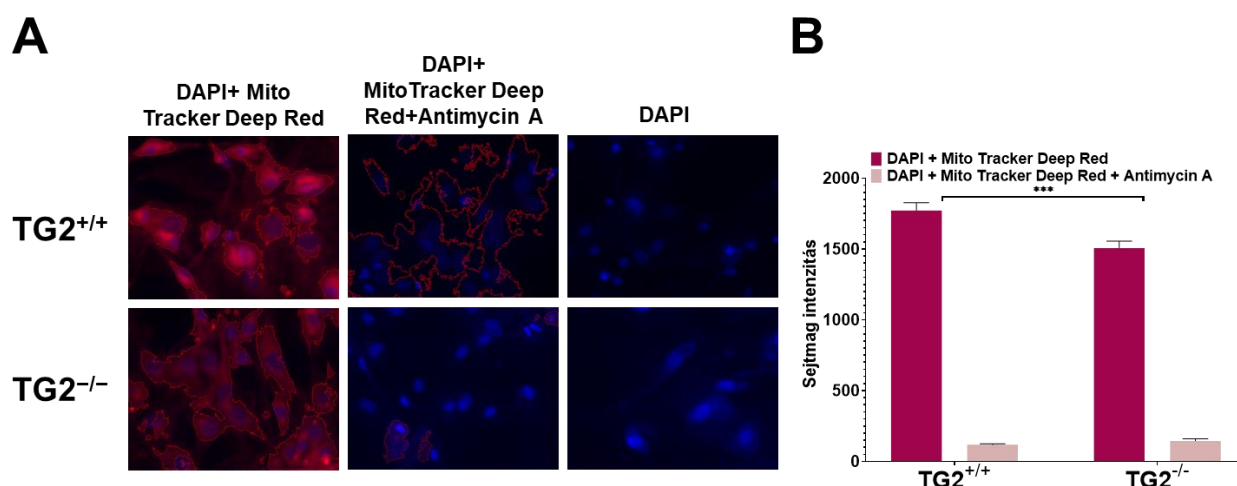
(A) Az UCP1, SDHB, UQCRC2, ATPSA fehérjék expresszióját a beige adipocitákban Western blottal vizsgáltuk ($n = 3$). A differenciálódott sejteket 10 μ M arterenollal, fenilefrinnel, CL-316,243-tal vagy forskolinnal is kezeltük 4 órán át a begyűjtés előtt. β -AKTIN-t használtunk kontrollként a normalizáláshoz. **(B-E)** Az UCP1, SDHB, UQCRC2 és ATPSA fehérjék Western blotjának kvantitatív elemzése. **(F)** A preadipociták UCP1, SDHB, UQCRC2, ATPSA reprezentatív Western blot elemzése ($n = 3$). **(G-J)** A preadipociták UCP1, SDHB, UQCRC2 és ATPSA fehérjéinek Western blotjainak kvantitatív elemzése. **(K)** Mitokondriális dehidrogenáz aktivitás (MTT teszt) preadipocitákban és differenciált beige sejtekben ($n = 3$). **(L)** A preadipociták és a beige adipociták ATP-termelése. **(M)** A preadipociták és a beige adipociták NADH termelése. A szignifikancia számításokhoz t -tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. ($n = 4$) * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. A NADH és ATP eredményeket átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. A szignifikancia számításokhoz t -tesztet alkalmaztunk. ($n = 3$) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

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

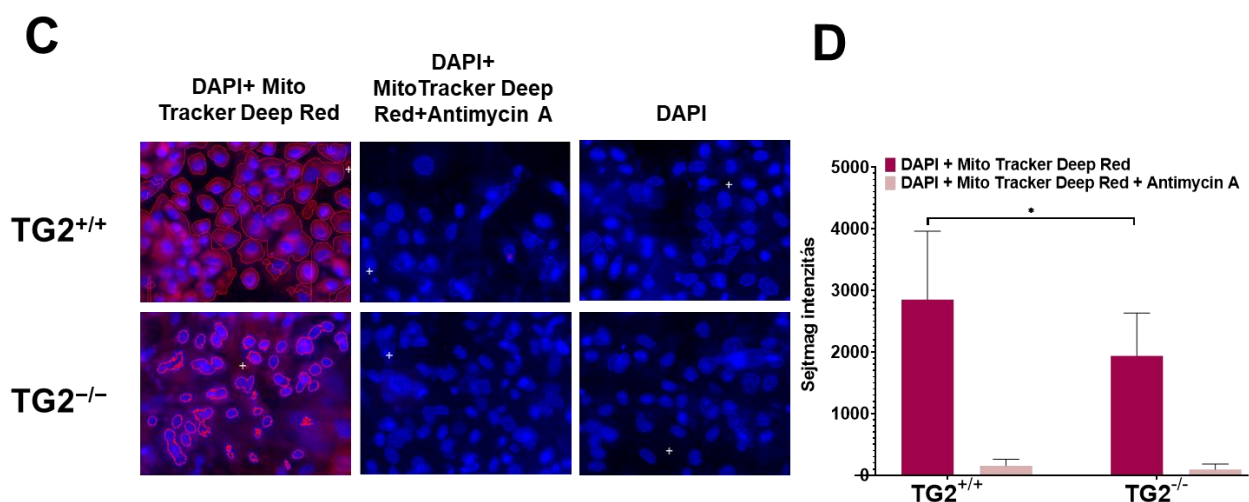
A preadipociták (**18/A ábra**) és a beige adipociták (**18/C ábra**) mitokondriális membránpotenciáljának vizsgálatához lézer-pásztázó citometriát (LSC) alkalmaztunk. A mitokondriumokat Mitotracker Deep Red festékkel, a sejtmagokat DAPI-val festettük. A MitoTracker Deep Red mitokondriális retenciója a mitokondriális membrán potenciáljától függ [213,214], 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 (**18/B ábra**) és a beige zsírsejtekben (**18/D ábra**) 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

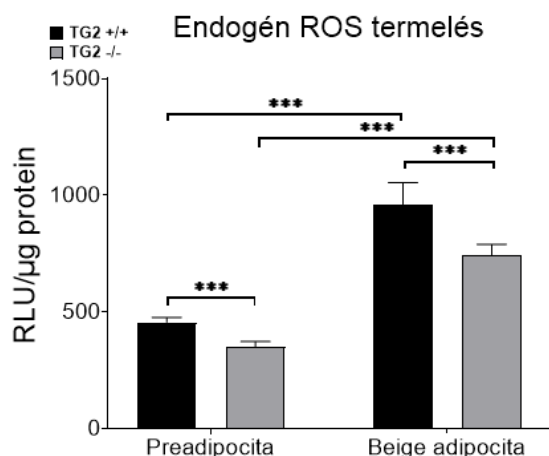
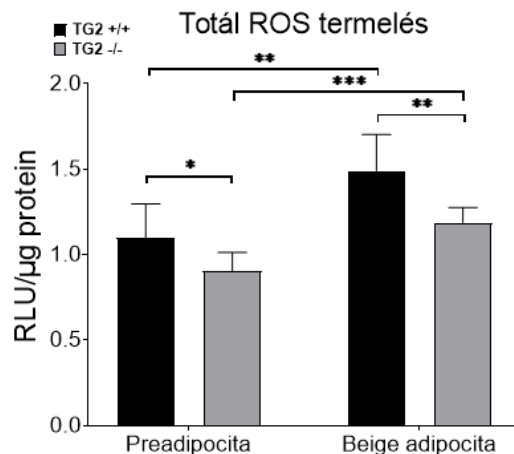
található ubikinon helyek [215,216]. Fontos megjegyezni, hogy éppen ezen komplexek fehérje-expressziójában figyeltünk meg különbségeket (**17/D, I és K ábra**). Erre való tekintettel tanulmányoztuk a preadipociták és a beige zsírsejtek endogén (**18/E ábra**) és teljes ROS termelését (**18/F ábra**). 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.

PREADIPOCITÁK



BEIGE ADIPOCITÁK



E**F**

18. ábra: A mitokondriális membránpotenciál szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} preadipocitákban és beige adipocitákban a TG2^{+/+} sejtekhez képest

(A) A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták lézer-pásztázó citometriával (LSC) készült reprezentatív képei. A sejtek számának meghatározásához DAPI festést alkalmaztunk, kontrollként a sejteket DAPI-val és Mito Tracker Deep Red-del festettük antimicyn A-val kombinálva. A Mito Tracker Deep Red-del festett sejteket használtunk a mitokondriális membránpotenciál ábrázolására.

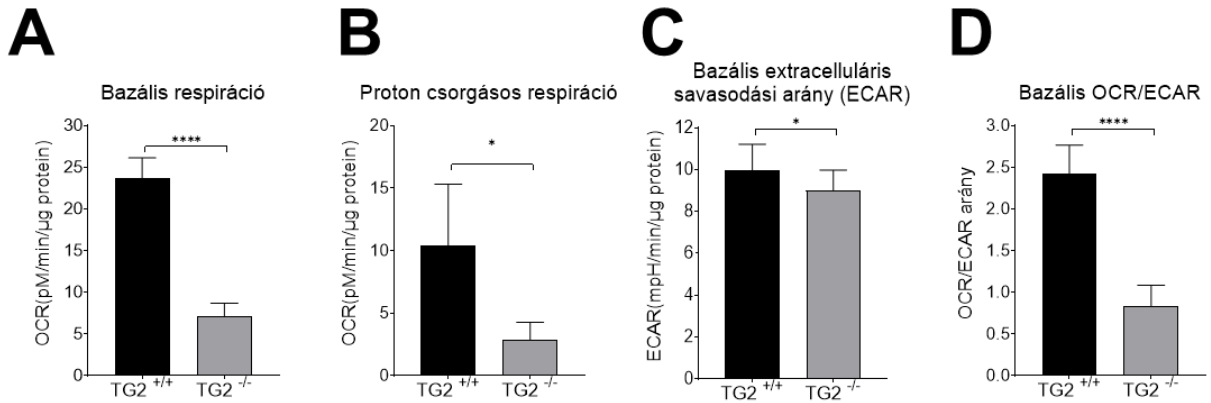
(B) A preadipociták mitokondriális membránpotenciáljának kvantitatív elemzése. **(C)** A differenciált beige adipociták lézer-pásztázó citometriával készült reprezentatív képei mindkét genotípusban (TG2^{+/+} és TG2^{-/-}). A sejtek számának meghatározásához DAPI festést alkalmaztunk, kontrollként a sejteket DAPI-val és Mito Tracker Deep Red-del festettük antimicyn A-val kombinálva. A Mito Tracker Deep Red-del festett sejteket használtunk a mitokondriális membránpotenciál ábrázolására. **(D)** A beige sejtek mitokondriális membránpotenciáljának kvantitatív elemzése. **(E)** A preadipociták és beige zsírsejtek endogén ROS-termelése. **(F)** A preadipociták és a beige zsírsejtek totál ROS-termelése. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. (n=4)

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001. Az endogén és a totál ROS termelés mérést Synergy Multimode Microplate Reader készülékkel végeztük. (n = 4) * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

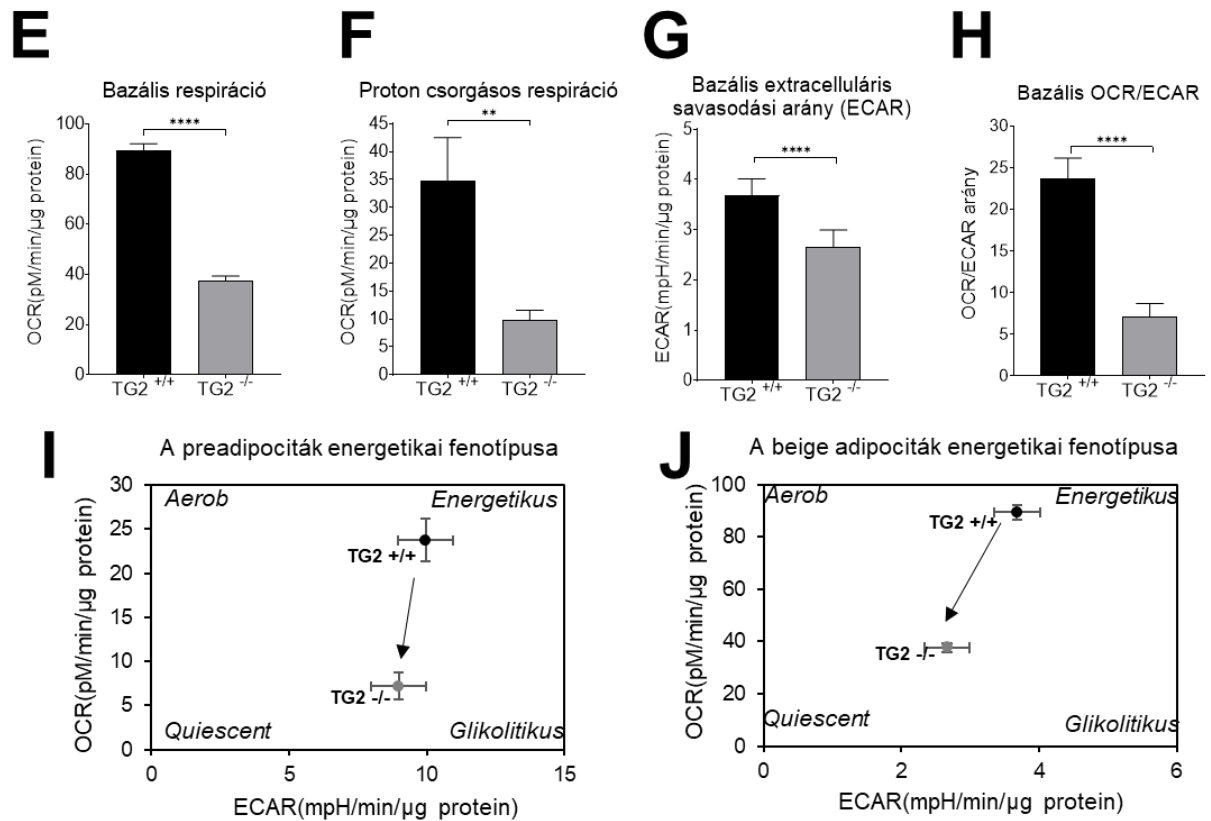
6.12. A TG2^{-/-} preadipociták és beige zsírsejtek hipometabolikusak a TG2^{+/+} sejtekhez képest

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 **(19/A, B ábra)** és beige adipocitákban **(19/E, F ábra)** szignifikánsan alacsonyabb bazális és proton csorgásos légzést figyeltünk meg a TG2^{+/+} sejtekhez viszonyítva. Ezzel párhuzamosan, a TG2^{-/-} preadipocitákban **(19/C ábra)** és beige zsírsejtekben **(19/G ábra)** 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 **(19/D ábra)** és beige adipocitákhoz **(19/H ábra)** 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” sejt-ként definiáltuk őket **(19/I, J ábra)**. Ezzel szemben eredményeink határozottan arra utalnak, hogy TG2 hiányában a sejtek hipometabolikusak **(19/I, J ábra)**.

