

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Elhízás-ellenes hőtermelő folyamatok kikapcsolása vagy
fenntartása humán bézs adipocitákban**

Vámos Attila

Témavezető: Dr. Kristóf Endre Károly



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	9
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. A metabolikus szindróma (MetS).....	10
2.2. Az elhízás	12
2.3. A zsírszövet és az adipocita típusok.....	13
2.4. A barna és bézs adipociták termogenezisben betöltött szerepe.....	15
2.5. A barna és bézs adipociták eredete.....	18
2.6. A hőtermelés aktiválása adipocitákban	19
2.7. A bézs-fehér adipocita átalakulás.....	23
2.8. A mitofágia és annak szerepe a termogenikus bézs adipociták szabályozásában	24
2.9. Az FTO gén.....	28
3. Célkitűzés	32
4. Anyagok és módszerek.....	33
4.1. Anyagok	33
4.2. Zsírszövet minták eredete és etikai engedélyek	33
4.3. Humán zsírszövet-eredetű sztrómális sejtek (hASC, preadipociták) izolálása és tenyésztése ...	33
4.4. A hASC-k differenciáltatása	33
4.5. RNS izolálás TRIzol reagens felhasználásával	35
4.6. Genomiális DNS izolálása TRIzol reagens felhasználásával	35
4.7. Genotipizálás valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)-rel	36
4.8. Reverz-transzkripció, qPCR és RNS-szekvencia analízis (RNS-Seq)	36
4.9. Mitokondriális DNS (mtDNS) izoláció és kvantifikáció PCR-rel	38
4.10. Antitestek és immunoblottolás	38
4.11. Immunfestés és képanalízis	39
4.12. Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás meghatározása.....	40
4.13. Az adipociták aminosav-fluxusainak mennyiségi meghatározása	40
4.14. Statisztikai analízis és ábrakészítés	41
5. Eredmények	42
5.1. A mitofágia közvetíti a humán bézs-fehér adipocita átalakulást primer szubkután zsírsejtekben <i>ex vivo</i>	42
5.1.1. A humán abdominális szubkután eredetű zsírsejtek termogenikus képessége folyamatos PPAR γ stimuláció hatására indukálódik, és a bézsből fehérbe való átalakulás eredményeként alábbhagy	42

5.1.2. A bézs adipociták megnövekedett mitokondriális tartalma, oxigénfogyasztása és extracelluláris savasodása eltűnik a fehér fenotípusra való átalakulásuk után	43
5.1.3. Az autofágia fokozódik a bézs-fehér adipocita átalakulás során.....	45
5.1.4. A bézs differenciáció gátolja, míg a bézs-fehér átalakulás fokozza a szelektív autofágia-adapterek által vezérelt mitofágiát.....	49
5.1.5. A parkin-független mitofágiával kapcsolt gének indukálódnak a bézs-fehér átalakulás során	52
5.2. Az FTO rs1421085 elhízás rizikó alléleket hordozó humán abdominális szubkután aktív bézs zsírsejtek alacsonyabb termogenikus kapacitást mutatnak.....	52
5.2.1. Az abdominális SC zsírból származó aktív bézs adipociták nagy barnulási kapacitást mutatnak	52
5.2.2. Az FTO rs1421085 elhízás rizikó alléleket hordozó aktív bézs adipociták alacsonyabb barna zsírsejt tartalommal rendelkeznek, és kisebb mértékben expresszálják a metabolikus útvonalakban résztvevő géneket	56
5.2.3. A termogenikus markergének kevésbé expresszálódnak elhízás rizikó FTO alléleket hordozó aktív bézs adipocitákban	59
5.2.4. Az FTO elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták kevesebb mitokondriális komplex alegységet expresszálnak, és kisebb a protoncsorgásos légzésük	60
5.2.5. Az FTO elhízás rizikó genotípust hordozó, termogenezisre aktivált adipociták kisebb mennyiségű semleges aminosavat fogyasztanak.....	63
6. Megbeszélés.....	68
6.1. Parkin-függő és független mitofágia közvetíti a bézs-fehér átalakulást a humán abdominális adipocitákban <i>ex vivo</i>	68
6.2. Humán abdominális szubkután adipocitákban az elhízás rizikó FTO rs1421085 allél jelenléte az energiafelszabadítás zavarát okozza.....	74
7. Összefoglalás.....	81
Summary.....	82
8. Irodalomjegyzék.....	83
9. Tárgyszavak.....	99
10. Köszönetnyilvánítás	100

Rövidítések jegyzéke

AHA-NHLBI - Amerikai Szív Egyesület és a Nemzeti Szív, Tüdő és Vér Intézet (American Heart Association, and the National Heart, Lung, and Blood Institute)

ALKBH - AlkB homológ

ANOVA - Varianciaanalízis

APC - Adipocita prekursor sejt

AR – Adrenerg receptor

ARID5b - AT-gazdag interakciós domén 5b (AT-rich interaction domain 5b)

ASC-1 - Alanin-szerin-cisztein transzporter 1

ATG - Autofágia kapcsolt protein

AU - Tetszőleges mértékegység (Arbitrary unit)

BAT - Barna zsírszövet

BCL2L13 - BCL2-szerű protein 13 (BCL2-like protein 13)

BNIP3 - BCL2/E1B 19 kDa-interakciós protein 3 (BCL2/E1B 19 kDa-interacting protein 3)

BNIP3L/NIX - BNIP3 szerű/NIP3-szerű protein X (BNIP3 Like/NIP3-Like protein X)

cAMP - Ciklikus adenzin-monofoszfát

CDK - Ciklin dependens kináz

CIDEA - Sejthalál indukáló DFFA szerű effektor A (Cell death inducing DFFA like effector A)

CITED1 - Cbp/P300 interakciós transzaktivátor Glu/Asp-ban gazdag karboxi-terminális domén 1 (Cbp/P300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1)

CK - Kreatin kináz

CKMT – Mitokondriális kreatin kináz

CPT – Karnitin palmitoil-transzferáz

Cr – Kreatin

CREB - cAMP válaszelem-kötő fehérje

CT - Számítógépes tomográfia

DB - Derékbőség

DCSA - Derék-csípő arány

DEG - Eltérően expresszált gén

DIO2 – II-es típusú dehidrogenáz

DM - Diabétesz mellitus

DMEM-F12 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham

EBF2 - Korai B sejt faktor 2

ECAR- Extracelluláris savasodási ráta

En1 - Csipkézett szegélyű 1 (Engrailed 1)

ER - Endoplazmatikus retikulum

ERR α - Ösztrogén-kapcsolt receptor alfa

ETO – Etomoxir

ETO-R – Etomoxir-rezisztens
FADH₂ - Flavin-adenin-dinukleotid
FBS - Magzati szarvasmarha szérum
FDR - Hamis felfedezési arány
FFA – Szabad zsírsav
Ffi - Férfiak
FG - Éhomi glükóz
FGF - Fibroblaszt növekedési faktor
FIP200 - Fokális adhézió kináz család interakciós 200 kDa protein (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa)
FKBP8 - FKBP prolil izomeráz 8
FOXO1 - Villásfejű doboz O1 (Forkhead box O1)
FTO - Zsír tömeg és elhízás asszociált (Fat mass and obesity associated)
FUNDC1 - FUN14 domént-tartalmazó protein 1 (FUN14 domain-containing protein 1)
GAPDH - Gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GFP – Zöld fluorescent protein
GLUT - Glükóz transzporter
GPT – Glutamát-piruvát transzamináz
GT - Glükóz terhelés
GWAS - Genom asszociációs tanulmány (Genome-wide association study)
hASC - Humán zsírszövet eredetű sztrómális sejt
HDL - Nagy sűrűségű lipoprotein
HOXC - Homeobox C
iBAT - Interszkapuláris BAT
IDF - Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation)
IGF2BP - Inzulin szerű növekedési faktor 2 mRNS kötő fehérje
IMT - Intermembrán tér
IRX - Irokéz homeobox transzkripció faktor
KÉG - Károsodott éhomi glikémia
KGT - Károsodott glükóztolerancia
KINY - Nemzetközi Diabétesz Szövetség Járványügyi és Megelőzési Munkacsoportjának; Nemzeti Szív-, Tüdő- és Vérintézetének; Amerikai szívsvövetségének; Szív Világszövetségének; Nemzetközi Atherosclerosis Társaságának; és az Elhízás Tanulmányozók Nemzetközi Szövetségének közös ideiglenes nyilatkozata
LC3 - Mikrotubulus-asszociált fehérje könnyűlánc 3
LEP – Leptin
LIR - LC3-interakciós régió
m³T - 3-metiltimin
m³U - 3-metiluracil
m⁶A - N⁶-metiladenozin

MetS - Metabolikus szindróma
METTL - N6-Adenozin-metiltransferáz alegység
MiT/TFE - Mikroftalmia/transzkripciós faktor E
MITF - Mikroftalmia-asszociált transzkripciós faktor
mtDNS – Mitokondriális dezoxiribonukleinsav
mTOR – Rapamicin emlős célpontja (Mammalian target of rapamycin)
Myf5 - Miogenikus faktor-5
Myh - Myozin nehézlánc
MyoD - Mioblaszt determinációs fehérje (Myoblast determination protein)
N - Nők
NADH - Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NASH - Nem alkoholos szteatohepatitisz
NBR1 - Brcal gén szomszéd (Neighbor of Brcal gene 1)
NCEP-ATP III - Nemzeti Koleszterin Oktatási Program harmadik jelentése, a felnőttek magas vérkoleszterinszintjének kimutatásával, értékelésével és kezelésével foglalkozó szakértői testület –felnőtt kezelés III. panele (Third Report of the National Cholesterol Education Program, the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults—Adult Treatment Panel III)
NDP52/CALCOCO2 - Nukleáris pontfehérje 52 kDa/kalciumkötő és tekercselt-tekercs domén 2 (Nuclear dot protein 52 kDa/Calcium binding and coiled-coil domain 2)
OCR – Oxigénfogyasztási ráta
OPTN - Optineurin
OXPHOS – Oxidatív foszforiláció génjei
p38-MAPK - p38 mitogén által aktivált protein kináz
PARK2 – Parkin 2
Pax 7 - Párosított doboz 7 (Paired box 7)
PCC - Pearson korrelációs együttható
PCOS - Policisztás ovárium szindróma
PCr - Kreatin-foszfát
PCR - Polimeráz-lánreakció
PDE - Foszfodiészteráz
PDGFRa/b - Vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor alfa/béta (Platelet derived growth factor receptor alpha/beta)
PE - Foszfatidil-etanol-amin
PET - Pozitronemissziós tomográfia
PI – Propídium jodid
PINK1 - Foszfátáz és tenzin homológ (PTEN)-indukált putatív kináz 1
PKA - Protein kináz A
PLIN1 – Perilipin 1
PM20D1 - Peptidáz M20 domént tartalmazó 1 (Peptidase M20 domain containing 1)

PPAR - Peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
PPARGC1A/ PGC-1 α - Peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1
Prdm16 - PRD1-BF-1-RIZ1 homológ domént-tartalmazó protein-16 (PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16)
PVDF - Polivinilidén-fluorid
qPCR - Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
RIN - RNS-integritási szám
S100B - S100 kalciumkötő fehérje B (S100 calcium binding protein B)
SARS-CoV-2 - Súlyos akut légúti szindróma koronavírus 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SC – Szubkután
SD - Standard deviáció
SGBS - Simpson–Golabi–Behmel-szindróma
SHMT1 – Szerin hidroximetiltranszferáz 1
SIRT1 - Szirtuin 1
SLC7A10 - Oldott anyagokat szállító család 7 tag 10 (Solute carrier family 7 member 10)
SMA - Spinalis izomsorvadás/ Túlélési motoros neuron protein (Spinal muscular atrophy/ Survival motor neuron protein)
SNP - Egy-nukleotid polimorfizmus (Single-nucleotide polymorphism)
SQSTM1 – Szekvesztoszóma 1
SVF - Sztómális-vaszkuláris frakció
sWAT - Szubkután WAT
T3 - 3,3',5-trijódtironin
T4 - Tiroxin
TCA – Trikarbonsav
TFE3 - IGHM enhancer 3-hoz kötődő transzkripciós faktor
TFEB - EB transzkripciós faktor
TG – Triglicerid
TH – Pajzsmirigy hormon
THF - Tetrahydrofolát
TOM20 – Külső mitokondriális membrán transzlokáz 20
TR - Pajzsmirigy receptor
TTI - Testtömeg-index
UBD - Ubikvitin-kötő domén
UCP - Szétkapcsoló fehérje (Uncoupling protein)
ULK - Unc-51-szerű autofágiát aktiváló kináz (Unc-51-like autophagy activating kinase)
UTR - Nem transzlálódó régió
WAT - Fehér zsírszövet
WHO - Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

YTHD - YTH N6-Metiladenozin RNS kötő fehérje

ZIC1 - Cink ujjfehérje-1

β 3-AR - β 3-adrenerg receptor

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben világszerte nőtt az elhízás előfordulása, mely elérte a járvány-szintű mértéket. Az elmúlt fél évszázadban a testtömeg-index (TTI) globálisan nőtt mind a nők, mind a férfiak körében. A testtömeg-gyarapodás a krónikus pozitív energiaegyensúlynak köszönhető, amikor az energiafelhasználás kisebb, mint az energiafelvétel. Annak ellenére, hogy számos tanulmány azt sugallja, hogy az elhízás fő oka a rendellenes táplálékfelvételhez köthető, bizonyos viselkedésbeli változások a közelmúltban (pl.: a fizikai aktivitáshoz kapcsolódó tevékenységek nagymértékű csökkenése) további magyarázatot adhatnak a folyamatos globális súlygyarapodásra. Ezenkívül az elhízás kialakulása erősen összefügg a társadalmi-gazdasági helyzettel és a környezeti tényezőkkel, amelyek meghatározhatják az epigenetikai módosításokat a gén-környezet kölcsönhatásokon keresztül. Az elhízott egyének zsírszöveti diszfunkciója abnormális gyulladást okoz az adipocitokin-termelés egyensúlyának felborulásával, amely a szív- és érrendszeri betegségek és számos helyspecifikus daganat kialakulásához kapcsolódik. A fentebb leírtak alapján látható, hogy rendelkezünk információkkal az elhízással kapcsolatban, azonban fontos annak kialakulásában résztvevő molekuláris mechanizmusok pontosabb megismerése új terápiás megközelítések létrehozásához.

Rágcsáló modellekben már több kísérletet végeztek, melyek az elhízás központi szövetében, a zsírszövetben vizsgálták a túlzott zsírraktározás mögött álló metabolikus útvonalakat. Az egyik ilyen publikációban közölték, hogy a szelektív mitokondrium eltávolításnak (mitofágiának) fontos szerepe van a hőtermelő zsírsejtek inaktivációjában, mely a zsírraktározáshoz vezet ezen sejtekben. Egy másik tanulmányban azonosították azt az oki egy-nukleotid polimorfizmust (single-nucleotide polymorphism, SNP) (rs1421085), amelynek jelenléte az adipogenezist a zsírraktározó fehér adipocita differenciáció felé indítja el, így növelve a felesleges energia zsírsav formában történő raktározását. Doktori értekezésemben a fentebb említett mitofágiát és az Fat mass and obesity associated (*FTO*) rs1421085 SNP-t vizsgáltam humán primer adipocitákban, mely eredményeim közelebb vihetnek bennünket a zsírsejtek anyagcseréjének, ezen keresztül pedig az elhízás jobb megértéséhez, mely újabb terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez vezethet a jövőben.

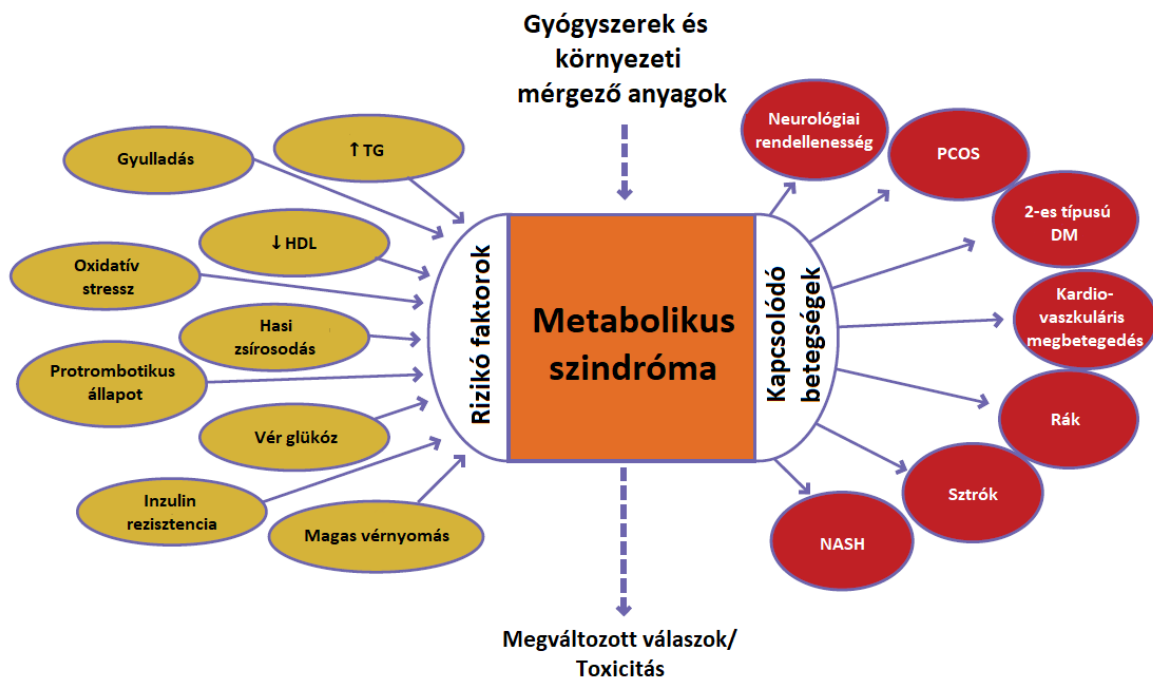
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A metabolikus szindróma (MetS)

A MetS a fő anyagcserezavarok összessége, amelyek közé tartozik a hasi zsírosodás, az inzulinrezisztencia, a diszlipidémia, a magas vérnyomás, melyek mellett szisztémás gyulladás is kialakulhat. Számos egészségügyi szervezet különböző kritériumokat állapított meg a MetS meghatározásához, melyeket az 1. táblázat részletez [Lemos és mtsai., 2023].

A MetS-át számos kockázati tényezővel, valamint számos feltételezett patofiziológiai mechanizmussal hozták összefüggésbe. Az elmúlt évtizedekben feltárták összetett patológiai jellemzőit, melyek számos rizikófaktort foglalnak magukba (1. ábra) [Saklayen, 2018; Menrick és mtsai., 2018]. A MetS összetevői patofiziológiailag összefüggenek egymással, és részben genetikai tényezők, valamint környezeti változók határozzák meg őket.

Az elhízás - mint az egyik kockázati tényező - maga is a MetS legfontosabb tüneteivel, például a vér glükóz koncentrációval van összefüggésben. A glükóztolerancia, az inzulinrezisztencia és a diszlipidémia, az elhízással összefüggésben számos vizsgálat középpontjában áll [Terán és Bouchard, 2007].



1. ábra: Metabolikus szindróma a kapcsolódó kockázati tényezőkkel és betegségekkel (TG: trigliceridek; HDL: nagy sűrűségű lipoprotein; PCOS: policisztás ovárium szindróma; NASH: nem alkoholos szteatohepatitisz; DM: diabétesz mellitus) [Menrick és mtsai., 2018 alapján].

Jellemzők	Definíció				
	WHO ¹	NCEP-ATP III ²	IDF ³	AHA-NHLBI ⁴	KINY ⁵
Károsodott glükóz anyagcsere	DM: ÉG \geq 126 vagy 2 h GT \geq 200 mg/dl vagy KGT: ÉG $<$ 126 és 200 $<$ 2 h GT \geq 140 mg/dl vagy KÉG: ÉG \geq 110 és 126 $<$ 2 h GT $<$ 140 mg/dl	ÉG \geq 110 mg/dl	ÉG \geq 100 mg/dl vagy korábban diagnosztizált DM	ÉG \geq 100 mg/dl vagy jelenlegi gyógyszeres kezelés \uparrow glükózra	ÉG \geq 100 mg/dl vagy jelenlegi gyógyszeres kezelés \uparrow glükózra
Központi elhízottság	DCSA $>$ 0.9 Ffi és $>$ 0.85 N vagy TTI $>$ 30 kg/m ²	DB $>$ 102 cm Ffi DB $>$ 88 N	DB $>$ 102 cm Ffi DB $>$ 88 N	DB \geq 102 cm Ffi DB \geq 88 N	Konkrét definíciók ország és népesség szerint
HDL	$<$ 35 mg/dl Ffi $<$ 39 mg/dl N	$<$ 40 mg/dl Ffi $<$ 50 mg/dl N	$<$ 40 mg/dl Ffi $<$ 50 mg/dl N	$<$ 40 mg/dl Ffi $<$ 50 mg/dl N vagy jelenlegi gyógyszeres kezelés \downarrow HDL-re	$<$ 40 mg/dl Ffi $<$ 50 mg/dl N
TG	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl vagy korábban diagnosztizált lipid abnormalitás	\geq 150 mg/dl vagy jelenlegi gyógyszeres kezelés \uparrow TG-re	\geq 150 mg/dl
Vérnyomás	\geq 160/90 mmHg	\geq 130/ \geq 85 mmHg	\geq 130/ \geq 85 mmHg vagy kezelés korábbi magas vérnyomásra	\geq 160/90 mmHg vagy jelenlegi magas vérnyomás terápia	\geq 130/ \geq 85 mmHg vagy jelenlegi magas vérnyomás terápia
Mikroalbuminúria	\geq 20 μ g/perc vagy albumin:kreatinin arány \geq 20 mg/g	-	-	-	-
Kritérium	Károsodott glükóz anyagcsere + 2 egyéb jellemző	\geq 3 jellemző	Központi elhízás + 2 egyéb jellemző	\geq 3 jellemző	\geq 3 jellemző

1. táblázat: A metabolikus szindróma diagnosztikai kritériumai a következők szerint

¹-Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization); ²- Nemzeti Koleszterin Oktatási Program harmadik jelentése, a felnőttek magas vérkoleszterinszintjének kimutatásával, értékelésével és kezelésével foglalkozó szakértői testület –felnőtt kezelés III. panele (Third Report of the National Cholesterol Education Program, the Expert Panel on Detection,

Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults—Adult Treatment Panel III); ³- Nemzetközi Diabétesz Szövetség (*International Diabetes Federation*); ⁴- Amerikai Szív Egyesület és a Nemzeti Szív, Tüdő és Vér Intézet (*American Heart Association, and the National Heart, Lung, and Blood Institute*); és ⁵- Nemzetközi Diabétesz Szövetség Járványügyi és Megelőzési Munkacsoportjának; Nemzeti Szív-, Tüdő- és Vérintézetének; Amerikai szívsvövetségének; Szív Világszövetségének; Nemzetközi Atherosclerosis Társaságának; és az Elhízás Tanulmányozók Nemzetközi Szövetségének közös ideiglenes nyilatkozata. TTI: testtömeg-index, DM: diabétesz mellitus; KGT: károsodott glükóztolerancia; KÉG: károsodott éhomi glükémia; ÉG: éhomi glükóz; GT: glükóz terhelés; DCSA: derék-csípő arány; DB: derékbőség; HDL: Nagy sűrűségű lipoprotein; TG: Triglicerid; Ffi: férfiak; N: nők; ↑: megnövekedett; ↓: csökkent [Lemos és mtsai., 2023 alapján].

2.2. Az elhízás

Az elmúlt néhány évtizedben az elhízás előfordulása drámaian megnőtt világszerte. A krónikus elhízás többek közt különféle rákos megbetegedésekhez, 2-es típusú diabétesz mellitushoz (DM-hoz), szív- és érrendszeri betegségekhez vezethet (1. ábra). Ezért az elhízást az elhalálozás és rokkantság egyik vezető okaként azonosították világszerte, mely a világ különböző régióiban a halálozások 10-13%-áért felelős [Frühbeck és mtsai., 2013]. Az elhízás megállapításának legelterjedtebb módszere a TTI kiszámítása, mely a kilogrammban mért testtömeg és a testmagasság méterben kifejezett négyzetének a hányadosa. A TTI szerint történő testtömeg osztályozást a 2. táblázat foglalja magába [Kovács és Szász, 2012]. Az elhízás fő patofiziológiai okának az energiahomeosztázis egyensúlyhiányát azonosították, amikor az energiafelvétel lényegesen nagyobb, mint az energiafelhasználás [Heymsfield és Wadden, 2017]. Az elhízás azonban egy többtényezős betegség, amely más összetevőkből is eredhet, beleértve a szociális, életmódbeli, viselkedési hálózatokat és az egyének genetikai háttérét [Christakis és Fowler, 2007; Frühbeck és mtsai., 2018; Lin és Li, 2021].

TTI (kg/m ²)	Testsúlyosztályozás
18,5-24,9	normális testsúly
25-29,9	túlsúlyos
30-34,9	enyhe elhízás
35-39,9	mérsékelt elhízás
≥ 40	súlyos fokú elhízás

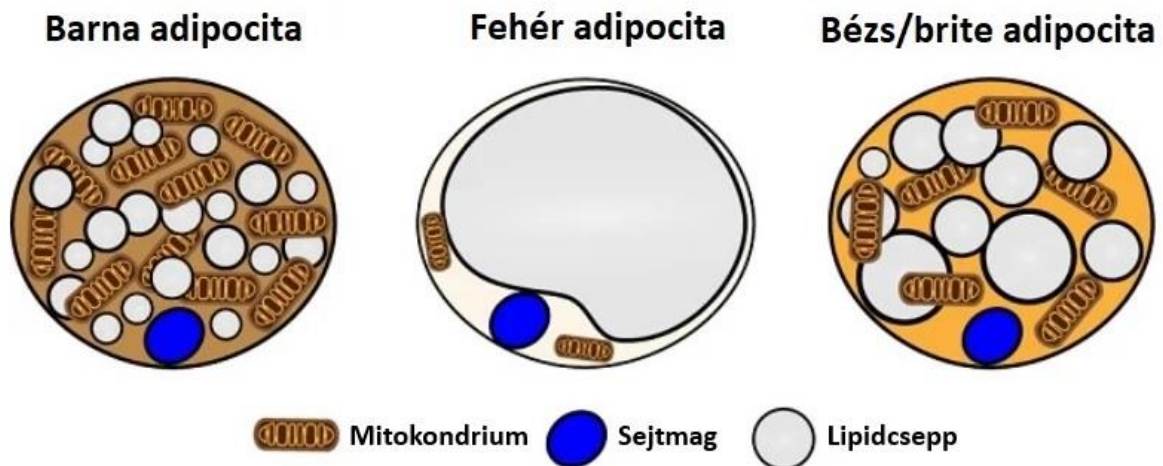
2. táblázat: TTI szerinti testsúly osztályozás [Kovács és Szász, 2012].

Kimutatták, hogy a zsírszövet, valamint számos más szerv, például a máj, a hasnyálmirigy és a vázizom szerepet játszik az elhízásban és az elhízással összefüggő anyagcserezavarokban. Mindazonáltal az a tény, hogy még kis mértékű (5%-os) fogyás valóban fokozhatja az inzulinérzékenységet és csökkentheti bizonyos kockázati tényezőket jelző paraméterek plazmaszintjét (pl.: a keringő glükóz, TG és alanin transzamináz szintje); az anyagcserezavarok

miatt, feltételezik, hogy a zsírszövet a központi szerv, amely képes szabályozni az anyagcsere egyensúlyát [Magkos és mtsai., 2016].

2.3. A zsírszövet és az adipocita típusok

A rágsálókban az adipocitákat három típusba sorolják. Az energiát tároló fehér zsírsejtek, melyek a fehér zsírszövetben (WAT-ban) helyezkednek el, egy nagy unilokuláris lipidcseppel és alacsony mitokondriális sűrűséggel rendelkeznek. A barna zsírszövetben (BAT-ban) található barna adipociták aktív termogén sejtek, magas mitokondriális tartalommal, fragmentációval és uncoupling protein (UCP) 1 expresszióval, valamint számos kis lipidcseppel a citoplazmában. A „barna-fehérben” („brown-like-in-white”/brite) vagy bézs sejtek hidegben indukálható termogén potenciállal és multilokuláris lipidcseppel rendelkeznek [Sanchez-Gurmaches és mtsai., 2016] (2. ábra). A bézs adipociták a WAT-ban elszórta találhatók. Alapállapotban génexpressziós mintázatuk hasonló a fehér zsírsejtekéhez, de hosszan tartó ingerekre (hideg expozíció, β -adrenerg stimuláció, peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (PPAR) γ agonista kezelés) barna-szerű fenotípust mutatnak, amely a sejtekben lezajló barnulásnak nevezett folyamat során alakul ki [Petrovic és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2012]. A lágyéki WAT-ot a bézs adipociták legjellemzőbb depójaként fedezték fel, amelyben a zsírsejtek termogenikus ingerek hatására multilokuláris morfológiával és termogenikus génexpressziós profillal rendelkeztek [Chan és mtsai., 2019].



	Barna	Fehér	Bézs/brite
UCP1 expresszió	Pozitív	Negatív	Pozitív
Mitokondrium sűrűség	Magas	Alacsony	Közepes
Lipidcsepp morfológia	Multilokuláris	Unilokuláris	Multilokuláris
Elsődleges funkció	Termogenezis Endokrin	Energia raktározás Endokrin	Termogenezis? Endokrin?

2. ábra: Különböző típusú adipociták morfológiai és funkcionális tulajdonságai [<https://www.umassmed.edu/guertinlab/research/adipocytes/> alapján].

Az adipocitákat két általános osztályba soroljuk: a fehér adipociták - amelyek egyetlen nagy lipidcseppben tárolják az energiát, és fontos endokrin funkciókat látnak el, valamint a barna adipociták - amelyek több kisebb lipidcseppben tárolják az energiát, de legfontosabb funkciójuk a testhő előállítás (termogenezis). A barna adipociták hőtermelését a mitokondriumban lokalizált UCP1 expressziója teszi lehetővé. Ezek az osztályozások azonban túlságosan leegyszerűsítettek, mivel egyes fehér adipociták vagy progenitorokból de novo differenciálódó adipociták a hőmérséklettől és az étrendtől függően barna adipocita tulajdonságokat vehetnek fel (ezeket brite vagy bézs adipocitáknak nevezzük), és fordítva.

Kezdetben a BAT-ot olyan szövetnek tekintették emberekben, amely csak csecsemőkben van jelen, és nehezen elérhető anatómiai helyeken található [Heaton, 1972]. Számos pozitronemissziós tomográfiát (PET-et) használó tanulmány bizonyította, hogy a felnőttek is jelentős mennyiségű BAT-tal rendelkeznek, leggyakrabban a nyaki-kulcscsont feletti (cervikális-szupraklavikuláris) depót jellemezte magas glükózfelvétel, különösen hideg expozíció után [Cypess és mtsai., 2009; Virtanen és mtsai., 2009]. A PET-számítógépes

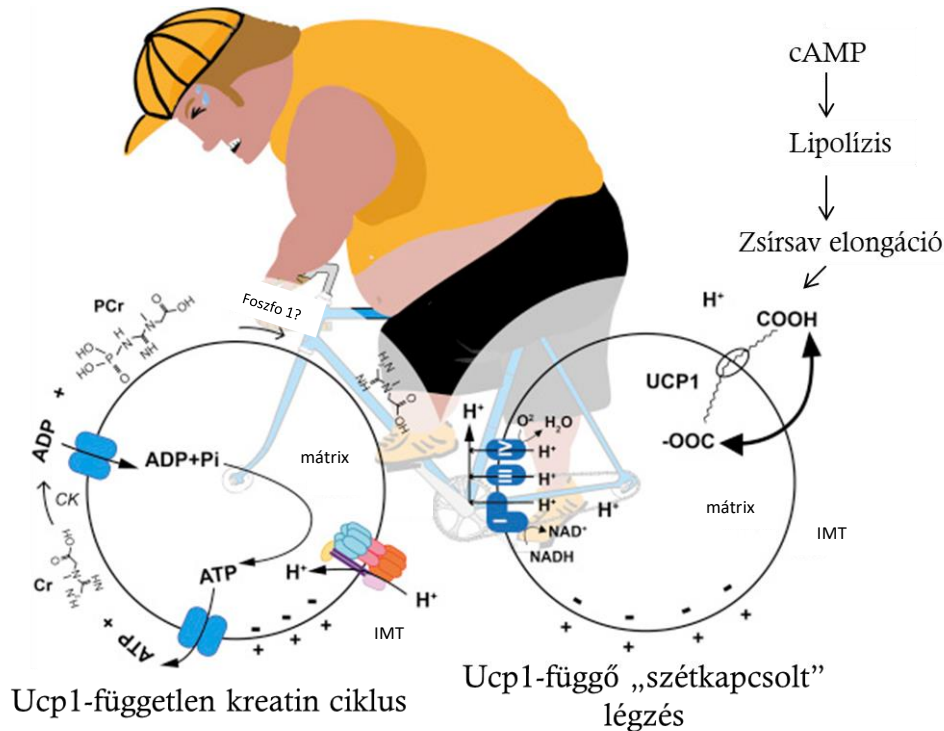
tomográfia (CT) módszerének elegáns megközelítésével a barnulásra képes zsírszövet több anatómiai régióban is megtalálható volt, például nyaki, szupraklavikuláris, hónalji, mediasztinális, paravertebrális és hasi területen [Leitner és mtsai., 2017]. A rágcsálókkal ellentétben azonban a humán BAT molekuláris jellemzői továbbra is feltérképezetlenek. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a cervikális-szupraklavikuláris depóból izolált humán BAT [Cypess és mtsai., 2013] és a magzati lapockák közti zsírszövetből származó primer zsírsejtek [Seiler és mtsai., 2015] a klasszikus barna zsírsejtek jellemzőivel rendelkeznek, amelyeket a cink ujjfehérje-1 (ZIC1) magas expressziója jellemez. Más, szupraklavikuláris depóból izolált, klonális eredetű, humán barna zsírsejteket használó vizsgálatok arról számoltak be, hogy az UCP1-pozitív sejtek populációja bézs adipocitákat tartalmazott [Shinoda és mtsai., 2015]. Egy másik tanulmány, amelyben különböző anatómiai helyekről származó zsírbiopsziákból izolált teljes RNS-t alkalmaztak, beleértve a szubkután (SC) szupraklavikuláris, hátsó mediasztinális, retroperitoneális, intraabdominális vagy mezenterialis depókat, arról számolt be, hogy a bézs-szelektív markerek, például a Homeobox C (*HOXC*) 8, *HOXC9* és *CITED1* nagymértékben kifejeződtek a humán BAT-ban, míg a klasszikus barna markerek nem voltak kimutathatók [Sharp és mtsai., 2012].

2.4. A barna és bézs adipociták termogenezisben betöltött szerepe

A termogenikus barna és bézs zsírsejteket tartalmazó BAT [Wu és mtsai., 2012] hőtermelés révén képes energia felszabadításra [Cannon és mtsai., 2004], amelyet főként az UCP1-függő protoncsorgás közvetít, amely szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt az ATP-szintézisétől a mitokondriumban [Fedorenko és mtsai., 2012]. Ekkor hő szabadul fel, az ATP termelés pedig elmarad. Ilyenkor a terminális oxidáció során a protongrádiens kialakító H⁺-ok az UCP1 fehérje (termogenin) csatornáján, nem pedig az ATP-szintázon keresztül fognak visszaáramolni a mitokondrium mátrixába. Így a gradiens kiegyenlítődés hatására hő keletkezik.

Leírták, hogy a kreatin-függő ATP-t felhasználó szubsztrát ciklus elősegíti az energia szétkapcsolást a barna és bézs adipocitákban. Ezt a ciklust kezdetben a hidegnek kitett állatok bézs zsírjából izolált mitokondriumokban azonosították, korlátozott ADP jelenlétében, majd megerősítették, hogy mind egér, mind humán barna zsírsejtekben létezik [Kazak és mtsai., 2015]. Előzetes tanulmányok kimutatták, hogy a kreatin serkenti a szubsztrát ciklust, és fokozza az ADP-függő légzést a bézs adipocita mitokondriumokban, amikor az ADP mennyisége limitált. UCP1 hiányában a kreatin metabolizmusban részt vevő gének, beleértve a kreatinkináz B (CKB) -t is, a termogenikus cAMP jelátvitel révén felszabályozódnak [Brownstein és

mtsai., 2022]. Ezenkívül az egerek termogenikus zsírsejtjeiben a kreatinszint csökkenése a kreatin bioszintézis sebességkorlátozó enzimének, a glicin-amidino-transzferáznak kiütésével csökkenti az energiafelhasználást a gátolt termogenezis miatt, és táplálkozás által kiváltott elhízást okoz [Kazak és mtsai., 2017; Kazak és mtsai., 2019]. Ennek a ciklusnak a megléte a BAT-ban alátámasztja azt az elképzelést, hogy a mitokondriális ATP szintézis növelése az energia szétkapcsolást elősegítő megközelítésként használható (3. ábra).



3. ábra: A bézs zsírsejtben eddig jellemzett két fő hőtermelési mechanizmus sematikus illusztrációja CK: kreatin kináz; Cr: kreatin; PCr: kreatin-foszfát; IMT: intermembrán tér [Szabo és Zoratti, 2017 alapján].

Az UCP1 aktiválása a barna/bézs adipociták hőtermelése érdekében a tápanyagok, például a glükóz és a zsírsavak nagyobb felvételét eredményezi, mely fenntartja a trikarbonsav (TCA) ciklus intermedierek képződését. Ennek következtében NADH és FADH₂ keletkezik, amelyek belépnek az elektrontranszport láncba. Az aktív barna/bézs adipociták nagy mennyiségben vesznek fel TCA ciklus intermediereket is, pl. szukcinátot, hogy fokozzák a protoncsorgásos légzésüket [Mills és mtsai., 2018]. Egy újabb tanulmány arról számolt be, hogy az egér BAT által felhasznált jelzett glükóz a hideg expozíció során piruváttá alakult, amely tovább oxidálódott acetyl-CoA-vá, a piruvát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban [Panic és mtsai., 2019]. A glükóz és a zsírsavak mellett az aktív barna/bézs zsírsejtek az elágazó láncú aminosavakat is katabolizálják, hogy kielégítsék nagy energiaigényüket [Yoneshiro és mtsai., 2019]. Korábbi tanulmányunk is felvetette az alanin-szerin-cisztein transzporter 1 (ASC-1) által

közvetített szerin, cisztein és glicin felvétel fontosságát a mély nyaki eredetű adipociták adrenerg stimulációjára adott hatékony termogenikus válasza során [Arianti és mtsai., 2021]. Az *SLC7A10* gén által kódolt transzporter elősegíti a fentebb említett kis, semleges aminosavak nátrium-független, kétirányú szállítását. Megfigyeltük, hogy a gén magasabb expressziót mutatott a mély nyaki eredetű termogenikus zsírsejtekben, különösen barna differenciáció során. Az ASC-1 az extracelluláris D-szerinszint fő szabályozója a szinaptikus rendszerekben [Rutter és mtsai., 2007]. Az ASC-1 transzporter korábban fehér zsírsejtekre specifikus sejtfelszíni markerként volt ismert [Ussar és mtsai., 2014]. A közelmúltban arról számoltak be, hogy az ASC-1 mRNS expressziója magas és indukálódik a hasi SC és omentális fehér zsírszövetből frissen izolált adipocitákban, és erős negatív korrelációt mutat a zsigeri elhízással és az inzulinrezisztenciával emberekben, valamint elősegíti a mitokondriális légzést és az inzulin által stimulált glükózfelvételt [Jersin és mtsai., 2021]. Az aktív barna/bézs zsírsejtek tápanyag-elnyelő képessége hozzájárulhat a cukrok és lipidek szintjének csökkenéséhez a vérben, ami közvetve javítja a glükóztoleranciát és az inzulinérzékenységet [Cheng és mtsai., 2021].

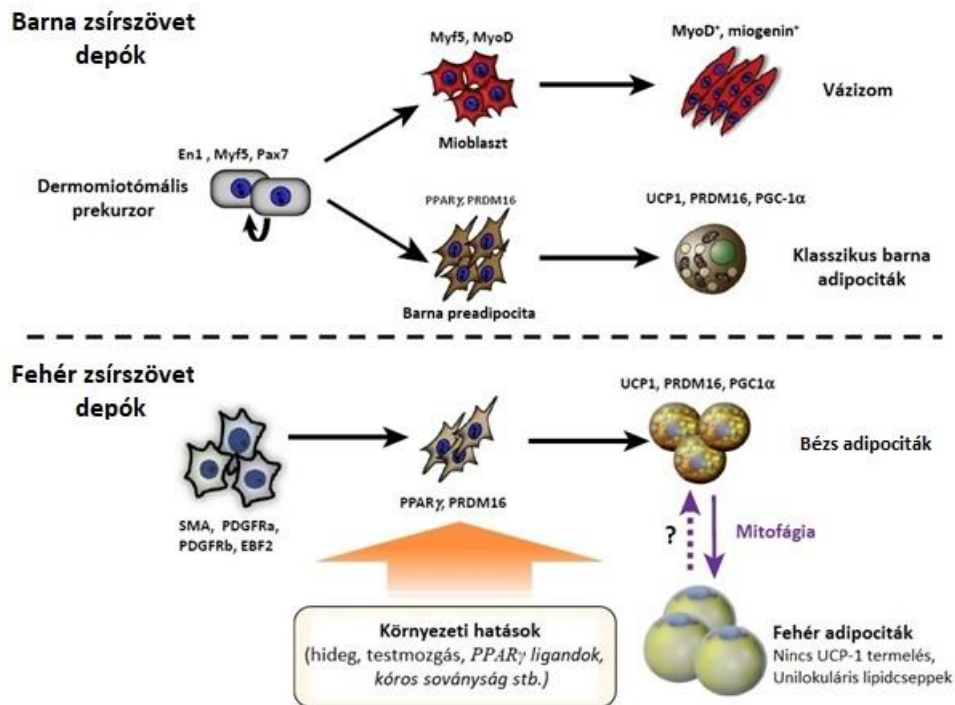
A BAT kulcsszerepet játszik az állandó magi testhőmérséklet fenntartásában a didergés nélküli termogenezis révén [Cohen és Kajimura, 2021], és ígéretes terápiás lehetőségeket nyithat meg az elhízás elleni küzdelemben [Jimenez-Munoz és mtsai., 2021]. A BAT hat anatómiai régióban (nyaki, szupraklavikuláris, hónalji, mediasztinális, paraszpinális és abdominális) található meg felnőtt emberekben, ami az összes zsír 4,3%-át és a teljes testtömeg 1,5%-át teszi ki [Leitner és mtsai., 2017]. Matematikai modellezések alapján a BAT évente körülbelül 4 kg zsírt képes oxidálni felnőtt emberekben, és termogén aktivitása akár 5%-kal is hozzájárulhat az alap anyagcseréhez [van Marken és Schrauwen, 2011]. Az aktív barna/bézs adipociták magas metabolikus szubsztrát-felhasználás révén növelik az energiefelhasználást, így elősegíthetik a fogyást és potenciális farmakológiai célponttá válhatnak az elhízás és a kapcsolódó anyagcsere-betegségek kezelésében.

2.5. A barna és bézs adipociták eredete

A vázizom sejtekhez hasonlóan a barna adipociták is az embrionális mezoderma prekursorokból erednek. Ezen prekursor sejtek miogenikus faktor (Myf) 5-öt, engrailed (En) 1-et és paired box (Pax) 7-et fejeznek ki átmenetileg, melyek a mezodermális eredetét jelzik a vázrendszer miogén sejtjeinek. Ez az izom-szerű génexpressziós mintázat, valamint az izomsejtekhez hasonló mitokondriális proteóm arra enged következtetni, hogy sejtontológiai kapcsolat van a klasszikus barna adipociták és az izomsejtek között (4. ábra) [Seale és mtsai., 2008; Sanchez-Gurmaches, 2012; Lepper és Fan, 2010; Forner és mtsai., 2009]. Egér modellben leírták, hogy az embriogenezis során kialakult primitív BAT-raktárakat hiperproliferatív fibroblaszt-szerű sejtek generálják, amelyek lipidszegények maradnak egészen a szülés utáni időszakig. Embrionális prekursorok korai „fate-mapping” vizsgálatai kimutatták, hogy a barna zsírsejtek a dermomiótómán belüli korai szomiták (összselvények) paraxiális mezodermáiból származnak [Xue és mtsai., 2023]. A barna zsírsejtek kialakulásának fő szabályozója a PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16 (Prdm16). A Prdm16 molekuláris kapcsolóként működik, amely meghatározza, hogy a Myf5-öt expresszáló prekursor sejtek barna zsírsejteké vagy miocitákká differenciálódjanak. Az elkötelezett BAT-ban a prekursorok En1, Myf5 és Pax7 transzkripciós faktorokat expresszálnak. Míg a barna adipocita prekursorokban korai B sejt faktor 2 (EBF2) fejeződik ki, addig a szomitákban myoblast determination protein (MyoD) és Myf5 termelés downstream zajlik (4. ábra, felső panel). A szomitákban expresszálódó MyoD gátolja meg, hogy a prekursorok barna adipocitákká alakuljanak [Seale és mtsai., 2008; Ikeda és mtsai., 2018].

A klasszikus barna adipocitákkal ellentétben a bézs adipociták embrionális eredete ez idáig nem teljes mértékben tisztázott. E két sejt valószínűleg különböző sejtvonalakból eredeztethető, mivel a SC zsírraktárakban nem található Myf5+ sejtek [Seale és mtsai., 2008; Sanchez-Gurmaches, 2012]. „Pulse-chase fate-mapping” technikával, a SC lágyéki régióban hideg és β 3-adrenerg agonisták alkalmazásával bézs adipociták képződését figyelték meg egy eddig nem karakterizált prekursor sejtől [Wang és mtsai., 2013]. „Lineage-tracing” tanulmányokban leírták, hogy egerekben a bézs adipociták olyan progenitorokból származnak, amelyek Myosin heavy chain (Myh) 11-et, Spinal muscular atrophy/ Survival motor neuron protein (SMA)-t, Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α -t vagy PDGFR β -t expresszálnak (4. ábra, alsó panel). A roscovitine, mely a Ciklin dependens kináz (CDK) 5 farmakológiai inhibitora az UCP1-pozitív adipociták fejlődését segíti elő, amely eltérő molekuláris mintázatot mutat a klasszikus bézs adipocitákhoz viszonyítva [Wang és mtsai., 2016].

A fentiek alapján a bézs adipociták erősen plasztikusak, reagálnak a környezeti ingerekre, így a bézs és fehér zsírsejt állapotok között átkonvertálódhatnak. Ezenkívül a bézs adipociták metabolikusan heterogénnek tűnnek, és szubsztrát-specifitással rendelkeznek.



4. ábra: A különböző zsírsejtek biogenezisének ontológiája

A klasszikus barna zsírsejtek az embrionális fejlődés során dermomyotómális prekursorokból differenciálódnak, melyek *En1*-et, *Myf5*-öt és *Pax7*-et expresszálnak. A bézs adipociták fejlődését a szubkután WAT depókban környezeti tényezők (krónikus hideg akklimatizáció, testmozgás, *PPAR γ* ligandumok, szövetsérülés, cachexia) stimulálják. A külső ingerek megszűnésével az újonnan képződött bézs zsírsejtek fehér adipocita fenotípust alakítanak ki (unilokuláris lipidcseppekkel, *UCP1* expresszió nélkül) [Ikeda és mtsai., 2018 alapján].

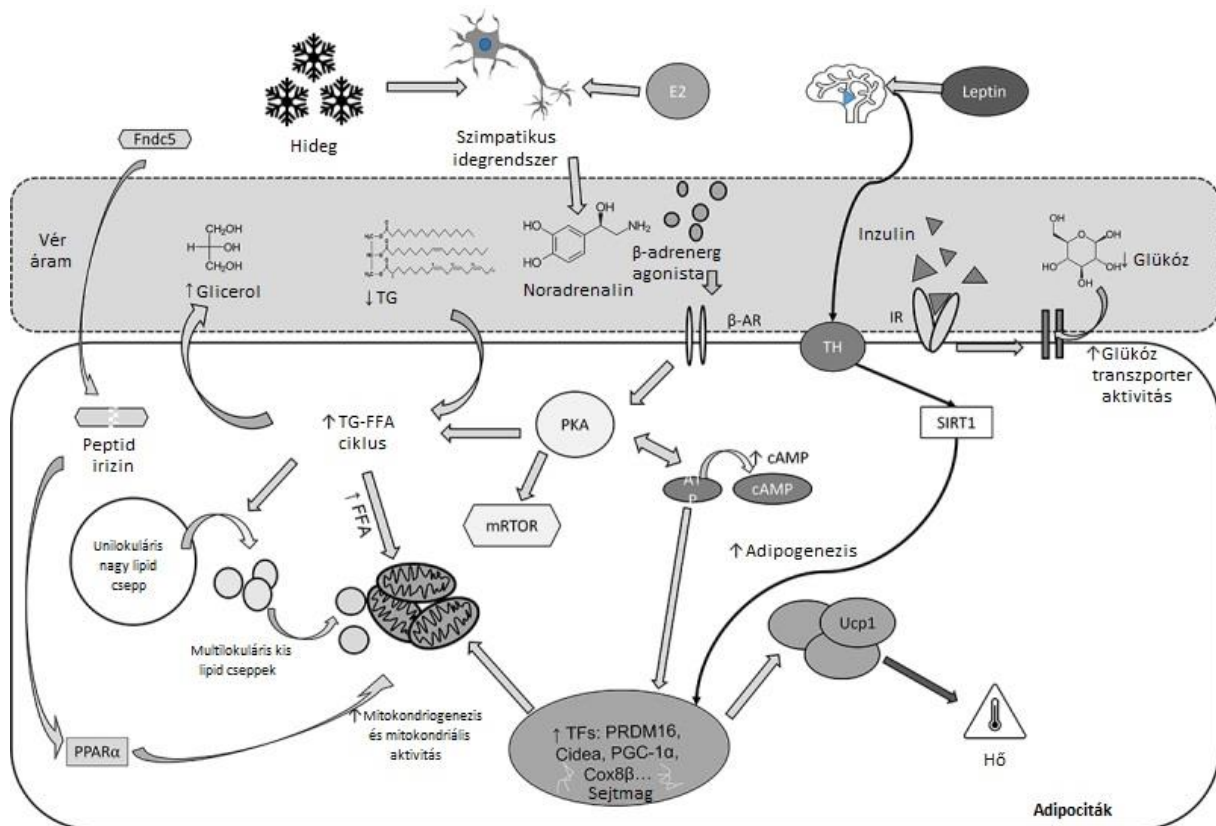
2.6. A hőtermelés aktiválása adipocitákban

A bézs termogenezissel kapcsolatos legtöbb laboratóriumi vizsgálatban a hőtermelő aktivitást indukálják a hosszan tartó hideg expozíció vagy a β 3-adrenerg receptorok (β 3-AR-ok) farmakológiai aktiválása révén egerekben. Mindkét mechanizmus átmeneti és folyamatos ingereket igényel [Weyer és mtsai., 1998]. A hideg hatására aktiválódó barna zsírsejtek fokozzák az anyagcsere-aktivitást és a termogenezist, melynek folyamata magában foglalja a GLUT1 és GLUT4 glükóztranszporterek felszabályozását, valamint a glikolitikus enzimek, például a hexokináz, a laktát-dehidrogenáz és a foszfofruktokináz fokozott expresszióját [Basse és mtsai., 2017]. Termogén aktiváció a legtöbb zsírszövetben eltérő mértékben fordulhat elő a különböző régiókban, így a lágyéki (inguinalis), a deréki (dorsolumbaris), a retroperitoneális és a SC WAT (sWAT)-ban, valamint a lapockák közötti (interszkapuláris), cervikális,

szupraklavikuláris, paravertebrális, SC és perirenális BAT-ban [Nguyen és mtsai., 2023]. Számos stimuláció, mint például a hideg expozíció, a β -adrenerg agonista alkalmazása, a testmozgás és a természetes növényi kivonatok hatékonynak bizonyultak a zsírsejtek aktiválásában a magas termogenikus kapacitás megszerzése érdekében, miközben egyidejűleg fokozták az anyagcsere aktivitását [Weir és mtsai., 2018; Lee és mtsai., 2021]. A kutatások során leggyakrabban használt és leghatékonyabb stimuláció a korábban említett hideg expozíció és a β -adrenerg stimuláció, amely során a β -adrenerg jelátvitel aktiválódik. Rágcsálókban kimutatták, hogy a β 3-AR-ok aktiválják a barna zsírsejteket és a zsírszövetek barnulását, ami az UCP1 fehérjeszint növekedéséhez vezet a különböző zsírraktárakban, és csökkenti a szabad zsírsav (FFA) raktározását a WAT-ban, valamint magasabb FFA oxidációt és felhasználást eredményez a BAT-ban [Warner és mtsai., 2016; Mottillo és mtsai., 2014]. Bár a legújabb bizonyítékok arra utalnak, hogy a β 3-AR talán nem nélkülözhetetlen, és barnulás előfordulhat β 3-AR jelenléte nélkül is [de Jong és mtsai., 2017], az a tény, hogy a β 3-AR részt vesz az adrenerg stimuláció aktiválási kaszkádjában, széles körben megerősített [Cao és mtsai., 2001; Chartoumpakis és mtsai., 2011; Fan és mtsai., 2019]. Emberekben azonban a β 2-AR-t, és nem a β 3-AR-t azonosították a BAT termogenezis aktiválásának kulcsfontosságú receptoraként, és ez volt a domináns β -AR (akár 91%-ban), amely RNS-szinten expresszálódik a WAT-ban [Blondin és mtsai., 2020], ami arra utal, hogy az emberek és a rágcsálók eltérők a β -AR stimuláció hatását tekintve.

A noradrenalin β -AR-okhoz való kötődése aktiválja a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) termelődését és a protein kináz A (PKA) aktivitását [Dickson és mtsai., 2016; Yehuda-Shnaidman és mtsai., 2010]. A PKA foszforilálja a cAMP válaszadó elem-kötő fehérjét (CREB-et) és a p38 mitogén által aktivált protein kinázt (p38-MAPK-t), mindkettő szabályozza a PPAR γ koaktivátor (PGC) 1 α transzkripcióját és fokozza az UCP1 fehérjék expresszióját [Cao és mtsai., 2001; Cao és mtsai., 2004] (5. ábra). A PKA emellett foszforilálja a mammalian target of rapamycint (mTOR-t), amely a celluláris mikrokörnyezetben a sejtmetabolizmus és a tápanyagokra adott válasz kulcsfontosságú szabályozója, illetve szükséges a barna morfológia kialakításához a zsírszövetekben [Liu és mtsai., 2016]. Kimutatták, hogy a PKA szerepe a BAT stimulációban és metabolikus modulációban korrelál a PGC-1 α transzkripciós faktoral, amely az adaptív termogenezishez szükséges mitokondriális metabolizmus kulcsfontosságú szabályozója [Wu és mtsai., 1999; Puigserver és mtsai., 1998]. A PKA szerepe a barnulásban hely-specifikus és az egyedi fiziológiai állapottól függ, mivel csak a SC fehér zsírsejtek

stimulálása fokozta a lipolízist a mitokondriális szétkapcsolás révén, az elhízás pedig csökkentette a sejt termogenikus kapacitását [Yehuda-Shnaidman és mtsai., 2010].



5. ábra: A barnulás és a termogenezis aktivációja

A hideg hőmérséklet aktiválhatja a szimpatikus idegrendszert, ami noradrenalin szekréciót eredményez, és ezt követően a β -adrenerg receptorokon keresztül aktiválja a termogenezist a barna zsírsejtekben. A noradrenalin mellett a β -adrenerg receptor agonisták (pl.: CL-316,243) aktiválják a PKA-t és növelik a cAMP-szintet, amely a TG lebomlásához és az FFA-termelés felgyorsulásához vezet, mely a mitokondriumok és az UCPI szabályozásának döntő szubsztrátjaként szolgál. A TH a BAT-ban lévő TR-hez kötődik, aktiválja a SIRT1 útvonalat, ami a BAT adipogenezisét eredményezi. A leptin korrelál a hipotalamusz szabályozásával a BAT-ban, és javítja a szervezet energiafelhasználását. Az ösztrogénreceptorokat az ösztradiol aktiválja a ventromediális hipotalamuszban, hogy fokozza a szimpatikus idegrendszer szabályozását az AMPK-n keresztül a BAT-ban, aktiválva annak termogenezisét. Az aktivált barna zsírsejtek fokozott lipolízist és TG-FFA ciklust mutatnak, ami csökkenti a felhalmozódott TG-eket a véráramban és a közeli szervekben, és fokozza a mitokondriális aktivitást. A magasabb mitokondriális aktivitás hozzájárul az UCPI expressziójának növekedéséhez, amely fontos szerepet játszik az energia-hő konverzióban a BAT-ban. Ezenkívül a hideg hőmérsékletre való akklimatizáció a leptin és a TH-k magasabb szintjéhez is vezet, ami az inzulinérzékenység növekedéséhez vezet, ezáltal fokozza a glükóz transzporter aktivitását, és ezt követően csökkenti a glükózsintet a véráramban. Ezzel szemben az edzés aktiválja az Fndc5 expresszióját a miocitákban. A zsírsejtek membránjában az Fndc5 elhasad, mely irizin peptidet képez, amely aktiválja a PPAR γ -t, hogy szabályozza a barnulási folyamatot [Nguyen és mtsai., 2023 alapján].

A β -AR-on keresztüli aktiváláson kívül egy nemrégiben készült tanulmány feltárta az UCP1 szabályozásának és a termogenikus aktivációnak a 6-os és 9-es fibroblaszt növekedési faktoron (FGF) keresztül történő nem kanonikus útját [Shamsi és mtsai., 2020]. Ebben a tanulmányban a szerzők azt találták, hogy az FGF6 és az FGF9 indukálódik az edzés és a hideg expozíció során, ami aktiválja az FGFR3 receptorokat. Ez elősegíti a prosztaglandin E2 mediátor bioszintézisét, mely szabályozza az UCP1 expresszióját az FLII transzkripciós koaktivátorok és az ösztrogén-kapcsolt receptor alfa ($ERR\alpha$) *UCP1* enhancerhez történő megkötésén keresztül [Shamsi és mtsai., 2020], ami egy új módot sugall a termogenezis aktiválására.

A termogenikus gének a pajzsmirigy α és β receptorainak ($TR\alpha$ és β) aktiválásával is szabályozhatók, amelyek mind a WAT-ban, mind a BAT-ban expresszálódnak [Ribeiro és mtsai., 2001]. A TR specifikus izoformái a BAT-ban nagymértékben különbözhetnek egyes fajokban [Nguyen és mtsai., 2023]. A pajzsmirigyhormonnak (TH) két fő izoformája van. A kevésbé aktív tiroxin izoforma (T4) a II-es típusú dejodináz (DIO2) hatására átalakulhat aktív formájává, 3,3',5-trijódtironinná (T3) [Sentis és mtsai., 2021; Yau és Yen, 2020]. A TH fontos szerepet játszik az anyagcsere szabályozásában a különböző szövetekben a növekedés és fejlődés során [Mullur és mtsai., 2014]. Megállapítást nyert, hogy az interszkapuláris BAT (iBAT)-ban a T3 aktiválja a $TR\alpha$ -t, amely elősegíti az adipocita progenitor sejt (APC) populáció differenciációját és az APC-k átmenetét a megnyúlt morfológiából az adipogén elkötelezettség irányába, amely folyamat során az iBAT depóiban a Myc-mediált glikolízis aktiválódik [Liu és mtsai., 2022]. Egy másik tanulmányban feltárták, hogy a T3 indukálta a forkhead box O1 (FOXO1)-t, mely a szirtuin 1 (SIRT1) downstream célpontja, amelynek enzimaktivitása a celluláris NAD^+ -tól függ [Cantó és mtsai., 2012]. Leírták, hogy a SIRT1 aktiválása javítja a BAT metabolizmusát és működését, valamint javítja a glükóz homeosztázist. Ezenkívül a SIRT1 indukálta az mTOR gátlását, ami a barna zsírszövetek megnövekedett autofág és lizoszómális génexpressziójához vezetett, mely fokozott mitokondriális turnover-t és biogenezist, valamint a BAT termogenezisének javulását eredményezte [Yau és mtsai., 2019; Boutant és mtsai., 2015]. A T3 fokozta egy másik termogenin fehérje izoformának, az UCP3-nak az expresszióját is, amely részt vesz a termogenezisben, és korrelál az UCP1 expressziójával a BAT-ban hidegnek való kitettség során [Hilse és mtsai., 2016; Gong és mtsai., 1997]. Az UCP3 termogenezisben betöltött szerepét számos szövetben kimutatták, beleértve a váz- és a szívmizomatot. Bár az UCP3 részt vehet a BAT termogenezisében és nélkülözhetetlen a nem-didergéses hőtermelésben hőröcsögökben, az egér BAT-ban csak az UCP1 termogenikus funkciójának kiegészítője lehet [Riley és mtsai., 2016; Christopher és Edward, 2020; Liebig és

mtsai., 2014], ami arra utal, hogy az UCP1 minden esetben a fő termogénin izoforma a BAT-ban hideg expozíció során.