PREADIPOCITÁK



BEIGE ADIPOCITÁK



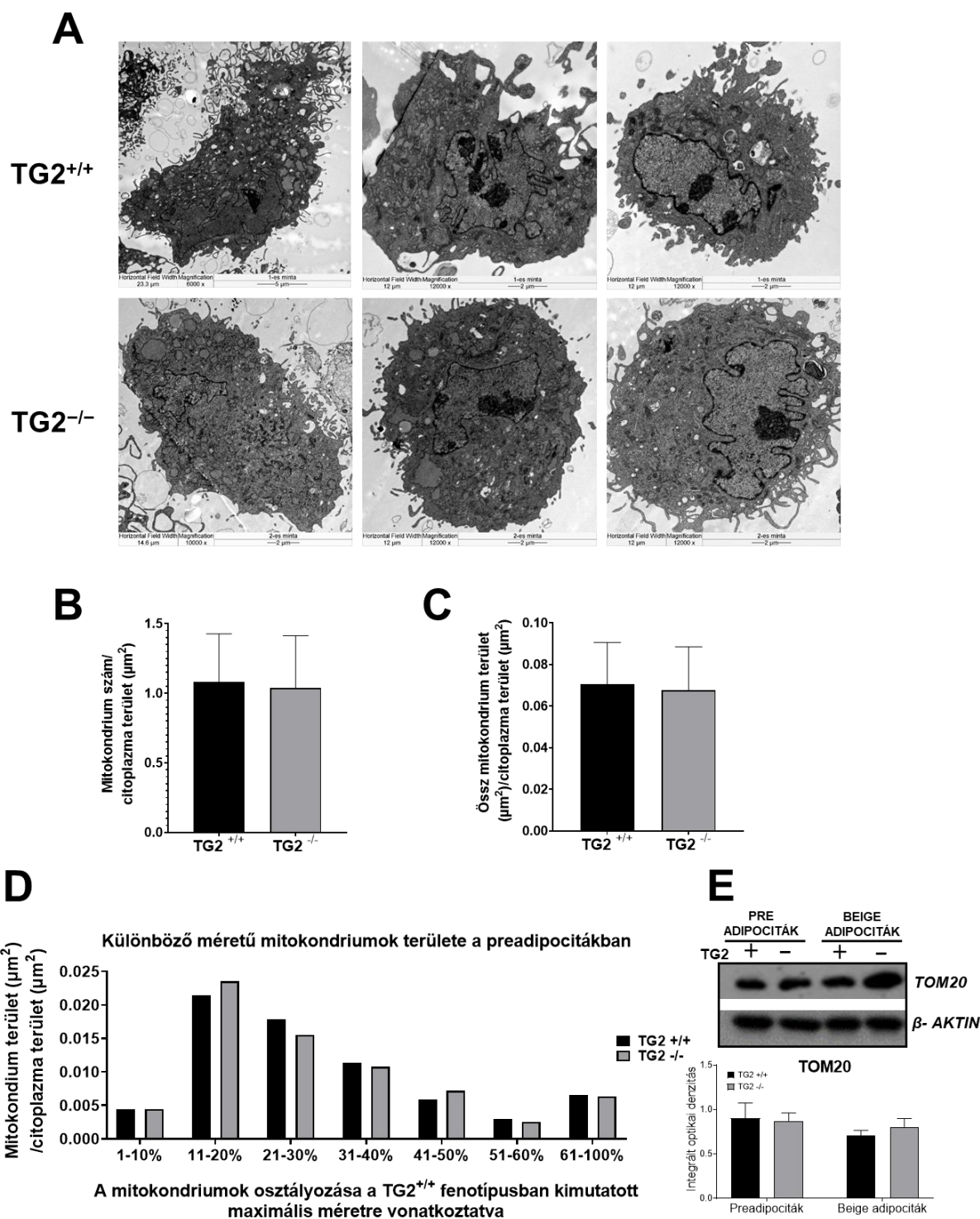
19. ábra: $TG2^{+/+}$ és $TG2^{-/-}$ preadipociták és beige adipociták bioenergetikai profiljai

(A) A preadipociták mitokondriális bazális oxigénfogyasztása (OCR). (B) A preadipociták oligomicinnel gátolt oxigénfogyasztása. (C) A preadipociták bazális extracelluláris savasodási aránya (ECAR). (D) A preadipociták bazális OCR / ECAR aránya. (E) A beige adipociták mitokondriális bazális oxigénfogyasztása (OCR). (F) A beige adipociták oligomicinnel gátolt oxigénfogyasztása. (G) A beige zsírszövetek bazális extracelluláris savasodási aránya (ECAR).

(H) *A beige adipociták bazális OCR / ECAR aránya. (I) A preadipociták energetikai fenotípus-profilja (EPP). (J) A beige adipociták energetikai fenotípus-profilja (EPP).* Az oxigénfogyasztást és az extracelluláris savasodási arányt egyidejűleg mértük a Seahorse Bioscience XF-96 analizátorral. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. ($n = 4$) * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

6.13. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták mitokondriumainak száma és morfológiája nem különbözik

A preadipociták mitokondriumainak ultrastruktúráját transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) vizsgáltuk **(20/A ábra)**. Megállapítottuk, hogy a mitokondrium szám **(20/B ábra)** és a preadipociták citoplazmájában lévő teljes mitokondriális terület **(20/C ábra)** nem különbözött a genotípusok között. A mitokondriumokat méretük szerint is csoportosítottuk, azonban mitokondriális méretbeli különbséget sem tudtunk detektálni ezzel a megközelítéssel a genotípusok között **(20/D ábra)**. Az elektronmikroszkópos metszeteken sajnos a beige sejteket triacilglicerol tartalmuk miatt technikai okokból nem tudtuk megvizsgálni. Összességében elmondható, hogy az elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálattal nem tudtunk azonosítani különbségeket a mitokondriális hálózatban (a mitokondriumok számát és méretét tekintve). A citoszolból a mitokondriumokba történő fehérjetranszport hatékonyságának vizsgálatára, a TOM20 külső mitokondriális membrán transzlokáz fehérje expresszióját is mértük, amely nem különbözött a TG2-hiányos preadipocitákban és a beige adipocitákban a TG2^{+/+} sejtekhez képest **(20/E ábra)**. Ez az eredmény arra utal, hogy ezen a ponton a fehérjék mitokondriális importja nem különbözik a vizsgált genotípusokban.



20. ábra: Az elektronmikroszkóppal vizsgált TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták mitokondriumainak morfológiája nem különbözik

(A) A preadipociták reprezentatív elektronmikroszkópos képei mindkét genotípusban (TG2^{+/+} és TG2^{-/-}) (nagyítások: 6000x, 10000x, 12000x). (B-C) A mitokondriumok számának és a teljes mitokondriális terület (µm²) mennyiségi meghatározása a preadipociták citoplazmájában. (n

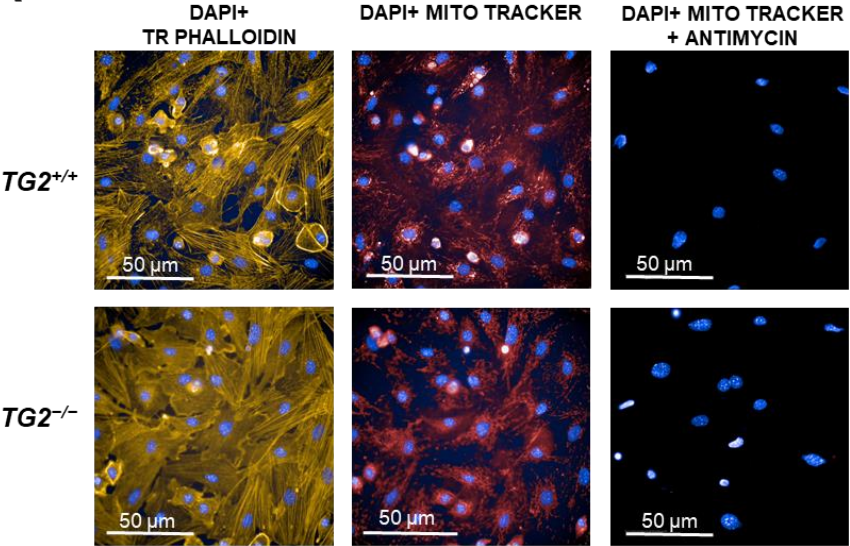
= 60 sejt / genotípus). **(D)** A mitokondriumok osztályozása méret szerint. A $TG2^{+/+}$ sejtekben kimutatott legnagyobb méretet 100% -nak tekintettük. **(E)** A preadipociták és a differenciált beige adipociták TOM20 expressziójának reprezentatív Western blot-analízise és kvantitatív elemzése. A statisztikai elemzéseket Student t-tesztel végeztük. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg (n=3).

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

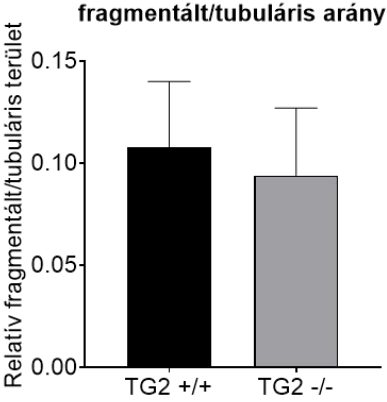
Eredményeink alapján felvetettük a kérdést, hogy a $TG2^{-/-}$ beige adipocitákban milyen típusú mitokondriális morfológia várható a $TG2^{+/+}$ sejtekhez képest. Mivel a TEM során kapott ultravékony metszetek nem mindig alkalmasak a mitokondriális hálózat összetettségének megállapítására, és kísérleteink során csupán a preadipociták vizsgálatát tette lehetővé, ezért fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk a mitokondriumok morfológiáját és a mitokondriális hálózat szerkezetét **(21/A és 21/D)**. Mindkét genotípusban a dominánsan jelenlévő mitokondriális morfológia a tubuláris forma volt a preadipocitákban **(21/C ábra)** és a beige adipocitákban **(21/F ábra)** is. Bár a fragmentált / tubuláris mitokondriumok aránya nem különbözött a preadipocitákban **(21/B ábra)**, a $TG2^{-/-}$ beige zsírsejtekben szignifikánsan több fragmentált mitokondriumot azonosítottunk a $TG2^{+/+}$ kontroll sejtekhez képest **(21/E ábra)**.

PREADIPOCITÁK

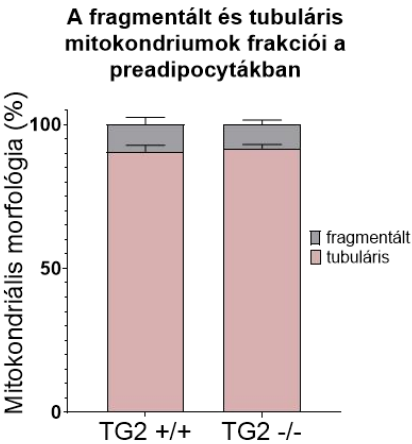
A



B

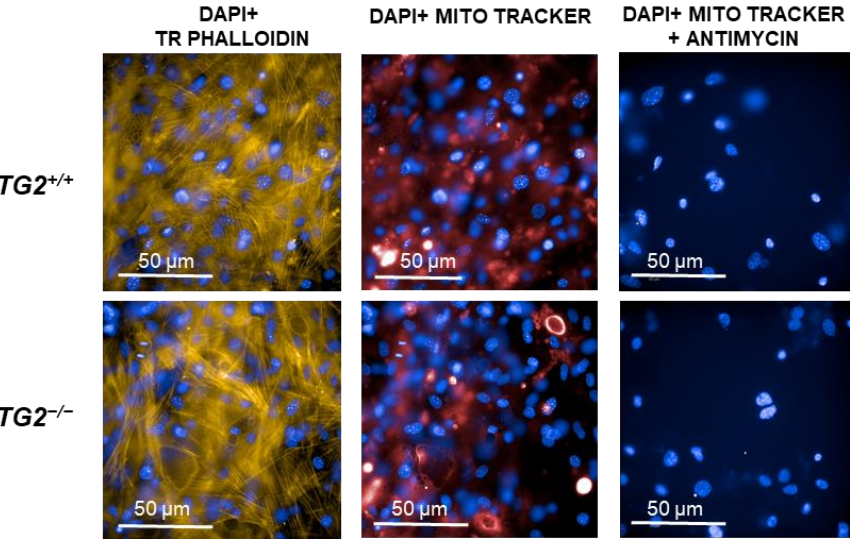


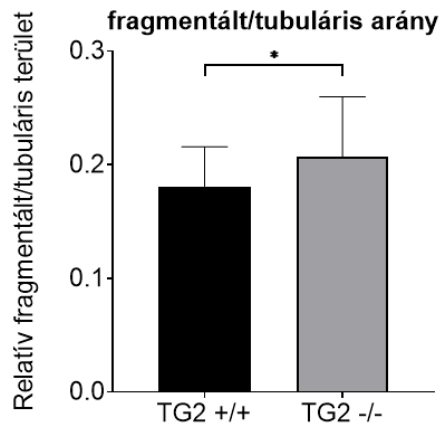
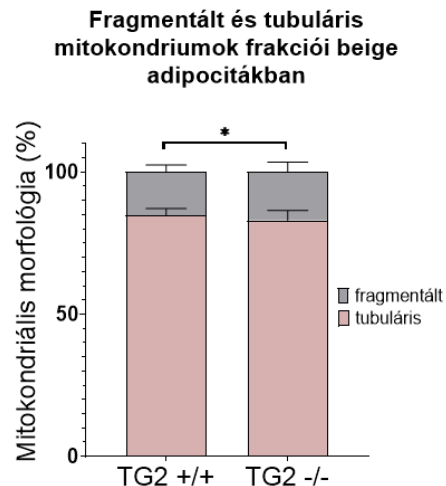
C



BEIGE ADIPOCITÁK

D



E**F**

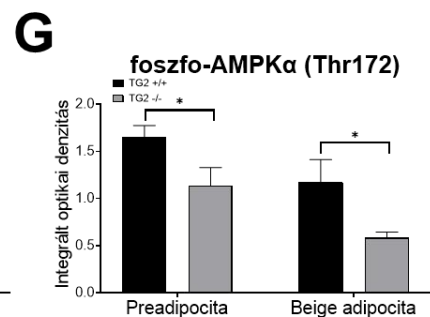
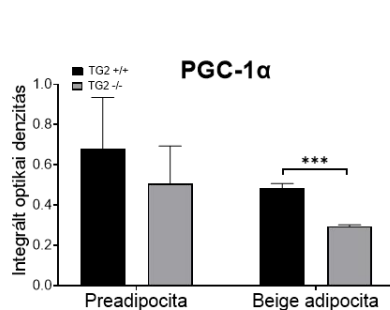
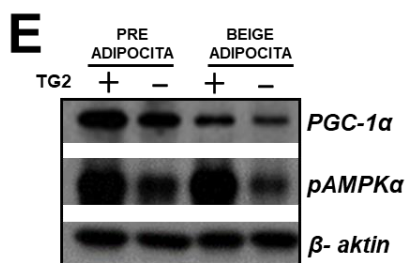
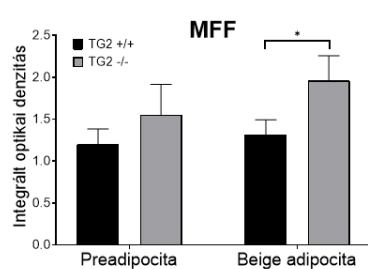
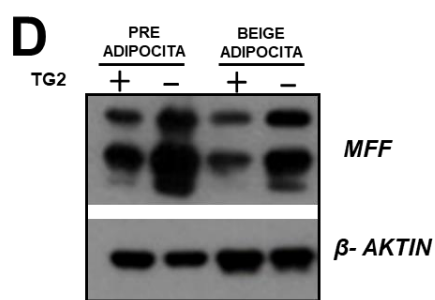
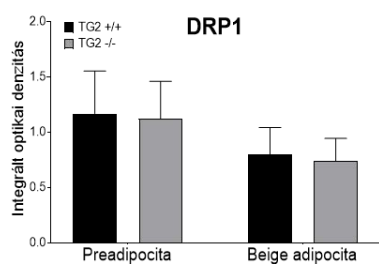
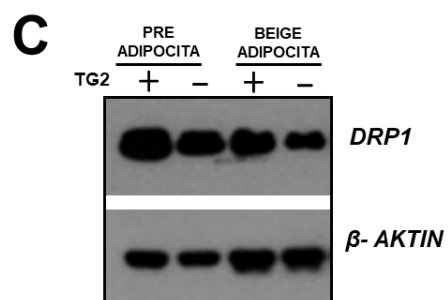
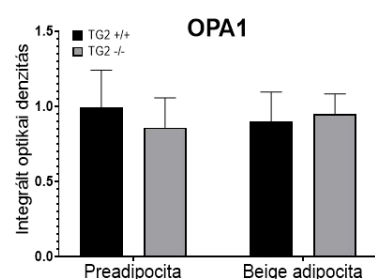
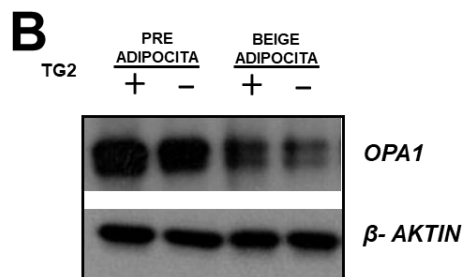
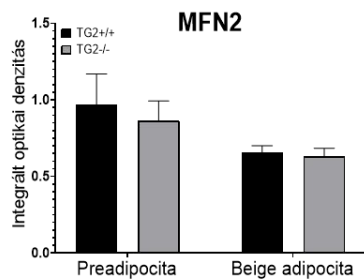
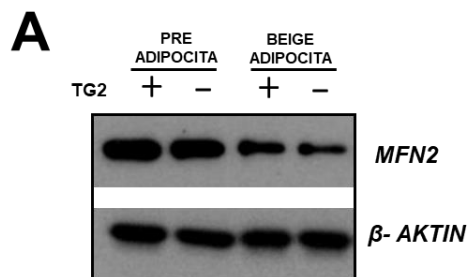
21. ábra: A preadipociták és a beige zsírsejtek mitokondriális morfológiájának vizsgálata

(A) Reprezentatív HCS vizsgálatok, amelyek a preadipociták mitokondriális morfológiáját mutatják mindkét genotípusban (TG2^{+/+} és TG2^{-/-}). A sejtek számának meghatározásához DAPI festést alkalmaztunk, kontrollként a sejteket DAPI-val és Mito Tracker Deep Red-del festettük antimycin A-val kombinálva. A mitokondriális morfológia meghatározásához Mito Tracker Deep Red festéket alkalmaztunk, az aktin filamentumok festésére Texas Red-X phalloidint használtunk. A méretarány 50 μ m-nek felel meg. **(B)** A preadipociták mitokondriális morfológiájának kvantitatív elemzése. **(C)** Fragmentált és tubuláris mitokondriumok frakciói preadipocitákban (%). **(D)** Reprezentatív, HCS képek, amelyek a beige adipociták mitokondriális morfológiáját mutatják (TG2^{+/+} és TG2^{-/-}). A sejtek számának meghatározásához DAPI festést alkalmaztunk, kontrollként a sejteket DAPI-val és Mito Tracker Deep Red-del festettük antimycin A-val kombinálva. A mitokondriális morfológia meghatározásához Mito Tracker Deep Red festéket alkalmaztunk, az aktin filamentumok festésére Texas Red-X phalloidint használtunk. A méretarány 50 μ m-nek felel meg. **(E)** A beige sejtek mitokondriális morfológiájának kvantitatív elemzése. **(F)** Fragmentált és tubuláris mitokondriumok frakciói beige zsírsejtekben (%). A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. (n=3) * $p < 0,05$

6.15. 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 (**22/A, B ábra**). 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 (**22/D ábra**). 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-hiányos 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 (**22/E és F ábra**). 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 zsírsejtekben történő indukálása között [217]. Megfigyeltük, hogy a foszforilált AMPK szintje csökkent a TG2^{-/-} preadipocitákban és a differenciált beige adipocitákban a TG2^{+/+} kontroll sejtekhez képest (**22/E és G ábra**).



22. ábra: Mitokondriális hasadás és fúziós fehérjék vizsgálata.

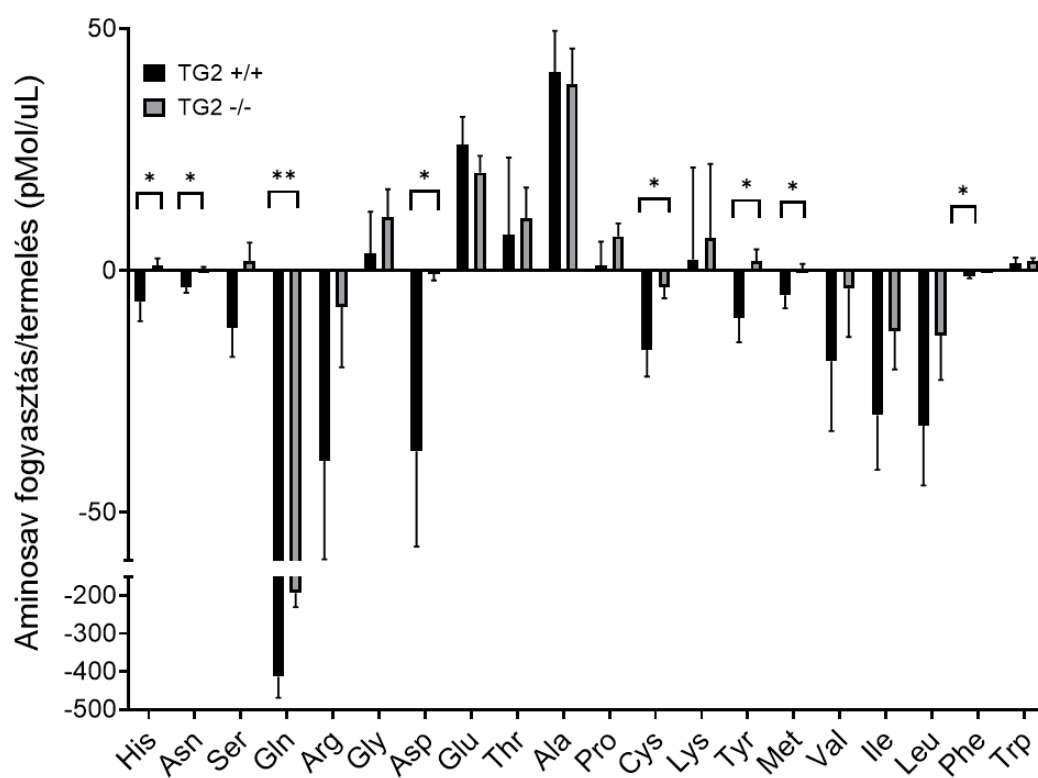
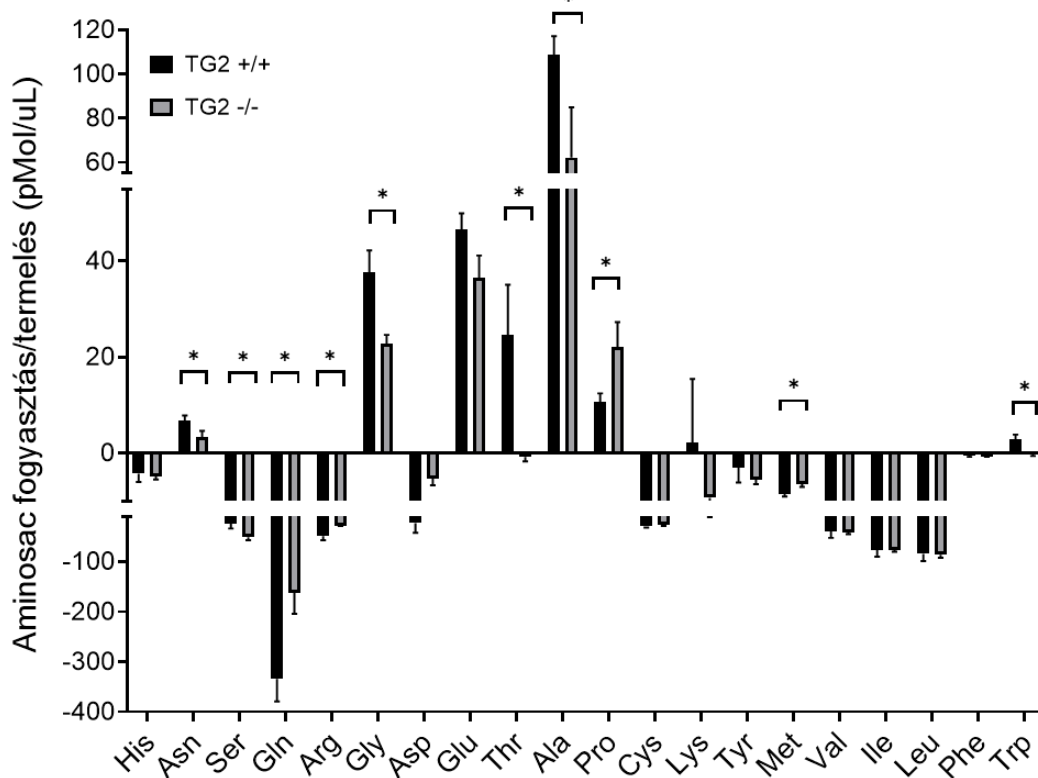
(A-B) A mitokondriális fúziós fehérjék (MFN2, OPA1) reprezentatív Western blot analízise és kvantitatív elemzése preadipocitákban és beige zsírsejtekben. **(C-D)** A mitokondriális hasadási fehérjék (DRP1, MFF) reprezentatív Western blot analízise és kvantitatív elemzése preadipocitákban és beige zsírsejtekben. A kapott eredményeket a β -AKTIN értékeivel normalizáltuk. A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. ($n=5$) * $p < 0,05$ **(E)** A preadipociták és a differenciált beige adipociták PGC-1 α és foszfo-AMPK α reprezentatív Western blot-analízise. **(F-G)** PGC-1 α , a foszfo-AMPK α fehérjék Western-blotjának kvantitatív elemzése ($n=3$). A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. ($n=3$) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

6.16. A TG2^{-/-} és TG2^{+/+} preadipociták és beige sejtek aminosav termelése és fogyasztása

Mivel az eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a TG2^{-/-} sejtek alacsonyabb mitokondriális aktivitása elsősorban nem az ETC sérüléseinek a következménye, ezért vizsgálni kívántuk az energiatermeléshez elérhető szubsztrátok szintjét. A citromsav-ciklus a sejtek anyagcseréjében, beleértve a zsír anyagcserét is, elosztórendszerként működik: funkciója az aktuális energetikai viszonyok szerint változik. Az aminosavak egy részének lebomlása során citromsav-ciklus intermedierek keletkeznek, melyek nem csak energitermelésre használódhatnak fel, hanem különböző bioszintetikus utak kiindulási vegyületei is lehetnek. Erre való tekintettel vizsgáltuk meg a sejtek aminosav fogyasztását és termelését. A preadipociták esetén a TG2^{+/+} sejtek szignifikánsan több hisztidint, aszparagint, glutamint, aszparaginsavat, ciszteint, tirozint, metionint és fenil-alanint (His, Asn, Gln, Asp, Cys, Tyr, Met, Phe) fogyasztottak **(23/A ábra)**. A legjelentősebb különbséget a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} preadipociták között a glutamin fogyasztásában láttuk, ami több szempontból is érdekes lehet. Ez az aminosav egyrészt a trikarbonsav-ciklus anaplerózisát okozhatja, ami magasabb energiatermelést eredményez a TG2^{+/+} sejtekben. A glutamin felhasználásának másik lehetséges módja a zsírsavak szintetizálása redukzív karboxilezés útján. Szakirodalmi adatok alapján a glutamin a legfőbb szénforrás a *de novo* zsírsavszintézisben barna zsírsejtek esetén [218]. Ilyenkor a glutamin alfa-ketoglutarátot képez a glutamáton keresztül, az alfa-ketoglutarát pedig redukzív karboxilezéssel citráttá alakul. A reakciót a NADPH-függő izocitrát-karboxiláz

katalizálja, és a keletkező citrát a hőtermeléshez szükséges zsírsavszintézishez használdik fel. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a glutamin a *de novo* zsírsavszintézis fő szénforrása is lehet a differenciálódó preadipocitákban, és szükséges lehet a beige adipociták működéséhez is.

A TG2^{+/+} beige zsírsejtek szignifikánsan több glutamint, arginint és metionint (Gln, Arg, Met) fogyasztottak, míg több aszparagint, glicint, treonint, alanint és triptofánt (Asn, Gly, Thr, Ala, Trp) termeltek. Ezzel szemben a TG2^{-/-} adipociták több szerint (Ser) vettek fel a tápfolyadékból és szignifikánsan több prolint (Pro) termeltek **(23/B ábra)**. A beige zsírsejtek esetén a glutamin fogyasztásban és alanin termelésben láttuk a legnagyobb eltéréseket a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} adipociták között. A glutamin zsírsavszintézisben betöltött szerepe mellett az irodalomban leírták, hogy patkányokból izolált adipociták exogén glutamint használnak, amely az egész testre extrapolálva fiziológiailag jelentős mennyiségnek tűnik [219]. Az alanin termeléssel kapcsolatban arról számoltak be, hogy a patkányok gonadális zsírjából alanin szabadul fel, ami jelentősen hozzájárulhat az egész szervezet alanintermeléséhez. A TG2^{-/-} sejtek csökkent alanin kibocsátása újabb hipometabolikus karakterük indikátora lehet.

A**A preadipociták aminosav termelése és fogyasztása****B****A beige adipociták aminosav termelése és fogyasztása**

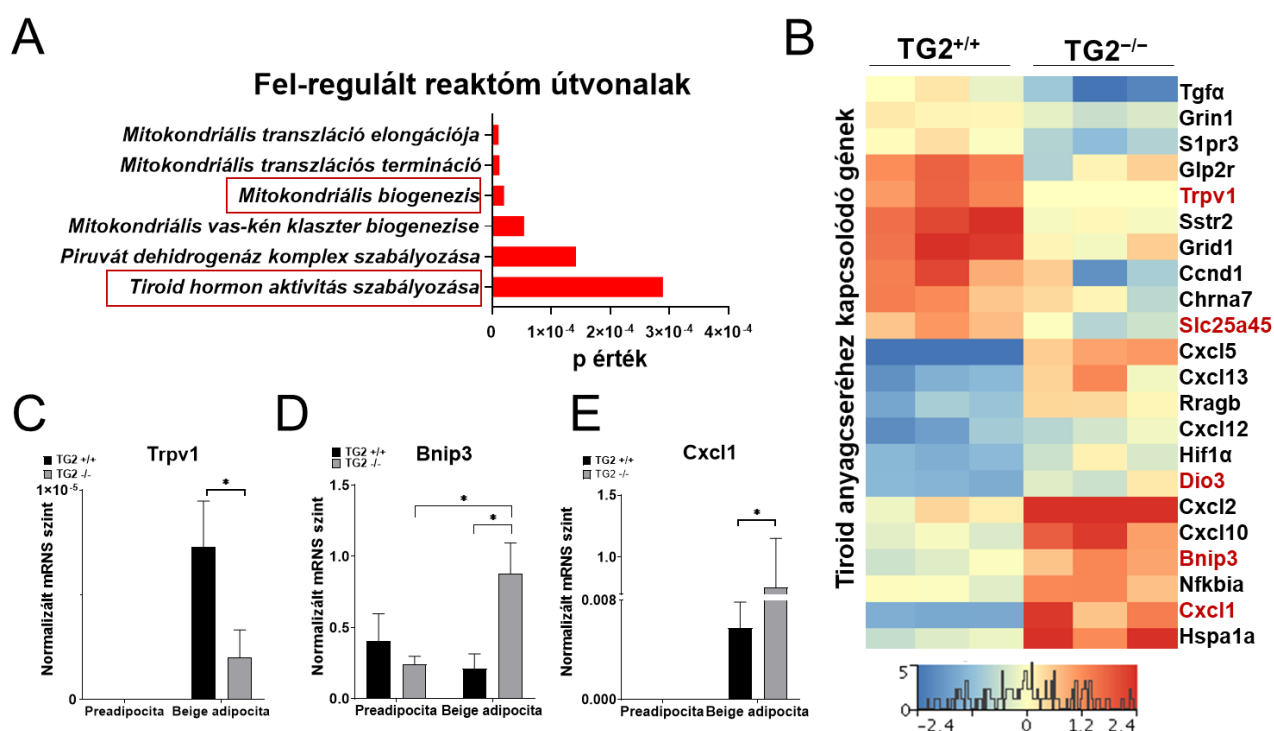
23. ábra: A preadipociták és a beige adipociták aminosav termelése és fogyasztása

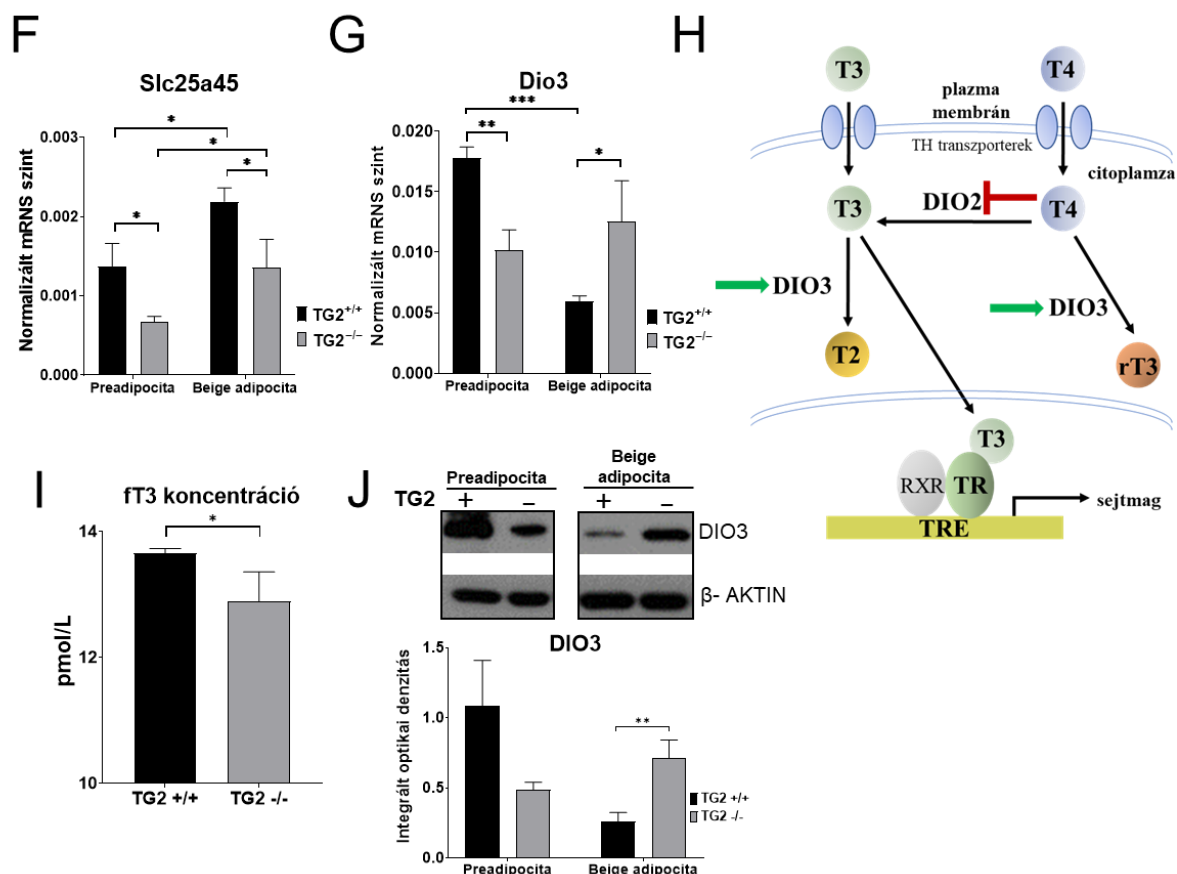
(A) A preadipociták aminosav termelése (pozitív értékek) és fogyasztása (negatív értékek) **(B)** A beige zsírsejtek aminosav termelése (pozitív értékek) és fogyasztása (negatív értékek). A szignifikancia számításokhoz t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg ($n = 3$, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

6.17. A tiroid hormont 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 a fel-regulált gének gén ontológiai (GO: reaktom út) elemzése azt mutatta, hogy ezek a differenciálisan expresszált gének többek között a mitokondriális biogenezis és a tiroidhormon aktivitás szabályozása szempontjából jelentősek **(24/A ábra)**. Tekintettel arra, hogy a tiroidhormon-aktivitás szabályozása volt az egyik legjelentősebb reaktom útvonal, megkíséreltük azonosítani, hogy a mely differenciálisan expresszáldó gének szabályozódnak a tiroid hormon receptor α (THRA) által **(24/B ábra)**. A kapott tiroid anyagcserével kapcsolatos gének közül azokat a fel- és le-reguláltakat választottuk ki validálásra, amelyek irodalmi adatok alapján alátámaszthatja a barnulási és mitokondriális funkcióval kapcsolatos korábbi eredményeinket. A TG2^{-/-} beige mintákban a fel-regulált gének tekintetében a Bnip3 gént validáltuk **(24/D ábra)**, amely részt vesz a mitokondriális hasadás pozitív szabályozásában [220], amit már korábban megfigyeltünk a TG2^{-/-} beige adipocitákban. Elemeztük továbbá az elhízáshoz is asszociált Cxcl1 gént **(24/E ábra)** [221] és a pajzsmirigy hormonok lebontásért felelős Dio3 gént **(24/G ábra)** [222] kvantitatív valós idejű PCR-rel. A TG2^{-/-} beige sejtekben le-regulált gének közül validálásra a mitokondriális működéshez kapcsolódó Trpv1 [223] **(24/C ábra)** és Slc25a45 [224] **(24/F ábra)** 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 **(24/C-G ábra)**. Fontos kiemelni, hogy eredményeink alapján a Dio3 gén, amely az energia-anyagcserében fontos szerepet játszó pajzsmirigy hormonok hatását csökkenti [222], a TG2^{-/-} beige adipocitákban jelentősen magasabb szinten expresszáldik **(24/G ábra)**.