A hipertireózis a hipotalamusz TH-szintjének emelkedéséhez is vezet, és a TH növekedése a hipotalamusz ventromediális magjában 4°C-on és 23°C-on is felerősíti az UCP1 expresszióját a BAT-ban, ami súlycsökkenést eredményez [Rial-Pensado és mtsai., 2022], mely arra utal, hogy a TH közvetett centrális hatást fejt ki a termogenezisre, a szisztémás anyagcserére és az energiafelhasználásra. A termogenezis és az energiafelhasználás hipotalamikus szabályozása a leptin adipokin szekréciónak is megvalósítható, amely szabályozza a BAT termogenezist, valószínűleg a szimpatikus idegek BAT-ra irányuló aktivitásának növelésével és a szimpatikus szabályozó régiókban a BAT-kör bevonásával, mely fokozza az UCP1 expresszióját magas zsírtartalmú táplálékban kitett egér modellekben [Nguyen és mtsai., 2023]. Lipodisztrófiás egér modellben a leptin növeli a Pgc-1 α , a Cidea és az Ucp1 expresszióját a BAT-ban, valamint fokozza a testhőmérsékletet annak ellenére, hogy e folyamat anyagcserére kifejtett előnyös hatásai ezidáig nem bizonyítottak [Hoffmann és mtsai., 2021]. A leptin BAT termogenezisére és metabolizmusára gyakorolt hatásának molekuláris hatását korlátozottan vizsgálták, azonban a leptin energiafelhasználást növelő hatása összefüggésbe hozható a hipotalamusz TH szabályozásával [Rogers és mtsai., 2009]. Ezek az adatok szisztémás kölcsönhatásra utalnak, amely szerint a BAT részt vesz a termogenezis és az energiafelhasználás centrálisan vezérelt szabályozásában. Nem tisztázott még részletesen, hogy az egyén különböző fiziológiai állapotai hogyan befolyásolják a BAT aktivitását és annak hatását a szisztémás anyagcserére. A jövőbeli vizsgálatok tervezésekor figyelembe kell venni az egyes egyedek specifikus fiziológiai és metabolikus állapotával kapcsolatos szempontokat is.

2.7. A bézs-fehér adipocita átalakulás

A bézs adipociták termogénikus fenotípusa a külső ingerek megvonása után reverzibilissé válik. Az adrenerg stimuláció megszűnésekor (például meleg hőmérsékleten) a bézs adipociták fokozatosan uniloculáris lipidcseppekkel rendelkező sejtekké alakulnak, és elveszítik bézs tulajdonságaikat, miközben fokozódnak a fehér jellemzőik (pl. csökkent mitokondrium szám és termogenezis). Ezt a bézs-fehér átalakulást csökkent szimpatikus beidegződés, vaszkularizáció és UCP1 expresszió, valamint fokozott idegi kemorepellens (szemaforin III) szekréciónak és leptin expresszió kíséri [Cinti és mtsai., 1997; Canello és mtsai., 1998; Giordano és mtsai., 2001]. A bézs zsír depókban az ingerek megvonása után észlelt fenotípusos és morfológiai átalakulás nem figyelhető meg a klasszikus barna zsírsejtekben [Seale és mtsai.,

2008]. 2013-ban Christian Wolfrum kutatócsoportja a sejtek leszármazási vonalának nyomkövetését használta a bézs-fehér interkonverzió követésére. Kimutatták, hogy a hideg által kiváltott bézs zsír a meleg hőmérséklet megjelenésétől számított 5 héten belül átalakult, azonban a fehéredett bézs zsírsejtek csaknem 75%-a ismét bézssé válhat az újbóli hideg indukció hatására. Érdekes módon a második hideg expozíció után a bézs zsírsejtek fele a korábbi fehéredett bézs zsírsejtekből alakult ki, az újonnan képződött bézs zsírsejtek másik fele pedig más forrásból származott [Rosenwald és mtsai., 2013]. Bár a bézs zsírsejtek elvesztették barna-szerű fenotípusukat és a fehérekéhez hasonló fenotípust vettek fel a hőmérséklet emelésekor, megőrizték epigenetikus emléküket a hideg expozícióról, ami lehetővé tette számukra, hogy újból aktiválják a barnulásra jellemző géneket, amint hideg hőmérsékletnek voltak kitéve [Roh és mtsai., 2018]. Érdekes módon a bézs adipociták apoptózisát és halálát nem találták a bézs fenotípus elvesztésének okaként [Rosenwald és mtsai., 2013]. Ezzel szemben kimutatták, hogy a BAT fehéritése növeli a sejthalált azáltal, hogy fokozza a zsírszövet gyulladását, ami a BAT plaszticitásának hiányára utal [Kotzbeck és mtsai., 2018]. 2015-ben Kozak és kutatócsoportja sokkal nagyobb dinamikáról számolt be az UCP1 és a mitokondriális forgalomban a bézs zsírban, a BAT-hoz képest [Gospodarska és mtsai., 2015]. A legújabb publikációk arról számoltak be, hogy az autofágia szerepet játszik a bézs adipociták termogenezisének csökkenésében. Rágcsálókban a parkin-függő szelektív mitokondriális eltávolítás (mitofágia) inaktív – morfológiailag fehér, de reaktiválódni képes – bézs zsírsejtek képződését indítja el. A mitofágia aktivitás megnövekedett az adrenerg ingerek megvonásakor, és kimutatták, hogy a parkin (PARK2) mitokondriumba való toborzása közvetíti. Az autofágia gátlása az autofágia kapcsolt protein (ATG) 5, az ATG12 és a PARK2 deléciójával megőrizte a bézs fenotípust az ingerek eltávolítása után is. Egyedi sejtes kísérletekben megfigyelték, hogy ugyanez a folyamat közvetlen transzdifferentiációt okozott (bézs-fehér átalakulás), amely nem tartalmazott köztes lépést [Altshuler-Keylin és mtsai., 2016]. Kutatócsoportunk az elmúlt években leírta, hogy a differenciált humán primer SC és Simpson–Golabi–Behmel-szindróma (SGBS) zsírsejtekben a cAMP által kiváltott termogénikus aktiváció leszabályozta a mitofágiát, blokkolva a bézs-fehér átalakulást [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. Az ebbe az átalakulási folyamatba való belépés megakadályozása potenciális módja lehet a fokozott termogenezis fenntartásának az elhízás elleni küzdelemben.

2.8. A mitofágia és annak szerepe a termogénikus bézs adipociták szabályozásában

A mitokondriumok kulcsfontosságúak a sejtek homeosztázisában. Olyan létfontosságú funkciókat látnak el, mint a bioenergetika, a bioszintézis és a sejtes jelátvitel, valamint fontos

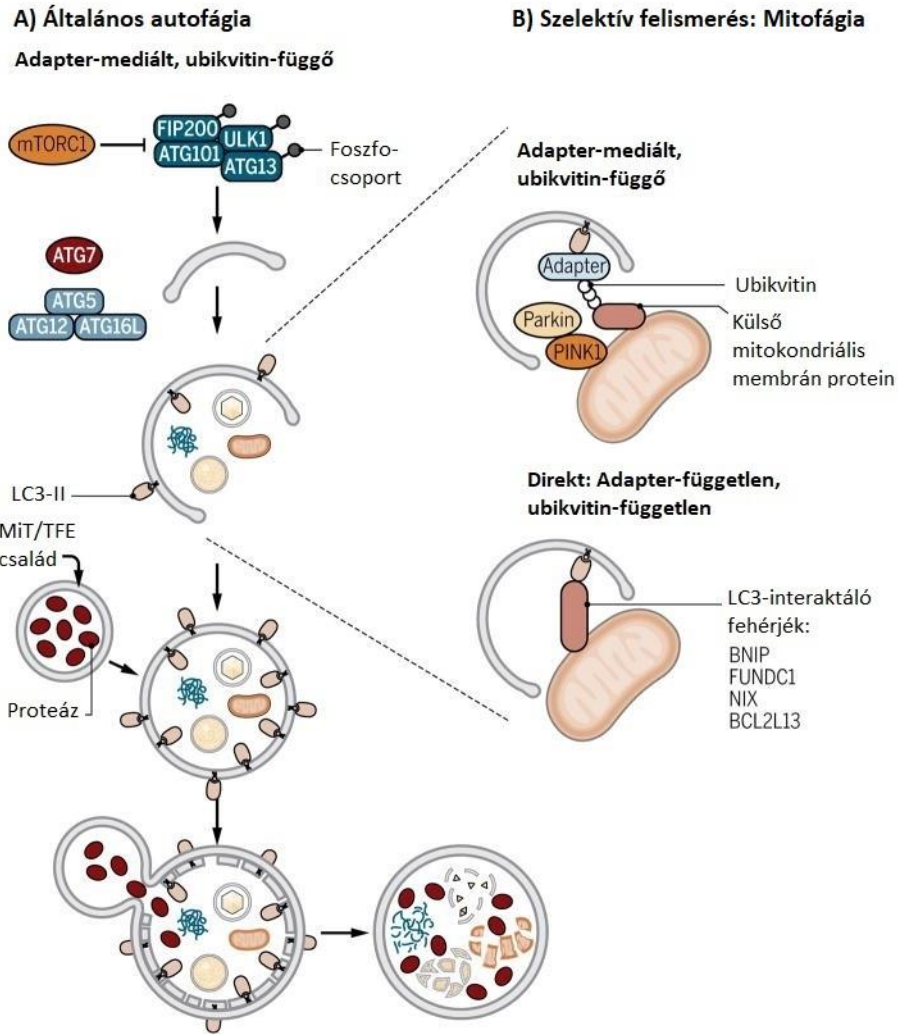
szerepet töltenek be a klasszikus barna és bézs adipociták termogenikus és metabolikus működésében is. Ezeknek a folyamatoknak a megfelelő fenntartása kulcsfontosságú a betegségek kialakulásának megelőzéséhez és az optimális sejtműködés biztosításához. A mitokondriumok hasadáson és fúzió keresztül képesek változtatni a morfológiájukat. A fúzió során egy nagy megnyúlt mitokondriumokból álló hálózat jön létre, hasadás során kisebb fragmentált egységek képződnek [Liesa és mtsai., 2013; Costa és mtsai., 2023]. A károsodott vagy nem kívánt mitokondriumok szelektív autofágiával, az úgynevezett mitofágiával eltávolíthatók, amelyet a mitokondriális minőség-ellenőrzés kulcsfontosságú mechanizmusának tartanak [Palikaras és mtsai., 2018].

Az autofágia egy részletesen leírt intracelluláris katabolikus folyamat, amelyben a fehérje-aggregátumokat vagy a sérült organelleket kettős membránnal határolt struktúrák, úgynevezett autofagoszómák juttatják a lizoszómákba lebontásra, és komponenseiket újrahasznosítják [Parzych és Klionsky, 2014; Lőrincz és Juhász, 2020]. Az autofagoszóma kialakulásakor az mTOR komplex 1 (mTORC1) molekuláris jele kiváltja az unc-51-like autophagy activating kinase (ULK) 1 komplex aktiválását, amely az ULK1-ből, az ATG13-ból és a focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa (FIP200)-ból áll, mely elindítja az izolációs membrán kialakulását a meglévő membránforrásokból, például az endoplazmatikus retikulumból (ER-ből) vagy a Golgiból (6A. ábra). A membrán tovább nyúlik, és egy teljesen zárt, kettős membránnal határolt vezikulát hoz létre, amely autofagoszómaként ismert. Az autofagoszóma kialakulását számos, az autofágia kapcsolt központi fehérje irányítja. Az autofagoszóma kialakulásának kulcsfontosságú lépése a foszfatidil-etanol-amin (PE) és a mikrotubulus-asszociált fehérje könnyűlánc 3 (LC3)-I konjugálása - amely egy ATG8 homológ - az LC3 lipidált formája, LC3-II létrehozása érdekében. Ezt a konjugációt részben az ATG7 és az ATG5-ATG12-ATG16L1 komplex közvetíti. Az LC3 egy széles körben elfogadott autofagoszómális marker, az LC3-II tartalom pedig az autofagoszóma képződés mértékének indikátora [Lamb és mtsai., 2013]. Az LC3-I átalakulásának LC3-II-vé történő kimutatása western blottal egy általánosan használt módszer az autofágia aktivitás követésére, mivel az LC3-II mennyisége korrelál az autofagoszómák számával [Yoshii és Mizushima, 2017]. Amint az autofagoszóma kifejlődött, egyesül a lizoszómával, és egy autolizoszómát (egy membránnal határolt savas vezikulát) képez, ahol a lizoszómális hidrolitikus enzimek, például a katepszinok lebontják annak tartalmát. A lizoszóma biogenezis az autofágia gépezet fontos összetevője, és a mikroftalmia/transzkripciós faktor E (Mit/TFE) transzkripciós faktor család szabályozza, amely magában foglalja a mikroftalmia-asszociált transzkripciós faktort (MITF), az EB

transzkripciós faktort (TFEB) és az IGHM enhancer 3-hoz kötődő transzkripciós faktort (TFE3) [Altshuler-Keylin és Kajimura, 2017].

Mitofágia esetében a szelektivitást specifikus fehérjék biztosítják, amelyek fizikailag összekapcsolják a mitokondriumokat az LC3 autofagoszómális fehérjével. Ezek a receptorok kölcsönhatásba lépnek az autofagoszómával az LC3-interaktáló régió (LIR-en) keresztül (6B. ábra). A mitokondriális károsodás a szelektív mitokondriális eltávolítás fő fiziológiai kiváltó oka. A károsodás által kiváltott mitofágia két különböző mechanizmuson keresztül fordulhat elő: adapter által közvetített, ubikvitin-függő mitofágia (6B. ábra, felső rész) és közvetlen, ubikvitin-független mitofágia (6B. ábra, alsó rész). Az adapter-mediált mitofágiához - amelyet a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN)-indukált putatív kináz 1 (PINK1) és a Parkin E3 ubikvitin ligáz közvetít - elengedhetetlen a cél ubikvitinációja. A mitokondriumok károsodása csökkent mitokondriális membránpotenciálhoz, a külső mitokondriális membránon a PINK1 stabilizálásához, és ezt követően a Parkin toborzásához vezet, mely mindenütt ubikvitinálja a külső mitokondriális fehérjéket [Narendra és mtsai., 2010]. Az ubikvitinált szubsztrátokat ezután felismerik az autofágia adapter fehérjék. Ilyenek a p62, az optineurin (OPTN), a nuclear dot protein 52 kDa (NDP52/ CALCOCO2) és a neighbor of Brca1 gene 1 (NBR1), amelyek összekapcsolják az ubikvitinált célpontokat az LC3-mal [Kirkin és mtsai., 2009; Sarraf és mtsai., 2013; Lazarou és mtsai., 2015; Heo és mtsai., 2015]. Az adapterfehérjék két meghatározó domént tartalmaznak: egy ubikvitin-kötő domént (UBD-t) a cél felismeréséhez és egy LIR domént, amely kölcsönhatásba lép az LC3-mal, hogy elősegítse az autofagoszóma kialakulását.

A károsodás által kiváltott mitofágia a mitokondriumban lokalizált fehérjék és az LC3 közötti közvetlen kölcsönhatáson keresztül is előfordulhat, függetlenül az ubikvitinációtól. Például a BCL2/E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3), BNIP3 Like/NIP3-Like Protein X (BNIP3L/NIX) és FUN14 domain-containing protein 1 (FUNDC1) közvetlenül kölcsönhatásba lép az LC3-mal, hogy elősegítse a mitofágiát, válaszul a hipoxia által kiváltott mitokondriális károsodásra [Hanna és mtsai., 2012; Liu és mtsai., 2012]. Az Atg32 emlős homológ BCL2-like protein 13 (BCL2L13) mitofágia receptor közvetlenül kölcsönhatásba lép az LC3-mal a LIR doménon keresztül, de a BCL2L13-at aktiváló mechanizmusa még nem tisztázott [Murakawa és mtsai., 2015]. Jelentős ismeretekkel rendelkezünk a szelektív mitofágiáról; azonban sok kérdés megválaszolatlan maradt, például az, hogy a mitokondriális eltávolítás milyen módon szabályozott sejttípus- vagy szövet-specifikus módon.

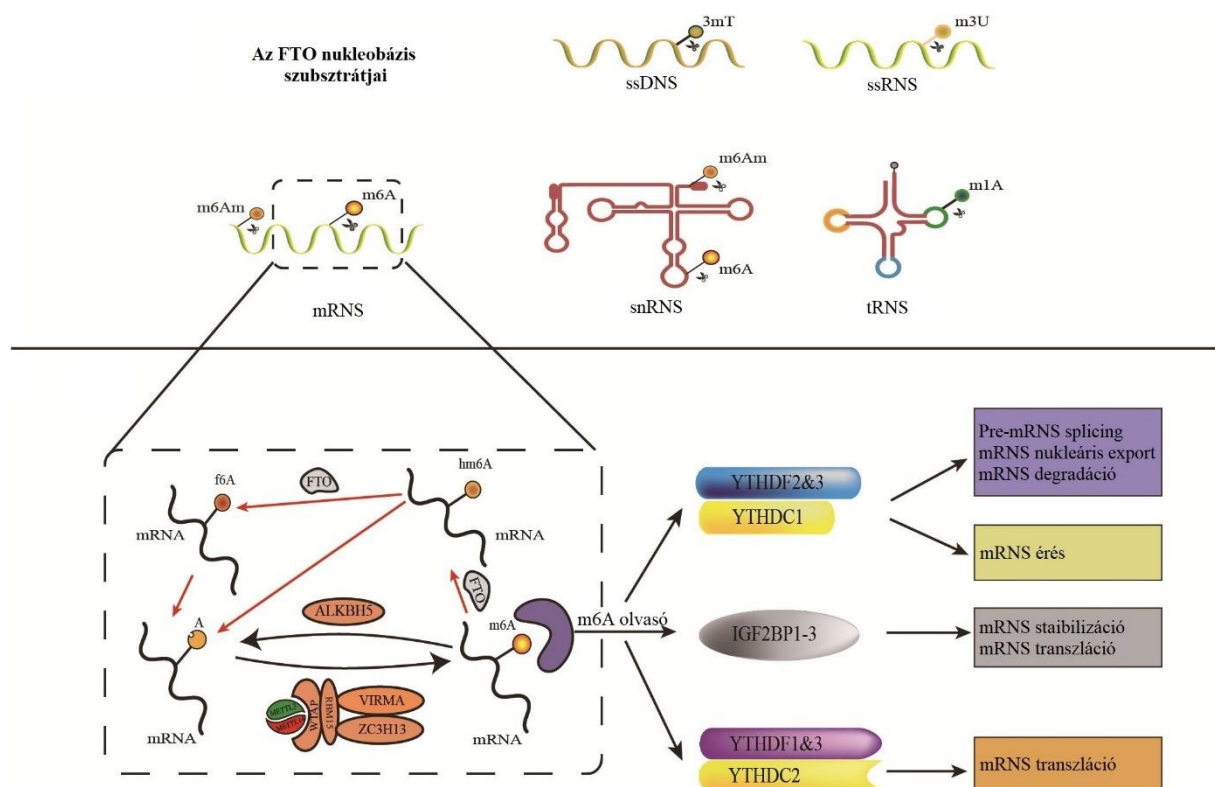


6. ábra: Az autofágia és a mitofágia útvonalainak áttekintése

(A) Az autofágia az izolációs membrán kialakulásával kezdődik. Az izolációs membrán elindításához az ULK1 komplexre van szükség, amelyet az mTORC1 szabályoz. Az izolációs membrán ezután körülveszi a citoszól komponenseket, és megnyúlik, hogy teljesen bezárja és kialakítsa az autofagoszómát. Az autofagoszóma megnyúlása és zárása két ubikvitin-szerű konjugációs rendszert foglal magában: az egyik az ATG5-ATG12-ATG16L komplexet, a másik pedig a PE-konjugált LC3-at (LC3-II) alkotja. Az LC3-II szükséges az autofagoszóma kialakulásához, és az autofágia markereként szolgál. Ezt követően az autofagoszóma összeolvad a lizoszómával, és a bezárt komponenseket a lizoszómális enzimek lebontják. A transzkripciós faktorok MiT/TFE családja szabályozza a lizoszómális autofágia gének transzkripcióját. (B) A szelektív mitokondriális degradáció vagy a mitofágia az autofágia receptorokon alapul, amelyek kölcsönhatásba léphetnek az LC3-II fehérjékkel (zöld). Az adapter által közvetített, ubikvitin-függő mitofágiában (fent) a PINK1 stabilizálása megköti a Parkint, és elősegíti a fehérjék ubikvitinációját a külső mitokondriális membránban. Az ubikvitin láncokat az adapter fehérjék ismerik fel, amelyek szintén tartalmazzák a LIR-t, és elősegítik a mitokondriumok körül az autofagoszóma kialakulását. Az adapter-független, ubikvitin-független mitofágiában a specifikus mitokondriális fehérjék, amelyek közül többet azonosítottak, közvetlenül kölcsönhatásba lépnek az LC3-mal [Altshuler-Keylin és Kajimura, 2017 alapján].

2.9. Az *FTO* gén

A poligénes betegségek háttérében álló biológiai mechanizmusok jobb megértése érdekében a genom asszociációs tanulmányok (genome-wide association study, GWAS) célja, hogy jobban megértsük az emberi genom genetikai változatait [Loos és Yeo, 2013]. Ezen első GWAS-ok rámutattak, hogy az *FTO*-nak elhízásra hajlamosító hatása van, valamint felfedeztek két SNP-t, melyek a gén első intronjában találhatóak (rs9930506, rs9939609). Ezek a tanulmányok végül az *FTO* elhízásra gyakorolt hatásának vizsgálatához vezettek [Scuteri és mtsai., 2007; Frayling és mtsai., 2007].



7. ábra: Az *FTO* demetiláz aktivitása

Felső panel: FTO nukleobázis szubsztrátjai. Alsó panel: Az m⁶A módosulását a METTL3, METTL14 és kofaktoraik (írók) indukálják, az FTO és az ALKBH5 (eltávolítók) megfordítják, és funkcionálisan elősegítik az m⁶A-kötő fehérjék, köztük az YTHDF1-3, YTHDC1-2 és IGF2BP1-3 (olvasók). METTL: N⁶-Adenozin-metiltransferáz alegység; ALKBH: AlkB homológ; YTHDF: YTH N⁶-Metiladenozin RNS kötő fehérje; IGF2BP: Inszulin szerű növekedési factor 2 mRNA kötő fehérje [Lan és mtsai., 2020 alapján].

Az *FTO* egy az emberekben a 16-os kromoszómán található 9 exonból és 8 intronból álló gén, mely az AlkB DNS javító dioxigenáz enzimcsaládba tartozó fehérjét kódol. Az enzim a 2-oxoglutarát és Fe(II) dependens demetilációt katalizálja egyszálú DNS-ekben és RNS-ekben. Demetiláció során több nucleotid átalakulását katalizálhatja (pl.: 3-metiluracil (m³U), 3-metiltimin (m³T)), azonban fő szubsztrátja a N⁶-metiladenozin (m⁶A). Az *FTO* többféle RNS-

hez kötődhet, beleértve az mRNS-t, snRNS-t és tRNS-t, és demetilálhatja az m⁶A-t és az N⁶,2'-O-dimetiladenozint (m⁶Am) az mRNS-ben, az m⁶A-t az U6RNS-ben, az m⁶Am-et az snRNS-ekben és az N¹-metiladenozint (m¹A) a tRNS-ben (7. ábra, felső panel) [Wei és mtsai., 2018; Lan és mtsai., 2020].

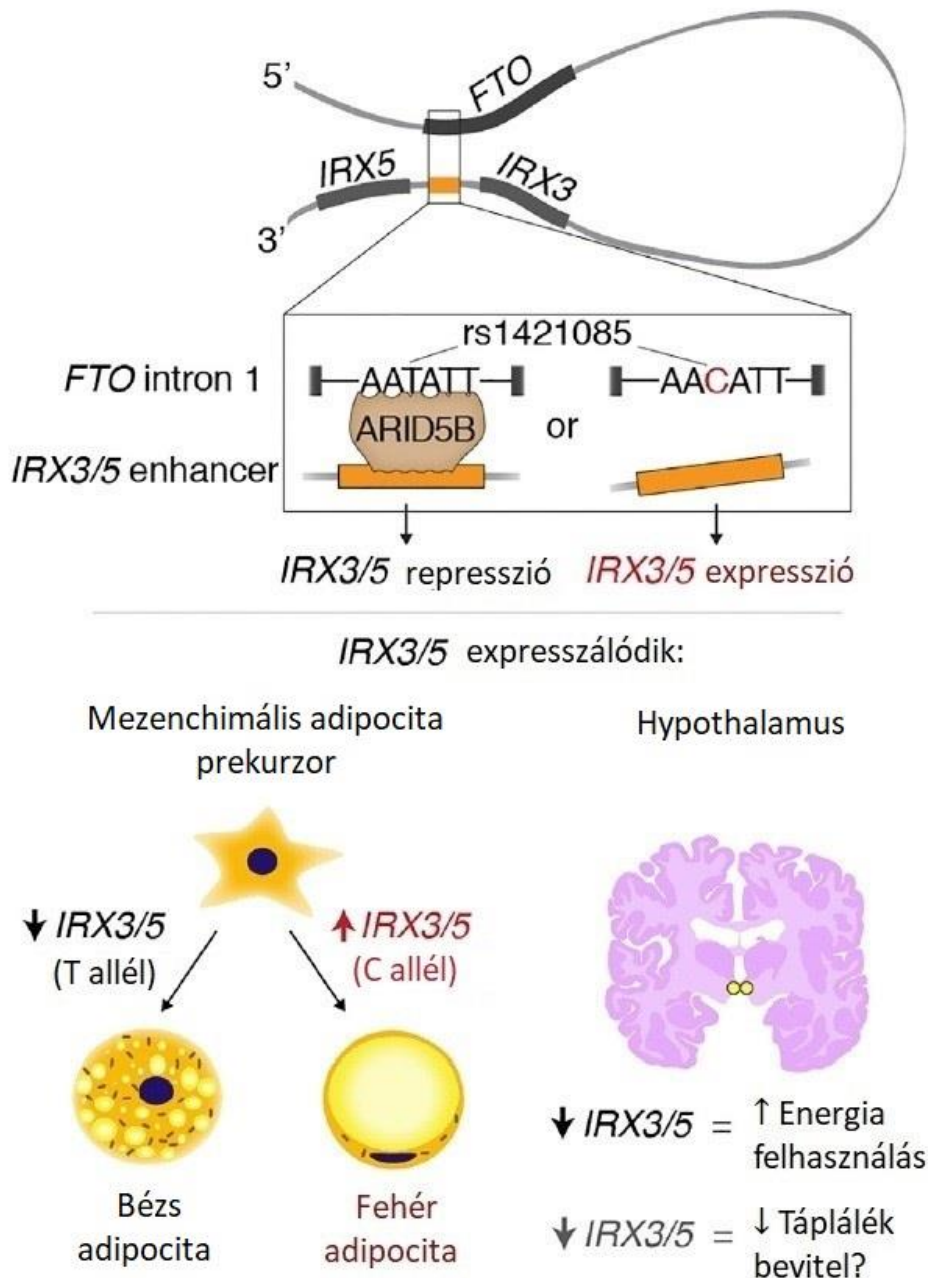
Az m⁶A metilációs módosítása az adenin hatodik nitrogénatomján a leggyakoribb mRNS-metiláció, mely a 3'-nem transzlált régióban (3'-UTR-ek) feldúsult a stop és start kodon között [Roundtree és mtsai., 2017]. Az m⁶A módosításai reverzibilis és dinamikus szabályozásoknak vannak kitéve, beleértve az írókat (METTL3, METTL14 és WTAP), az eltávolítókat (FTO és ALKBH5) és az olvasókat (YTH domain család és IGF2BP) (7. ábra, alsó panel). Dinamikus szabályozás alapján látható, hogy a m⁶A fontos szerepet játszik olyan transzkripciót követő szabályozó folyamatokban, mint például az RNS splicing, a nukleáris termelés, a degradáció és a transzláció. A DNS javító és poszttranszlációs szabályozások mellett az FTO enzim a zsírsav metabolizmusban is részt vesz [Gerken és mtsai., 2007; Lan és mtsai., 2020].

Az FTO kiterjedten expresszálódik a zsírszövetekben és a vázizomzatban, a legmagasabb expresszióval a hipotalamuszban az energiaegyensúlyt szabályozó régióban (nucleus arcuatus), ami azt jelzi, hogy kritikus szerepet játszhat az étvágy és az energia-anyagcsere szabályozásában [Frayling és mtsai., 2007]. Az *FTO* gén exonjában megjelenő mutációk súlyos polimalformációs szindrómát és növekedési retardációt okozhatnak. *FTO* KO egerekben leírták, hogy a teljes *FTO* hiány posztnatális növekedési retardációval, a zsírszövet jelentős csökkenésével és sovány testtömeggel jár, azonban a központi idegrendszerben vagy a kardiovaszkuláris rendszerben nem számoltak be semmilyen fejlődési rendellenességről. Ezzel szemben a rágszálókban túltermeltetett *FTO* jelentősen megnövelte az abdominális WAT zsírtömegét mind normál, mind magas kalóriatartalmú étrend mellett [Boissel és mtsai., 2009; Church és mtsai., 2010].