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 **(24/H ábra)**. A 3,5,3'-trijód-L-tironin, más néven T3, döntő szerepet játszik a fejlődéssel, a differenciálódással és az anyagcserével kapcsolatos különféle folyamatokban [225]. Ezenkívül a T3 mind a sejtmagokban, mind a mitokondriumokban megtalálható, elősegítve a mitokondriális biogenezist [226]. Megmértük a szabad T3 (fT3) koncentrációt a beige adipociták sejtfelülűszojában. 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 felülűszojában a TG2^{+/+} kontroll mintákhoz képest, ami arra utalhat, hogy a magasabb szinten expresszáldó DIO3 annak egy részét lebontja ebben a sejtípustban **(24/I ábra)**. Ezt az elképzelést gén **(24/G ábra)** és fehérje expressziós eredményeink **(24/J ábra)** 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.



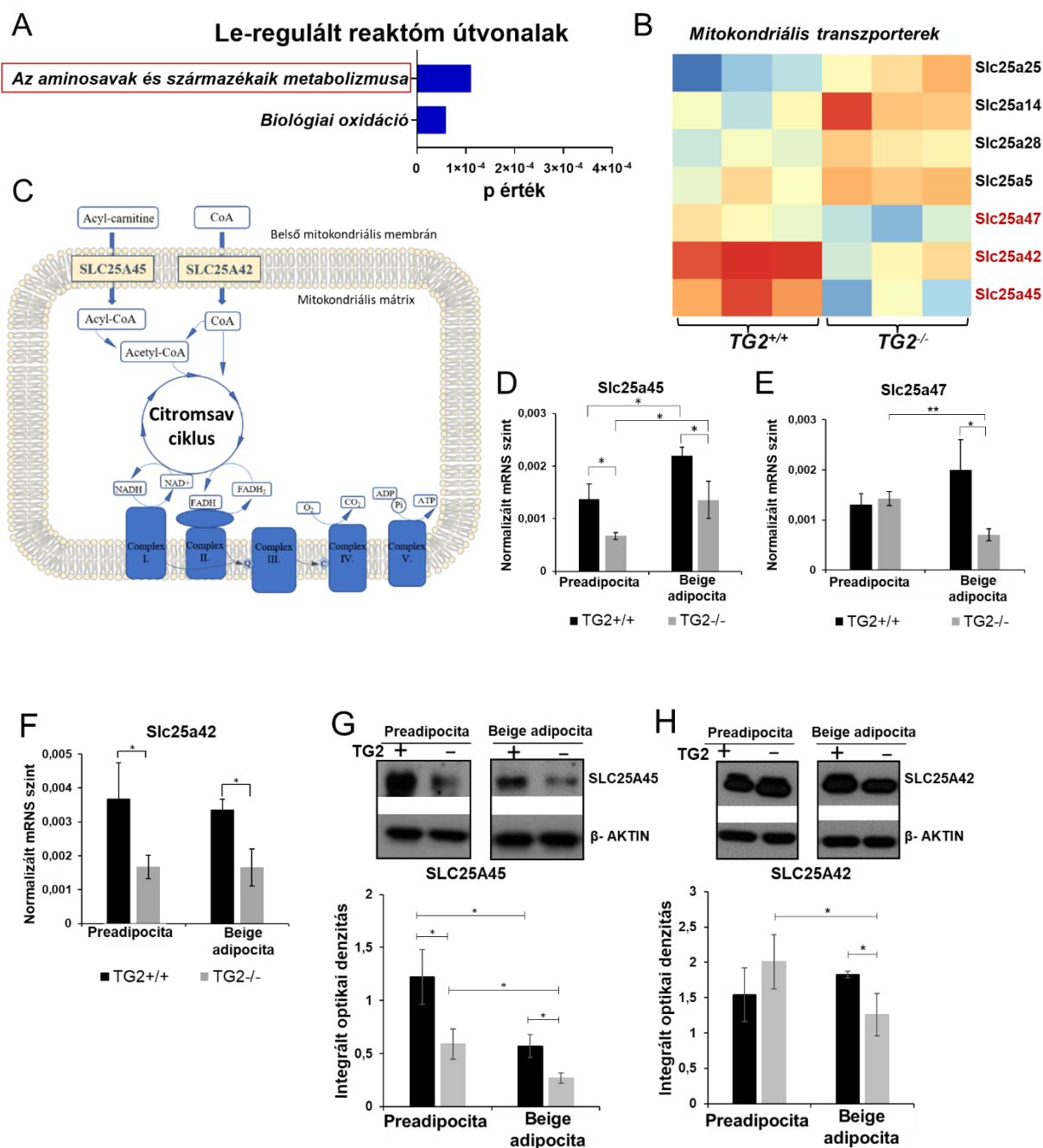


24. ábra: A TG2^{-/-} beige adipocitákban fel-regulált reakció útvonala és validálása

(A) A TG2^{-/-} beige zsírsejtekben fel-szabályozott reakció útvonala a gén ontológia (GO: reakció útvonala) elemzés alapján. (B) A tiroid-anyagcserével kapcsolatos gének hő térképe beige zsírsejtekben. (C-G) A kiválasztott tiroid-anyagcserével kapcsolatos gének validálása valós idejű PCR-analízissel (Light Cycler 96, Roche Diagnostics). (H) A DIO3 működésének sematikus ábrázolása. (I) fT3 koncentráció a beige zsírsejtek felülűszojában (differenciációs médiumban). (J) A DIO3 reprezentatív Western blotja és kvantitatív elemzése preadipocitákban és differenciált beige adipocitákban. A szignifikancia számításokhoz *t*-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg (*n* = 3, * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001).

6.18. 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 expresszált gének az aminosavak és származékaik metabolizmusához valamint a biológiai oxidáció folyamatához kapcsolódnak **(25/A ábra)**. RNS szekvenálási adatainkból azonosítottuk a differenciálisan expresszált gének közül azokat, amelyek mitokondriális transzport folyamatokért felelősek **(25/B ábra)**. Megtaláltuk az aminosavakat szállító mitokondriális 'solute carrier' (SLC) transzportereket, és érdekes módon ezek a le-szabályozódott gének az acilkarnitin és a koenzim A transzportja révén szerepet játszanak a zsírsav anyagcserében is **(25/C ábra)**. 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 [224,227,228]. 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 **(25/B, D ábra)**. Az SLC25A45 expresszió és tiroid anyagcsere összefüggését már leírták a szakirodalomban, amikor egy feltételezett tiroid válasz elemet találtak az SLC25A45 gén promóter régiójában [229]. Az RNS szekvenálási adatok validálását kvantitatív valós idejű PCR-rel **(25/D-F ábra)** és Western blot-analízissel **(25/G-H ábra)** végeztük el, amelyek azt mutatták, hogy az SLC25A45 mRNS és fehérjeszint is szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} beige adipocitákban a vad típusú kontroll sejtekhez képest **(25/D, G ábra)**. Az SLC25A45 fontos ortológ génje az SLC25A47, amely szintén le-regulált a TG2^{-/-} adipocitákban **(25/B ábra)**, emellett alacsonyabb expressziót detektáltunk az SLC25A42 esetében is **(25/B, F, H ábra)**, amely a koenzim-A és az ADP mitokondriumba történő transzportjáért felelős, és ilyen módon fontos szerepet játszik az energiatermelésben és -hasznosításban is [230-232].



25. ábra: TG2 hiányában a zsírsavak, aminosavak és a koenzim A transzportja a mitokondrium mátrixába alacsonyabb hatékonyságú

(A) A TG2^{-/-} beige zsírsejtekben le-szabályozott reakciók útvonalak a gén ontológia (GO: reakciók útvonal) elemzés alapján. (B) Differenciálisan expresszált mitokondriális transzporterrel kapcsolatos gének hőterképe beige zsírsejtekben. (C) A TG2^{-/-} beige adipocitákban le-regulált mitokondriális transzporterek funkciójának sematikus ábrázolása. (D-F) A TG2^{-/-} beige adipocitákban le-regulált mitokondriális transzportért felelős gének validálása valós idejű qPCR analízissel (Light Cycler 96, Roche Diagnostics). (G) Az

SLC25A45 reprezentatív Western blotja és kvantitatív elemzése preadipocitákban és differenciált beige sejtekben. **(H)** Az *SLC25A42* reprezentatív Western blotja és kvantitatív elemzése preadipocitákban és differenciált beige sejtekben. A szignifikancia számításokhoz *t*-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg ($n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

7. 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 [233,234]. Az UCP1 expressziójának csökkenése kóros következményekkel jár: az UCP1 pozitív sejtek hiánya transzgenikus egerekben fokozott hajlandóságot vált ki az elhízásra és a cukorbetegsége [235], és az UCP1 KO egerekben elhízás alakul ki még termoneutrális körülmények között is, ha magas zsírtartalmú étrenden tartják az állatokat [236]. A termogén humán barna zsírszövet jellemzőinek részletes leírásához még további vizsgálatok szükségesek, azonban számos kutatás kimutatta, hogy a szuprakavikuláris humán barna zsírszövet sejtjei nagyban hasonlítanak a rágsálók beige zsírsejtjeihez, kiemelve a fehér zsírszövet barnulási folyamatának egérmodellekben történő vizsgálatának a jelentőségét [39, 237]. Következésképpen az emberi zsírszövetek termogén potenciáljának ellenőrzött növelése, az elhízás és az ahhoz kapcsolódó betegségek jövőbeni terápiás célpontja lehet [238-240]. Korábbi vizsgálatok a TG2 fel-regulációját mutatták ki emberi barna zsírszövetben a fehér zsírszövethez képest [172], 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 zsírtjukat 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 kevéssé barnult be hidegkezelés hatására, ellenben a másik abundáns zsírdepóban, a szubkután zsírszövetben nem tapasztaltunk különbséget TG2 hiányában.

Szakirodalmi adatok alapján a fehér zsírszövet barnulása az inguinális zsírdepóban erőteljesebb, míg a gonadális zsírszövetben ehhez képest kevéssé aktív [241]. Ugyanakkor eredményeink szerint a TG2 jelenlétében a gonadális zsírszövet barnulása jelentős szerepet tölthet be hidexpozíció során [204]. A beige adipociták indukciója erősen zsírraktár függő. A barnulással szemben ellenállóbb depók (például a hasi fehér depók) esetében a beige prekursor sejteknek proliferálniuk kell, mielőtt a jelentős barnulás bekövetkezhet. Ez az elképzelés összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy az UCP1-pozitív sejtek adrenerg stimuláció után

feldúsulnak a gonadális zsírdepóban, ellentétben az inguinalis vagy retroperitoneális depóval [36,234]. Ezenkívül kimutatták azt is, hogy patkányok gonadális adipocitáiban több mitokondrium van, mint az inguinalis adipocitákban [242], ami fontos tényezővé válhat a barnulási folyamat során.

A beige zsírsejtek a hidegkezelésen kívül testmozgással és β -adrenerg jelátviteli úton keresztül is aktiválhatók [205,243]. Munkacsoportunk vizsgálta a beige marker gének expressziójának változását a fehér zsírszövetben [204]. Ezek közül az UCP1 expressziójának emelkedése az alkalmazott akut hidegkezelés során összevethető volt az adenilát-cikláz aktivátor forskolinnal 4 órán át kezelt beige sejtkultúrákban észlelt változásokkal [39], és azokkal a differenciált 3T3-F442A sejtekkel, melyeket 4 órán keresztül 27°C-ra helyeztek [240], valamint egy beige sejtvonalból előállított zsírban 5 órával a β -adrenerg agonista adása után [29]. A hideg által kiváltott termogenezis a barna zsírszövet és a beige sejtek nem-didergéses hőtermelése mellett magába foglalja a vázizomzat összehúzódásai során hőt termelő didergéses termogenezist [244]. Mindkét folyamathoz, a barnuláshoz és a didergéses termogenezishez is szükséges a szabad zsírsavak fehér zsírszövetből történő mobilizálása. A lipolízishez vezető fő útvonal a cAMP-függő protein-kináz (PKA) útja, amelyen keresztül a Gs-kapcsolt β -adrenerg receptorok stimulálása bekapcsolja az adenilát-cikláz, majd a cAMP intracelluláris szintjének emelkedése a PKA aktivációjához vezet, ami a hormon-szenzitív lipáz (HSL) foszforilációja és transzlokációja révén zsírsav felszabadulást eredményez [245]. Ez a folyamat azonban egyértelműen csökken a TG2^{-/-} gonadális zsírszövetben, ami a jelentősen megemelkedett noradrenalin szinttel és a szignálútvonalak esetleges kapcsolódása révén felveti annak lehetőségét, hogy a TG2 G-fehérjeként működik ebben a zsírdepóban. Ezt alátámaszthatja, hogy érdekes módon a β -adrenerg receptor hiányos egerek az enyhehidegexpozícióra reagálva tudják növelni a fehér zsírszövetük termogén funkcióját [206], ami más járulékos utak létezésére utal. Fontos kiemelni, hogy a TG2 egyes sejtípusokban G fehérjeként (G α) működhet [112]. Ez a TG2 funkció GTPáz-aktivitása révén az α 1B-AR felől érkező jelet a foszfolipáz C (PLC) aktiválásához kapcsolja [113,118]. A PLC enzimatis hatása aktiválja a protein-kináz C-t (PKC), és a PKC elősegítheti a barnulási folyamatot a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) foszforilezésével [246-250], amelynek központi szerepe van az UCP1 expresszió aktiválásában [251,252]. Ilyen módon a barnulási folyamat során a TG2 kulcsfehérje lehet az α -adrenerg útvonal és a β -adrenerg útvonal közötti lehetséges kölcsönhatás kialakításában. Bár a TG2 G-fehérje funkciója számos sejtípusban (pl. szív- és simaizomsejtekben, fibroblasztokban, endoteliális sejtekben, hepatocitákban) ismert [119],

még mindig nem világos, hogy vajon hasonló funkcióval bírhat-e adipocitákban vagy preadipocitákban, és ha igen, akkor miért korlátozódik ez csak a gonadális zsírszövet sejtjeire. A multifunkcionális TG2 hiánya nem okoz letális fenotípust egerekben. Ezt általában azzal magyarázzák, hogy a TG-család többi tagja expresszáldhat a sejtekben, és pótolhatják a TG2 hiányzó funkcióinak nagy részét. Ugyanakkor a többi emlős TG nem kötődik GDP/GTP-hez, következésképpen nem képesek betölteni a TG2 G-fehérje funkcióját. Eddigi irodalmi adatok szerint esetleg ezzel is magyarázható, hogy az életképes TG2^{-/-} egereknél elsősorban csak bizonyos stresszhatások és patológiás körülmények között várhatók súlyosabb változások és kóros állapotok [72]. 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 [253]. 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 [254]. 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 [255].

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 eltéréseben 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 [67]. 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. Fontos megjegyezni, hogy mind az $\alpha 1A$ -, mind az $\alpha 1B$ -AR aktiválása növelheti az egész test zsírsav-oxidációját, ami RER csökkenést eredményez [256]. A $TG2^{-/-}$ állatok később, a kezelést követő nap végén érték el a $TG2^{+/+}$ egerek RER értékét, körülbelül 30 órával a kezelés után (az adatokat nem mutatjuk be). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az adrenerg receptor szignálban esetleg $G_{\alpha h}$ 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 $\beta 3$ -AR agonistát alkalmaztunk az $\alpha 1$ -AR agonista fenilefrin kontrolljaként. Ez a receptor főleg a zsírszövetben helyezkedik el, ahol fokozhatja a lipolízist [257]. Következésképpen a CL-316,243 kezelés a RER értékek azonnali csökkenését eredményezte mind a $TG2^{-/-}$ mind a $TG2^{+/+}$ egerekben, ami ezután az éjszakai időszakban hasonló módon fokozatosan növekedni kezdett. A törzsek egyéb metabolikus paraméterei szintén nagyon hasonlóak voltak, ami arra utalhat, hogy a $TG2$ -nek nincsen közvetlen szerepe a $\beta 3$ -AR által szabályozott jelátvitelben. A $\beta 3$ -AR részt vesz a vázizmok [258] és a zsírszövetek [6] termogenezisének szabályozásában is, de mi a $\beta 3$ -AR stimuláció után nem észleltünk eltéréseket a törzsek hőtermelésében sem.

Ezzel szemben, a fenilefrin kezelést követően a hőtermelés csökkent a $TG2^{-/-}$ egerekben, és alacsonyabb volt mind a nappali, mind az éjszakai periódusokban. Hidegkezeléses kísérleteinkben bemutattuk, hogy a $TG2^{-/-}$ egerek csökkent hidegtűrő képességgel rendelkeznek, és ez az eredmény arra utalhat, hogy a $TG2$ potenciálisan hatással lehet a hőtermelésre, mint $\alpha 1B$ -AR-kapcsolt G-fehérje egerekben. Mivel az $\alpha 1$ -AR-ok szerepet játszhatnak különféle metabolikus folyamatok szabályozásában [256,259,260], ezért először a törzsek vércukorszintjét mértük meg. Azt találtuk, hogy ezek az értékek hasonlóak és a normál tartományba esők voltak [261,262] a fenilefrin kezelés előtt és után is. A normál értékekhez képest a fenilefrin az $\alpha 1$ -AR altípuson keresztül növelte a glükagonszintet az [261], de az mind a $TG2^{-/-}$ mind a $TG2^{+/+}$ állatok plazmájában hasonló volt 13 órával a fenilefrin kezelés után, amikor a RER-értékek eltérése még jelentős mértékű volt. Ezek az eredmények a lipidfrakciók mérési adataival együtt azt sugallják, hogy a sejtszintű anyagcsere legfontosabb energiaforrásai feleslegben voltak elérhetőek az egerek számára, és eltérő felhasználásuk a fentiekben ismertetett eltérő RER-értékeket eredményezhette. Szakirodalmi adatok alapján, a fenilefrin gyorsan, néhány percen belül hat a felszívódást követően, és felezési ideje körülbelül 2,1–3,4 óra [263], mivel a monoamino-oxidáz gyorsan lebontja [264]. Ezért a RER-értékekben észlelt

különbséget valószínűleg nem közvetlenül a fenilefrin jelenléte okozta, hanem az agonista által kiváltott hosszú távú hatásainak köszönhető.

Beszámoltak arról, hogy az $\alpha 1$ B-AR KO egerek vércukorszintje és inzulinszintje normális, azonban táplált állapotban megemelkedik bennük a leptin koncentrációja [260]. A leptinről ismert, hogy az AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) aktiválásával serkenti a glükózfelvételt és a β -oxidációt, különösen a vázizomban [265]. Az AMPK aktiválódását két különböző mechanizmus közvetítheti: egyrészt a leptin közvetlen hatása, másrészt közvetett hatása a hipotalamusz szimpatikus rendszere és az $\alpha 1$ B-AR aktivitása révén [260, 266]. Az AMPK aktiválása leptinnel az acetyl-CoA karboxiláz (ACC) foszforilálásához, ezáltal annak gátlásához vezet, és egyúttal a zsírsavak oxidációjának stimulálását eredményezi a karnitin-palmitoil-transzferáz 1 (CPT1) aktiválódásával [265]. Amennyiben a TG2 képes G_{α} -ként működni, akkor az $\alpha 1$ B-AR jelátvittele legalább részben hiányos lehet a TG2^{-/-} egerekben, ami magasabb leptinszintet és alacsonyabb RER-t eredményez, amint az utóbbit megfigyeltük, a fenilefrin kezelést követően.

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 [267]. A fenilefrin kifejezett érrendszeri káros hatásokat okozhat, beleértve mind a szisztolés, mind a diasztolés vérnyomás növekedését [268]. 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 [269]. 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. A TG2^{-/-} egerekben tapasztaltakhoz hasonlóan az $\alpha 1$ B-AR KO egerekben csökkent vérnyomás válasz arra utal, hogy ez az AR típus a vérnyomás fontos közvetítője [270]. Következésképpen, ha a TG2 $\alpha 1$ B-AR-csatolt G_{α} -ként működhet, akkor ez a funkció megnövekedett simaizomsejt-tónushoz vezethet [113,271-273], és megmagyarázhatja, miért nem figyeltünk meg vazokonstrikciót a

TG2^{-/-} egerek farkában. Ezenkívül kimutatták, hogy a TG2 keresztükötő képességétől független módon is modulálta az érrendszer működését, valamint a TG2^{-/-} aortát merevebbnek találták a TG2^{+/+} egerek aortájához képest [274]. Érdekes módon a fenilefrin hosszú távú hatása vizsgálatunkban is nyilvánvaló volt, mivel a TG2^{+/+} állatok szisztolés vérnyomása az éjszakai periódusban szignifikánsan alacsonyabb maradt, és diasztolés vérnyomásuk szintén alacsonyabb volt ezen időszak három mérési időpontjában.

Érszűkítő hatása miatt a fenilefrin súlyos nekrozist okozhat a szövetekben [267]. Az LDH egy oldható citoplazmatikus enzim, amely felszabadul az extracelluláris térbe, amikor a plazmamembrán megsérül a nekrosis során [275]. Az LDH aktivitás számszerűsítése a szérummintákban jelzi a szövetkárosodás mértékét [276], 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 [277], 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 izoenzimok kóros szintű megjelenése a szérumban jelezheti, hogy mely szövetben vagy szervben történt a károsodás [278]. Az LDH izoenzimok 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 izoenzimoknak 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 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 [279]. 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 [103]. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a TG2 működhet G fehérjeként a vaszkuláris simaizomsejtekben, azonban hasonló funkcióját a zsírszövetben nem igazoltuk.

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 [280], így hatással lehet a beige sejtek kialakulására is. A beige és fehér adipociták aránya a fehér zsírszövetben részben meghatározott a mezenchimális progenitorok érett adipocitává történő differenciálódásának korai szakaszában [1,243]. A beige adipociták képződése ismert módon specifikus prekursor sejtekből indukálódik [281]; és bár nem volt különbség a fiatalabb 16 hetes állatoknál az adipociták méretében 22°C-on [204], azt feltételeztük, hogy a TG2 működése összefügg a fehér *versus* beige prekursor sejtek proliferációja és differenciációja közötti egyensúly szabályozásával, mely befolyásolja a gonadális zsírszövet sejteinek termogén potenciálját.

Emellett, a hideg kezelés nemcsak a *de novo* beige zsírsejtek differenciálódását, hanem a termogén tulajdonságok indukálását is elősegíti egyes úgynevezett „masked beige” zsírsejtekben. Ezek az adipociták morfológiailag és funkcionálisan is fehér zsírsejtekre hasonlítanak, de beige identitással rendelkeznek és a hidegre reagálva termogén programjukat képesek gyorsan aktiválni [188]. Ezek a hideg által indukált UCP1-pozitív sejtek fehérszerű, uniloculáris morfológiával rendelkeztek, miután az állatokat a hideg expozíció után magasabb hőmérsékletre helyezték vissza [55]. A prekursor sejtekből történő differenciáció helyett a β -agonista kezelés vagy a hideg expozíció egyszerű módon és gyorsan aktiválja ezen már létező „masked beige” adipociták termogén tulajdonságait [1].

Számos tanulmány leírta a TG2 mitokondriális homeosztázisban betöltött szerepét. A mitokondriális légzési lánc stabilizálásában betöltött funkciója mellett, [71,127,128] 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 [126]. 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 [129]. 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. A beige prekursor sejtek proliferációs lépéseken mennek keresztül ahhoz, hogy erőteljes barnulás következhesen be [234]. A preadipocitáknak fontos szerepük van a proliferáció és a differenciálódás egyensúlyának szabályozásában. Ezek a prekursorok határozzák meg a differenciált adipociták mennyiségét és méretét. A preadipociták proliferációjának és érésének diszregulációja hozzájárul az elhízás és a kapcsolódó rendellenességek kialakulásához [282]. 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 [210]. 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 kulcsszerepet játszanak az anyagcsere folyamatokban, beleértve a citrátkört, a β -oxidációt, valamint az ATP ETC és V-ATPSA általi képződését. Érdekes módon az ETC komponensek és a V-ATPSA alacsonyabb expresszióját találtuk a TG2^{-/-} beige adipocitákban. Továbbá a mitokondriális II. (SDHB), a III. (UQCRC2) és az V. (ATP5A1) komplexek alacsonyabb fehérje expresszióját és csökkent NADH dehidrogenáz aktivitást észleltünk a TG2^{-/-} preadipocitákban a TG2^{+/+} preadipocitákhoz képest, ami arra utal, hogy a mitokondriális ETC és ATP szintézis funkciói több helyen hibásak lehetnek a TG2^{-/-} preadipocitákban, és ennek következtében a differenciált beige sejtekben is. Eredményeink arra utalnak, hogy a TG2^{+/+} és a TG2^{-/-} sejtek közötti különbségek nem függték össze az adrenerg

kezelésekre adott válaszokkal, hanem már léteztek a differenciált beige adipocitákban további adrenerg kezelés nélkül is.

A mitokondriumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a hőtermelésben az UCP1 belső membránfehérje révén, amely szétválasztja a légzést az ATP-szintézistől, és ezért hő formájában energiadisszipációt vált ki, miközben serkenti a zsírsavak fokozott oxidációját [32,283]. Az a figyelemre méltó megfigyelés, hogy egy preadipocita terminális beige differenciálódási markert, például UCP1-et fejez ki, már ismert az irodalomból [212]. 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 adipocitákban, 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 [215,216], ennek ellenkezőjét tapasztaltuk, a ROS termelés jelentősen csökkent a TG2^{-/-} sejtekben, ami alacsonyabb szintű mitokondriális metabolizmusra utal. Más sejt típusoknál 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 (MEF) [71,127-129]. 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 MEF sejtekben [127]. 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 [284]. Ismeretes, hogy a mitokondriális fragmentáció a depolarizációval, a szignifikánsan csökkent légzési kapacitással és az ATP termelés csökkenésével járhat [285,286]. Érdekes módon megváltozott mitokondriális morfológiát és funkcionalitást is kimutattak a több fragmentált és depolarizált mitokondriumot tartalmazó TG2^{-/-} MEF-ekben [127].

Megállapítottuk azt is, hogy a mitokondriális biogenezist szabályozó, jól ismert koaktivátor PGC1 α fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb a TG2^{-/-} beige sejtekben. Ezzel az eredménnyel összhangban a foszforilált AMPK szignifikánsan alacsonyabb fehérje-expresszióját is megfigyeltük TG2-hiányos beige adipocitákban. Az AMPK a sejt energiaállapotának kulcsfontosságú érzékelője, amely foszforilálódik és aktiválódik amikor az AMP/ATP arány magas, és az ATP sejtszintjének növelésére irányuló katabolikus útvonalak széles skáláját aktiválja [287]. Az aktivált AMPK közvetlenül foszforilálja és aktiválja a PGC1 α -t, amit kimutattak *in vivo* és *in vitro* kísérletekben is [288-290]. A PGC-1 α fehérje ilyen közvetlen foszforilációja a Thr-177 és a Ser-538 pozícióban szükséges a PGC-1 α -promoter PGC-1 α -függő indukciójához. Adataink szerint a mitokondriális energiatermeléshez és termogenezishez hozzájáruló számos folyamat károsodhat a TG2 hiányában. Eredményeink azt sugallják, hogy TG2 hiányában a mitokondriális funkciók megváltozhatnak, ami a TG2^{-/-} beige adipociták alacsonyabb hőtermelő képességéhez vezethet. Ugyan nem találtunk különbséget a TG2^{-/-} és TG2^{+/+} sejtek mitokondriumának mennyiségében, azért a fentebb említett eltérések hozzájárulhatnak a mitokondriális funkciók megváltozásához TG2 hiányában.

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 citoszkkeletonnal, az aktin szabályozással és az extracelluláris mátrix szabályozásával kapcsolatos klaszterekben volt

jelentős [291]. 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 tápközegében a TG2^{+/+} kontrollokhoz képest. A T3 döntő szerepet játszik a barnulási folyamat aktiválásában és a beige zsírsejtek differenciálódásában [292], 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 [227,230,231]. 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 [229], azaz a DIO3 által közvetített T3 inaktiváció hozzájárulhat az általunk megfigyelt le-regulációjához. 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 [233,293]. Megfigyeléseink jelentőségét tovább növelheti az a tény is, hogy az SLC25A42-t nemrégiben egy barnulási markerként írták le, amely egerekben szükséges a termogenezis folyamatához [294].

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 zsírdepóban, melyben a mitokondriumok nem képesek a normális termogenezishez szükséges küszöbérték elérésére. Feltételezésünk szerint ez

kulcsszerepet 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.

8. 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 zsírszövetüket hidegkezelés során 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 G α 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 vajon 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 fenotípusosan 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

jelez, és ezért „energetikus” sejt-ként definiáltuk őket. Ezzel szemben eredményeink határozottan arra utalnak, hogy TG2 hiányában a vizsgált sejt-típusok hipometabolikusak.

A mitokondriális hasadási és fúziós fehérjék immuncitokémiai és fehérje szintű vizsgálati eredményeink alapján leírtuk, hogy a tubuláris mitokondriális morfológia jellemzőbb mindkét sejt-típus 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 magasabban expresszálandó 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 matrixba 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^{-/-} sejt-típusokon. Az általunk bemutatott adatok a TG2-vel kapcsolatos szabályozási folyamatokkal egészítették ki az elhízás és a kapcsolódó anyagcsere-rendellenességek lehetséges célpontjainak listáját.

9. Summary

In our work, we have studied the role of TG2 in thermogenesis in a mouse model. We have shown that TG2^{-/-} mice have reduced cold tolerance and are less efficient in mobilizing their gonadal fat during cold exposure compared to their TG2^{+/+} littermates. The lower mobilization of the gonadal adipose tissue was most likely caused by the inhibited browning process of the tissue in TG2^{-/-} mice with lower expression of browning markers, including UCP1.

We have investigated the role of TG2 in the possible interaction of α - and β -adrenergic signaling pathways by treatment of adrenergic agonists and using indirect calorimetry. Phenylephrine, the α 1 adrenergic agonist, has induced a significantly lower respiration rate (RER) in TG2^{-/-} animals compared to TG2^{+/+} mice, suggesting different metabolic processes in them. Our results suggest that TG2, which may act as a G protein in the adrenergic receptor signaling pathway, might play a role in determining the balance between carbohydrate and fatty acid oxidation. We have shown that the vasoconstrictive effect of phenylephrine is weaker in TG2^{-/-} animals, which in turn induced lower levels of tissue necrosis.

A further aim of our research program was to compare the biochemical mechanisms by which TG2 is involved in mitochondrial function and thus, in the activation of thermogenesis by comparing TG2^{+/+} and TG2^{-/-} preadipocytes isolated from gonadal adipose tissue and differentiated to beige direction. We have demonstrated that beige differentiation of preadipocytes was phenotypically successful for both genotypes. We have found that the expressions of subunits of some mitochondrial protein complexes and UCP1 were significantly lower in TG2^{-/-} preadipocytes and beige adipocytes compared to TG2^{+/+} cells, suggesting that the function of mitochondrial electron transport is defective at several points in TG2^{-/-} preadipocytes and differentiated beige cells. In our work, we have demonstrated that TG2 deficiency leads to lower mitochondrial membrane potential and lower ATP and NADH content, in parallel with lower oxygen consumption compared to TG2^{+/+} control cells. In addition, ROS production is lower in TG2^{-/-} cells, suggesting lower activity of their mitochondria. By examining the energetic phenotypes of the cells, we have showed that TG2^{+/+} preadipocytes and beige cells are strongly characterized by glycolytic and oxidative metabolism, as indicated by high extracellular acidification (ECAR) and oxygen consumption (OCR) compared to TG2^{-/-} cells, and therefore, we can define them as energetic cells. In contrast, our results strongly suggest that cells are hypometabolic in the absence of TG2.

Based on our immunocytochemical and protein-level studies of mitochondrial fission and fusion proteins, we have described that tubular mitochondrial morphology is more characteristic of both cell types; however, the fractions of fragmented mitochondria in TG2^{-/-} beige adipocytes are significantly higher than in TG2^{+/+} cells. We have also found that the expressions of the well-known coactivator PGC1 α , which regulates mitochondrial biogenesis, and the phosphorylated AMP-activated protein kinase protein were significantly lower in TG2^{-/-} beige cells. Comparative global transcriptome analysis of preadipocytes and differentiated beige cells have identified potential genes to explain mitochondrial differences caused by TG2 deficiency. We have demonstrated that the increased level of DIO3 protein may play a key role in the decreased mitochondrial function of TG2^{-/-} cells. In addition, we have described that in the absence of TG2, the transport of fatty acids, amino acids, and coenzyme A into the mitochondrial matrix is less efficient, which may contribute to lower energy production by their mitochondria. Based on our results, TG2 plays an essential role in the function of beige cells of gonadal origin and in the process of thermogenesis. The importance of our work is further enhanced by the fact that similar systematic studies have not been performed on TG2^{-/-} cell types yet. The data we presented supplemented the list of possible targets for obesity and related metabolic disorders with TG2-related regulatory processes.