Az *FTO* gén első intronjában megjelenő genetikai variánsok elhízásra hajlamosítanak. A korábban említett rs9939609 polimorfizmus rizikó alléljára homozigóta egyedek átlagosan 3 kg-mal nagyobb súlyúak, és 1,7-szer nagyobb az esélyük az elhízásra, mint a rizikó-mentes allél homozigótáinak. Szignifikáns testtömeg, zsírtömeg és WAT térfogat csökkenés volt megfigyelhető *FTO*-hiányos egerekben a vad típusú és heterozigóta egerekhez képest. A BAT aránya nőtt a testsúlyhoz képest, de nem jelentősen. Az *FTO* nem nélkülözhetetlen enzim az embrionális fejlődéshez, azonban a posztnatális letalitás gyakrabban fordult elő a rizikó allélra homozigóta egerekben [Frayling és mtsai., 2007; Fischer és mtsai., 2009].

A GWAS-okban használt technikák fejlődésével sikerült megtalálni azt az oki SNP-t, melynek jelenléte megbont egy konzervált motívumot az *FTO* lókuszan belül. A zsírsejtek differenciálódásának korai szakaszában az rs1421085 rizikó allél változásai (T→C tranzíció) az irokéz homeobox transzkripciós faktor 3 és 5 (*IRX3/5*) megemelkedett kettős expressziójához vezetnek, mivel az AT-rich interaction domain 5b (*ARID5B*) represszor fehérje kötődése gátlódik. Ennek következtében a bézs program irányába elkötelezett progenitor sejtek nagyobb valószínűséggel fehér adipocitákká differenciálódnak, mely ötszörösére csökkenti a mitokondriális termogenezist (8. ábra, felső panel) [Claussnitzer és mtsai., 2015].

Miután kimutathatóvá vált, hogy az *FTO* lókuszmely része hajlamosít elhízásra, a következő feladat annak kiderítése volt, hogyan szabályozódik az SNP működése. Az emberi testben a hipotalamikus régióban fejt ki hatását a legtöbb testsúlyt befolyásoló genetikai variáns. Ez a terület felelős a táplálék bevitel, valamint az energiafelhasználás szabályozásáért (7. ábra, alsó panel). Egér modellben leírták, hogy a hipotalamikus *Irx3* kifejeződés részleges gátlásával csökkent az *Ucp1* expresszió, mely súlyosbította az elhízást [Speliotes és mtsai., 2010; Smemo és mtsai., 2014; de Araujo és mtsai., 2019]. Az *FTO* első intronjában az SNP-k egy úgynevezett szuper-enhancer régió belül helyezkednek el, amelyek a mezenchimális eredetű sejtekben a legaktívabbak, ilyenek az adipocita-eredetű mezenchimális sejtek is. A megnövekedett *IRX3/5* expresszió olyan gének kifejeződését indukálja, amelyek az adipocita prekursorokat a bézs adipocita differenciáció helyett a fehér adipocita differenciáció irányába indítják el (8. ábra, alsó panel) [Claussnitzer és mtsai., 2015].



8. ábra: Az *FTO* lókuszból található polimorfizmus meghatározza az *IRX3/5* expresszióját, mely befolyásolja a testtömeget

*Felső panel: Az *FTO* lókuszból a rs1421085 az *ARID5b* transzkripciós faktor bekötődése révén szabályozza az *IRX3* és *IRX5* expressziót.*

*Alsó panel: Az *IRX3/5* expresszió hatással van az adipogenezisre a mezenchimális adipocita prekurzorok differenciációja során és/vagy a hipotalamusz táplálékfelvételt és energiafelhasználást fokozó hatásán keresztül [Herman és Rosen, 2015 alapján].*

3. Célkitűzés

Három adipocita sejttípust különböztetünk meg: az energiaraktározó fehér zsírsejtet, mely unilokuláris lipidcseppel rendelkezik, valamint a barna és bézs adipocitákat, melyek citoplazmája multilokuláris lipidcseppeket tartalmaznak, expresszálják az UCP1-et, és elősegítik az energiafelhasználást. Utóbbi két sejttípusnak fontos szerepe van a hideg expozíciót követően a testhőmérséklet fenntartásában a nem didergés hőtermelés révén.

Korábban egér modellekben leírták, hogy külső termogenikus stimulus hiányában a bézs adipociták inaktiválódnak mitofágia közreműködésével, így ezek a sejtek egy fehér-szerű állapotba kerülnek. Ennek függvényében a következő célokat tűztük ki:

- Annak vizsgálata, hogy a mitofágia aktiválódik-e sejtautonóm módon a primer humán abdominális SC zsírsejtek bézs-fehér átmenete során
- A humán bézs zsírsejtek inaktivációja során a mitofágia aktiválódásának hátterében álló molekuláris mechanizmus tanulmányozása

2015-ben azonosították azt az oki SNP-t (rs1421085), melynek jelenléte megbontja az *FTO* lokuszán belüli konzervált motívumot, mely a mezenchimális adipocita prekursorokat a fehér adipocita differenciáció felé fogja elindítani. Tanulmányom során az alábbi célokat tűztük ki:

- A SC zsírból származó fehér, aktív bézs és inaktív bézs zsírsejtek jellemzése rendszerbiológiai megközelítéssel
- A bézs-fehér átalakulás hatásának vizsgálata a primer humán SC zsírsejtekre (génexpressziós elemzéssel)
- Annak tisztázása, hogy az *FTO* rs1421085 SNP hogyan befolyásolja a SC zsírsejtek differenciálódását, tápanyag felhasználását és bézs-fehér átalakulását

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

Minden reagenst a Sigma-Aldrich-tól (München, Németország) szereztük be, ellenkező esetben lásd feltüntetve.

4.2. Zsírszövet minták eredete és etikai engedélyek

Vizsgálatainkhoz hasfali (abdominális) és inguinalis plasztikai sebészeti beavatkozásból származó SC zsírsejteket használtunk. A donor betegek megfelelő tájékoztatás után írásos beleegyezésüket adták a mintavételhez. Ezen humán eredetű sejteken végzett kísérleteinket a Helsinkai Deklarációban foglalt irányelveknek megfelelően végeztük. A kutatási tervet elfogadta az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (No. 20571-2/2017/EKU), valamint a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (No. 3186-2010/DEOEC RKEB/IKEB; No. 4734-2017/DE RKEB/IKEB).

4.3. Humán zsírsejt-eredetű sztrómális sejtek (hASC, preadipociták) izolálása és tenyésztése

Zsírsejt-eredetű sztrómális sejtek többszöri steril-PBS-el történő mosása után a kötőszöveti állomány emésztését 120 U/ml kollagenáz kezeléssel hajtottuk végre steril-PBS-ben 3-4 órán keresztül a sejtek rázogatója mellett 37°C-on. Az inkubáció után a sejteket 140 µm pórusátmérőjű szűrőn keresztül tisztítottuk meg, melyet tápfolyadékkal való mosás és centrifugálás követett 1300 rpm-en, 10 percig. A sejteket növekedési tápfolyadékba szuszpendáltuk, mely a következő összetevőkből állt: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM-F12) + 10% magzati szarvasmarha szérum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) + 33 µM biotin + 17 µM pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomycin. A sejteket ezután T-75 flasksba szélesztettük, az izolálás másnapján steril-PBS-sel mostuk őket, majd 3 naponként cseréltük a tápfolyadékot. A megfelelő konfluencia eléréséig 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett inkubáltuk a flaskskat. Mycoplasma kontamináció hiányának ellenőrzésére polimeráz-lánreakció (PCR) alapú analízist végeztünk PCR Mycoplasma Test Kit I/C-vel (PromoKine, PromoCell, Heidelberg, Németország) [Kristóf és mtsai., 2019; Szatmári-Tóth és mtsai., 2020].

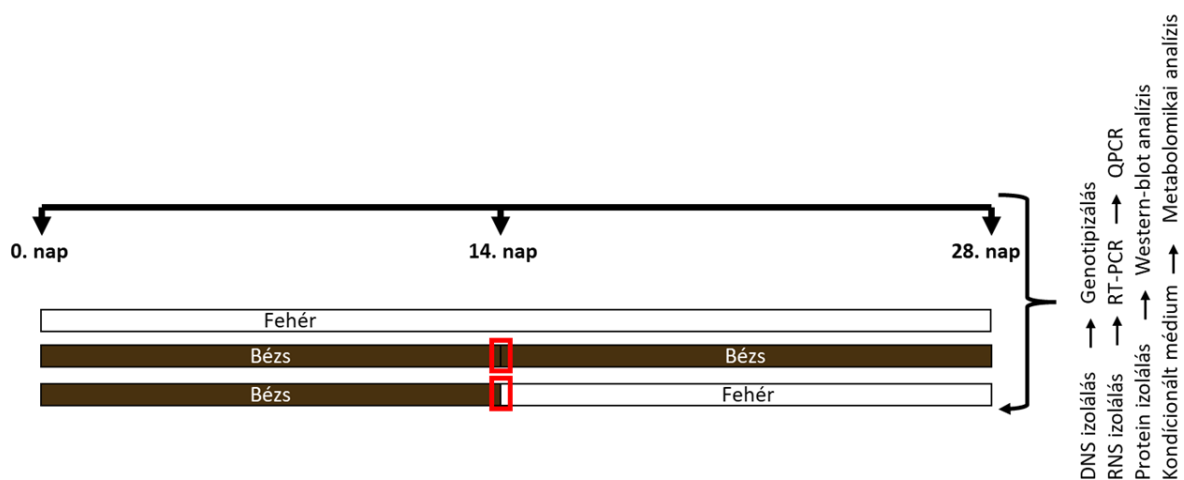
4.4. A hASC-k differenciálása

A hASC-eket 6-lyukú lemezekre szélesztettük, melyeket a 4.3-as pontban leírt növekedési tápfolyadékban és körülmények között tartottunk a megfelelő konfluencia eléréséig.

A fehér zsírsejt differenciáció indukálása három napig az alábbi médiumban történt: szérum-mentes DMEM-F12 + 33 μM biotin + 17 μM pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomycin + 10 $\mu\text{g/ml}$ humán-apotranszferrin + 20 nM humán inzulin + 100 nM kortizol + 200 pM trijód-trionin + 2 μM rozigitazon (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) + 25 nM dexametazon + 500 μM 3-izobutiril-1-metilxantin. A harmadik napot követően a differenciáció további 25 napjáig nem tettünk a médiumhoz rozigitazont, dexametazont és 3-izobutiril-1-metilxantint. A tápfolyadékot minden harmadik nap lecseréltük [Fischer-Posovsky és mtsai., 2008; Sárvári és mtsai., 2014].

Az aktív bézs differenciáltatás a következő médiumban történt három napig: szérum-mentes DMEM-F12 + 33 μM biotin + 17 μM pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomycin + 10 $\mu\text{g/ml}$ humán-apotranszferrin + 0,85 μM humán inzulin + 200 pM trijód-trionin + 25 nM dexametazon + 500 μM 3-izobutiril-1-metilxantin. A harmadik nap után a dexametazont, 3-izobutiril-1-metilxantint elhagytuk, és 500 nM rozigitazont adtunk a médiumhoz. A differenciáció 14. napján egy 4 órán át tartó 500 μM dibutiril-cAMP kezelést hajtottunk végre, hogy *in vitro* utánozzuk a hideg-indukált termogenezist [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. A kezelés után az előbb említett bézs differenciációs tápfolyadékkal folytattuk a tenyésztést további 14 napig, a differenciáció végéig.

Az inaktív bézs differenciáció első 14 napja az aktív bézs adipocitákhoz hasonlóan zajlott, de a dibutiril-cAMP kezelés után a médiumot rozigitazon-, dexametazon- és 3-izobutiril-1-metilxantin-mentes fehér koktéllra cseréltük további 14 napra. Az aktív és inaktív bézs adipociták tápfolyadékát minden harmadik napon lecseréltük (9. ábra).



9. ábra: Kísérleti beállítások

A piros négyzetek 4 órás 500 μM dibutiril-cAMP kezelést jelentenek.

A mitofágia vizsgálatához fehér és bézs differenciációt, valamint bézs-fehér átalakulást modelleztük. A hASC-eket 6-lyukú lemezeken (Costar, Corning, NY, USA) differenciáltuk 14, 21 és 28 napig fehér vagy bézs adipogenikus differenciálódási protokollok használatával. A fehér differenciációt lásd a fentebb feltüntetett részben. A bézs differenciáció megegyezett az aktív bézs differenciációval, azonban a 14. napon nem történt 500 μ M dibutiril-cAMP kezelés. Az átalakulást 100 nM kortizol és 20 nM humán inzulin hozzáadásával, valamint 500 nM rozigitazon eltávolításával indítottuk el. A sejteket 5% CO₂ jelenlétében és 37°C-on inkubáltuk, valamint a tápközeget háromnapos időközönként cseréltük.

4.5. RNS izolálás TRIzol reagens felhasználásával

A differenciáció végén a tápfolyadék eltávolítása után 1000 μ l TRIzol reagenst (Thermo Fisher Scientific) adtunk a sejtekhez, majd alaposan vortexeltük a mintákat. Az így keletkező lizátumokat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután 200 μ l kloroformot adtunk hozzájuk, vortexeltük, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat 15 percig 2000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk, mely során három fázis különült el egymástól. A felső, színtelen fázis tartalmazta az RNS-t, melyet Eppendorf csőbe vittünk át. Az alsó, magenta színű fázisokból hajtottuk végre a genomiális DNS izolálást (lásd a következő fejezetben). A színtelen fázisokhoz 500 μ l izopropanolt adtunk, majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ezt követte 10 perc centrifugálás 4°C-on 2000 g-n. Ezután a pelletokról eltávolítottuk a felülúszót, majd mostuk 1000 μ l 70%-os etanollal, majd ismét centrifugáltuk 5 percig 4°C-on 2000 g-n. A pelletokról eltávolítottuk a felülúszót, majd szobahőmérsékleten szárítottuk őket. Ezt követően a pelleteket 65°C-on 10 perc alatt visszaoldottuk nukleáz-mentes vízbe. Az RNS minták minőségét és koncentrációját Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) készülékkel ellenőriztük, majd kihígítottuk őket 50 ng/ μ l koncentrációjúra.

4.6. Genomiális DNS izolálása TRIzol reagens felhasználásával

A 4.5-ös fejezetben nyert magenta színű fázisokból 300 μ l 100%-os etanollal precipitáltuk a DNS-t, majd 2-3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően pedig 5 percig centrifugáltuk 4°C-on 2000 g-n. A felülúszó óvatos eltávolítását követően a DNS pelletet 1,5 ml 0,1 M nátrium-citráttal mostuk 1 óráig, 20 perces megforgatásokkal, majd újra centrifugáltuk 5 percig 4°C-on 2000 g-n. A mosófolyadék eltávolítása után a mintákat 1,5 ml 70 %-os etanollal mostuk, majd 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, ezt követően pedig centrifugáltuk 5 percig 4°C-on 2000 g-n. A felülúszót eltávolítottuk a pelletekről,

melyeket ezután szobahőmérsékleten kiszárítottunk. Végül a DNS pelletet nukleáz-mentes vízben oldottuk vissza 65°C-on 10 perc alatt. A DNS minták minőségét és koncentrációját Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) készülékkel ellenőriztük, majd 50 ng/μl koncentrációjúra hígítottuk ki őket.

4.7. Genotipizálás valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)-rel

Az általunk vizsgálni kívánt rs1421085 SNP analíziséhez kvantitatív PCR-t hajtottunk végre, melyhez TaqMan® Genotyping Master Mix-et és TaqMan® Genotyping Assay-t (Thermo Fisher Scientific) használtunk. Genotyping Master Mix a következő összetevőkből állt: ultra tiszta DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific), dNTP mix, ROX passzív referencia (a riporter jel normalizáláshoz), valamint PCR puffer. Az Assay tartalmazta az általunk vizsgálni kívánt szekvencia specifikus primereket, valamint két TaqMan® MGB próbát az alléldetektáláshoz. A qPCR-t egy Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex készüléken végeztük. Az amplifikációs protokoll a következő volt: 10 perc inkubáció 95°C-on, majd 15 s 95°C és 1 perc 60°C-on (50 cikluson keresztül). Mintánként két párhuzamossal dolgoztunk. A kiértékelést Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex Software v1.2.2. programmal végeztük.

4.8. Reverz-transzkripció, qPCR és RNS-szekvencia analízis (RNS-Seq)

A cDNS létrehozásához TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit-et használtunk (Applied Biosystems), melyet a gyártói utasítás szerint alkalmaztunk az Applied Biosystems által tervezett primerekkel és próbákkal. A qPCR analízis LightCycler 480 (Roche, Bazel, Svájc) műszerrel történt az alábbi protokoll használatával: 10 s 94°C-on, 12 s 94°C-on és 30 s 60°C-on (40 cikluson keresztül). Minden minta esetében három technikai párhuzamos ismétlést alkalmaztunk. A génexpressziót a humán *GAPDH* génre vagy a *GAPDH* és az *ACTB* gének Ct értékeinek átlagára normalizáltuk, melyek a ΔC_t módszerrel lettek kiszámolva. A kutatásban felhasznált próbák teljes listája megtalálható a 3. táblázatban.

Gén név	Esszé azonosító
<i>UCP1</i>	Hs00222453_m1
<i>UCP2</i>	Hs01075227_m1
<i>PM20D1</i>	Hs00399438_m1
<i>CIDEA</i>	Hs00154455_m1
<i>CITED1</i>	Hs00918445_g1
<i>S100B</i>	Hs00389217_m1
<i>CKMT1</i>	Hs00179727_m1
<i>CKMT2</i>	Hs00176502_m1
<i>PLIN1</i>	Hs00160173_m1
<i>CPT2</i>	Hs00988962_m1
<i>SLC7A10</i>	Hs00219811_m1
<i>SHMT1</i>	Hs00541043_g1
<i>GPT2</i>	Hs00370287_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>PPARGC1A</i>	Hs01016719_m1
<i>PARK2</i>	Hs01038322_m1
<i>SQSTM1</i>	Hs00177654_m1
<i>OPTN</i>	Hs00184221_m1
<i>NDP52</i>	Hs00977443_m1
<i>BNIP3</i>	Hs00969291_m1
<i>BNIP3L</i>	Hs00188949_m1
<i>FKBP8</i>	Hs01014664_m1
<i>BCL2L13</i>	Hs00209789_m1
<i>FUNDC1</i>	Hs00697693_m1
<i>LEP</i>	Hs00174877_m1
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1

3. táblázat: A tanulmányban használt génexpressziós próbák listája

A nagy áteresztőképességű mRNS szekvenálási analízist az MGI DNBSEQ G400 szekvenáló platformon végeztük el. A teljes RNS minta minőségét az Agilent BioAnalyzer készüléken ellenőriztük az Eukaryotic Total RNA Nano Kit használatával, a gyártó protokollja szerint. A 7-nél nagyobb RNS-integritási számú (RIN) mintákat használtuk a könyvtárkészítési folyamat során. A könyvtárakat a teljes RNS-ből MGIEasy RNA Library Prep Set V3.0 (MGI, Shenzhen, Kína) segítségével készítettük elő a gyártó protokollja szerint. Röviden, a poli-A RNS-eket oligo-dT konjugált mágneses gyöngyökkel fogtuk be, majd az RNS-eket eluáltuk és 94°C-on fragmentáltuk. Az első szál cDNS véletlenszerű indító reverz-transzkripcióval állítottuk elő, és a második szál szintézise után kettős szálú cDNS jött létre. A végek javítása, az A-farok és az adapter ligálási lépések után az adapterrel ligált fragmentumokat dúsító PCR-rel amplifikáltuk, és végül szekvenálási könyvtárakat hoztunk létre. A szekvenálás után a leolvasásokat GRCh38 referenciagenomhoz illesztettük Ensembl 95 annotációval Star aligner (2.7.0a verzió)

segítségével. A FeatureCounts segítségével számszerűsítettük leolvasásainkat a génekre. A szignifikánsan eltérően expresszált géneket (differentially expressed gene, DEG) a korrigált $p < 0,05$ és a \log_2 -szeres változási küszöb $> 0,85$ alapján határoztuk meg. A heatmap-eket a GraphPad 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftverrel, az interaktom térképeket a Gephi 0.9 használatával állítottuk elő a STRING interakció alapján (<http://string-db.org/>). Az útvonalelemzést úgy végeztük, hogy a DEG-ek listáját STRING-analízisnek vetettük alá, és a magasan expresszált KEGG útvonalakat a 0,05-nél kisebb hamis felfedezési arány (false discovery rate, FDR) alapján választottuk ki. A minták barna zsírsejt tartalmát és barnulási kapacitását BATLAS, illetve ProFat szabad hozzáférésű alkalmazásokkal számítottuk ki mindkét marker csoport transzkriptomikai adatainak vizsgálatával [Predikari és mtsai., 2018; Cheng és mtsai., 2018].

4.9. Mitokondriális DNS (mtDNS) izoláció és kvantifikáció PCR-ral

A teljes sejtes DNS-t a 4.6. fejezetben leírt módon izoláltuk. A qPCR-t három technikai párhuzamossal végeztük hígított DNS-el 10 μ M primerek (mtDNS-specifikus PCR, forward primer 5'-CTATGTCGCAGTATCTGTCTTTG-3', reverse primer 5'-GTTATGATGTCTGTGTGGAAAG-3', és sejtmag specifikus PCR, forward primer 5'-CTTTGTGTGCTATAGATGATATGGTAAATTG-3', reverse primer 5'-GATTAACAGTGTACAAAAGTAG-3') és Maxima Sybr Green/Rox qPCR MasterMix (Thermo Scientific) használatával. A reakciót LightCycler 480 készüléken futtatuk az alábbi programmal: 20 perc 95°C-on, majd 50 ciklus 15 másodpercig 95°C-on, 20 másodperc 58°C-on és 20 másodperc 72°C-on. Az egy-termékes amplifikációt integrált futás utáni olvadási görbe elemzéssel igazoltuk. Az eredményeket a mtDNS és a magspecifikus amplifikáció Ct értékeinek különbségéből számítottuk ki. Az adatokat mtDNS tartalomként fejeztük ki diploid sejtmagokra normalizálva [Kristóf és mtsai., 2015].

4.10. Antitestek és immunoblottolás

A vizsgált fehérjék szétválasztását nátrium dodecil szulfát- poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) végeztük, majd polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra blottoltuk, melyet 5%-os sovány tejporoldattal blokkoltunk [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020; Shaw és mtsai., 2021]. Az elsődleges antitesteket a következő hígításokban használtuk: anti- β -aktin (1:5000, A2066), anti-UCP1 (1:750, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, MAB6158), anti-OXPHOS (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA, ab110411), anti-SLC7A10 (1:500, Abnova, Taipei City, Tajvan, H00056301-B01P), anti-PGC1 α (1:1000, Novus Biologicals, Centennial, CO,

USA, NBP1-04676), anti- glutamát-piruvát transzamináz (GPT) 2 (1:2000, Thermo Fisher Scientific, PA5-62426), anti-szerin hidroximetiltranszferáz (SHMT) 1 (1:2000, Thermo Fisher Scientific, PA5-88581), anti-p62 (1:5000, Novus Biologicals, NBP1-49956), anti-LC3 (1:2000, Novus Biologicals, NB100-2220), anti-Parkin (1:750, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-32282) és anti-NBR1 (1:1000, Novus Biologicals, NBP1-71703). A következő fajoknak megfelelő másodlagos antitesteket használtuk: HRP-konjugált kecske anti-egér (1:5000, Advansta, San Jose, CA, USA, R-05071-500) vagy anti-nyúl (1:5000, Advansta, R-05072-500) IgG. A vizualizált immunreaktív fehérjék expresszióját denzitometriával, FIJI ImageJ szoftver felhasználásával (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) számszerűsítettük.

4.11. Immunfestés és képanalízis

A hASC-ket nyolclyukú Ibidi μ -kamrákban (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) szélesztettük és differenciáltuk a 4.4-es fejezetben részletezett módon és ideig. A sejteket egyszer mostuk PBS-sel, és 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0,1 %-os szaponinnal permeabilizáltuk, utána pedig 5 %-os sovány tejporoldattal blokkoltuk [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. Az elsődleges antitest inkubálást egy éjszakán át anti-TOM20-szal (1:75, WH0009804M1) és anti-LC3-mal (1:200 Novus Biologicals, NB10-2220) végeztük. A másodlagos antitest-inkubáció Alexa Fluor 647 kecske anti-egér IgG-vel (1:1000, Thermo Fisher Scientific, A21236) és Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl IgG-vel (1:1000, Thermo Fisher Scientific, A11034) történt 3 órán át. A sejtmagok jelöléséhez propídium-jodidot (PI, 1,5 μ g/ml, 1 óra) használtunk. A képeket Olympus FluoView 1000 (Olympus Scientific Solutions, Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal és FluoView10-ASW (Olympus Scientific Solutions) szoftverrel (3.0-s verzió) készítettük [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020; Shaw és mtsai., 2021]. Az Alexa Fluor 488 gerjesztéséhez egy argon lézer 488 nm-es hullámhosszát, míg az Alexa Fluor 647-hez egy 633 nm-es He-Ne lézert használtunk, a PI esetében 543 nm-es He-Ne lézert alkalmaztunk. Az Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 647 fluoreszcencia emisszióját 500-530 nm-es, illetve 655-755 nm-es sávszűrőn, míg a PI fluoreszcenciáját 555-625 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. A képek szekvenciális módban készültek, hogy minimalizáljuk a csatornák közötti áthallást. A képek körülbelül 1 μ m vastag optikai metszetek, melyek mindegyike 512 x 512 pixelt tartalmazott (pixelméret: \sim 137 nm), és 60 x UPLSAPO olajimmerziós objektívvel készült.

Az LC3 és külső mitokondriális membrán transzlokáz 20 (TOM20) immunfestés képeket bináris formává alakítottuk, majd FIJI-vel analizáltuk. Az LC3 ponttátumok számát a méret (pixel²) alapján határoztuk meg, 50-végtelen tetszőleges mértékegység (arbitrary unit, AU) és cirkuláris 0-1 AU-val. A fragmentált mitokondriumokat a bináris TOM20 immunfestés képekből elemeztük, 0-100 AU méretű (pixel²) és cirkuláris 0-1 AU-val. Az LC3 ponttátumok és a fragmentált mitokondriumok optimális méretét az összes immunfestett kép elemzése és a számlálás pontosságának kézi ellenőrzése alapján határoztuk meg a számlálások körvonalainak ellenőrzésével. Mind az LC3 ponttátum, mind a fragmentált mitokondriumok tartalmát a sejtmagok számára normalizáltuk az egyes képeknél. Az LC3 és a TOM20 kolokalizációját a Pearson korrelációs együttható (PCC) számításával értékeltük [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020; Shaw és mtsai., 2021].

4.12. Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás meghatározása

A valós idejű oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mértékét Seahorse XF96 oximéterrel (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) mértük. A hASC-eket 96 lyukú XF96 sejtenyésztő lemezekre oltottuk. Ezen sejteket növekedési tápfolyadékban tartottuk leghosszabb ideig 24 órán keresztül, majd elindítottuk a 4.4.-ben részletezett differenciációs folyamatot. Az alapszintű oxigénfogyasztás rögzítése után a sejtek egyszeri 500 µM-os dibutiril-cAMP kezelésben részesültek az adrenerg stimulációt modellezendő. Ezután 30 percenként mértük a stimulált oxigénfogyasztást. A végső leolvasásra a kezelést követő 6. órában került sor. A differenciálódott zsírsejteket 50 µM etomixirral (ETO-val, mely egy mitokondriális zsírsav transzport inhibitor) kezeltük, hogy blokkoljuk a zsírsavak β-oxidációját. Az ETO-rezisztens (ETO-R) légzés, így a sejtek glükóz és aminosav felhasználásával arányos [Nagy és mtsai., 2022]. Ezen kívül a protoncsorgást oligomicinnel (Enzo, USA) mértük 2 µM koncentrációban, amely blokkolja az ATP-szintáz. Az alapvonal korrekciója érdekében a sejtek egy egyszeri 10 µM-os Antimycin A kezelést kaptak, mellyel mértük a nem mitokondriális légzést. A mérések után az oxigénfogyasztás mértékét a lyukankénti fehérjetartalomra – melyet Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával határoztunk meg – normalizáltuk.

4.13. Az adipociták aminosav-fluxusainak mennyiségi meghatározása

A sejtek felülúszóját a differenciálódási folyamat végén összegyűjtöttük. Ezeket a kondicionált tápfolyadékokat 3 kDa-os szűrővel (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) szűrtük, és ebből a szűrletből 10 µl-t AccQ Tag Ultra Derivatization Kit-tel (Waters, Milford, MA, USA)

derivatizáltunk. A kromatográfiás elválasztást H-osztályú UPLC-n (Waters) hajtottuk végre AccQ·Tag Ultra Column (2,1 x 100 mm), AccQ·Tag A és B eluens használatával, a gradienst pedig az AccQ·Tag Ultra Chemistry Kit (Waters) biztosította. Az aminosav származékokat 260 nm-en detektáltuk az UPLC PDA detektorával. Az aminosav-koncentrációkat az Empower szoftverrel (Waters) 7 pontos kalibrációs görbe segítségével számítottuk ki. Az aminosavak adipocitákba való beáramlását vagy onnan történő kiáramlását a kondicionált tápfolyadékban mért koncentrációkülönbségek összehasonlításával számítottuk ki kondicionálatlan kontroll médium felhasználásával. Az aminosavak fluxusát a sejtek számára normalizáltuk [Arianti és mtsai., 2021].