10. Az értekezés új megállapításai

Az energiafelhasználás növekedésével a barnulási folyamat farmakológiai aktiválása hozzájárulhat az elhízás és a kapcsolódó betegségek kezeléséhez a jövőben. Eredményeink arra utalnak, hogy a TG2 valamilyen módon hozzájárul a szénhidrát és a zsírsav oxidációja közötti egyensúly meghatározásában. Adataink szerint a TG2 kritikus szerepet játszik a beige zsírsejtek termogén kapacitásának szabályozásában. A TG2 hiánya a gonadális zsírszövet GONAT preadipocitáit hipometabolikussá teszi, és a beige differenciálódás aktivátorai nem tudják teljesen kompenzálni ezt a jelenséget. Az eredmény olyan beige zsírsejt, amelyben a mitokondriumok nem tudják elérni a normál termogén funkciókhoz szükséges küszöbértéket, ami a TG2^{-/-} egerek korábban leírt csökkent hidegtűrését eredményezheti a stresszes akut hideg expozíció során. A bemutatott adatok a TG2-vel kapcsolatos szabályozási folyamatokkal egészítették ki az elhízás és a kapcsolódó anyagcsere-rendellenességek lehetséges célpontjainak listáját.

11. Irodalomjegyzék

1. Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, 22 (4), 546–559.
2. Flier, J.S., Lowell, B., Napolitano, A., Usher, P., Cook, K.S., Spiegelman, B. (1989) Adipsin: regulation and dysregulation in obesity and other metabolic states. *Recent Prog Horm Res.* 45, 567-80
3. Porat, O. (1989). The effect of tumor necrosis factor alpha on the activity of lipoprotein lipase in adipose tissue. *Lymphokine Res.* 8 (4):459-69.
4. Meinders, A. (1996). Leptin. *The Netherlands Journal of Medicine*, 49 (6), 247–252.
5. Iyen, B., Weng, S., Vinogradova, Y., Akyea, R. K., Qureshi, N., & Kai, J. (2021). Long-term body mass index changes in overweight and obese adults and the risk of heart failure, cardiovascular disease and mortality: a cohort study of over 260,000 adults in the UK. *BMC Public Health*, 21(1).
6. Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, 156 (1-2), 20–44.
7. Ottaviani, E., Malagoli, D., and Franceschi, C. (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174 (1): 1–4.
8. Young, S.G., and Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 27 (5):459–484.
9. Michalakis, K., Goulis, D. G., Vazaiou, A., Mintziori, G., Polymeris, A., & Abrahamian-Michalakis, A. (2013). Obesity in the ageing man. *Metabolism*, 62 (10), 1341–1349.
10. Pond, C.M. (1992) An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 51 (3), 367–377.
11. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7
12. Teklu, M., Zhou, W., Kapoor, P., Patel, N., Playford, M. P., Sorokin, A. V., ... Mehta, N. N. (2021). Abdominal subcutaneous adipose tissue negatively associates with subclinical coronary artery disease in men with psoriasis. *American Journal of Preventive Cardiology*, 8, 100231
13. Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, 34 (1), 1–11.
14. Rodríguez, E., Ribot, J., Rodríguez, A. M., & Palou, A. (2004). PPAR- γ 2 Expression in Response to Cafeteria Diet: Gender- and Depot-Specific Effects. *Obesity Research*, 12(9), 1455–1463.

15. Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metabolism*, 17 (5), 644–656.
16. Macotela, Y., Emanuelli, B., Mori, M. A., Gesta, S., Schulz, T. J., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2012). Intrinsic Differences in Adipocyte Precursor Cells From Different White Fat Depots. *Diabetes*, 61 (7), 1691–1699.
17. Tran, T. T., Kahn, C. R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 6 (4), 195–213.
18. Hankir, M. K., & Klingenspor, M. (2018). Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject. *EMBO Reports*, e46404.
19. Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., & Berge, R. K. (2011). Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents. *Journal of Obesity*, 2011, 1–15.
20. Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition*, 3.
21. Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(1), 9–15.
22. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170(5), R159–R171.
23. Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q. et al. (2018). An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metabolism*, 27(1), 252–262.e3.
24. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7.
25. Birsoy, K., Berry, R., Wang, T., Ceyhan, O., Tavazoie, S., Friedman, J. M., & Rodeheffer, M. S. (2011). Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. *Development*, 138 (21), 4709–4719.
26. Greenwood, M.R., Hirsch, J. (1974). Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *Journal of lipid research*, 15 (5), 474–483.
27. Han, J., Lee, J.-E., Jin, J., Lim, J. S., Oh, N., Kim, K., et al. (2011). The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development*, 138 (22), 5027–5037.
28. Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*, 8 (1), 1–11.
29. Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Human Development*, 10 (1-2), 1–11.

30. Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F., & Cowan, C. A. (2011). Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. *PLoS ONE*, 6 (3), e17637.
31. Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453 (7196), 783–787.
32. Fedorenko, A., Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*, 151 (2), 400–413.
33. Young, P., Arch, J. R. S., & Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, 167 (1), 10–14.
34. Collins, S., Daniel, K. W., Petro, A. E., & Surwit, R. S. (1997). Strain-Specific Response to β 3-Adrenergic Receptor Agonist Treatment of Diet-Induced Obesity in Mice. *Endocrinology*, 138 (1), 405–413.
35. Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *The Journal of clinical investigation*, (102), 412–420.
36. Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279 (3), C670–C681.
37. Cinti, S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60 (03), 319–328.
38. Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D., & Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 53 (4), 619–629.
39. Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., et al. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, 150(2), 366–376.
40. Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302 (1), E19–E31.
41. Lidell, M. E., Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2013). Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*, 3 (1), 63–66.
42. Schulz, T. J., Huang, P., Huang, T. L., Xue, R., McDougall, L. E., Townsend, K. L., et al. (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495 (7441), 379–383.
43. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). Mechanisms in endocrinology: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170 (5), R159–R171.
44. Cinti, S. (2018). Pink Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29 (9), 651–666.

45. Zinngrebe, J., Debatin, K.-M., & Fischer-Posovszky, P. (2020). Adipocytes in hematopoiesis and acute leukemia: friends, enemies, or innocent bystanders? *Leukemia*.
46. Hayward, J. S., Lisson, P. A. (1992). Evolution of brown fat: its absence in marsupials and monotremes. *Canadian Journal of Zoology*, 70 (1), 171–179.
47. Oelkrug, R., Goetze, N., Exner, C., Lee, Y., Ganjam, G. K., Kutschke, M., et al. (2013). Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution. *Nature Communications*, 4 (1).
48. Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842 (3), 340–351.
49. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454 (7207), 961–967.
50. Bonet, M. L., Oliver, P., & Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831 (5), 969–985.
51. Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., & Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *Journal of Lipid Research*, 54 (8), 2214–2224.
52. Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M., Sparks, C. A., Tang, Y., Li, H., & Guertin, D. A. (2012). PTEN Loss in the Myf5 Lineage Redistributes Body Fat and Reveals Subsets of White Adipocytes that Arise from Myf5 Precursors. *Cell Metabolism*, 16 (3), 348–362.
53. Long, J. Z., Svensson, K. J., Bateman, L. A., Lin, H., Kamenecka, T., Lokurkar, I. A. et al. (2016). The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria. *Cell*, 166 (2), 424–435.
54. Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K. et al. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298 (6), E1244–E1253.
55. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, 15 (6), 659–667.
56. Fu, L., Zhu, X., Yi, F., Liu, G.-H., & Belmonte, J. C. I. (2013). Regenerative medicine: Transdifferentiation in vivo. *Cell Research*, 24 (2), 141–142.
57. Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., et al. (2007). Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metabolism*, 6 (1), 38–54.
58. Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., et al. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes & Development*, 22 (10), 1397–1409

59. Van der Lans, A. A. J. J., Wierds, R., Vosselman, M. J., Schrauwen, P., Brans, B., & van Marken Lichtenbelt, W. D. (2014). Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307 (2), R103–R113.
60. Roth, C. L., Molica, F., & Kwak, B. R. (2021). Browning of White Adipose Tissue as a Therapeutic Tool in the Fight against Atherosclerosis. *Metabolites*, 11 (5), 319.
61. Celi, F. S. (2009). Brown Adipose Tissue — When It Pays to Be Inefficient. *New England Journal of Medicine*, 360 (15), 1553–1556.
62. Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293 (2), E444–E452.
63. Villarroya, F., & Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the Sympathetic Tone: The New Brown Fat Activators. *Cell Metabolism*, 17 (5), 638–643.
64. Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., et al. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481 (7382), 463–468.
65. Watanabe, M., Houten, S. M., Matak, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439 (7075), 484–489.
66. Weir, J. B. de V. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *The Journal of Physiology*, 109 (1-2), 1–9.
67. Simonson, D. C., & DeFronzo, R. A. (1990). Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 258 (3), E399–E412.
68. Lam, Y. Y., & Ravussin, E. (2016). Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71 (3), 318–322.
69. Pendergast, D. R., Leddy, J. J., & Venkatraman, J. T. (2000). A Perspective on Fat Intake in Athletes. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (3), 345–350.
70. Lesort, M., Attanavanich, K., Zhang, J., & Johnson, G. V. W. (1998). Distinct Nuclear Localization and Activity of Tissue Transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (20), 11991–11994.
71. Piacentini, M., Farrace, M.G., Piredda, L., Matarrese, P., Ciccocanti, F., Falasca, L. et al. (2002) Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J Neurochem.* (81), 1061–1072.
72. Fesus, L., & Piacentini, M. (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 27 (10), 534–539.

73. Eckert, R. L., Kaartinen, M. T., Nurminskaya, M., Belkin, A. M., Colak, G., Johnson, G. V. W., & Mehta, K. (2014). Transglutaminase Regulation of Cell Function. *Physiological Reviews*, 94 (2), 383–417.
74. Muma, N.A. (2018). Transglutaminase in receptor and neurotransmitter-regulated functions. *Med. One*, 3 (6): e180012.
75. Folk, J. E., & Finlayson, J. S. (1977). The ϵ -(γ -Glutamyl)Lysine Crosslink and the Catalytic Role of Transglutaminases. *Advances in Protein Chemistry*, 1–133.
76. Lee, K. N., Birckbichler, P. J., & Patterson, M. K. (1989). GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 162 (3), 1370–1375.
77. Datta, S., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2007). GTP-Binding-Defective Forms of Tissue Transglutaminase Trigger Cell Death†. *Biochemistry*, 46 (51), 14819–14829.
78. Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A. T., & Khosla, C. (2007). Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation. *PLoS Biology*, 5 (12), e327.
79. Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J., & Johnson, G. V. W. (2012). Transglutaminase 2: A molecular Swiss army knife. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823 (2), 406–419.
80. Hasegawa, G., Suwa, M., Ichikawa, Y., Ohtsuka, T., Kumagai, S., Kikuchi, M., et al. (2003). A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochemical Journal*, 373 (3), 793–803.
81. Mishra, S., Saleh, A., Espino, P.S., Davie, J.R., Murphy, L.J. (2006). Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 281: 5532–5538.
82. Mishra, S., & Murphy, L. J. (2006). The p53 oncoprotein is a substrate for tissue transglutaminase kinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339 (2), 726–730.
83. Katt, W.P., Antonyak, M.A., Cerione, R.A. (2018). Opening up about tissue transglutaminase: When conformation matters more than enzymatic activity. *Med. One*, 3 (6) e180011.
84. Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L., & Graham, R. M. (2009). Transglutaminases and disease: Lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiological Reviews*, 89 (3), 991–1023.
85. Wang, Z., & Griffin, M. (2011). TG2, a novel extracellular protein with multiple functions. *Amino Acids*, 42 (2-3), 939–949.
86. Király, R., Thangaraju, K., Nagy, Z., Collighan, R., Nemes, Z., Griffin, M., & Fésüs, L. (2015). Isopeptidase activity of human transglutaminase 2: disconnection from transamidation and characterization by kinetic parameters. *Amino Acids*, 48 (1), 31–40.
87. Szondy, Z., Korponay-Szabó, I., Király, R., Sarang, Z., Tsay, G.J. (2017) Transglutaminase 2 in human diseases. *Biomedicine*, 7 (3), 15.

88. Mangala, L. S., & Mehta, K. (2005). Tissue Transglutaminase (TG2) in Cancer Biology. *Progress in Experimental Tumor Research*, 125–138.
89. Johnson, T.S., Knight, C.R. L., El-Alaoui, S., Mian, S., Rees, R.C., Gentile, V., Davies, P.J.A., Grin, M. (1994). Transfection of tissue transglutaminase into a highly malignant hamster fibrosarcoma leads to a reduced incidence of primary tumour growth. *Oncogene*, (9), 2935–2942.
90. Mehta, K., Kumar, A., & Kim, H. I. (2010). Transglutaminase 2: A multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 80 (12), 1921–1929.
91. Mangala, L. S., Fok, J. Y., Zorrilla-Calancha, I. R., Verma, A., & Mehta, K. (2006). Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. *Oncogene*, 26 (17), 2459–2470.
92. Dudek, S. M., & Johnson, G. V. W. (1994). Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the β -amyloid peptide. *Brain Research*, 651 (1-2), 129–133.
93. Norlund, M.A., Lee, J.M., Zainelli, G.M., Muma, N.A. (1999). Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 851, 154–163.
94. Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., & Dickson, D. W. (2003). Colocalization of Tau and Alpha-Synuclein Epitopes in Lewy Bodies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62 (4), 389–397.
95. Porzio, O., Massa, O., Cunsolo, V., Colombo, C., Malaponti, M., Bertuzzi, F., Hansen, T., Johansen, A., Pedersen, O., Meschi, F. et al. (2007). Missense mutations in the TGM2 gene encoding transglutaminase 2 are found in patients with early-onset type 2 diabetes. *Hum. Mutat.* 28, 1150.
96. Wang, W.X., Rajeev, B. W., Stromberg, A. J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., et al. (2008). The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *Journal of Neuroscience*, 28 (5), 1213–1223.
97. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3 (7), 797–801.
98. Song, M., Hwang, H., Im, C. Y., & Kim, S.-Y. (2016). Recent Progress in the Development of Transglutaminase 2 (TGase2) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (2), 554–567.
99. Keillor, J. W., & Apperley, K. Y. P. (2015). Transglutaminase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26 (1), 49–63.
100. Facchiano, A.; Facchiano, F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids* 2009, 36, 599–614.
101. Csősz, É., Meskó, B., & Fésűs, L. (2008). Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids*, 36 (4), 615–617.

102. De Laurenzi, V., & Melino, G. (2001). Gene Disruption of Tissue Transglutaminase. *Molecular and Cellular Biology*, 21 (1), 148–155.
103. Nanda, N., Iismaa, S. E., Owens, W. A., Husain, A., Mackay, F., & Graham, R. M. (2001). Targeted Inactivation of Gh/Tissue Transglutaminase II. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (23), 20673–20678.
104. Szondy, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G. et al. (2003). Transglutaminase 2-/- mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (13), 7812–7817.
105. Sarang, Z., Mádi, A., Koy, C., Varga, S., Glocker, M. O., Ucker, D. S., et al. (2007). Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death & Differentiation*, 14 (10), 1842–1844.
106. Toth, B., Garabuczi, E., Sarang, Z., Vereb, G., Vamosi, G., Aeschlimann, D., et al. (2009). Transglutaminase 2 Is Needed for the Formation of an Efficient Phagocyte Portal in Macrophages Engulfing Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*, 182 (4), 2084–2092.
107. Balajthy, Z. (2006). Tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation and functions. *Blood*, 108 (6), 2045–2054.
108. Csomos, K., Nemet, I., Fesus, L., & Balajthy, Z. (2010). Tissue transglutaminase contributes to the all-trans-retinoic acid-induced differentiation syndrome phenotype in the NB4 model of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 116 (19), 3933–3943.
109. Sarang, Z., Tóth, B., Balajthy, Z., Köröskényi, K., Garabuczi, É., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2008). Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse. *Amino Acids*, 36 (4), 625–631.
110. Sarang, Z., Köröskényi, K., Pallai, A., Duró, E., Melino, G., Griffin, M. et al. (2011). Transglutaminase 2 null macrophages respond to lipopolysaccharide stimulation by elevated proinflammatory cytokine production due to an enhanced $\alpha\beta3$ integrin-induced Src tyrosine kinase signaling. *Immunology Letters*, 138 (1), 71–78.
111. Bernassola, F., Federici, M., Corazzari, M., Terrinoni, A., Hribal, M. L., DE Laurenzi, V. et al. (2002). Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *The FASEB Journal*, 16 (11), 1371–1378.
112. Nakaoka, H., Perez, D., Baek, K., Das, T., Husain, A., Misono, K. et al. (1994). Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*, 264 (5165), 1593–1596.
113. Feng, J.-F., Rhee, S. G., & Im, M.J. (1996). Evidence That Phospholipase $\delta1$ Is the Effector in the Gh (Transglutaminase II)-mediated Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (28), 16451–16454.