4.14. Statisztikai analízis és ábrakészítés

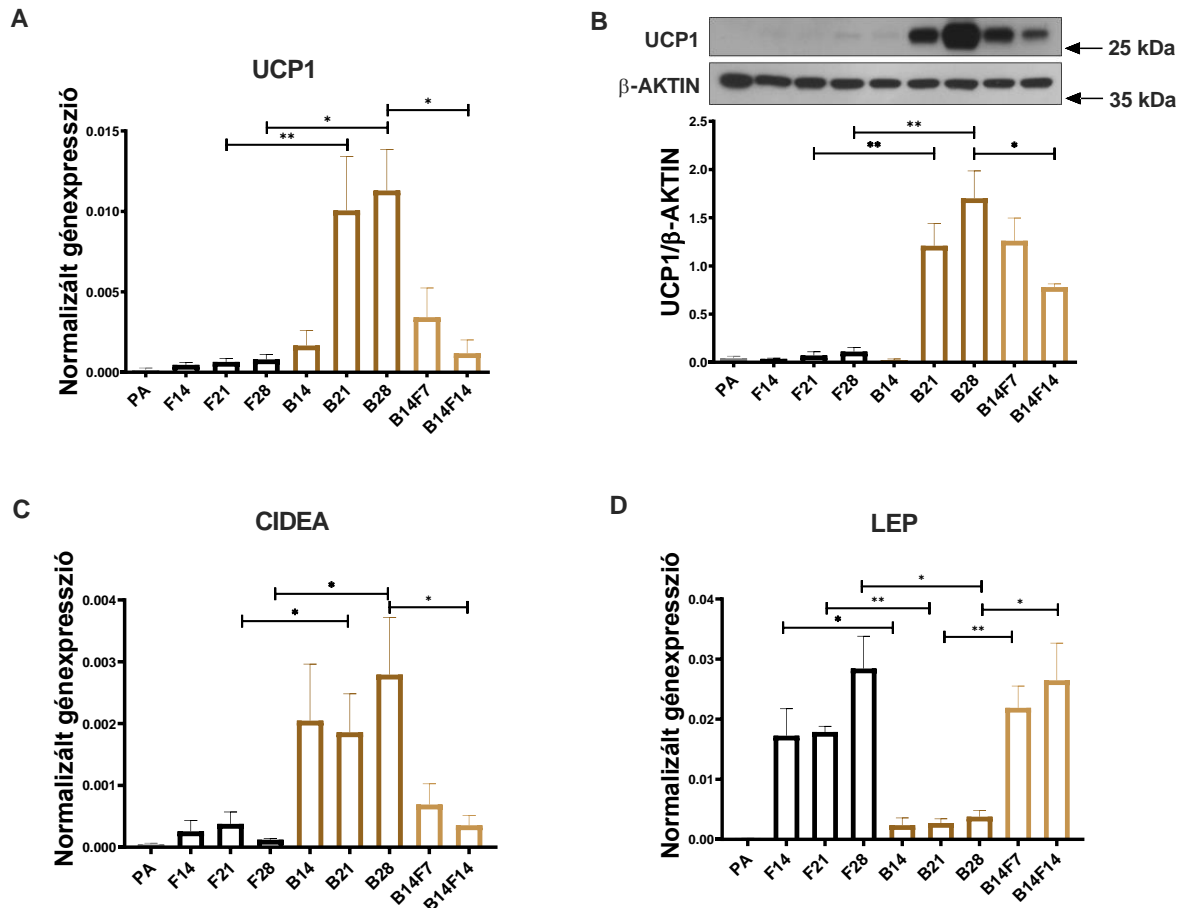
Az összes mért értéket átlag \pm SD-ben fejeztük ki. A független biológiai ismétlések számát az ábra feliratokban jelezzük. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov (n=5 vagy több) vagy Shapiro-Wilk (n=4) tesztekkel végeztük. Egyutas ANOVA Tukey post hoc tesztjét alkalmaztuk több csoport összehasonlítására, amikor az adatok normál eloszlást követtek. Friedman és Dunn többszörös összehasonlító teszteket használtunk a több csoport összehasonlítására, amikor az adatok nem követtek normál eloszlást. A Graphpad Prism 8-cal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) készítettük el az ábrákat és a statisztikai analíziseket.

5. Eredmények

5.1. A mitofágia közvetíti a humán bézs-fehér adipocita átalakulást primer szubkután zsírsejtekben *ex vivo*

5.1.1. A humán abdominális szubkután eredetű zsírsejtek termogenikus képessége folyamatos PPAR γ stimuláció hatására indukálódik, és a bézsből fehérbe való átalakulás eredményeként alábbhagy

A hASC-k adipogén potenciáljának és a differenciált zsírsejtek termogenikus kompetenciájának tanulmányozására kutatócsoportunk a korábban publikált fehér [Fischer-posovszky és mtsai., 2008] és barna/bézs [Elabd és mtsai., 2009] adipogén differenciálódási protokollokat optimalizálta. Ezek a differenciációs médiumok változatos összetételben tartalmaznak hormonokat [Kristóf és mtsai., 2015; Klusóczki és mtsai., 2019], amelyekben a PPAR γ agonista roziglitazon a barnulás fő mozgatórugója [Petrovic és mtsai., 2010]. Az elvárásnak megfelelően az abdominális SC hASC-k a detektálás küszöbén expresszálták a termogenezis fő funkcionális markergénjét és fehérjét, az UCP1-et. Mérsékelt UCP1 expressziót találtunk azokban a zsírsejtekben, amelyek 28 napon át *ex vivo* fehérre differenciálódtak (10A, B. ábra). A korábbi eredményekkel összhangban a folyamatos PPAR γ stimuláció az UCP1 gén- és fehérje expressziójának jelentős növekedését eredményezte a bézs irányba differenciált adipocitákban a fehér zsírsejtekhez képest. Az UCP1 kifejeződés tovább emelkedett, amikor a bézs irányba differenciálást három vagy négy hétig végeztük. Amikor a bézs differenciációs koktélt fehérre cseréltük és a roziglitazont elhagytuk a differenciálódás tizennegyedik napján, az UCP1 gén és fehérje expressziója a következő héten emelkedett, hasonlóan azokhoz a zsírsejtekhez, amelyek folyamatosan a bézs differenciálatsnak voltak kitéve. Két héttel a roziglitazon megvonása után az UCP1 gén és fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a bézs adipocitákhoz képest (10A, B. ábra), és a fehér zsírsejtekéhez hasonló génexpressziós szintet mutatott (10A. ábra). Az UCP1 expresszió csökkenése lassabb volt fehérjeszinten (10B. ábra), mint mRNS-szinten (10A. ábra). Egy másik termogenikus markergén, a sejthalált indukáló DFFA-szerű effektor A (*CIDEA*) [Hallberg és mtsai., 2008] expressziója követte az *UCP1* mRNS expressziós mintáját (10C. ábra). Ezzel szemben a fehér adipocint, a leptint kódoló *LEP* gén [Funcke és mtsai., 2019] alacsony szinten expresszálódott mind a preadipocitákban, mind a bézs zsírsejtekben; azonban erősen növekedett, amikor az adipociták folyamatosan a fehér differenciációs koktél jelenlétében differenciálódtak, vagy amikor a bézs kezelést a fehér váltotta fel (10D. ábra).

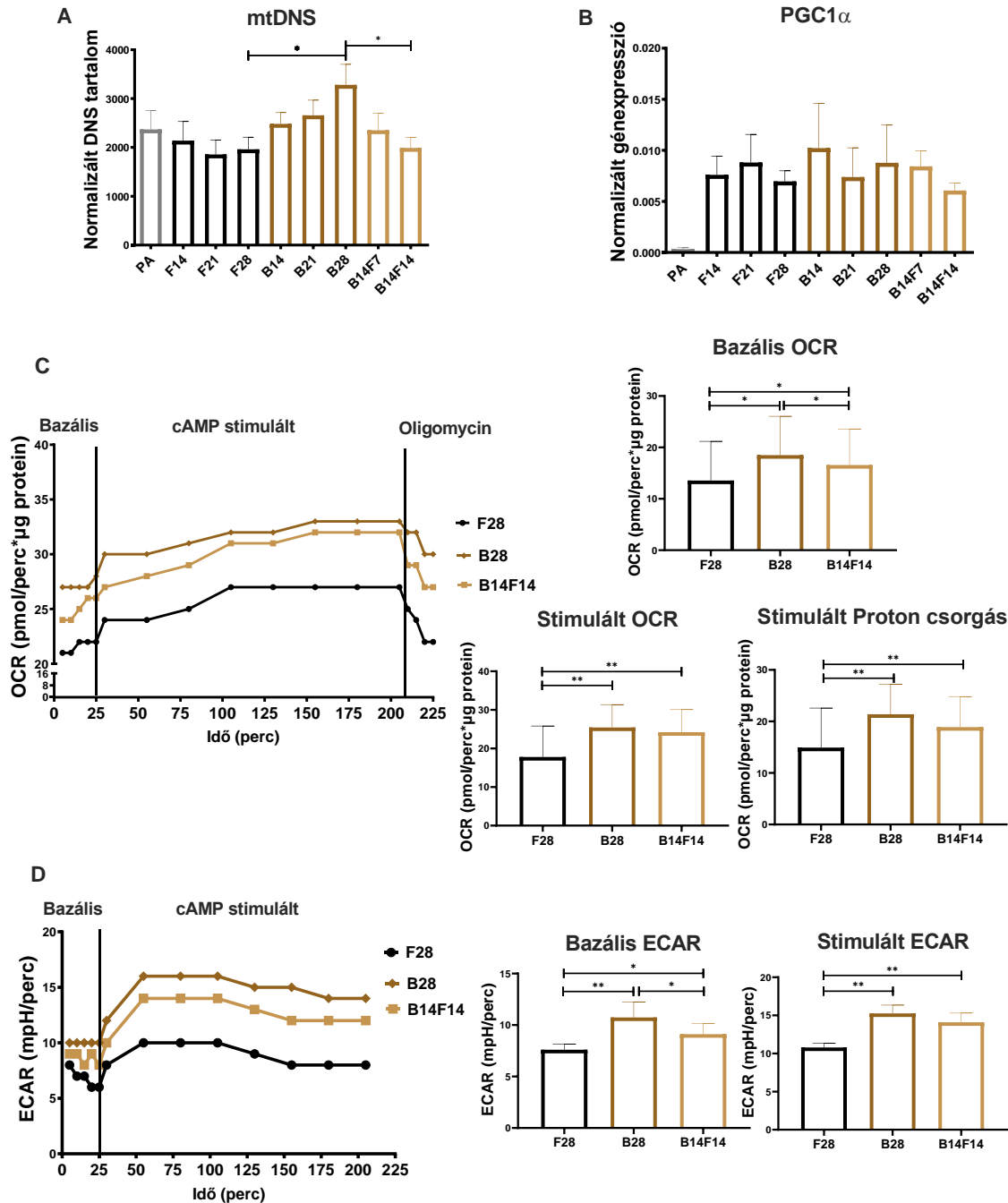


10. ábra: A termogenikus markerek expressziója megemelkedett a hosszú távú rozigitazon kezelést követően, és a bézs (B)-fehér (F) átalakulás hatására csökkent

*A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat 14 napig B-vé differenciáltuk (B14), majd vagy a B médiumot alkalmaztuk további 14 napig (B21 és B28), vagy F-differenciációs tápfolyadékkal (B14F7 és B14F14) helyettesítettük. Negatív kontrollként a F adipocitákat specifikus differenciációs koktélljuk alkalmazásával állítottuk elő (F14, F21 és F28). UCP1 (A) gén, (B) fehérje, (C) CIDEA és (D) LEP géneexpresszió. A qPCR-ral mért géneexpressziót GAPDH-ra, és a western blottal meghatározott fehérjeexpressziót β-aktinra normalizáltuk. Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. n=6. * p<0,05, ** p<0,01. A statisztikát Friedman teszt Dunn többszörös összehasonlító tesztjével (A) vagy egyutas ANOVA Tukey post hoc teszttel (B–D) elemeztük.*

5.1.2. A bézs adipociták megnövekedett mitokondriális tartalma, oxigénfogyasztása és extracelluláris savasodása eltűnik a fehér fenotípusra való átalakulásuk után

Következő lépésként a mitokondriális tartalmat és funkciót vizsgáltuk a differenciálódás és a bézs-fehér átalakulás során. Amint az várható volt, a mtDNS száma magasabb volt a bézs adipocitákban, mint a fehér differenciált zsírsejtekben, és ezt követően csökkent a bézsből fehérbe való átalakulás eredményeként (11A. ábra).



11. ábra: A mitokondriális biogenezis és a termogenezis funkcionális paraméterei fehér (F) és bézs (B) zsírsejtekben, valamint a B-F átalakulásra adott válaszként

A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat a 10. ábra szerint differenciáltattuk. (A) teljes mitokondriális DNS-tartalom ($n=6$) és (B) PGC1 α génexpresszió ($n=6$) mennyiségi meghatározása. (C) Reprezentatív oxigénfogyasztási ráta (OCR) görbe, majd a bazális, stimulált (500 μ M dibutiril-cAMP kezelés) és stimulált protoncsorgásos OCR mennyiségi meghatározása ($n=4$). (D) Reprezentatív extracelluláris savasodási ráta (ECAR) görbe, majd a bazális és stimulált (500 μ M dibutiril-cAMP kezelés) ECAR mennyiségi meghatározása ($n=4$). A génexpressziót GAPDH-ra normalizáltuk. Az adatokat átlag \pm SD formában adjuk meg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc tesztjével a statisztikai analízishez.

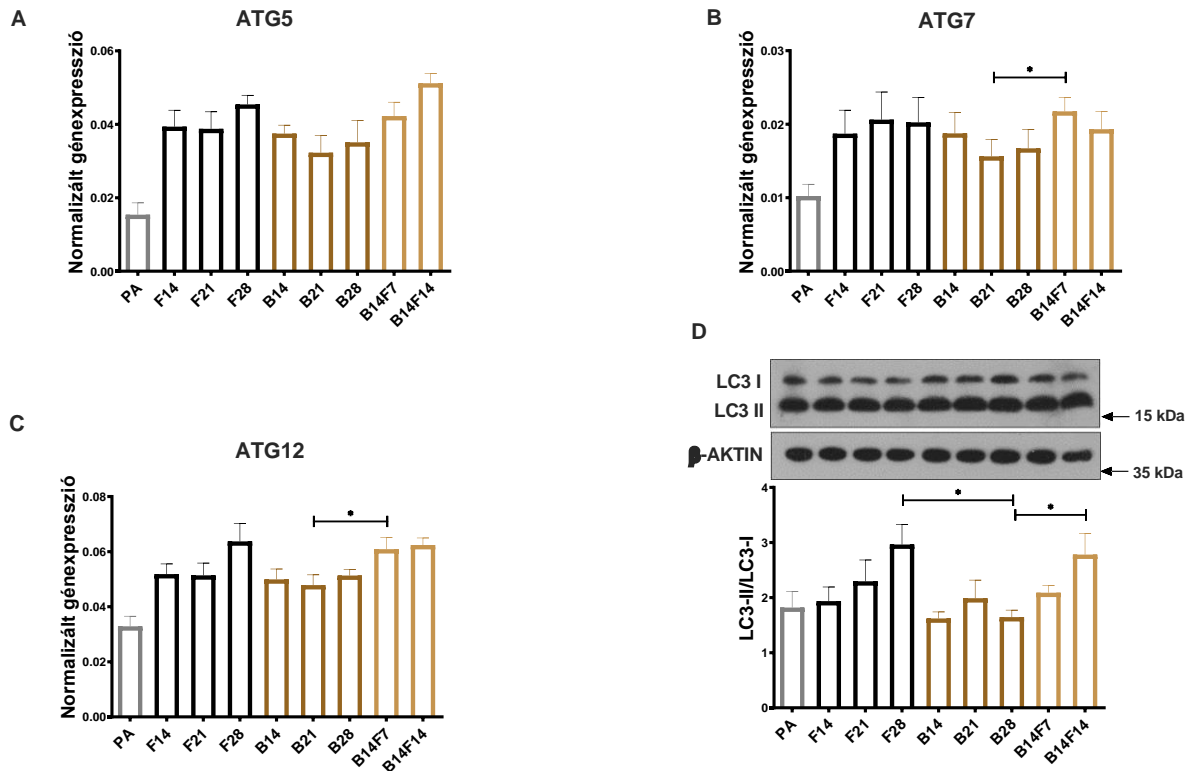
A fehér és bézs differenciálódás a mitokondriális biogenezis fő szabályozójának, a *PGC1 α* azonos expressziós szintjét eredményezte [Puigserver és mtsai., 1999]. A bézs-fehér átalakulás során a *PGC1 α* expresszió csökkenő tendenciát mutatott; ez a hatás azonban nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. A differenciálatlan hASC-k csak a detektálhatóság határán fejezték ki a *PGC1 α* -t (11B. ábra).

Ezt követően extracelluláris fluxus analízist végeztünk a differenciált zsírsejtek funkcionális paramétereinek feltárására [Klusóczki és mtsai., 2019, Dranka és mtsai., 2011, Arianti és mtsai., 2021]. A korábban közölt adatokkal összhangban [Kristóf és mtsai., 2015, Arianti és mtsai., 2021] a bézs adipociták bazális oxigénfogyasztási rátája (OCR) magasabb volt, mint a fehéreké. A kéthetes bézs-fehér átalakuláson átesett zsírsejtek szignifikánsan magasabb bazális OCR-t mutattak, mint a fehér, de alacsonyabbat, mint a bézs adipociták, amelyek ugyanannyi ideig differenciálódtak. Az elvárásoknak megfelelően a sejt-permeábilis cAMP analóg, amely modellezi a termogenezis adrenerg inger által vezérelt aktiválását, azonnal megnövelte az adipociták OCR-értékét. A cAMP-stimulált zsírsejtek protoncsorgása, amely pozitívan korrelál az UCP1 aktivitással, az ATP-szintáz komplex oligomicinnel történő gátlása után volt értékelhető [Dranka és mtsai., 2011, Tews és mtsai., 2019]. A bézs zsírsejtek fokozott stimulált és protoncsorgós OCR-t mutattak a fehérekhez képest. A bézs-fehér átalakulást követően ezek a paraméterek hasonlóak maradtak a bézs zsírsejtekben megfigyeltekhez (11C. ábra). A korábbi eredményekkel összhangban [Klusóczki és mtsai., 2019, Arianti és mtsai., 2021] a bazális extracelluláris savasodási ráta (ECAR) megnövekedett a bézs adipocitákban a fehér zsírsejtekhez képest, míg a bézs-fehér átalakulás következtében szignifikánsan csökkent ez a paraméter. Bár a cAMP stimulálta a zsírsejtek ECAR-ját, a végig bézs irányba differenciált és az átalakult bézs zsírsejtek erősebb választ mutattak a termogén jelzésre, mint a fehérek (11D. ábra). Összefoglalva, adataink arra utalnak, hogy a bézs-fehér átalakuláson áteső zsírsejtek a végig fehér vagy bézs irányba differenciált adipocitákhoz képest eltérő funkcionális tulajdonságokkal rendelkező sejtpopulációként jelennek meg.

5.1.3. Az autofágia fokozódik a bézs-fehér adipocita átalakulás során

Rágcsálókban leírták, hogy a hideg vagy β 3-adrenerg ingerek megvonása aktiválja a mitofágiát és közvetíti a bézs-fehér átalakulást *in vivo* [Altshuler és mtsai., 2016]. Elsőként az autofagoszóma kialakulását irányító *ATG* gének expresszióját vizsgáltuk. A bézs-fehér átalakulás során az *ATG5* a második héten növekvő tendenciát mutatott; ez a különbség azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (12A. ábra). Az *ATG7* (12B. ábra)

és *ATG12* (12C. ábra) mRNS expressziója szignifikánsan megnövekedett az átalakulás első hetében a végig bézs irányba differenciálódott zsírsejtekhez képest. A vizsgált *ATG* gének kisebb mértékben expresszálódtak a differenciálatlan preadipocitákban. Ehhez képest emelkedetten, de meglepő módon ugyanolyan mértékben fejeződtek ki a fehér és bézs zsírsejtekben (12A–C. ábra).



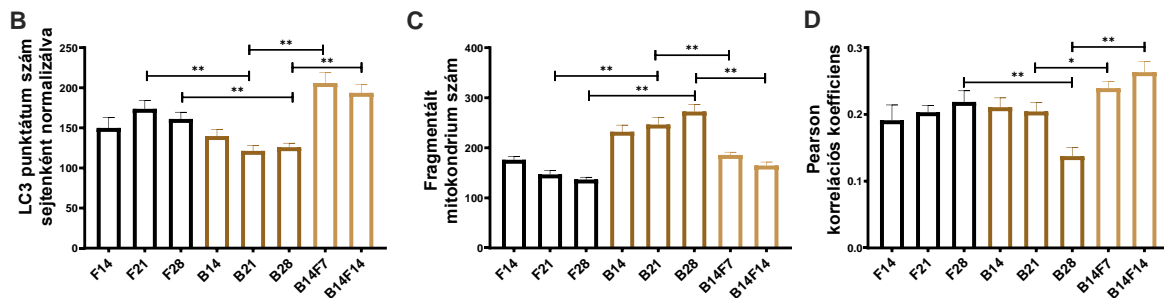
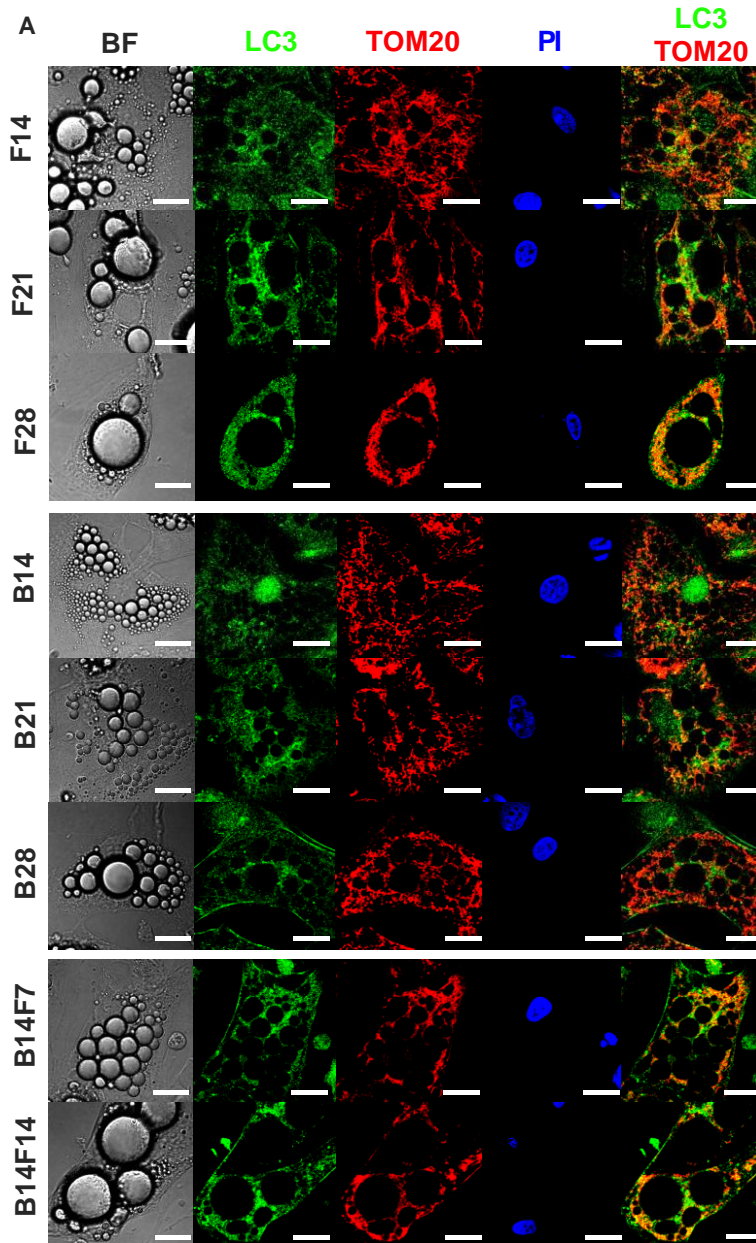
12. ábra: Az általános autofágia markerek kifejeződése csökkenő tendenciát mutatott a hosszú távú rozigitazon kezelést követően, és növekedett a bézs (B)-fehér (F) átalakulás során

A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat az 10. és 11. ábra szerint differenciáltattuk. (A–C) Az *ATG5*, *ATG7* és *ATG12* génexpresszió mennyiségi meghatározása; (D) az *LC3-II/LC3-I* fehérjearány reprezentatív immunoblot és denzitometriás elemzése. A génexpressziókat *GAPDH*-ra, a fehérjeexpressziót β -aktinra normalizáltuk. Az adatokat átlag \pm SD formában jelenítettük meg. $n=6$. * $p < 0,05$. Egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc teszttel a statisztikai analízishez.

A folyamatban lévő autofágia mérésére megvizsgáltuk a specifikus autofágia markert, az *LC3-I* átalakulását *LC3-II*-vé olyan zsírsejtekben, amelyek végig fehér vagy bézs irányba differenciálódtak, illetve átalakultak. Ennek a folyamatnak a western blottal történő kvantifikálása széles körben elfogadott módszer az autofágia aktivitásának monitorozására [Mizushima és mtsai., 2010]. 28 napig differenciáltatott fehér zsírsejtekben az *LC3-II/LC3-I* arány folyamatos emelkedését tapasztaltuk, ami magas autofágia aktivitást jelez. A bézs

adipocitákban az aktivitás mérsékelt szinten maradt, szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a fehér adipocitákban, négy hét differenciálódás után. Amikor a bézs protokollt fehérre cseréltük, az autofágia aktivitása két hét után szignifikánsan megnőtt a végig bézs irányba differenciálódott zsírsejtekhez képest (12D. ábra). Ezt megerősítettük, amikor a mitokondriális morfológia és a mitofágia aktivitás vizsgálatához együttes immunfestést végeztünk a TOM20 transzlokázára [Szatmári-Tóth és mtsai.,2020; Dolman és mtsai., 2013], valamint az LC3-ra (13A. ábra). Az elvárásnak megfelelően, a fehér zsírsejtek, amelyek három vagy négy héten át differenciálódtak, sejtenként több LC3-punktátumot tartalmaztak, mint a bézs adipociták. Ezenkívül a bézs-fehér átalakulás jelentősen megnövelte az LC3 pontok számát a bézs zsírsejtekhez képest (13B. ábra). Adataink azt mutatták, hogy az általános autofágia sejt-autonóm módon indukálódott a humán SC zsírsejtek *ex vivo* bézs-fehér átalakulása során.

A fentebb leírtak mellett azt találtuk, hogy az irodalommal összhangban a termogenikus potenciált tükröző fragmentált mitokondriumok száma [Pisani és mtsai., 2018] magasabb volt a bézs, mint a fehér differenciálódás során. A fragmentált mitokondriumok száma azonban a fehér zsírsejtekével megegyezőre csökkent egy héten belül, amikor a bézs kezelést abbahagytuk, majd a fehéret alkalmaztuk (13C. ábra). A zsírsejtek UCP1-tartalmának és morfológiai jellemzőinek változásai arra utalnak, hogy a PPAR γ agonista hatására erőteljesen, akár négy hétig növelik termogenikus képességüket; azonban a barnulást indukáló szer eltávolítására válaszul bézsből fehérbe alakulnak át. Az autofagoszómák képződésének és a mitokondrium a lebontás helyére történő bejutásának nyomon követésére a fent részletezett immunfestést használtunk [Dolman és mtsai., 2013], mely során számszerűsítettük az autofagoszóma és a mitokondriális marker kolokalizációját a PCC értékekkel. Összhangban a megnövekedett autofágia aktivitással (12. ábra), emelkedett PCC értékeket találtunk a fehér adipogenezis során négy héten át a bézs zsírsejtekhez képest. A kolokalizáció erősebb volt az átalakuláson átesett zsírsejtekben, mint a végig bézs irányba differenciált adipocitákban (13D. ábra).



13. ábra: A mitofágia a hosszú távú rozigitazon kezelés hatására gátlódott, és a bézs (B)-fehér (F) átalakulás során aktiválódott

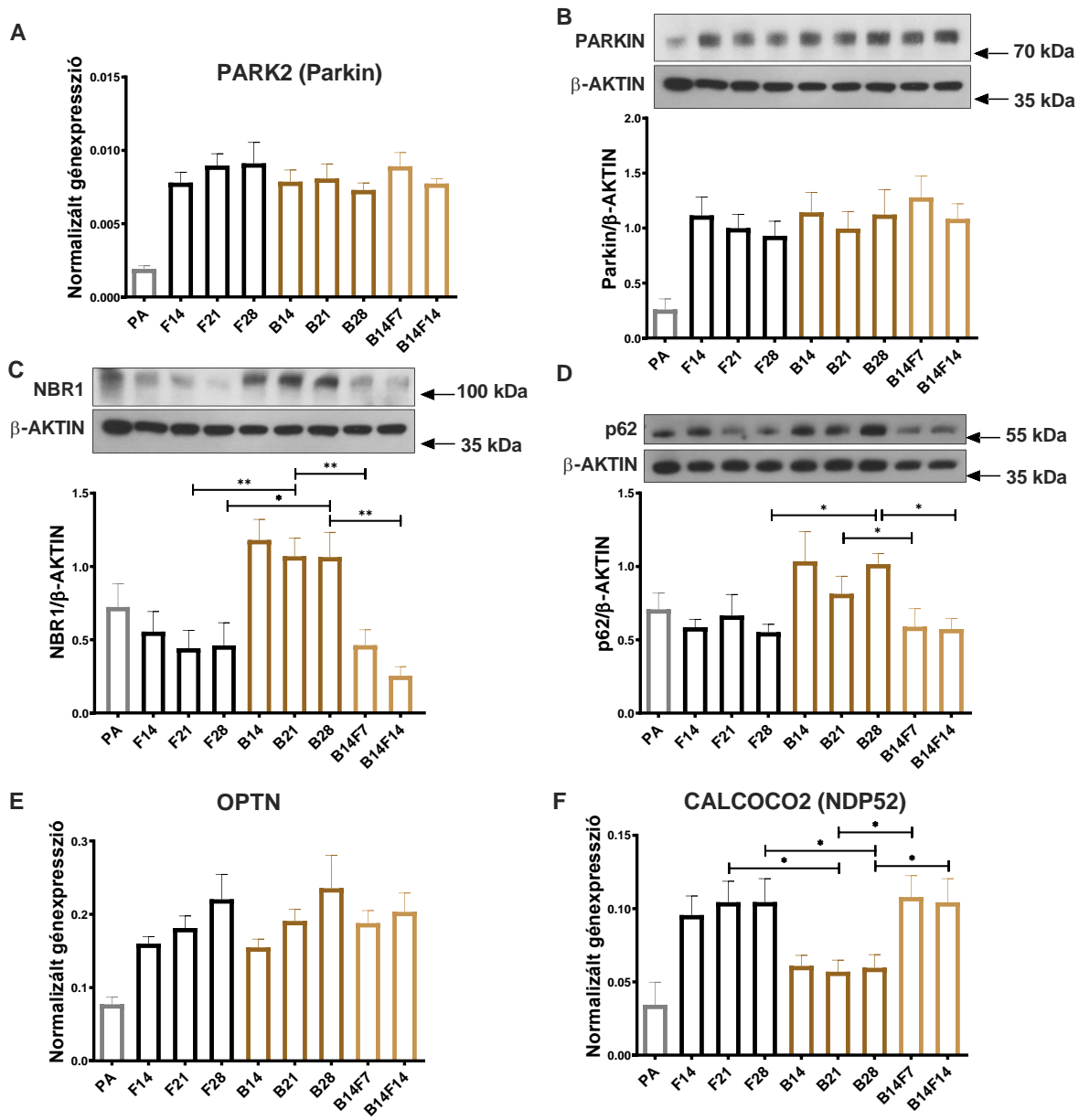
A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat az 10., 11. és 12. ábra szerint differenciáltattuk. (A) Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek az LC3 és TOM20 immunfestésről; a magokat propidium-jodiddal (PI) jelöltük, a BF transzmissziós képet jelent;

a skálák 10 μm -t jelölnek. (B) A sejtek számára normalizált LC3 ponttáum mennyiségi meghatározása ($n=50$ sejt három donorból). (C) A fragmentált mitokondriális tartalom mennyiség a TOM20 immunfestés alapján sejtenként normalizálva ($n=50$ sejt három donorból). (D) A mitofágia aktivitás mennyiségi meghatározása az LC3 és a TOM20 immunfestés kolokalizációja alapján ($n=50$ sejt három donorból). Az adatokat átlag \pm SD formában adjuk meg. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. A statisztikai elemzéshez (B, D) egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc teszttel, valamint (C) Friedman tesztet Dunn többszörös összehasonlító teszttel.

5.1.4. A bézs differenciáció gátolja, míg a bézs-fehér átalakulás fokozza a szelektív autofágia-adapterek által vezérelt mitofágiát

A parkin, a *PARK2* gén által kódolt E3 ubiquitin ligáz a mitofágia egyik kulcsfontosságú szabályozója [Morales és mtsai., 2020]. A parkin kis mértékben expresszálódott a preadipocitákban mind mRNS (14A. ábra), mind fehérjeszinten (14B. ábra). Az alkalmazott adipogén protokollok hasonlóan fokozták a parkin expresszióját. A fehér-bézs átalakulás nem változtatta meg a parkin expresszióját sem gén (14A. ábra), sem fehérjeszinten (14B. ábra). Ezt követően megvizsgáltuk a lebomló szelektív autofágia-adapter fehérjék mennyiségét, amelyek molekuláris kapcsolatot építenek ki a célsejtszervecskék és az autofagoszómák LC3-II-je között az aktív mitofágia során [Turco és mtsai., 2021].

A fehér zsírsejtek NBR1 fehérjetartalma hasonló volt, mint a differenciálatlan progenitoroké, és 28 napos differenciálódást követően csökkenő tendenciát mutatott (14C. ábra). A p62 fehérje állandó, mérsékelt szinten volt kimutatható a preadipocitákban és a fehér zsírsejtekben (13D. ábra). A bézs zsírsejtekben a fent említett adapterek közül lényegesen több volt kimutatható. Ez az adat alátámasztja a szelektív autofágia alacsony aktivitását a bézs adipocitákban. A differenciációs tápfolyadékból a barnulást indukáló rozigitazon eltávolítása után egy, illetve két héttel az NBR1 (14C. ábra) és a p62 (14D. ábra) mennyisége szignifikánsan csökkent. Adataink arra utalnak, hogy a mitokondriumok szelektív autofágián keresztül történő degradációja fokozódik a bézs-fehér átalakulás során.

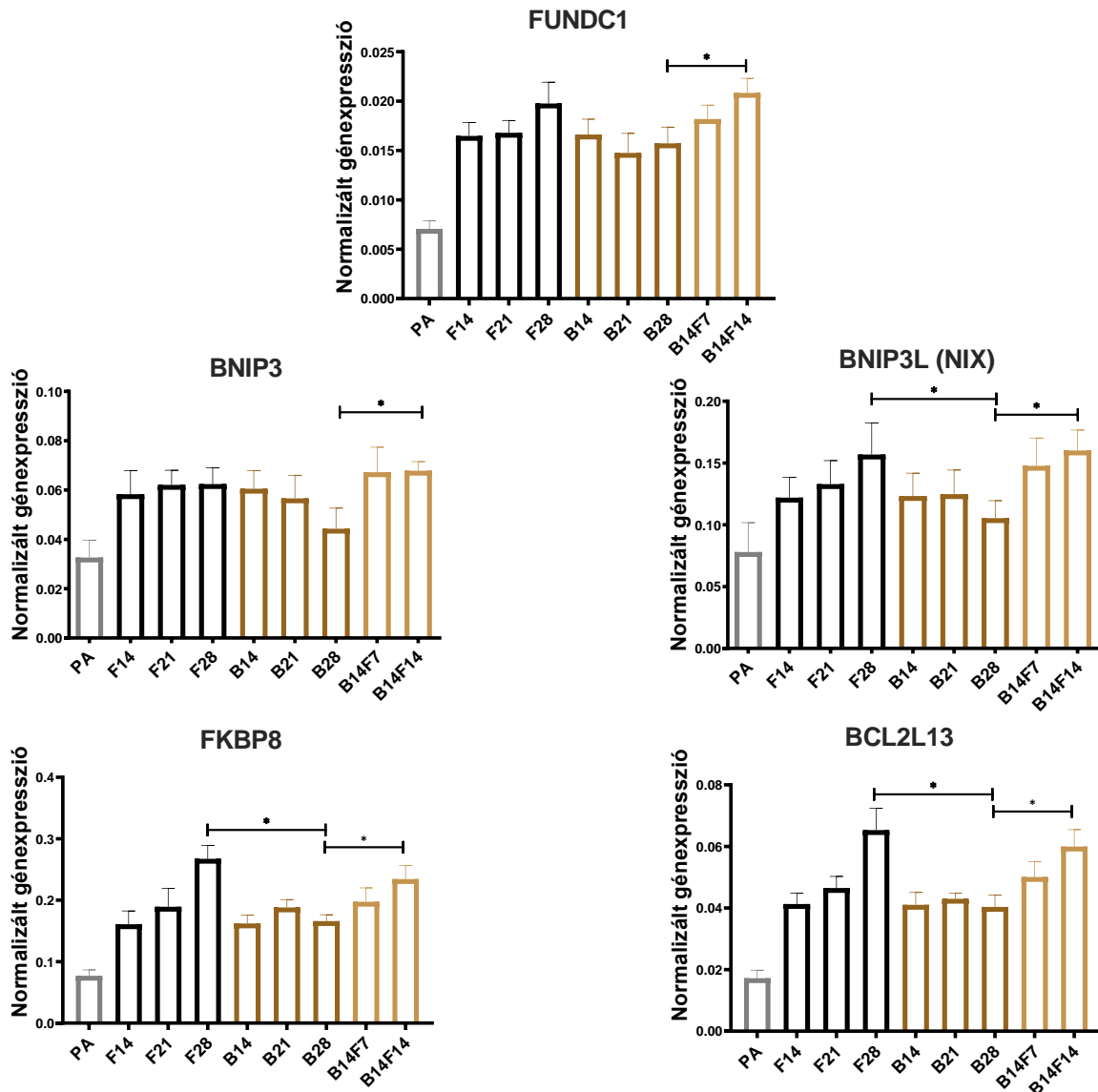


14. ábra: A parkin-függő mitofágia markerek expressziója fehér (F) és bézs (B) zsírsejtekben, valamint a B-F átalakulás során

A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat az 10., 11., 12. és 13. ábra szerint differenciáltattuk. A parkin (A) gén és (B) fehérje expressziójának mennyiségi meghatározása. A (C) NBR1 és (D) p62 fehérje expressziója. Az (E) OPTN és (F) NDP52 génexpressziója. A génexpressziót GAPDH-ra, a fehérjeexpressziót β-aktinra normalizáltuk. Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. $n=6$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. A statisztikai analíziseket Friedman teszt Dunn többszörös összehasonlító tesztjével (A,B,D) vagy egyutas ANOVA Tukey post hoc tesztjével (C,E,F) végeztük.

Ezt követően mértük az autofágia adapterhez és a parkin-függő mitofágia útvonalhoz kapcsolódó egyéb markergének, az OPTN (14E. ábra) és a CALCOCO2/NDP52 (14F. ábra) expresszióját. Mindkét gén alacsony szinten expresszálódott a preadipocitákban. Az OPTN

ugyanolyan mértékben expresszáldott a fehér és a bézs zsírsejtekben, és időfüggő felszabályozódást mutatott, de a bézs-fehér átalakulás nem befolyásolta az mRNS-szintet (14E. ábra). A *CALCOCO2/NDP52* expressziója megnövekedett a fehér adipogenezis és az átalakulás során a végig bézs irányba differenciált adipocitákhoz képest (14F. ábra); ez a mitokondrium tartalom fokozott eltávolításának lehetőségét sugallja az NDP52-függő útvonalon.



15. ábra: A parkin-független mitofágia markerek expressziója fehér (F) és bézs (B) zsírsejtekben, és válasz az átalakulásra

A humán primer abdominális szubkután preadipocitákat az 10., 11., 12., 13. és 14. ábra szerint differenciáltattuk. A *FUNDC1*, *BNIP3*, *BNIP3L*, *FKBP8* és *BCL2L13* géneexpressziójának mennyiségi meghatározása. A géneexpressziókat *GAPDH*-ra normalizáltuk. Az adatokat átlag \pm SD formában adjuk meg. $n=6$. * $p < 0,05$. Egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc tesztjével a statisztikai analízishez.

5.1.5. A parkin-független mitofágiával kapcsolt gének indukálódnak a bézs-fehér átalakulás során

Végül annak tanulmányozására, hogy a parkin-független mitofágia hozzájárul-e a bézs-fehér átalakuláshoz, számos olyan gén expresszióját vizsgáltuk, amelyek részt vesznek ezen útvonalban: *FUNDC1*, *BNIP3*, *BNIP3L/NIX*, FKBP Prolil Izomeráz 8 (*FKBP8*) és *BCL2L13* (15. ábra). A fent említett markerek kismértékben expresszálódtak a differenciálatlan progenitorokban. A *BNIP3L/NIX*, *FKBP8* és *BCL2L13* expressziója a fehér adipogenezis során időfüggő módon növekedett. Hasonló *FUNDC1* és *BNIP3* expressziós szinteket tapasztaltunk a fehér és bézs differenciálódás során. Négy hét differenciálódás után a *BNIP3L/NIX*, *FKBP8* és *BCL2L13* expressziója a fehér zsírsejtekhez képest bézs adipocitákban represszált volt. Két héttel a bézs protokoll fehérre cserélése után a vizsgált parkin-független mitofága markerek szignifikánsan felszabályozódtak (15. ábra). Ez arra utalhat, hogy a parkin-független útvonal fontos szerepet játszhat a humán SC zsírsejtek bézs-fehér átalakulásában.

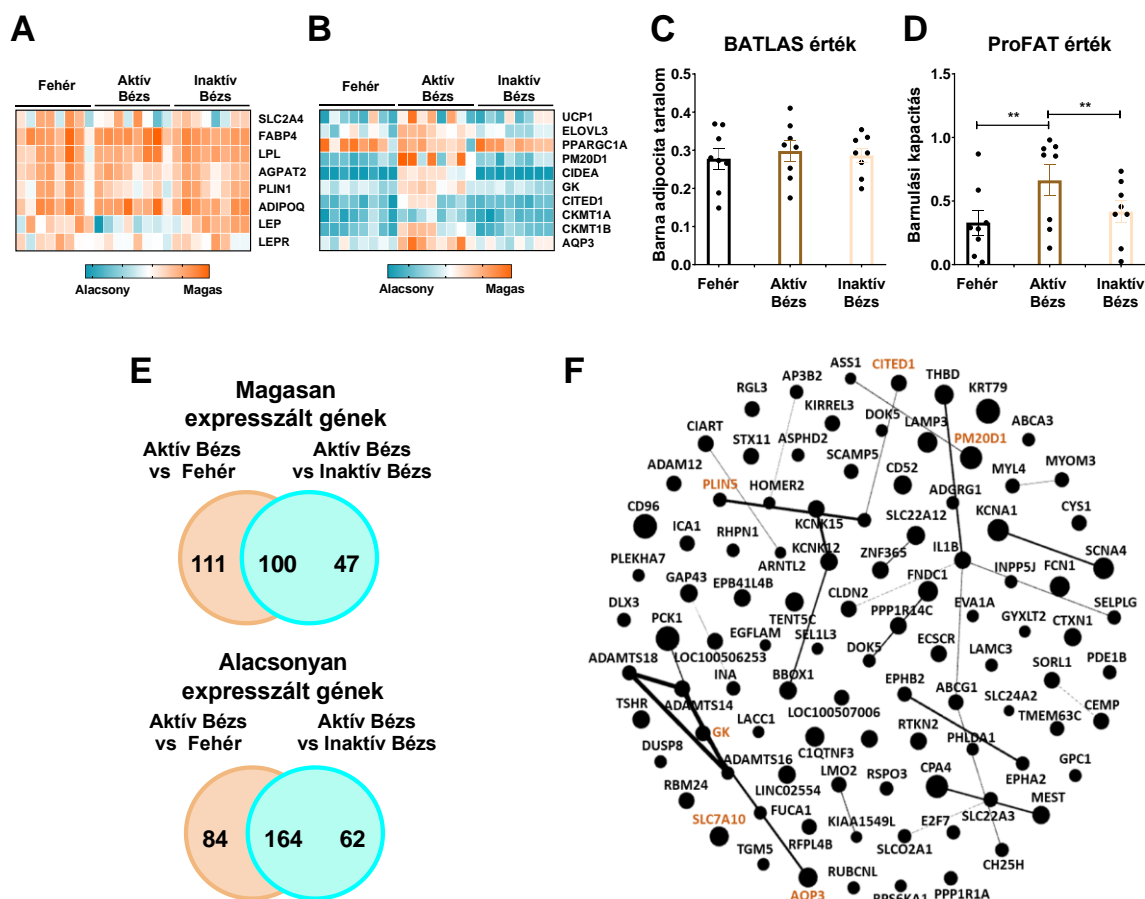
5.2. Az *FTO* rs1421085 elhízás rizikó alléleket hordozó humán abdominális szubkután aktív bézs zsírsejtek alacsonyabb termogenikus kapacitást mutatnak

Az *FTO* rs1421085 SNP adipocita differenciációra és termogenikus funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálatára tovább optimalizáltuk a mitofágia kísérleteinkhez használt bézs differenciációs protokollt, melyet kiegészítettünk a differenciáció 14. napján egy 4 órás 500 μ M dibutiril-cAMP kezeléssel. E módosítással kívántuk fokozni a bézs adipociták termogenikus kapacitását. Az ilyen módon differenciált adipocitákat ezt követően aktív bézs zsírsejteknek nevezzük a dolgozatban.

5.2.1. Az abdominális SC zsírból származó aktív bézs adipociták nagy barnulási kapacitást mutatnak

Vizsgálataink során elsőként a három különböző módon differenciált SC adipocita - a fehér, az aktív és az inaktív bézs - globális génexpressziós mintázatának összehasonlítását tűztük ki célul RNS-seq analízissel. Azt találtuk, hogy az általános adipocita-markerek - mint például az *SLC2A4*, *FABP4*, *LPL*, *ADIPOQ*, *AGPAT2*, *PLIN1*, *LEP* és *LEPR* - azonos mértékben fejeződtek ki a három különböző zsírsejt típusban (16A. ábra), ami arra utal, hogy a differenciálódási arányuk hasonló volt. A termogenikus markerek, mint például az *UCPI1*, *ELOVL3*, *PGC1a*, *CIDEA*, *CITED1*, *AQP3*, *GK*, *CKMT1a/b* és *PM20D1* magasabb expressziót mutattak aktív bézs adipocitákban, mint a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtekben (16B. ábra). Ezután a jól definiált markergének expressziós szintjei alapján a globális transzkriptomikai

adatainkat nyílt hozzáférésű web-eszközökkel analizáltuk; a BATLAS algoritmus és génlista segítségével számszerűsítettük a barna adipocita tartalmat [Perdikari és mtsai., 2018], a ProFAT alkalmazásával pedig a barnulási kapacitást [Cheng és mtsai., 2018]. Nem találtunk szignifikáns különbséget a barna zsírsejt tartalomban (16C. ábra), azonban az aktív bézs zsírsejtek magasabb barnulási kapacitást mutattak, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták (16D. ábra). RNS-seq adataink alapján 211 és 147 gén expressziója magasabb volt az aktív bézs vs. fehér, illetve az aktív bézs vs. inaktív bézs összehasonlításban; a felregulált gének közül 100 gén mindkét összehasonlításban megtalálható volt (16E. ábra, felső diagram), melyek között termogenikus markereket - mint például a *GK*, *PM20D1*, *PLIN5*, *CITED1* és *AQP3* - találtunk (16F. ábra). Érdekes módon az ASC-1-et kódoló *SLC7A10*, amelyet a termogenikus aktiválás során fontos transzporterként írtak le [Arianti és mtsai., 2021; Jersin és mtsai., 2021], mindkét összehasonlításban megtalálható volt a felregulált gének között (16F. ábra). 248 valamint 226 gén expressziója alacsonyabb volt az aktív bézs vs. fehér, illetve az aktív bézs vs. inaktív bézs összehasonlításban, ezek közül 164 gén mindkét összehasonlításban kisebb mértékű expressziót mutatott (16E. ábra, alsó diagram). A fehér és az inaktív bézs zsírsejtek génexpressziós profiljának összehasonlításakor nem találtunk DEG-eket.

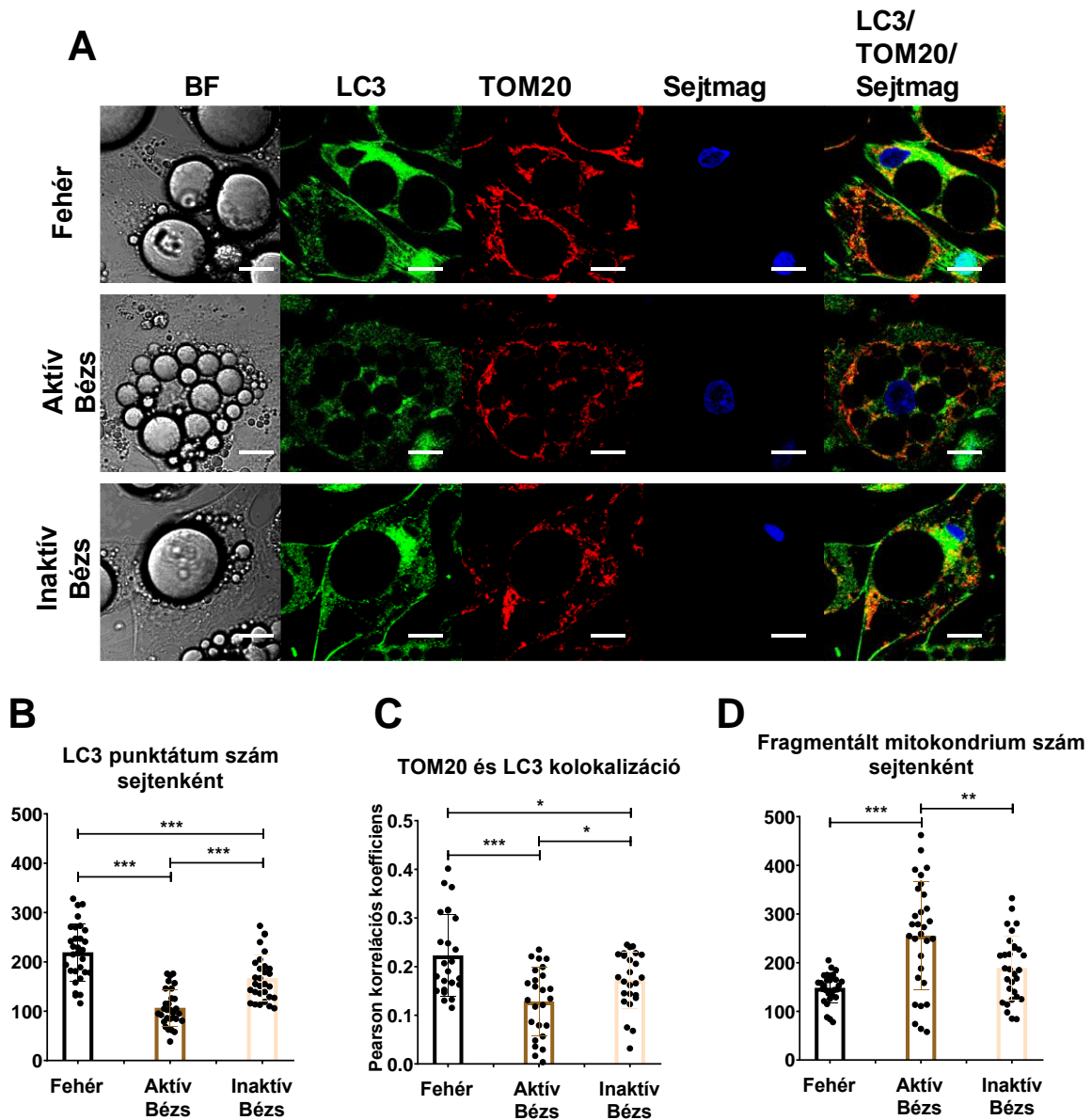


16. ábra: A humán abdominális szubkután adipociták eltérően expresszált génjei és termogenikus kapacitásuk

(A) Az adipociták általános markereinek expresszióját megjelenítő hőterkép. (B) Barna/bézs adipocita markerek expresszióját megjelenítő hőterkép. (C) Barna adipocita tartalom mennyiségi meghatározása BATLAS nyílt hozzáférésű web-eszközzel, $n=8$. (D) Barnulási kapacitás mennyiségi meghatározása ProFAT nyílt hozzáférésű web-eszközzel, $n=8$. (E) Venn diagram, mely a magasabban (felső panel) és az alacsonyabban (alsó panel) expresszált géneket ábrázolja aktív bézs vs. fehér, valamint aktív bézs vs. inaktív bézs adipocita összehasonlításban. (F) Az aktív bézs vs. fehér, valamint az aktív bézs vs. inaktív bézs közötti átfedő, eltérően expresszált gének a Gephi által generált interaktóm térképen. A csomópontok mérete korrelál a génexpresszió fold change értékével. A barnával jelölt gének ismert termogenikus markerek. Egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc tesztjével a statisztikai analízishez. $**p<0,01$.

Elemeztük a mitofágia sebességét és a mitokondriális morfológiát ebben a kísérleti elrendezésben is, az LC3 és a TOM20 együttes immunfestésével [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020] (17A. ábra). Alacsonyabb sejtenkénti LC3 ponttárum-számot (17B. ábra) és PCC-értékeket figyeltünk meg az aktív bézs, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipocitákban (17C. ábra). Azt is megállapítottuk, hogy az aktív bézs zsírszövetekben nagyobb mennyiségű fragmentált mitokondrium - amelyekről bizonyított, hogy elősegítik a szétkapcsolt légzést és a fokozott energiafelhasználást [Pisani és mtsai., 2018] - volt megtalálható, mint a fehér vagy az inaktív

bézs adipocitákban (17D. ábra). Összességében ezek az adatok azt sugallják, hogy a termogenezishez kapcsolódó gének felszabályozódtak, a mitofágia aktivitása csökkent, és a mitokondriumok fragmentáltabbak voltak, amikor a humán abdominális SC adipocitákat termogenezisre aktiváltuk. A modellünk így alkalmazható a három adipocita állapot összehasonlítására.

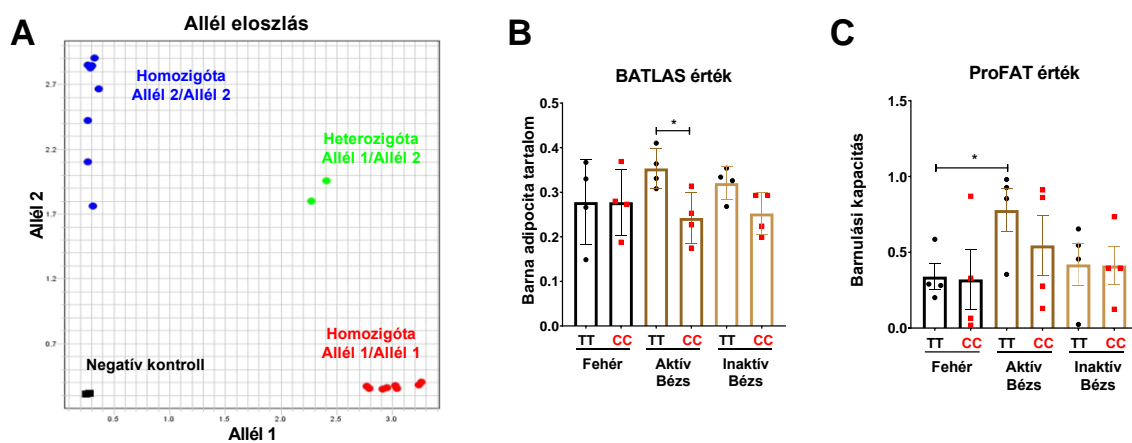


17. ábra: A humán abdominális szubkután adipociták mitokondriális morfológiájának és mitofágiájának vizsgálata

(A) A fehér, aktív bézs és inaktív bézs adipociták LC3 és TOM20 immunfestésének reprezentatív konfokális mikroszkópos képei. BF: transzmissziós kép, a skálák $10\ \mu\text{m}$ -t jelölnek. (B) Az LC3 ponttátum mennyiségi meghatározása, $n=30$ sejt három donorból. (C) A TOM20 és az LC3 kolokalizációja, $n=25$ sejt három donorból. (D) A fragmentált mitokondriumok sejtenkénti számának meghatározása, $n=30$ sejt három donorból. Egyutas ANOVA-t használtunk Tukey post hoc tesztjével a statisztikai analízishez. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ és *** $p<0,001$.

5.2.2. Az *FTO* rs1421085 elhízás rizikó alléleket hordozó aktív bézs adipociták alacsonyabb barna zsírsejt tartalommal rendelkeznek, és kisebb mértékben expresszálják a metabolikus útvonalakban résztvevő géneket

Ezt követően arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az *FTO* rs1421085 SNP befolyásolja-e a humán abdominális SC zsírsejtek - amelyeket fehér, aktív és inaktív bézs adipocitákká differenciáltunk - barnulási képességét. Ezért az izolált hASC-ket genotipizáltuk az *FTO* rs1421085 SNP-re, melynek révén a 18A. ábrán látható allél diszkriminációs diagramot kaptunk. Ezután 4 homozigóta TT (rizikó-mentes) és 4 homozigóta CC (elhízás rizikó) genotípusú egyénből választottuk ki a mintákat további elemzésre.



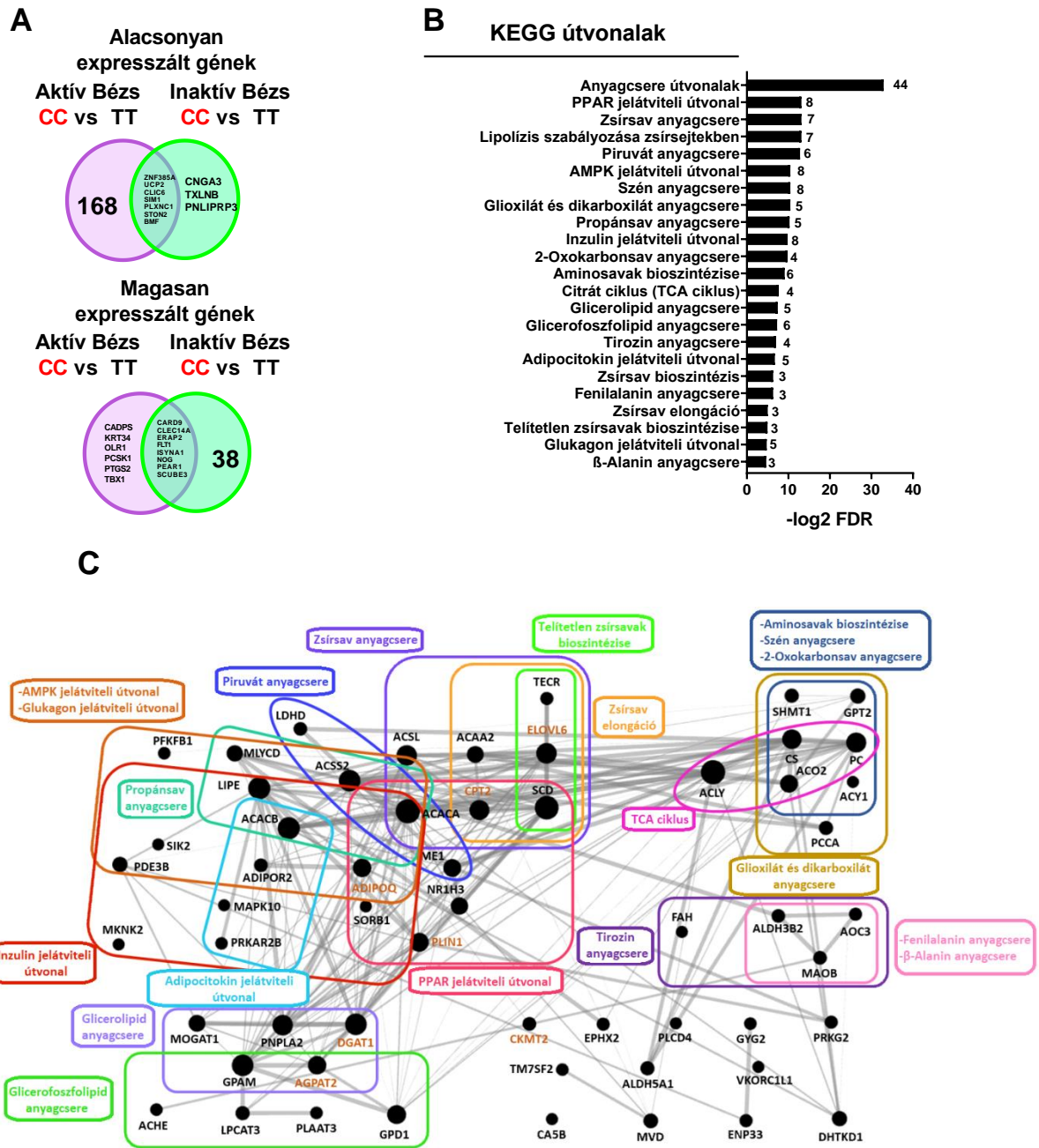
18. ábra: Az *FTO* rs1421085 SNP hatása a differenciált abdominális SC adipociták termogenikus kapacitására

(A) Az *FTO* rs1421085 SNP alléloszlása. Kék: SC progenitorok TT allélokkal, piros: SC progenitorok CC allélekkel, zöld: heterozigóta SGBS adipociták, fekete: templát nélküli negatív kontroll. (B) Barna adipocita tartalom mennyiségi meghatározása BATLAS-al, $n=4$ genotípusonként. (C) A barnulási kapacitás ProFAT-el számszerűsítve, $n=4$ genotípusonként, $*p<0,05$, statisztikai elemzés egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével.