114. Baek, K.J., Das, T., Gray, C.D., Desai, S., Hwang, K.C., Gacchui, R., Ludwig, M., Im, M.J. (1996). A 50 KDa protein modulates guanine nucleotide binding of transglutaminase II. *Biochemistry*, 35, 2651–2657.
115. Park, E.-S., Won, J. H., Han, K. J., Suh, P.-G., Ryu, S. H., Lee, H. S. et al. (1998). Phospholipase C- δ 1 and oxytocin receptor signalling: evidence of its role as an effector. *Biochemical Journal*, 331 (1), 283–289.
116. Vezza, R., Habib, A., & FitzGerald, G. A. (1999). Differential Signaling by the Thromboxane Receptor Isoforms via the Novel GTP-binding Protein, Gh. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (18), 12774–12779.
117. Lin, Y.-F., Tseng, M.-J., Hsu, H.-L., Wu, Y.-W., Lee, Y.-H., & Tsai, Y.-H. (2006). A Novel Follicle-Stimulating Hormone-Induced G α h/Phospholipase C- δ 1 Signaling Pathway Mediating Rat Sertoli Cell Ca²⁺-Influx. *Molecular Endocrinology*, 20 (10), 2514–2527.
118. Feng, J.-F., Gray, C. D., & Im, M.-J. (1999). α 1B-adrenoreceptor interacts with multiple sites of transglutaminase II: Characteristics of the interaction in binding and activation. *Biochemistry*, 38 (7), 2224–2232.
119. Nurminskaya, M. V., & Belkin, A. M. (2012). Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 1–97.
120. Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal*, 368 (2), 377–396.
121. Kim, S.-Y., Jeitner, T. M., & Steinert, P. M. (2002). Transglutaminases in disease. *Neurochemistry International*, 40 (1), 85–103.
122. Lorand, L., & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (2), 140–156.
123. Gentile, V., Porta, R., Chiosi, E., Spina, A., Valente, F., Pezone, R. et al. (1997). tTGase/G α h protein expression inhibits adenylate cyclase activity in Balb-C 3T3 fibroblasts membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1357 (1), 115–122.
124. Lee, M.Y., Chung, S., Bang, H.W., Baek, K.J., Uhm, D.Y. (1997). Modulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel by G α h (transglutaminase II) in the vascular smooth muscle cell. *Eur. J. Physiol*, 433, 671–673.
125. Mastroberardino, P. G., Farrace, M. G., Viti, I., Pavone, F., Fimia, G. M., Melino, G. et al. (2006). Tissue transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757 (9-10), 1357–1365.
126. Lai, T.-S. (2017). Tissue transglutaminase TG2 and mitochondrial function and dysfunction. *Frontiers in Bioscience*, 22 (7), 1114–1137.
127. Rossin, F., D'Eletto, M., Falasca, L., Sepe, S., Cocco, S., Fimia, G. M. et al. (2014). Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis. *Cell Death & Differentiation*, 22 (3), 408–418.

128. Battaglia, G., Farrace, M. G., Mastroberardino, P. G., Viti, I., Fimia, G. M., Van Beeumen, J. et al. (2007). Transglutaminase 2 ablation leads to defective function of mitochondrial respiratory complex I affecting neuronal vulnerability in experimental models of extrapyramidal disorders. *Journal of Neurochemistry*, 100 (1), 36–49.
129. Szondy, Z., Mastroberardino, P. G., Váradi, J., Farrace, M. G., Nagy, N., Bak, I. et al. (2006). Tissue transglutaminase (TG2) protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by regulating ATP synthesis. *Cell Death and Differentiation*, 13 (10), 1827–1829.
130. Carelli, V., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial DNA: Impacting Central and Peripheral Nervous Systems. *Neuron*, 84 (6), 1126–1142.
131. Lightowlers, R. N., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science*, 349 (6255), 1494–1499.
132. Sebastián, D., & Zorzano, A. (2018). Mitochondrial dynamics and metabolic homeostasis. *Current Opinion in Physiology*, 3, 34–40.
133. Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (2003). The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-Like Protein DLP1. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (15), 5409–5420.
134. Kong, D., Xu, L., Yu, Y., Zhu, W., Andrews, D. W., Yoon, Y., & Kuo, T. H. (2005). Regulation of Ca²⁺-induced permeability transition by Bcl-2 is antagonized by Drp1 and hFis1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 272 (1-2), 187–199.
135. Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., & Rojo, M. (2002). Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (12), 4343–4354.
136. Ferree, A., & Shirihai, O. (2012). Mitochondrial Dynamics: The Intersection of Form and Function. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation*, 13–40.
137. Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 212 (4), 379–387.
138. Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F. et al. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell*, 1 (4), 515–525.
139. Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 15 (11), 5001–5011.
140. Yu, T. (2005). Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *Journal of Cell Science*, 118 (18), 4141–4151.
141. Gomes, L. C., & Scorrano, L. (2008). High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777 (7-8), 860–866.

142. Jourdain, I., Gachet, Y., & Hyams, J. S. (2009). The dynamin related protein Dnm1 fragments mitochondria in a microtubule-dependent manner during the fission yeast cell cycle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66 (8), 509–523.
143. Shroff, E. H., Snyder, C. M., Budinger, G. R. S., Jain, M., Chew, T.-L., Khuon, S., et al. (2009). BH3 Peptides Induce Mitochondrial Fission and Cell Death Independent of BAX/BAK. *PLoS ONE*, 4 (5), e5646.
144. Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S. O., Masuda, K. et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biology*, 11 (8), 958–966.
145. Kane, L. A., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart. *Journal of Molecular Medicine*, 88 (10), 971–979.
146. Choudhary, V., Kaddour-Djebbar, I., Lakshmikanthan, V., Ghazaly, T., Thangjam, G. S., Sreekumar, A., et al. (2011). Novel role of androgens in mitochondrial fission and apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 9 (8), 1067–1077.
147. Grohm, J., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2010). Bid mediates fission, membrane permeabilization and peri-nuclear accumulation of mitochondria as a prerequisite for oxidative neuronal cell death. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24 (5), 831–838.
148. Karbowski, M. (2010). Mitochondria on Guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis. *BCL-2 Protein Family*, 131–142.
149. Mendl, N., Occhipinti, A., Muller, M., Wild, P., Dikic, I., & Reichert, A. S. (2011). Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *Journal of Cell Science*, 124 (8), 1339–1350.
150. Wilkerson, D. C., & Sankar, U. (2011). Mitochondria: A sulfhydryl oxidase and fission GTPase connect mitochondrial dynamics with pluripotency in embryonic stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43 (9), 1252–1256.
151. Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (25), 10190–10195.
152. Dorn, G. W. (2018). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annual Review of Physiology*, 81 (1).
153. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays In Biochemistry*, 62 (3), 341–360.
154. Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N. A., McNiven, M. A., & Schrader, M. (2005). A Role for Fis1 in Both Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16 (11), 5077–5086.
155. Serasinghe, M. N., & Yoon, Y. (2008). The mitochondrial outer membrane protein hFis1 regulates mitochondrial morphology and fission through self-interaction. *Experimental Cell Research*, 314 (19), 3494–3507.

156. Otera, H., Wang, C., Cleland, M. M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J., & Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 191 (6), 1141–1158.
157. James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y., & Martinou, J.-C. (2003). hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (38), 36373–36379.
158. Huang, P., Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2011). Control of Mitochondrial Morphology Through Differential Interactions of Mitochondrial Fusion and Fission Proteins. *PLoS ONE*, 6 (5), e20655.
159. Cai, Q., & Tammineni, P. (2016). Alterations in Mitochondrial Quality Control in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10.
160. Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2016). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23 (1), 5–22.
161. Zhu, Y., Soto, J., Anderson, B., Riehle, C., Zhang, Y. C., Wende, A. R. et al. (2013). Regulation of fatty acid metabolism by mTOR in adult murine hearts occurs independently of changes in PGC-1 α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305 (1), H41–H51.
162. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research*, 79 (2), 208–217.
163. Ploumi, C., Daskalaki, I., & Tavernarakis, N. (2016). Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *The FEBS Journal*, 284 (2), 183–195. doi:10.1111/febs.13820
164. Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death & Differentiation*, 22 (9), 1399–1401.
165. Dominy, J. E., & Puigserver, P. (2013). Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (7), a015008–a015008.
166. Hock, M. B., & Kralli, A. (2009). Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function. *Annual Review of Physiology*, 71 (1), 177–203.
167. Yun, J., & Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*, 19 (5), 757–766.
168. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183 (5), 795–803.
169. Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., & Youle, R. J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*, 6 (8), 1090–1106.

170. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2009). Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy*, 5 (5), 706–708.
171. Sahin, E., & DePinho, R. A. (2012). Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (6), 397–404.
172. Svensson, P.A., Jernas, M., Sjöholm, K., Hoffmann, J.M., Nilsson, B.E., Hansson, M., Carlsson, L.M.S. (2011). Gene expression in human brown adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*, 27 (2).
173. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127,(6):1109-22.
174. Sarang, Z., Molnár, P., Németh, T., Gomba, S., Kardon, T., Melino, G., et al. (2015). Tissue transglutaminase (TG2) acting as G protein protects hepatocytes against Fas-mediated cell death in mice. *Hepatology*, 42 (3), 578–587.
175. MacPherson, R. E. K., Castellani, L., Beaudoin, M.-S., & Wright, D. C. (2014). Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307 (7), E563–E570.
176. Rajbhandari, P., Thomas, B. J., Feng, A.-C., Hong, C., Wang, J., Vergnes, L. et al. (2018). IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell*, 172 (1-2), 218–233.e17.
177. Wang, Y., Thatcher, S. E., & Cassis, L. A. (2017). Measuring Blood Pressure Using a Noninvasive Tail Cuff Method in Mice. *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 69–73.
178. Daugherty, A., Rateri, D., Hong, L., & Balakrishnan, A. (2009). Measuring Blood Pressure in Mice using Volume Pressure Recording, a Tail-cuff Method. *Journal of Visualized Experiments*, (27).
179. Hron, W.T., Menahan, L.A. (1981). A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *Journal of Lipid Research*, 22, 377–381.
180. Nishida, H. I., Arai, H., & Nishida, T. (1993). Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (22), 16352–16360.
181. Van der Heiden, C., Bais, R., Gerhardt, W., Lorentz, K., Rosalki, S. (1994). Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*, 32, 639–655.
182. Mathieu, M., Bretauiere, J.P., Galteau, M.M., Guidollet, J., Lalegerie, P., Bailly, M., Buret, P., Dorche, C., Louisot, P., Schiele, F. (1982). Recommendations for measuring the catalytic concentration of creatine kinase in human serum at 30 oC. *Ann. Biol. Clin.* 40, 138–149.

183. Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Clerc-Renaud, P., Ferrero, C. A., Férard, G. et al. (2002). IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 2. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Creatine Kinase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40 (6).
184. Dietz, A. A., & Lubrano, T. (1967). Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 20 (2), 246–257.
185. Bene, L., Kanyári, Z., Bodnár, A., Kappelmayer, J., Waldmann, T. A., Vámosi, G., & Damjanovich, L. (2007). Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4+ T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361 (1), 202–207.
186. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9 (7), 676–682.
187. Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82(7-8), 518–529.
188. Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., et al. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metabolism*, 24 (3), 402–419.
189. Fodor, T., Szántó, M., Abdul-Rahman, O., Nagy, L., Dér, Á., Kiss, B., & Bai, P. (2016). Combined Treatment of MCF-7 Cells with AICAR and Methotrexate, Arrests Cell Cycle and Reverses Warburg Metabolism through AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and FOXO1. *PLOS ONE*, 11 (2), e0150232
190. Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18 (1).
191. Virág, L., Kerékgyártó, C., & Fachet, J. (1995). A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 185 (2), 199–208.
192. Slater, T. F., Sawyer, B. & Sträuli, U. (1963). *Biochim. Biophys Acta* 77, 383-393.
193. Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., Boyd, M.R. (1991). *Cancer Res.* 51, 2515–2520.
194. Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D.-P., & Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397 (3), 603–607.
195. Jambrovics, K., Uray, I. P., Keillor, J. W., Fésüs, L., & Balajthy, Z. (2020). Benefits of Combined All-Trans Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Treatment of Acute Promyelocytic

- Leukemia Cells and Further Enhancement by Inhibition of Atypically Expressed Transglutaminase 2. *Cancers*, 12(3), 648.
196. Zielonka, J., Lambeth, J. D., & Kalyanaraman, B. (2013). On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1310–1314.
 197. Nagy, L., Márton, J., Vida, A., Kis, G., Bokor, É., Kun, S. et al. (2017). Glycogen phosphorylase inhibition improves beta cell function. *British Journal of Pharmacology*, 175 (2), 301–319.
 198. Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C. et al. (2019). Ilastik: interactive machine learning for (bio) image analysis. *Nature Methods*, 16 (12), 1226–1232.
 199. Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M., & Carpenter, A. E. (2007). CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*, 42 (1), 71–75.
 200. Armenta, J. M., Cortes, D. F., Pisciotta, J. M., Shuman, J. L., Blakeslee, K., Rasoloson, D. et al. (2010). Sensitive and Rapid Method for Amino Acid Quantitation in Malaria Biological Samples Using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-MS/MS with Multiple Reaction Monitoring. *Analytical Chemistry*, 82 (2), 548–558.
 201. Tóth, B. B., Arianti, R., Shaw, A., Vámos, A., Veréb, Z., Pólska, S. et al. (2020). FTO Intronic SNP Strongly Influences Human Neck Adipocyte Browning Determined by Tissue and PPAR γ Specific Regulation: A Transcriptome Analysis. *Cells*, 9 (4), 987.
 202. Semlitsch, G., Buchinger, W., Reiterer, E., Binter, G., & Rainer, F. (2000). Bestimmung von freiem Trijodthyronin (FT3) mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay bei Patienten mit peripheren Autoantikörpern gegen Trijodthyronin. *Acta Medica Austriaca*, 27 (2), 54–55.
 203. Kazerouni, F., Amirrasouli, H. (2012). Performance characteristics of three automated immunoassays for thyroid hormones. *Caspian J Intern Med*, 3 (2): 400–404.
 204. Mádi, A., Cuaranta-Monroy, I., Lénárt, K., Pap, A., Mezei, Z. A., Kristóf, E. et al. (2017). Browning deficiency and low mobilization of fatty acids in gonadal white adipose tissue leads to decreased cold-tolerance of transglutaminase 2 knock-out mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862 (12), 1575–1586.
 205. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, 19 (10), 1338–1344.
 206. Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R. K., Banks, A. S. et al. (2012). TRPV4 Is a Regulator of Adipose Oxidative Metabolism, Inflammation, and Energy Homeostasis. *Cell*, 151 (1), 96–110.
 207. Taguchi, K., Yang, M., Goepel, M., & Michel, M. C. (1998). Comparison of human $\alpha 1$ -adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 357 (2), 100–110.

208. Siegl, P.K.; McNeill, J.H. (1980). Comparison of the alpha-adrenergic agonists, phenylephrine and methoxamine in rabbit papillary muscles. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*, 30, 221–231.
209. Bloom, J.D., Dutia, M.D., Johnson, B.D., Wissner, A., Burns, M.G., Largis, E.E., Dolan, J.A., Claus, T.H. (1992). Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxymethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL 316,243). A potent α -adrenergic agonist virtually specific for β_3 -adrenoceptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 3081–3084.
210. Garcia, R. A., Roemmich, J. N., & Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutrition & Metabolism*, 13 (1).
211. Cypess, A. M., White, A. P., Vernochet, C., Schulz, T. J., Xue, R., Sass, C. A. et al. (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature Medicine*, 19 (5), 635–639.
212. Westphal, S., Gantert, T., Kless, C., Hüttinger, K., Klingenspor, M., & Fromme, T. (2019). Fibroblast growth factor 8b induces uncoupling protein 1 expression in epididymal white preadipocytes. *Scientific Reports*, 9 (1).
213. Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2005). Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*, 63 (8), 2311–2322.
214. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H. C. et al. (2010). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*, 12(3), 222–230.
215. Adam-Vizi, V. (2005). Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: Contribution by Electron Transport Chain and Non–Electron Transport Chain Sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7 (9-10), 1140–1149.
216. Moro, M., Almeida, A., Bolanos, J., & Lizasoain, I. (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39 (10), 1291–1304.
217. Wan, Z., Root-McCaig, J., Castellani, L., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., & Wright, D. C. (2013). Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 α expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. *Obesity*, 22 (3), 730–738.
218. Yoo, H., Antoniewicz, M. R., Stephanopoulos, G., & Kelleher, J. K. (2008). Quantifying Reductive Carboxylation Flux of Glutamine to Lipid in a Brown Adipocyte Cell Line. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (30), 20621–20627.
219. Snell, K., & Duff, D. A. (1977). Alanine release by rat adipose tissue in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77 (3), 925–931.
220. Lee, Y., Lee, H.-Y., Hanna, R. A., & Gustafsson, Å. B. (2011). Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in

- cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H1924–H1931.
221. Nunemaker, C. S., Chung, H. G., Verrilli, G. M., Corbin, K. L., Upadhye, A., & Sharma, P. R. (2014). Increased serum CXCL1 and CXCL5 are linked to obesity, hyperglycemia, and impaired islet function. *Journal of Endocrinology*, 222(2), 267–276.
 222. Peeters, R. P., Hernandez, A., Ng, L., Ma, M., Sharlin, D. S., Pandey, M. et al. (2013). Cerebellar Abnormalities in Mice Lacking Type 3 Deiodinase and Partial Reversal of Phenotype by Deletion of Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$. *Endocrinology*, 154 (1), 550–561.
 223. De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2005). Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. *Life Sciences*, 77(14), 1651–1666.
 224. Porcelli, V., Fiermonte, G., Longo, A., & Palmieri, F. (2014). The Human Gene SLC25A29, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (19), 13374–13384.
 225. McAninch, E. A., & Bianco, A. C. (2014). Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311 (1), 77–87.
 226. Lombardi, A., Moreno, M., de Lange, P., Iossa, S., Busiello, R. A., & Goglia, F. (2015). Regulation of skeletal muscle mitochondrial activity by thyroid hormones: focus on the “old” triiodothyronine and the “emerging” 3,5-diiodothyronine. *Frontiers in Physiology*, 6.
 227. Haitina, T., Lindblom, J., Renström, T., & Fredriksson, R. (2006). Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*, 88 (6), 779–790.
 228. Sveinbjornsson, G., Mikaelsdottir, E., Palsson, R., Indridason, O. S., Holm, H., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Eyjolfsson G.I., Sigurdardottir, O., Magnusson, O.T., Kong A., Masson, G., Sulem, P., Olafsson, I., Thorsteinsdottir, U., Gudbjartsson, D.F., Stefansson, K. (2014). Rare mutations associating with serum creatinine and chronic kidney disease. *Human Molecular Genetics*, 23 (25), 6935–6943.
 229. Paquette, M. A., Dong, H., Gagné, R., Williams, A., Malowany, M., Wade, M. G., & Yauk, C. L. (2011). Thyroid hormone-regulated gene expression in juvenile mouse liver: identification of thyroid response elements using microarray profiling and in silico analyses. *BMC Genomics*, 12 (1).
 230. Fiermonte, G., Paradies, E., Todisco, S., Marobbio, C. M. T., & Palmieri, F. (2009). A Novel Member of Solute Carrier Family 25 (SLC25A42) Is a Transporter of Coenzyme A and Adenosine 3',5'-Diphosphate in Human Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (27), 18152–18159.
 231. Almannai, M., Alasmari, A., Alqasmi, A., Fageih, E., Al Mutairi, F., Alotaibi, M. et al. (2018). Expanding the phenotype of SLC25A42 -associated mitochondrial encephalomyopathy. *Clinical Genetics*, 93(5), 1097–1102.

232. Chou, F.S., & Wang, P.S. (2020). The SLC25A42 Transcript Is a Biomarker for Fetal Reprogramming in Response to Placental Insufficiency in Preterm Newborns Under 32 Weeks Gestation—A Pilot Study. *Frontiers in Pediatrics*, 8.
233. Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F. et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development*, 26 (3), 271–281.
234. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., & Granneman, J. G. (2013). Identification of an Adipogenic Niche for Adipose Tissue Remodeling and Restoration. *Cell Metabolism*, 18 (3), 355–367.
235. Lowell, B. B., S-Susulic, V., Hamann, A., Charles, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J. et al. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366 (6457), 740–742.
236. Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009). UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism*, 9 (2), 203–209.
237. Sharp, L. Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D. W., Tomoda, E., Ruiz, L., et al. (2012). Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS ONE*, 7(11), e49452.
238. Whittle, A. J., López, M., & Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity – the central issue. *Trends in Molecular Medicine*, 17 (8), 405–411.
239. Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W. D., & Spiegelman, B. M. (2015). The future of brown adipose tissues in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 58 (8), 1704–1707.
240. Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Elia, E. F., Kessler, S. H., Kahn, P. A. et al. (2015). Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metabolism*, 21 (1), 33–38.
241. Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., Nedergaard, J. (2009). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (10), 7153–7164.
242. Deveau, C., Beauvoit, B., Salin, B., Schaeffer, J., Rigoulet, M. (2004). Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 267, no. 1-2, pp. 157–166, 2004.
243. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by β 3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metabolism*, 15 (4), 480–491.
244. Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359.

245. Belfrage, P., Fredrikson, G., Nilsson, N.O., Stralfors, P. (1981). Regulation of adipose tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase, *Int. J. Obes.* (5), 635–641.
246. Shimizu, Y., Tanishita, T., Minokoshi, Y., & Shimazu, T. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinase by norepinephrine in brown adipocytes from rats. *Endocrinology*, 138(1), 248–253.
247. Barge, R. M., Mills, I., Silva, J. E., & Larsen, P. R. (1988). Phorbol esters, protein kinase C, and thyroxine 5'-deiodinase in brown adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 254 (3), E323–E327.
248. Greenberg, A. S., Shen, W.-J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A., & Kraemer, F. B. (2001). Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45456–45461.
249. Cho, K.-J., Shim, J.-H., Cho, M.-C., Choe, Y.-K., Hong, J.-T., Moon, D.-C. et al. (2005). Signaling pathways implicated in α -melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96 (4), 869–878.
250. Li, Y., Zheng, X., Liu, B., & Yang, G. (2009). Regulation of ATGL expression mediated by leptin in vitro in porcine adipocyte lipolysis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333 (1-2), 121–128.
251. Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X. et al. (2004). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (7), 3057–3067.
252. Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes, *J. Clin. Invest.* 122 (3) 1022–1036.
253. DeGraff, A. C., Frieden, J., Ahlquist, R. P. (1976). Present state of alpha and beta adrenergic drugs. *American Heart Journal*, 92 (6), 804–807.
254. Chen, Z., & Minneman, K. P. (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (11), 1281–1287.
255. Chen, S., Lin, F., Iismaa, S., Lee, K. N., Birckbichler, P. J., Graham, R. M. (1996). α 1-Adrenergic Receptor Signaling via GhIs Subtype Specific and Independent of Its Transglutaminase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (50), 32385–32391.
256. Shi, T., Papay, R. S., Perez, D. M. (2016). The role of α 1-adrenergic receptors in regulating metabolism: increased glucose tolerance, leptin secretion and lipid oxidation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 37 (2), 124–132.
257. Ferrer-Lorente, R., Cabot, C., Fernández-López, J.-A., Alemany, M. (2005). Combined effects of oleoyl-estrone and a β 3-adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats. *Life Sciences*, 77 (16), 2051–2058.

258. Blaak, E. E., Van Baak, M. A., Kemerink, G. J., Pakbiers, M. T., Heidendal, G. A., Saris, W. H. (1994). beta-Adrenergic stimulation of skeletal muscle metabolism in relation to weight reduction in obese men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 267 (2), E316–E322.
259. Ballou, L. M., Tian, P.-Y., Lin, H.-Y., Jiang, Y.-P., Lin, R. Z. (2001). Dual Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β by the α 1A-Adrenergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (44), 40910–40916.
260. Burcelin, R., Uldry, M., Foretz, M., Perrin, C., Dacosta, A., Nenniger-Tosato, M. et al. (2003). Impaired Glucose Homeostasis in Mice Lacking the α 1b-Adrenergic Receptor Subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2), 1108–1115.
261. Skoglund, G., Lundquist, I., & Åhrén, B. (1987). α 1- and α 2-adrenoceptor activation increases plasma glucagon levels in the mouse. *European Journal of Pharmacology*, 143 (1), 83–88.
262. Sánchez-Andrés, J. V., Gomis, A., Valdeolmillos, M. (1995). The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. *The Journal of Physiology*, 486 (1), 223–228.
263. Gelotte, C. K., & Zimmerman, B. A. (2015). Pharmacokinetics, Safety, and Cardiovascular Tolerability of Phenylephrine HCl 10, 20, and 30 mg After a Single Oral Administration in Healthy Volunteers. *Clinical Drug Investigation*, 35 (9), 547–558.
264. Raffel, D.M., Corbett, J.R., del Rosario, R.B., Gildersleeve, D.L., Chiao, P.C., Schwaiger, M., Wieland, D.M. (1996). Clinical evaluation of carbon-11-phenylephrine: MAO-sensitive marker of cardiac sympathetic neurons. *J. Nucl. Med.* (37), 1923–1931.
265. Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Müller, C., Carling, D., Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339–343.
266. Minokoshi, Y., Toda, C., Okamoto, S. (2012). Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16 (Suppl. 3), S562–S568.
267. Cooper, B.E. Review and update on inotropes and vasopressors. (2008). *AACN Adv. Crit. Care*, 19 (1), 5–13.
268. Motta, M. M. S., Coblentz, J., Fernandes, B. F., & Burnier, Jr., M. N. (2009). Mydriatic and Cardiovascular Effects of Phenylephrine 2.5% versus Phenylephrine 10%, Both Associated with Tropicamide 1% Ophthalmic Research, 42 (2), 87–89.
269. Dubroca, C., Lacombe, P., Domenga, V., Maciazek, J., Levy, B., Tournier-Lasserre, E. et al. (2004). Impaired Vascular Mechanotransduction in a Transgenic Mouse Model of CADASIL Arteriopathy. *Stroke*, 36(1), 113–117.
270. Cavalli, A., Lattion, A.-L., Hummler, E., Nenniger, M., Pedrazzini, T., Aubert, J.-F. et al. (1997). Decreased blood pressure response in mice deficient of the α 1b-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (21), 11589–11594.
271. Baek, K. J., Kang, S. K., Damron, D. S., & Im, M.-J. (2000). Phospholipase C δ 1 Is a Guanine Nucleotide Exchanging Factor for Transglutaminase II (G α h) and Promotes α 1B-

- Adrenoreceptor-mediated GTP Binding and Intracellular Calcium Release. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (8), 5591–5597.
272. Kang, S. K., Kim, D. K., Damron, D. S., Baek, K. J., Im, M.-J. (2002). Modulation of intracellular Ca^{2+} via $\alpha 1\text{B}$ -adrenoreceptor signaling molecules, G α h (transglutaminase II) and phospholipase C- $\delta 1$. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293 (1), 383–390.
 273. Kang, S.K., Yi, K.S., Kwon, N.S., Park, K.H., Kim, U.H., Baek, K.J., Im, M.J. (2004). Alpha1B-adrenoceptor signaling and cell motility: GTPase function of Gh/transglutaminase 2 inhibits cell migration through interaction with cytoplasmic tail of integrin alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 36593–36600.
 274. Steppan, J., Bergman, Y., Viegas, K., Armstrong, D., Tan, S., Wang, H., Melucci, S., Hori, D., Park, S.Y., Barreto, S.F. et al. (2017). Tissue transglutaminase modulates vascular stiffness and function through crosslinking-dependent and crosslinking-independent functions. *J. Am. Heart Assoc.* 6, e004161.
 275. Burd, J. F., Usategui-Gomez, M. (1973). A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta*, 46 (3), 223–227.
 276. Chan, F. K.-M., Moriwaki, K., De Rosa, M. J. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. *Immune Homeostasis*, 65–70.
 277. Stahl, F. R., Jung, R., Jazbutyte, V., Ostermann, E., Tödter, S., Brixel, R. et al. (2018). Laboratory diagnostics of murine blood for detection of mouse cytomegalovirus (MCMV)-induced hepatitis. *Scientific Reports*, 8 (1).
 278. Yasuda, J., Tateyama, K., Syut, B., Too, K. (1990). Lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase isoenzymes in tissues of laboratory animals. *Jpn. J. Vet. Res.* (38), 19–29.
 279. Guzy, P.M. (1977). Creatine phosphokinase-MB (CPK-MB) and the diagnosis of myocardial infarction. *West. J. Med.*, (127), 455–460.
 280. Myneni, V. D., Melino, G., & Kaartinen, M. T. (2015). Transglutaminase 2—a novel inhibitor of adipogenesis. *Cell Death & Disease*, 6 (8), e1868–e1868.
 281. Long, J. Z., Svensson, K. J., Tsai, L., Zeng, X., Roh, H. C., Kong, X. et al. (2014). A Smooth Muscle-Like Origin for Beige Adipocytes. *Cell Metabolism*, 19 (5), 810–820.
 282. Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Experimental Biology and Medicine*, 226(11), 997–1002.
 283. Lin, C. S., & Klingenberg, M. (1980). Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Letters*, 113(2), 299–303.
 284. Liu, R., & Chan, D. C. (2015). The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1. *Molecular Biology of the Cell*, 26(24), 4466–4477.
 285. Jheng, H.-F., Tsai, P.-J., Guo, S.-M., Kuo, L.-H., Chang, C.-S., Su, I.-J. et al. (2011). Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 32 (2), 309–319.

286. Harmuth, T., Prell-Schicker, C., Weber, J. J., Gellerich, F., Funke, C., Drießen, S. et al. (2018). Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
287. Fernandez-Marcos, P. J., Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93 (4), 884S–890S.
288. Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., Jäeger, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Spiegelman, B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes & Development*, 18 (3), 278–289.
289. Jager, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (29), 12017–12022.
290. Knutti, D., Kressler, D., Kralli, A. (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (17), 9713–9718.
291. Rossin, F., Costa, R., Bordi, M., D'Eletto, M., Occhigrossi, L., Farrace, M. G. et al. (2021). Transglutaminase Type 2 regulates the Wnt/ β -catenin pathway in vertebrates. *Cell Death & Disease*, 12(3).
292. Yau, W. W., & Yen, P. M. (2020). Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3020.
293. Ye, L., Wu, J., Cohen, P., Kazak, L., Khandekar, M. J., Jedrychowski, M. P. et al. (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12480–12485.
294. Xue, H., Wang, Z., Hua, Y., Ke, S., Wang, Y., Zhang, J. et al. (2018). Molecular signatures and functional analysis of beige adipocytes induced from in vivo intra-abdominal adipocytes. *Science Advances*, 4 (7), eaar5319.

11. Tárgyszavak

metabolizmus, elhízás, beige adipocita, preadipocita, differenciáció, gonadális zsírszövet, szöveti transzglutamináz, termogenezis, UCP1, hidegkezelés, adrenerg agonista, indirekt kalorimetria, mitokondrium, hipometabolizmus, tiroid-anyagcsere, SLC traszporterek, biogenezis,

12. Keywords

metabolism, obesity, beige adipocyte, preadipocyte, differentiation, gonadal white adipose tissue (GONAT), tissue transglutaminase, thermogenesis, UCP1, cold exposure, adrenergic agonist, indirect calorimetry, mitochondria, hypometabolism, thyroid metabolism, SLC transporters, biogenesis

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mádi Andrásnak, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és értekezésem megírásához. Hálával tartozom támogatásáért, humoráért és nélkülözhetetlen szakmai tanácsaiért, amivel BSc-s tanulmányaimtól kezdve alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemmhez és kutatói pályám egyengetéséhez.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fésüs László akadémikusnak, aki lehetővé tette a munkacsoportjához való csatlakozást, ezáltal PhD tanulmányaimat barátságos légkörben, nagy szakmai tudással rendelkező kutatók között végezhettem. Továbbá köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Tőzsér József intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunkát a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben.

Szeretném megköszönni az Intézet minden munkatársának türelmét és segítségét.

Külön köszönettel tartozom az Orvosi Vegytani Intézetből Prof. Dr. Bay Péternek gyakorlati tanácsaiért és segítségéért, akihez mindig fordulhattam szakmai kérdésekkel.

Hálával és köszönettel tartozom Dr. Jambrovics Károlynak folyamatos segítségéért, elméleti és szakmai ismereteinek megosztásáért. Köszönet illeti Nagy Jennifer és Nagy Anikó asszisztensi tevékenységét, melyek nagyban segítették kísérletes munkámat.

Továbbá hálával tartozom Újlaki Gyulának a HCS elemzésekben nyújtott segítségéért, valamint Dr. Bacsó Zsoltnak és Bankó Csabának a lézer-pásztázó képalkotás kivitelezésének hozzájárulásához.

Szeretném megköszönni az Anatómiai Intézetből Kis Nikoletta Grétának és Dr. Antal Miklós Professzor Úrnak az elektronmikroszkópos képek elkészítését.

Köszönetet mondok kollégáimnak, Csobán-Szabó Zsuzsának, Dr. Jambrovics Károlynak, Rini Ariantinak és a laborunk minden munkatársának a jó hangulatban eltöltött mindennapokért.

Köszönöm barátaimnak, hogy mindig biztattak és mellettem álltak.

Legnagyobb hálával azonban a családomnak, szüleimnek és férjemnek tartozom, akik támaszt nyújtottak, pótolhatatlan szeretetükkel, gondoskodással és türelemmel kísérték végig munkámat.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A disszertációhoz kapcsolódó kutatások az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3-I-DE-48, ÚNKP-19-3-I-DE-59, ÚNKP-20-3-II-DE-83 és az ÚNKP-21-4-I-DE-204 Új Nemzeti Kiválóság Programjának, továbbá az OTKA K105046, K108308 és K103965 ösztöndíjak a támogatásával készültek.

14. Publikációs lista



**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., Pólska, S., Rácz, R., Bereczki, J., **Lénárt, K.**, Barta, Z., Lendvai, Á. Z., Tökölyi, 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. Tökölyi, J., Bradács, F., Hóka, N., Kozma, N., Máté, M., Mucza, O., **Lénárt, K.**, Ósz, 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 tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2021.11.26.



15. Függelék