Megállapítottuk, hogy az elhízás rizikó *FTO* allélokot hordozó aktív bézs adipociták alacsonyabb BATLAS-szerint számszerűsített barna zsírsejt tartalmat [Perdikari és mtsai., 2018] mutattak, ugyanakkor a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtekben az allélek eloszlásnak nem volt hatása a BATLAS értékekre (18B. ábra). Azt is megfigyeltük, hogy a rizikó-mentes genotípust hordozó aktív bézs zsírsejtek tendenciózusan nagyobb barna zsírsejt tartalommal és szignifikánsan magasabb barnulási kapacitással [Cheng és mtsai., 2018] rendelkeztek, mint az azonos TT genotípust hordozó fehér adipociták (18B, C. ábra). Érdekes módon az *FTO* elhízás rizikó genotípust hordozó aktív bézs adipociták hasonló barna zsírsejt tartalmat és barnulási

kapacitást mutattak a fehér zsírsejtekhez képest (18B, C. ábra), ami arra utal, hogy az aktív bézs differenciálódás nem tudta felülmúlni a CC allélok erős barnulást gátló hatását.

Összesen 175 gén - köztük termogenikus markerek (*UCP2*, *CKMT2* és *CITED1*) és 5 BATLAS marker (*PPARGC1B*, *ACO2*, *ACSF2*, *NNAT* és *DMRT2*) - expresszáldott kisebb mértékben az *FTO* elhízás rizikó variánst hordozó aktív bézs zsírsejtekben a rizikó-mentes hordozókhöz viszonyítva (19A. ábra, felső panel). Csak 10 gén (ebből 7 közös volt mindkét összehasonlításban) expresszáldott kisebb mértékben CC-t hordozó inaktív bézs zsírsejtekben a TT alléleket hordozókhöz képest (19A. ábra, felső diagram). Mindössze 14 és 46 gént találtunk (ebből 8 közös volt mindkét összehasonlításban), amelyek nagyobb mértékben expresszáldtak aktív vagy inaktív bézs zsírsejtekben, amelyek az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozzák a rizikó-mentes változathoz képest (19A. ábra, alsó diagram). A fehér zsírsejtekben nem találtunk olyan DEG-eket, amelyek expresszióját az *FTO* rs1421085 SNP szignifikáns mértékben befolyásolta volna. Ezután megvizsgáltuk az *FTO* rs1421085 SNP által érintett génexpressziós útvonalakat. Azt találtuk, hogy az elhízás rizikó genotípust hordozó aktív bézs zsírsejtekben kevésbé expresszáldó gének több útvonalban - például metabolikus, PPAR jelátvitel, lipolízis, zsírsav-anyagcsere és TCA-ciklus - reprezentálódtak felül (19B, C. ábra). A CC allélokkal rendelkező aktív bézs adipocitákban nagyobb mértékben kifejeződő gének nem reprezentálódtak felül szignifikánsan egyik útvonalban sem. Nem találtunk felülreprezentált útvonalat az inaktív bézs adipocitákban megfigyelt DEG-ek tekintetében sem. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *FTO* rs1421085 SNP csak az aktív bézs adipociták génexpressziós profilját befolyásolja - különösen a termogenezishez kapcsolódó génekét - azonban a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtek génexpressziójára nincs szignifikáns hatással. Ezen túlmenően, az alkalmazott differenciációs protokollok kifejezettebb különbségeket eredményeztek a rizikó-mentes *FTO* allélokkal rendelkező adipociták génexpressziós mintázatában, ami arra utal, hogy ezeknek a sejteknek jelentős barnulási potenciáljuk van, amikor a termogenikus jelek folyamatosan jelen vannak.

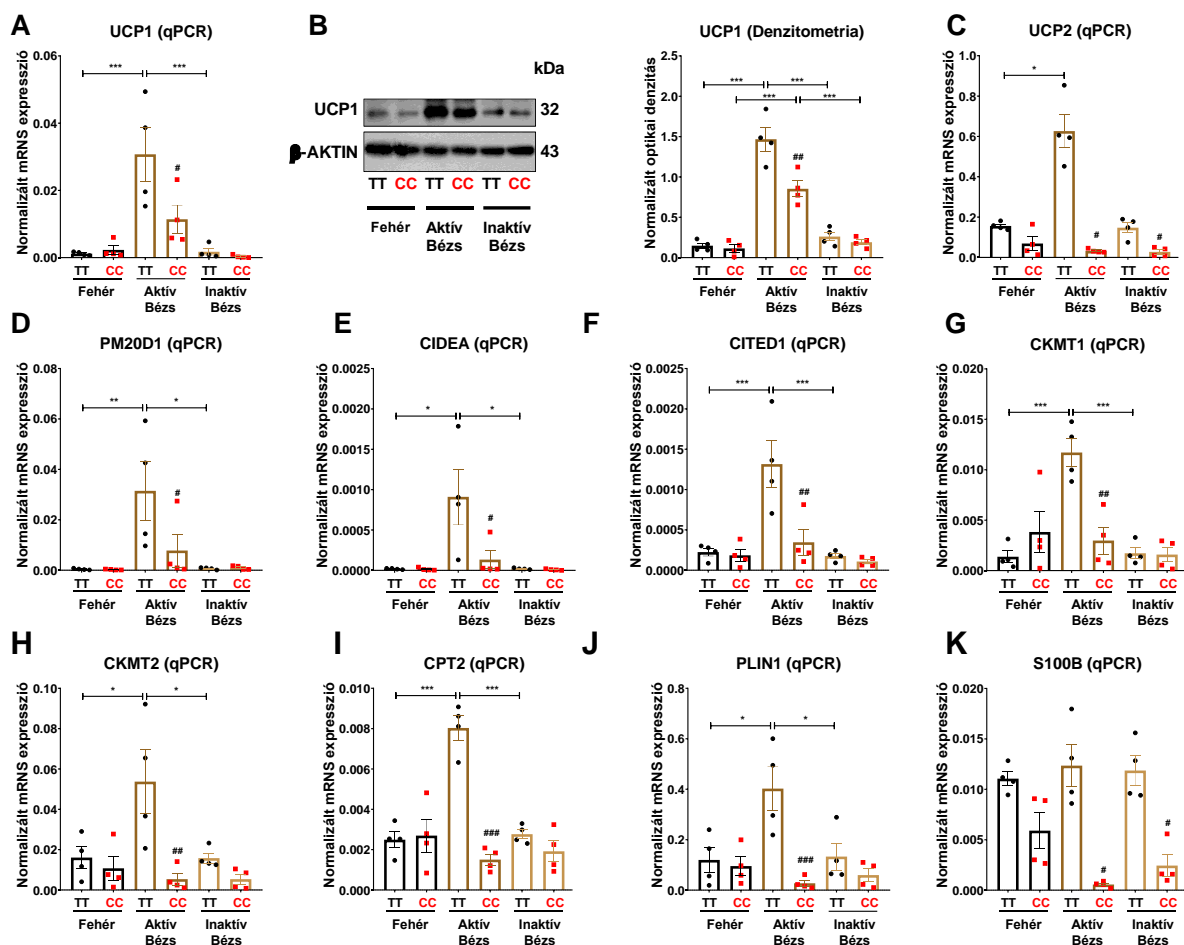


19. ábra: Az *FTO* rs1421085 SNP hatása a differenciált abdominális SC adipociták génexpressziós mintázatára

(A) Venn-diagram, amely az alacsonyabban (felső panel) és magasabban (alsó panel) expresszált gének számát mutatja az *FTO* rs1421085 CC vs. TT összehasonlításban mind az aktív, mind az inaktív bézs irányba differenciált adipocitákban. (B) Felülreprezentált génexpressziós útvonalak, amelyek kevésbé expresszálódnak az *FTO* CC/elhízás rizikó variánst hordozó aktív bézs zsírsejtekben, összehasonlítva a TT/rizikó-mentes variánst hordozókkal. A jobb oldalon lévő számok az útvonalakban részt vevő gének számát jelzik. (C) A kevésbé expresszált útvonalakban részt vevő gének a Gephi által generált interaktóm térképen. A csomópontok mérete korrelál a génexpresszió fold change értékével. A barnával jelölt gének ismert termogenikus markerek.

5.2.3. A termogenikus markergének kevésbé expresszálódnak elhízás rizikó *FTO* alléleket hordozó aktív bézs adipocitákban

Mivel megfigyeltük, hogy az *FTO* rs1421085 SNP allél eloszlása befolyásolja a termogenikus és BATLAS markerek kifejeződését, tovább folytattuk a termogenikus gének mRNS és fehérje szintű expressziójának vizsgálatát abdominális SC adipocitákban. Eredményeink azt mutatták, hogy az *UCP1* mRNS expressziója magasabb volt az aktív bézs adipocitákban, mint a fehér vagy inaktív bézs adipocitákban, melyek a rizikó-mentes *FTO* allélt hordozták, azonban ez a különbség nem volt megfigyelhető az elhízás rizikó allélt hordozó sejtekben (20A. ábra). Fehérje szinten azt tapasztaltuk, hogy az aktív bézs adipociták több *UCP1*-et expresszáltak, mint a fehér vagy inaktív bézs adipociták, függetlenül az *FTO* rs1421085 genotípustól, azonban az elhízás rizikó allélt hordozó minták esetében kevesebb *UCP1* fehérje mennyiséget detektáltunk, mint a rizikó-mentes allélhordozó aktív bézs adipocitákban (20B. ábra). Más termogenikus gének, mint például az *UCP2*, *PM20D1*, *CIDEA*, *CITED1*, *CKMT1* és *2*, *CPT2* és *PLIN1*, szintén nagyobb mértékben expresszálódtak a rizikó-mentes allélt hordozó aktív bézs adipocitákban, mint az azonos TT-változatot hordozó fehér vagy inaktív bézs adipocitákban. Az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozó mintákban nem figyeltük meg ezeket a különbségeket (20D–J. ábra). A rizikó-mentes hordozókhöz képest az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták kevésbé expresszálták ezeket a termogenikus géneket, valamint az S100b neurotróf faktort, amelyről feltételezték, hogy serkenti a szimpatikus axonok növekedését és fontos szerepet játszik a BAT beidegzésben [Zeng és mtsai., 2019] (20A–K. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak RNS-seq adatainkkal, amelyek az *FTO* rs1421085 SNP kritikus fontosságára, valamint az aktív bézs differenciációs protokoll csökkent hatására utalnak az elhízás rizikó allél jelenlétében, aktív bézs adipocitákban.

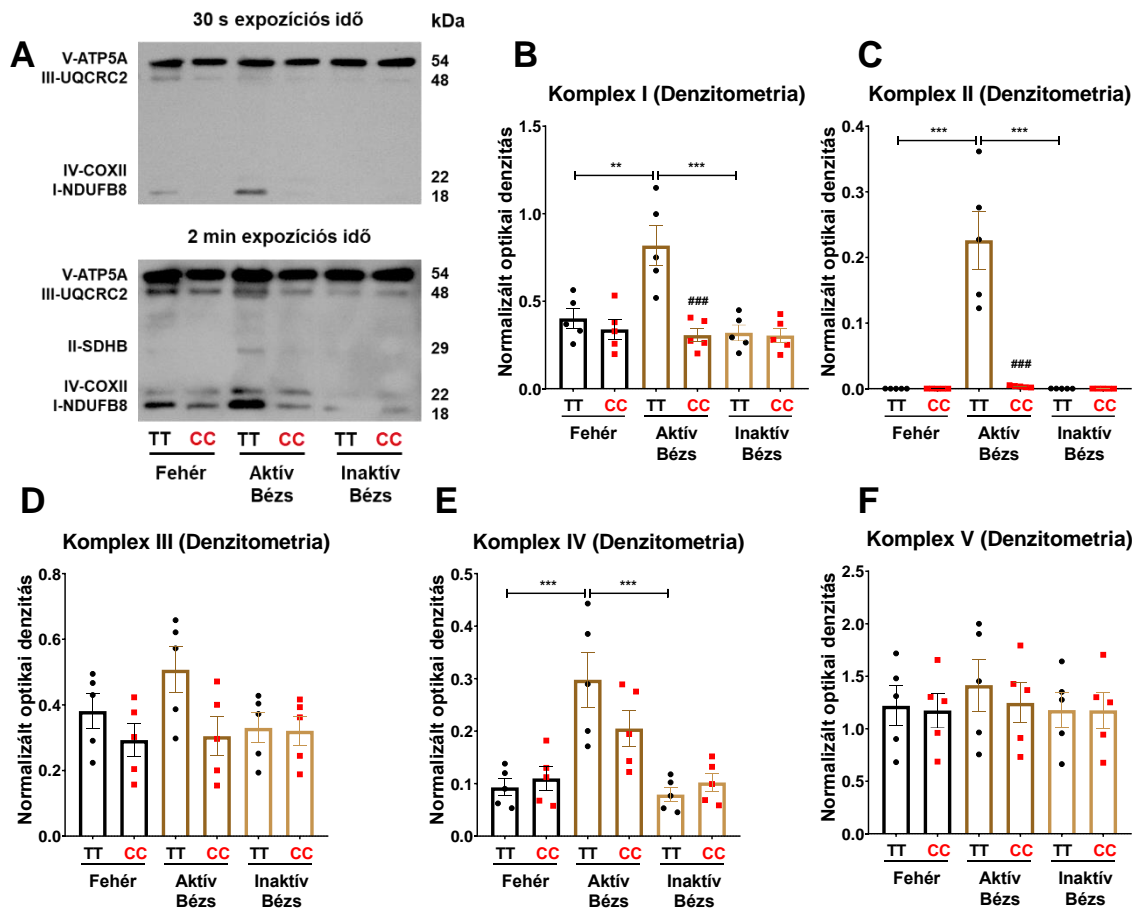


20. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása a termogenikus markerek expressziójára a differenciált abdominális SC adipocitákban (A, B) Az *UCP1* mRNS (A) és fehérje (B) expressziója RT-qPCR-rel vagy immunoblottal vizsgálva. (C–K) Az *UCP2*, *PM20D1*, *CIDEA*, *CITED1*, *CKMT1* és 2, *CPT2*, *PLIN1* és *S100B* mRNS expresszióját RT-qPCR-rel elemeztük. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük, $n=4$ genotípusonként, $*/\#p<0,05$, $*/\#\#p<0,01$ és $*/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 TT és CC genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

5.2.4. Az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták kevesebb mitokondriális komplex alegységet expresszálnak, és kisebb a protoncsorgásos légzésük

Miután megfigyeltük, hogy az *FTO* rs1421085 SNP befolyásolta a termogenikus gének expresszióját, következő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a mitokondriális komplex alegységek expressziója és a sejtes légzés is szuppresszált-e az elhízás rizikó allélt hordozó adipocitákban. Azt találtuk, hogy az *FTO* rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipociták nagyobb mennyiségben tartalmazták a mitokondriális komplex I., II. és IV. alegységeket, mint az azonos TT genotípusú fehér vagy inaktív bézs adipociták (21A–C, E. ábra). Azonban nem

találtunk különbséget a háromféle differenciálódási program között, amikor az adipociták az elhízás rizikó allélt hordozták (21A–C, E. ábra). Az elhízás rizikó *FTO* alléllal rendelkező aktív bézs adipocitákban a mitokondriális komplex I., II. és IV. alegységek expressziója alacsonyabb volt, mint a rizikó-mentes hordozókban (21A–C, E. ábra). Hasonló - de statisztikailag nem szignifikáns - tendenciát figyeltünk meg a mitokondriális komplex III. alegység esetében (21D. ábra), míg a komplex V. alegység expressziója egyforma volt minden adipocita típusban, függetlenül az *FTO* rs1421085 genotípusától (21F. ábra).

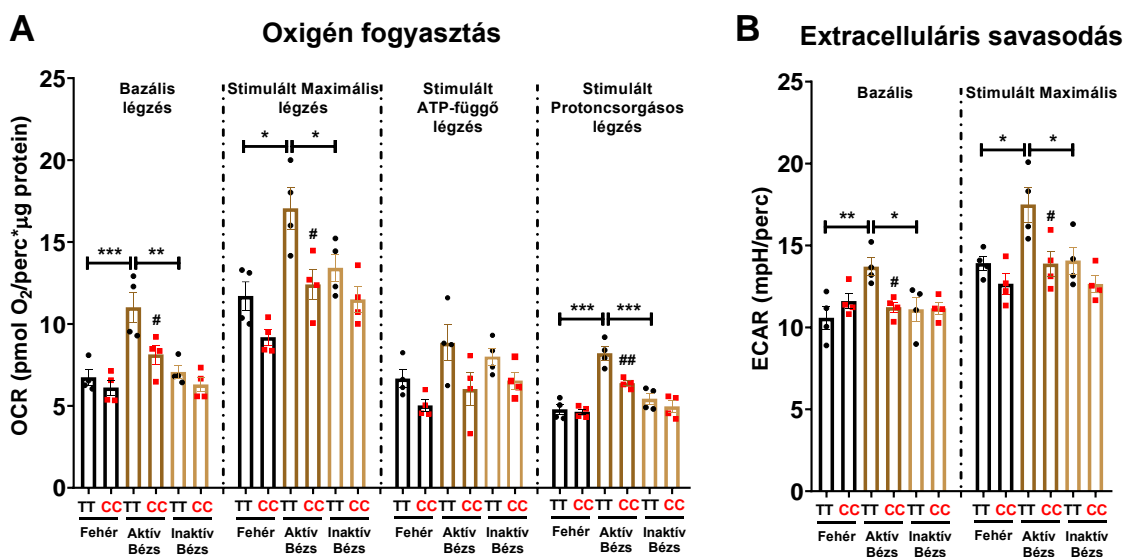


21. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása a mitokondriális komplex alegységek expressziójára

(A-F) A mitokondriális komplex alegységek fehérje expressziója immunoblottal vizsgálva fehér, aktív bézs és inaktív bézs adipocitákban, melyek *FTO* rizikó-mentes vagy elhízás rizikó genotípussal rendelkeztek. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük, $n=4$ genotípusonként, $*/\#p<0,05$, $**/\#\#p<0,01$ és $***/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 TT és CC genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

Ezt követően megvizsgáltuk az elhízás rizikó-mentes vagy rizikó *FTO* allélt hordozó háromféle adipocita sejtes légzését. A mitokondriális komplex alegységek expressziójával összhangban

azt találtuk, hogy a rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipociták nagyobb mértékű légzést (mind alap, mind maximálisan stimulált körülmények között), stimulált protoncsorgást és extracelluláris savasodást mutattak, mint a fehér vagy inaktív bézs adipociták. Azonban ez a különbség nem volt szignifikáns a rizikó allélt hordozó adipocitákban (22. ábra). A stimulált ATP-függő légzést nem befolyásolták jelentős mértékben sem az alkalmazott differenciációs protokollok, sem az *FTO* rs1421085 genotípus (22A. ábra). Az *FTO* elhízás rizikó variánsával rendelkező aktív bézs adipociták a rizikó-mentes hordozókkal összehasonlítva alacsonyabb sejtlégzést mutattak, különösen stimulált protoncsorgásos légzést - mely az UCP1-függő hőtermelést tükrözi - valamint extracelluláris savasodást, amely a glikolitikus aktivitással asszociált (22. ábra). Érdekes módon megfigyeltük az elhízás rizikó *FTO* allél sejtes légzésre gyakorolt egyedi hatását aktív bézs adipocitákban, mely nem volt jelen fehér vagy inaktív bézs adipocitákban. Ez kiemeli, hogy a vizsgált SNP csak a termogenezisre aktivált humán abdominális SC adipocitákban fejt ki szignifikáns hatást.



22. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása az oxigénfogyasztásra és az extracelluláris savasodásra

(A, B) Seahorse extracelluláris fluxus analízissel határoztuk meg a (A) bazális, dibutil-*cAMP* stimulált maximális és stimulált protoncsorgásos oxigénfogyasztást, valamint az (B) extracelluláris savasodást fehér, aktív bézs és inaktív bézs adipocitákban, melyek *FTO* rizikó-mentes vagy elhízás rizikó genotípussal rendelkeztek. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük, $n=4$ genotípusonként, $*/\#p<0,05$, $**/\#\#p<0,01$ és $***/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 TT és CC genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

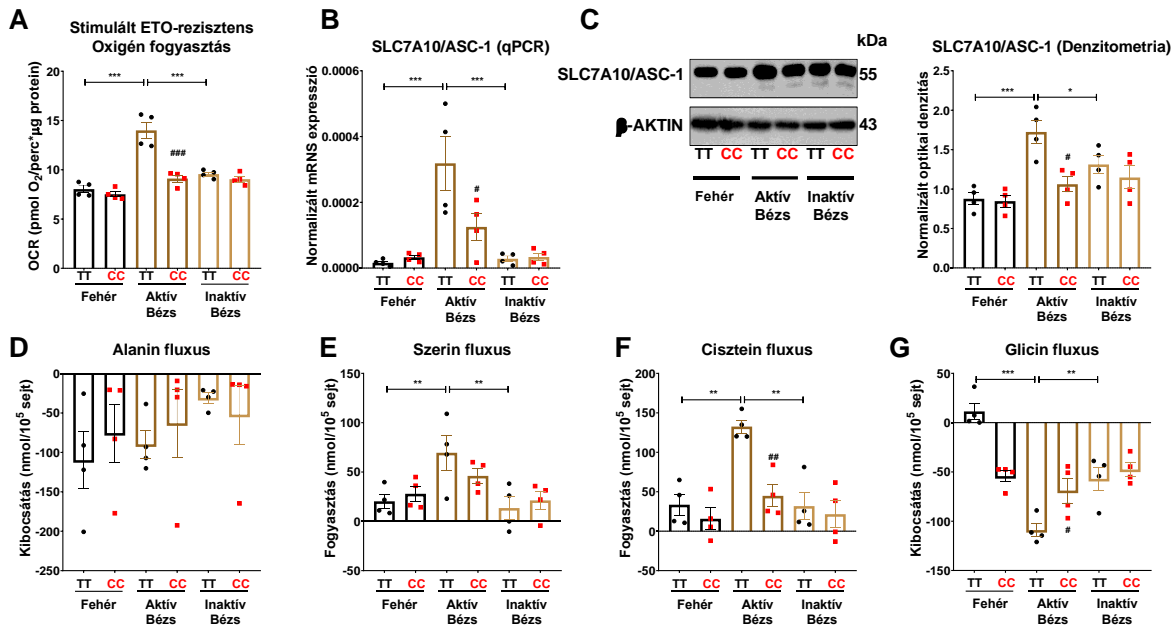
5.2.5. Az *FTO* elhízás rizikó genotípust hordozó, termogenezisre aktivált adipociták kisebb mennyiségű semleges aminosavat fogyasztanak

Az aktív termogénikus adipociták metabolikus szubsztrátokat, például szénhidrátokat, zsírsavakat vagy aminosavakat használnak fel a hőtermeléshez [Onogi és Ussar, 2022]. Ezért célul tűztük ki az eltérő *FTO* genotípusú abdominális SC adipociták „üzemanyag”-hasznosításának vizsgálatát a háromféle differenciációs programban. A zsírsavak elsősorban a lipidcseppekből szabadulnak fel lipolízis során [Cannon és Nedergaard, 2004; Townsend és Tseng, 2014]. Megállapítottuk, hogy az adipocitákban a lipolízis szabályozása és a zsírsav-anyagcsere génexpressziós útvonalai leszabályozódtak az *FTO* CC-vel rendelkező aktív bézs adipocitákban a TT allélhordozókhöz képest (19B. ábra). Bár az egér barna zsírsejtek képesek kompenzálni a lipidcseppekből származó zsírsavak hiányát [Chitraju és mtsai., 2020], *ex vivo* modellünkben nem szerepeltek zsírsavak az alkalmazott differenciációs tápközegben. Az *SLC7A10* által kódolt ASC-1 fontos szerepet játszik az alanin, szerin, cisztein és glicin fogyasztás közvetítésében az abdominális SC és a mély nyaki régiókból származó humán adipocitákban [Jersin és mtsai., 2021; Arianti és mtsai., 2021]. A termogénikus aktiválás során a felhasznált energiaforrások vizsgálatára az adipociták oxigénfogyasztását ETO (a karnitin-palmitoiltranszferáz-1 inhibitora) adásával követtük.

A szénhidrát- és aminosav-oxidáció aktivitását tükröző ETO-R légzés [Nagy és mtsai., 2022] magasabb volt az *FTO* rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipocitákban, mint az azonos TT genotípust hordozó fehér vagy inaktív bézs adipocitákban (23A. ábra). Az elhízás rizikó *FTO* alléllal rendelkező aktív bézs adipociták ETO-R oxigénfogyasztása alacsonyabb volt, mint a rizikó-mentes hordozóké (23A. ábra). Ezek a megfigyelések kisebb mértékű szénhidrát-és/vagy aminosav-felhasználásra utalnak a CC-hordozó aktív bézs adipocitákban.

Az *SLC7A10*-et a legnagyobb mértékben expresszált DEG-ek között találtuk a rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipocitákban (16F. ábra). Ezért úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk az alkalmazott differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 SNP hatását az ASC-1 expressziójára, valamint az ASC-1 által szállított aminosavak adipociták általi felhasználására. Azt találtuk, hogy a rizikó-mentes allélokkal rendelkező aktív bézs adipociták nagyobb *SLC7A10* mRNS expressziót mutattak, mint a fehér vagy inaktív bézs adipociták, amelyek ugyanazt a TT genotípust hordozták (23B. ábra). Ez a hatás megfigyelhető volt az ASC-1 fehérje szintjén is (23C. ábra). Az *FTO* rs1421085 SNP jelenléte az *SLC7A10* alacsonyabb expresszióját eredményezte az aktív bézs adipocitákban (23B, C. ábra). Ezt követően

megmértük az aminosavak fluxusát a háromféle módon differenciált, CC illetve TT alléleket hordozó adipociták kondicionált tápfolyadékából. Az alkalmazott differenciációs programok nem befolyásolták az alanin kibocsátását, az *FTO* allél státuszától függetlenül (23D. ábra). Az *FTO* rizikó-mentes genotípusú adipociták esetében azt találtuk, hogy az aktív bézs zsírsejtek nagyobb mennyiségű szerint (23E. ábra) és ciszteint (23F. ábra) fogyasztottak, és több glicint bocsátottak ki, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták (23G. ábra).

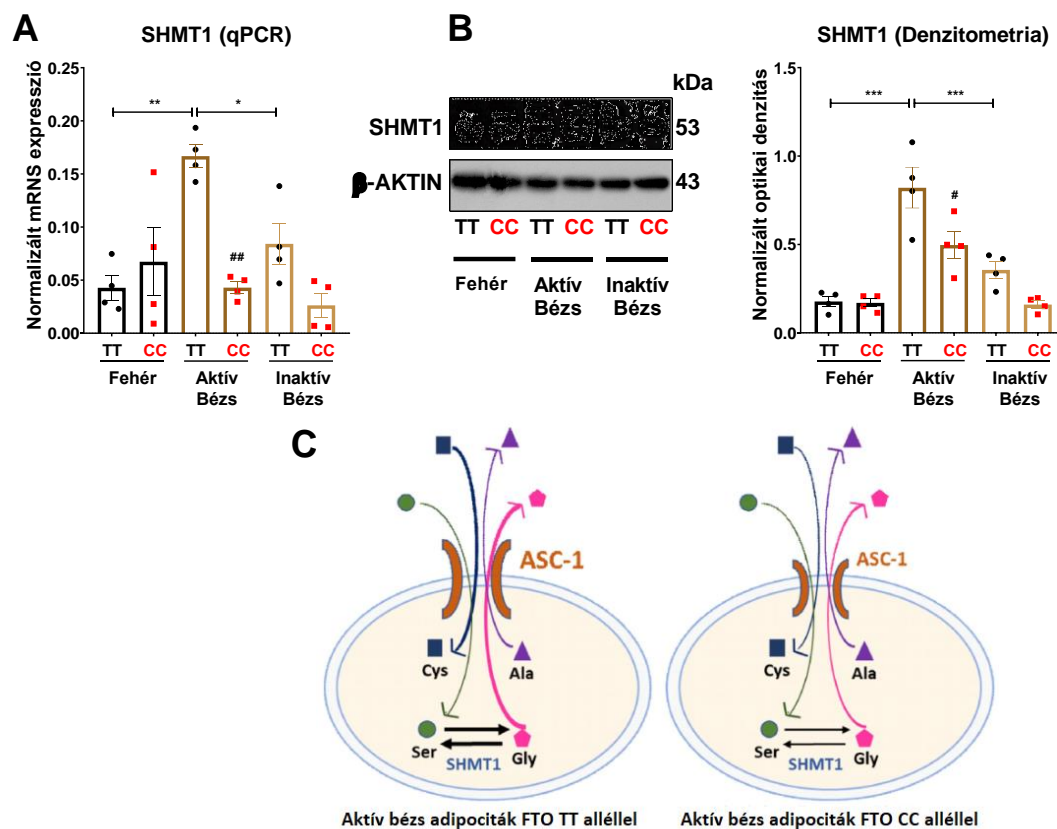


23. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása a differenciált abdominális SC adipociták ASC-1 által közvetített aminosav fluxusaira (A) Seahorse extracelluláris fluxus analízissel határoztuk meg az etomoxir (ETO)-rezisztens oxigénfogyasztást fehér, aktív bézs és inaktív bézs adipocitákban, melyek rizikó-mentes vagy elhízás rizikó genotípussal rendelkeztek. (B, C) *SLC7A10/ASC-1* mRNS (B) és fehérje (C) expressziója RT-qPCR-rel és immunoblottal mérve, $n=4$ genotípusonként. (D–G) Differenciált abdominális SC adipociták kondicionált médiumaiból mért aminosav-fluxus, $n=4$ genotípusonként. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük. $*/\#p<0,05$, $**/\#\#p<0,01$ és $***/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 TT és CC genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

A fent említett génextpressziós és ETO-R oxigénfogyasztási eredményeknek megfelelően nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ezen aminosavak fluxusában a háromféle differenciációs protokoll között az elhízás rizikó allélokkal rendelkező adipocitákban. Az elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták kevesebb ciszteint fogyasztottak, mint a rizikó-mentes hordozók (23F. ábra), azonban az SNP-nek nem volt szignifikáns hatása a

szerinfogyasztásra (23E. ábra), ami arra utal, hogy más aminosav transzporterek kompenzálhatják az ASC-1 csökkent expresszióját.

Az RNS-seq adataink azt mutatták, hogy a SHMT1, mely az L-szerin és tetrahydrofolát (THF) glicinné illetve 5,10-metilén-THF-tá (5,10-CH₂-THF) történő átalakulását katalizálja, alacsonyabb mértékben expresszálódott aktív bézs adipocitákban, melyek az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozták, összehasonlítva a rizikó-mentes hordozókkal. Az SHMT1 expressziójára vonatkozó RNS-seq adatainkat RT-qPCR-rel (24A. ábra) és immunoblot-vizsgálattal (24B. ábra) validáltuk.



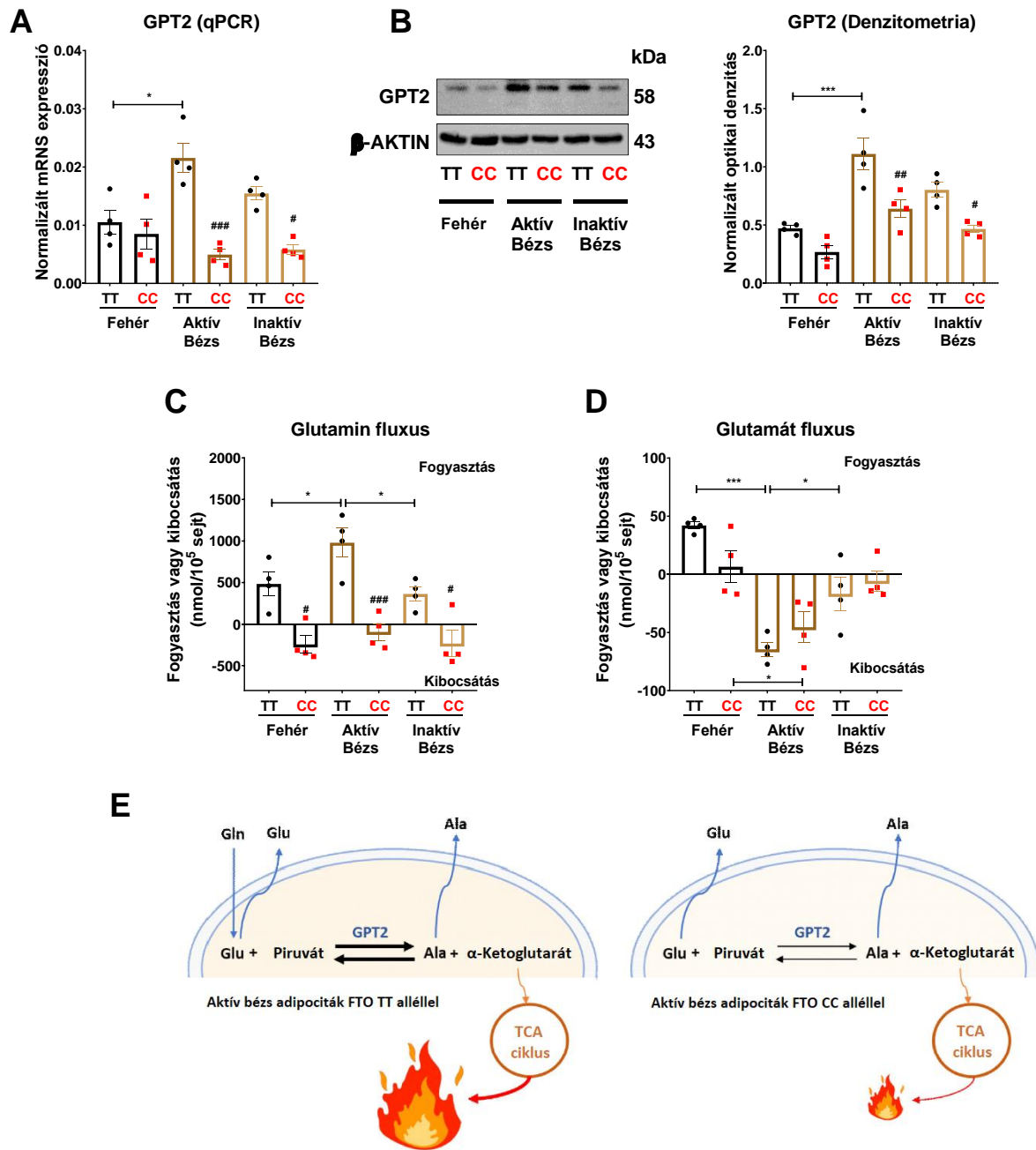
24. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása a differenciált abdominális SC adipociták SHMT1 expressziójára

(A, B) *SHMT1* (A) *mRNS* és (B) fehérje expressziója RT-qPCR-rel és immunoblottal mérve, $n=4$ genotípusonként. (C) Az *ASC-1* által közvetített aminosav-fluxus és az *SHMT1* enzimaktivitás grafikus ábrázolása *TT* (bal panel) és *CC* (jobb panel) *FTO* allélekkel rendelkező aktív bézs zsírsejtekben. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük. $*/\#p<0,05$, $**/\#\#p<0,01$ és $***/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 *TT* és *CC* genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

Azt is megállapítottuk, hogy az aktív bézs adipociták magasabb SHMT1 fehérje tartalommal rendelkeztek, mint a fehér vagy inaktív bézs adipociták a rizikó-mentes *FTO* allél jelenlétében,

de ez a különbség nem volt megfigyelhető az elhízás rizikó genotípusú mintákban (24B. ábra). Az ASC-1 által szabályozott aminosav-fluxus feltételezett modelljét, valamint a szerin és a glicin SHMT1 általi lehetséges interkonverzióját a 24C. ábra foglalja össze.

A metabolomikai analízis és RNS-seq adataink a rizikó-mentes allél aminosav anyagcserére - azon belül is a GPT2 expresszióra - gyakorolt hatására engedtek következtetni (25. ábra). Az RNS-seq eredményeink alapján az elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták alacsonyabb mértékben fejezték ki a *GPT2* mRNS-t, mint a rizikó-mentes allélhordozók. A rizikó-mentes *FTO* allélokat hordozó adipociták esetében az aktív bézs adipociták több GPT2-t expresszáltak mind mRNS (25A. ábra), mind pedig fehérje szinten (25B. ábra) a fehér adipocitákhoz képest. Alacsonyabb GPT2 kifejeződést is megfigyeltünk az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív és inaktív bézs adipocitákban a rizikó-mentes allélhordozókkal szemben (25A, B. ábra). A rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipociták nagyobb mennyiségű glutamint fogyasztottak, mint az azonos TT genotípusú fehér vagy inaktív bézs adipociták, de az elhízás rizikó genotípusú minták esetében nem tapasztaltunk különbséget a háromféle differenciációs protokoll között. A rizikó-mentes allélt hordozó adipocitákkal ellentétben az *FTO* elhízás rizikó genotípusú adipociták nem fogyasztottak glutamint az alkalmazott differenciációs protokolloktól függetlenül (25C. ábra). Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az aktív bézs zsírsejtek nagyobb mennyiségű glutamátot bocsátottak ki, mint az inaktívak, míg a fehér adipociták inkább ezt az aminosavat elfogyasztották. A glutamát fogyasztása nem függött az *FTO* rs1421085 lókusztól allél eloszlásától (25D. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TT *FTO* allélokat hordozó aktív bézs adipociták nagyobb mennyiségű glutamint használnak fel, amely glutamáttá alakítható. A sejtek ezt feltehetően több α -ketoglutarát (TCA-ciklus intermedier) termelésére használják, amely hozzájárulhat a megnövekedett hőtermeléshez (25E. ábra).



25. ábra: A differenciációs protokollok és az *FTO* rs1421085 alléljainak hatása a differenciált abdominális SC adipociták GPT2 expressziójára és glutamin-glutamát fluxusára

(A, B) *GPT2* mRNS (A) és fehérje (B) expressziója RT-qPCR-rel és immunoblottal mérve, $n=4$ genotípusonként. (C, D) Glutamin (C) és glutamát (D) fluxusa differenciált abdominális SC adipociták kondicionált médiumaiból mérve, $n=4$ genotípusonként. (E) A glutamin-glutamát fluxus és a *GPT2* enzimaktivitás grafikus ábrázolása TT (bal panel) és CC (jobb panel) *FTO* allélekkel rendelkező aktív béz zsírsejtekben. A statisztikai elemzést egyutas ANOVA-va Tukey post hoc tesztjével végeztük. $*/\#p<0,05$, $**/\#\#p<0,01$ és $***/\#\#\#p<0,001$. *analízist végeztünk az alkalmazott differenciációs protokoll hatásának összehasonlítására ugyanazon genotípusban. #analízist végeztünk az *FTO* rs1421085 TT és CC genotípusok összehasonlítására ugyanazon differenciációs protokollon belül.

6. Megbeszélés

6.1. Parkin-függő és független mitofágia közvetíti a bézs-fehér átalakulást a humán abdominális adipocitákban *ex vivo*

A BAT központi szerepet játszik az állandó hideghatásnak kitett emlősök energiaháztartásában [Cannon és mtsai., 2004]. Az aktív BAT-raktárak nukleáris képkalkotó módszerekkel felnőtt emberekben történő kimutatását követően [van Marken és mtsai., 2009; Cypess és mtsai., 2009; Virtanen és mtsai., 2009] erős negatív korrelációt tártak fel az elhízás és az aktív BAT mennyisége között [Lee és mtsai., 2010; Yoneshiro és mtsai., 2013]. Független tanulmányok azt sugallják, hogy a felnőtt emberek BAT-raktárai túlnyomórészt bézs adipocitákból állnak [Wu és mtsai., 2012; Jespersen és mtsai., 2013; Lee és mtsai., 2014]. A humán bézs zsírsejtek transzplantációja javította az étrend által kiváltott elhízást és a szisztémás anyagcserét egerekben, ami rávilágít a bézs sejtbeültetés terápia alkalmazásának lehetőségére az elhízás és a MetS kezelésében [Min és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2020]. Ez arra ösztönözte a kutatókat, hogy részletesen jellemezzék a bézs adipogenezist és a termogenikus aktivációt különböző humán sejtmodellekben. Tudomásunk szerint azonban ezeknek az *ex vivo* vizsgálatoknak a többsége legfeljebb két hétig terjedt ki a differenciálódási időszakra. Megjegyzendő, hogy a bézs zsírsejtek aktiválásának, vagy transzplantációjának lehetséges alkalmazása feltételezi, hogy a felhasznált sejtek jelentős ideig fenntartják energia felszabadító képességüket. Bár a felnőttek hasi sWAT-jában nem dúsultak fel túlságosan a termogenikus zsírsejtek [Leitner és mtsai., 2017], azonban ezek a depók tartalmaznak olyan progenitorokat, amelyek bézs adipocitákat eredményezhetnek [Min és mtsai., 2019; Oguri és mtsai., 2020]. Viszonylagosan könnyű hozzáférhetősége miatt az abdominális SC zsírbiopsziák vagy aspirációk sztómális-vaszkuláris frakcióiból (SVF) izolált hASC-ket gyakran használják a kutatásban és a regeneratív medicinában [Dykstra és mtsai., 2017].

A bézs adipociták aktiválása, például hideg expozíció vagy β -AR agonisták hatása szükséges a magas UCP1 expresszió fenntartásához. A hideg expozíció noradrenalin felszabadulását idézi elő a szimpatikus idegrendszerből, amely a β 3-AR-hoz kötődik [Cannon és mtsai., 2004]. A β -adrenerg jelátviteli kaszkádot a Gs fehérjék adenilát-cikláz aktiválása közvetíti, ami a PKA aktiválásához és cAMP termelődéséhez vezet. Ez elősegíti a lipolízist, a TG-k lebomlását, ami FFA-k felszabadulását eredményezi, ami aktiválja az UCP1-et [Sidossis és mtsai., 2015]. A PKA-nak számos downstream célpontja van, köztük a CREB, a MAP kináz útvonalak tagjai (Erk1/2, p38, JNK) és a hormon-szenzitív lipáz, amelyek elősegítik a hőtermelés fokozását a

termogenikus génexpresszió felszabályozásával és/vagy a szubsztrátok mobilizálásával a termogenezis megvalósítására [Cao és mtsai., 2004; Shi és mtsai., 2017].

A PPAR γ jól ismert, mint a fehér és barna zsírsejtek differenciálódásának fő szabályozója. Egyes szintetikus PPAR γ agonisták - mint például a roziglitazon - a fehér zsírsejtekben a bézs adipocita gén-transzkripció program indukálójaként működnek, amelyet a SIRT1, PRDM16, C/EBP α és PGC1 α -függő mechanizmusok közvetítenek [Sun és mtsai., 2021]. A PPAR γ közvetlenül szabályozza számos gén expresszióját, amelyek részt vesznek az adipociták központi funkcióiban, mint például a lipidtranszportban, a lipid metabolizmusban, az inzulin jelátvitelben és az adipokin szekrécióban [Lehrke és mtsai., 2005]. A PPAR γ célgének szabályozhatják a lipidtranszportot (FABP4), a zsírsavfelvételt (LPL, FATP/SLC27A1, OLR1), az intracelluláris zsírsavak újrahasznosítását (PEPCK/PCK1, GK, AQP7) [Koppen és mtsai., 2010] és a lipolízist (GPR81) [Jeninga és mtsai., 2009]. Ezenkívül a PPAR γ szabályozza az inzulinérzékenységet az adipokinek expresszióján keresztül [Rangwala és mtsai., 2004].

Munkám során négy héten keresztül követtem a primer abdominális SC eredetű hASC-k fehér és bézs zsírsejteké történő differenciálódását. A PPAR γ -vezérelt bézs differenciálódás időbeli kiterjesztése az UCP1 további felszabályozását eredményezte mind mRNS (10A. ábra), mind fehérje (10B. ábra) szinten, illetve a *CIDEA* gén szintjén (10C. ábra), míg fehér zsírsejtekben ezek a markerek folyamatosan expresszálódtak mérsékelt szinten. Ezt a jelenséget kutatócsoportunk reprodukálta az SGBS sejtvonal eredetű zsírsejtekkel [Klusóczki és mtsai., 2019], amely a humán fehér és bézs adipogenezis elfogadott és széles körben használt modellje [Wabitsch és mtsai., 2001; Halbgebauer és mtsai., 2020].

A bézs és barna zsírsejtekben a mitokondriumok állapota meghatározó a termogenezis és az energia-anyagcsere szempontjából. A rágcsálók barna adipocitáiban található mitokondriumok adrenerg jelre válaszul fragmentálódnak, hozzájárulva a szétkapcsolt légzéshez és a fokozott energiafelhasználáshoz [Liesa és mtsai., 2013; Wilkstrom és mtsai., 2014]. Pisani és munkatársai kimutatták, hogy az UCP1-pozitív humán zsírsejtek többnyire fragmentált morfológiájú mitokondriumokat tartalmaznak [Pisani és mtsai., 2018]. A közelmúltban azt találtuk, hogy a cAMP által vezérelt termogenikus stimuláció megnövekedett mitokondriális fragmentációt eredményezett humán inaktív és érett bézs zsírsejtekben, amelyek négy helyett két hét alatt differenciálódtak ugyanazon progenitor populációkból [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. Amikor fenntartottuk a bézs irányú differenciálódást, több mitokondrium

fragmentálódott, ellentétben a fehér zsírsejtekkel, amelyekben ezek a dinamikus organellek elongálódtak (13C. ábra).

A mitokondriális biogenezis és eltávolítás szabályozása fontos az energiahomeosztázis és a mitokondriumok optimális számának fenntartásához [Altshuler-Keylin és mtsai., 2017]. A mitokondriális biogenezist számos sejtmagban kódolt transzkripciós kofaktor - mint például a PGC1 α - szabályozza [Picca és mtsai., 2018]. Bár a *PGC1 α* expressziója mRNS szinten általában emelkedett volt a bézs irányú differenciálódás korai fázisában, nem különbözött statisztikailag szignifikáns mértékben a fehér és a bézs zsírsejtek között (11B. ábra). Az mtDNS mennyisége azonban növekvő tendenciát mutatott a hosszú távú bézs adipogenezis során (11A. ábra). A funkcionális extracelluláris fluxusvizsgálat magas bazális, cAMP-stimulált és protoncsorgásos OCR-t, valamint jelentősebb extracelluláris savasodást mutatott mind bazális, mind aktivált körülmények között a bézs zsírsejtek esetében, amelyek roziglitazon jelenlétében négy hétig differenciálódtak. A légzés és az extracelluláris savasodás szignifikánsan alacsonyabb volt fehér zsírsejtekben; azonban hatékonyan stimulálódott a sejt-permeabilis cAMP analógra adott válaszként, ami arra utal, hogy a fehér koktél jelenlétében differenciálódott zsírsejtek egy része inaktív bézs adipocita volt (11C, D ábra).

A megnövekedett mitokondriális fragmentáció, mtDNS tartalom és OCR felveti a gátolt mitofágia lehetőségét a bézs zsírsejtekben. Amikor ugyanazokat a progenitorokat két hétig differenciáltattuk, függetlenül az alkalmazott protokolltól, néhány órás cAMP-kezelés nemcsak a termogenezishez kapcsolódó géneket szabályozta fel, hanem a PKA-n keresztül gyorsan gátolta a mitofágiát, ami több mitokondriumot és megemelkedett UCP1 szintet eredményezett [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. Hosszú távú differenciálódási körülmények között a tartós roziglitazon adagolás a mitofágia mérsékelt fékeződését is eredményezte, amit az LC3-I LC3-II-vé való átalakulásának lassulása (12D. ábra), LC3-pozitív pontátumok megjelenése (13B. ábra), a pontátumok és a mitokondriumok kolokalizációja (13C. ábra), valamint az adapterfehérjék lebontása (14C, D. ábra) mutatott. További vizsgálatokra van szükség a háttérben zajló molekuláris mechanizmusok feltárásához, amelyek bizonyíthatják a mitofágia mérsékelt alacsony szintjét a bézs adipocitákban.

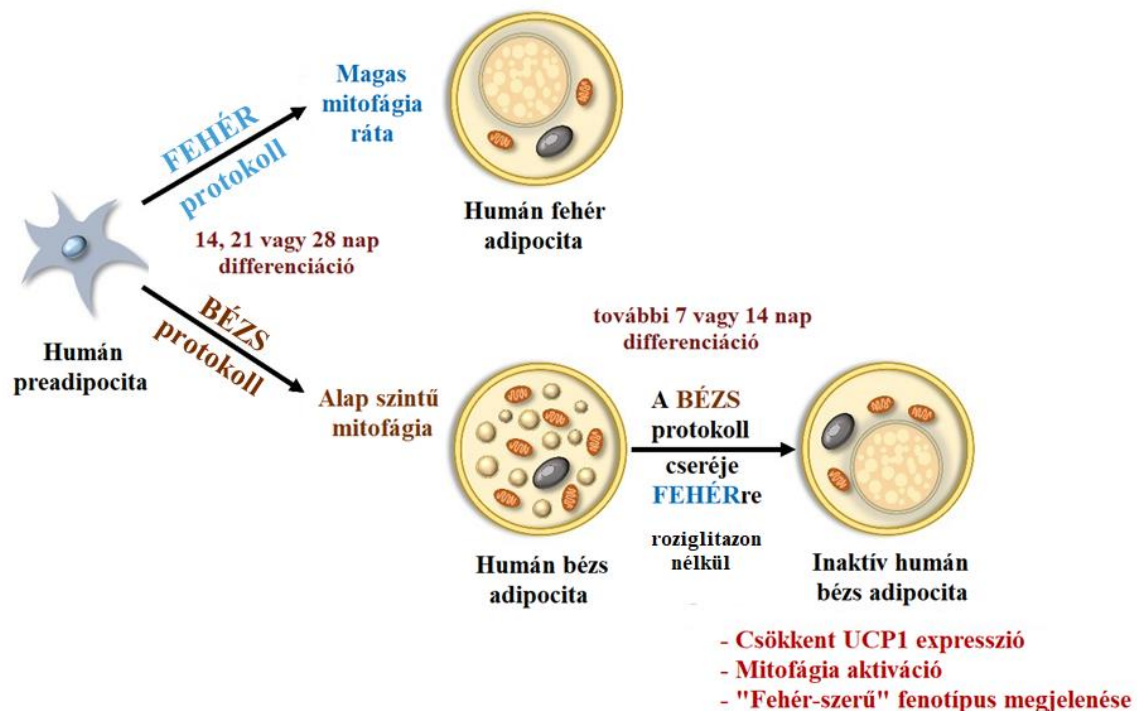
Hím egerekben bebizonyították, hogy a CL 316,243 β 3-AR agonista intraperitoneális beadásával indukálódik a WAT bézsosodása hét egymást követő napon keresztül. Alacsony autofágia aktivitást figyeltek meg az újonnan differenciálódott bézs zsírsejtekben [Altshuler-Keylin és mtsai., 2016], ami összhangban van az itt bemutatott *ex vivo* eredményekkel (12. és

13. ábra). A termogenikus inger visszavonása után azt találták, hogy a bézs zsírsejtek elvesztették morfológiai és termogenikus jellemzőiket, és „fehér-szerű” zsírsejteké alakultak, amit a mitokondriumok eltávolítása váltott ki a mitofágián keresztül. A bézs-fehér adipocita átalakulás során az autofágiával-asszociált *ATG5* és *ATG12* gének expressziója fokozódott, a Green Fluorescent Protein (GFP)-LC3 pontok száma, a GFP-LC3 és TOM20 kolokalizációja jelentősen megnőtt, az LC3-II fehérjeszintje megemelkedett. Ezzel párhuzamosan a szelektív autofágia adapter fehérjék, az NBR1 és a p62 lebomlottak, összehasonlítva azokkal az egerekkel, amelyeket a teljes kísérleti időszak alatt folyamatosan β 3-AR agonistával kezeltek [Altshuler-Keylin és mtsai., 2016].

Kísérleteink során a humán primer SC hasi eredetű zsírsejtek *ex vivo* modelljét alkalmaztuk a bézs-fehér átalakulás folyamatának jellemzésére a mitofágia kontextusában. A zsírsejtek UCP1 (10A, B. ábra), *CIDEA* (10C. ábra) és *LEP* (10D. ábra) expressziója, a mitokondriumok fragmentációja (13C. ábra) és a bazális légzése (11C. ábra) szignifikánsan megváltoztak az átalakulás eredményeként; ezért ezek a sejtek több, a fehér zsírsejtekre jellemző tulajdonságot vettek fel. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a közelmúltban, amikor 28 napos differenciálást végeztünk, párhuzamosan a bézs protokoll fehérre cserélésével a 14. napon az SGBS preadipocita sejtvonalban [Klusóczki és mtsai., 2019]. Az SGBS zsírsejtekre vonatkozó korábbi megfigyeléseinkkel és az itt bemutatott adatokkal ellentétben Guennoun és munkatársai magas UCP1-tartalmat figyeltek meg a 14 napig differenciált SGBS zsírsejtekben, még a fehér differenciálódási protokollra válaszul is, barnulást indukáló anyagok hiányában. Érdekes módon, amikor az SGBS sejtek fehér differenciálódását további két héttel meghosszabbították, az UCP1 expressziója szignifikánsan csökkent [Guennoun és mtsai., 2015]. Az autofágia hozzájárulását ehhez a váratlan eredményhez eddig nem vizsgálták.

A 12. és 13. ábrán látható adataink összhangban vannak Kajimura munkacsoportja *in vivo* vizsgálatának eredményeivel [Altshuler-Keylin és mtsai., 2016], melyek bizonyítják, hogy barnulást indukáló inger hiányában az autofágia aktiválódik a bézs adipociták mitokondriumainak eltávolítására. Így a bézs adipociták egy adaptív átalakuláson mennek keresztül, aminek következtében egy termogenikusan inaktív állapotba kerülnek (26. ábra). Az *ex vivo* átalakult bézs zsírsejtek azonban hatékonyabban reagáltak az adrenerg ingert utánzó dibutiril-cAMP-re az OCR, a protoncsorgásos légzés (11C. ábra) és az ECAR (11D. ábra) aktiválásával, mint a fehérek. Megjegyzendő, hogy az UCP1 fehérje jelentős mennyiségben expresszáldott kéthetes átalakulást követően (10B. ábra), ami megmagyarázhatja, hogy az átalakult zsírsejtekben miért volt magasabb a stimulált és protoncsorgás OCR, mint a

fehérekben. A megfigyelt funkcionális különbségek arra utalnak, hogy az átalakult bézs és az eredendően fehér zsírsejtek két különböző sejtpopulációba sorolhatók. Szisztematikus vizsgálatokra van szükség a termogenikusan aktív bézs, az átalakult inaktív bézs és a fehér zsírsejtek molekuláris jellemzőinek további feltárásához embereken.



26. ábra: A bézs differenciációs protokoll felfüggesztése a mitofágia aktivációjával inaktíválja a bézs adipocitákat

A humán adipocita prekursorok bézs adipocita irányba történő differenciációja során a PPAR γ agonista (rozigitazon) megvonása megnövekedett mitofágiát okoz, mely inaktíválja ezen sejteket és egy fehér adipocitákra jellemző fenotípust alakít ki.

Utolsó lépésként arra törekedtünk, hogy feltárjuk, hogyan közvetítődik a mitokondriumok szelektív eltávolítása a tranzíciós folyamat során. Az irodalomban ellentmondásos adatok jelentek meg a parkin szerepéről az egér bézs zsírsejtek funkcióinak fenntartásában. A 3T3-L1 adipociták adipogenezise során fokozott parkin expressziót figyeltek meg, míg a rozigitazon kezelés hatására a fehérje expressziója csökkent [Taylor és mtsai., 2017]. Egér modellben azt találták, hogy a parkin expresszió indukálódott a bézs zsírsejtek differenciálódása során; továbbá kimutatták a mitokondriumban gazdag bézs adipociták aktív állapotának fenntartását még az adrenerg inger eliminálása után is a PARK2 knockout egerekben [Lu és mtsai., 2018]. Ezekkel az eredményekkel ellentétben Corsa és munkatársai azt találták, hogy az egér zsírsejtekben a parkin deléción nem befolyásolta az adipogenezist, a bézs-fehér átalakulást és a bézs zsírsejtek aktív állapotának fenntartását [Corsa és mtsai., 2019]. A közelmúltban

kutatócsoportunk leírta, hogy a parkin-függő és az adapterektől független, mitofágiához kapcsolódó gének expresszálódnak a humán inaktív és érett bézs zsírsejtekben. A cAMP-vezérelt termogenikus inger a parkin-függő mitofágiával kapcsolt gének expressziójának csökkenését eredményezte [Szatmári-Tóth és mtsai., 2020]. Kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a parkin gén- és fehérje expressziója nem változott a bézs-fehér átalakulás során (14A, B. ábra). Azonban az NBR1 (14C. ábra) és a p62 (14D. ábra) szelektív adapterfehérjék szintje szignifikánsan csökkent, a *CALCOCO2/NDP52* (14F. ábra) és a vizsgált parkin-független mitofágiával kapcsolt gének (15. ábra) expressziója pedig szignifikánsan megemelkedett az átalakulás során, összehasonlítva a végig bézs irányba differenciált zsírsejtekkel. Összefoglalva, adataink azt sugallják, hogy mind a parkin-függő, mind a független mitofágia útvonalak részt vesznek a mitokondriális elimináció szabályozásában a bézs-fehér zsírsejtek átalakulása során.

A p62 egy többfunkciós fehérje, amely számos jelátviteli folyamatban vesz részt, amelyek különböző sejtfolyamatokat érintenek, mint például a gyulladás, a sejthalál, a daganatképződés és az anyagcsere [Katsuragi és mtsai., 2015; Ning és mtsai., 2019]. Beszámoltak arról, hogy a teljes testet érintő p62 knockout egerek elhízott fenotípust mutattak a megnövekedett zsírosodás és a csökkent energiafelhasználás miatt [Rodriguez és mtsai., 2006]. Ezen túlmenően a BAT mitokondriális funkciója adipocita-specifikus p62^{-/-} egerekben károsodott, ami azt eredményezte, hogy a BAT nem reagált a β 3-adrenerg ingerekre [Müller és mtsai., 2013]. Ez arra utal, hogy a p62 jelentős szerepet játszik a BAT termogenezisének szabályozásában. Egy friss tanulmány kimutatta, hogy az NBR1 szükséges az adaptív termogenezis gátlásához a PPAR γ aktivitásának csökkentése révén a p62-hiányos egerek BAT-jában; ezáltal azonosították az NBR1 gátló szerepét a termogenezisben p62 inaktiváció jelenlétében [Huang és mtsai., 2021]. Ezen tanulmányok alapján további vizsgálatok feltárhatják a p62 és az NBR1 szerepét a humán barna és bézs zsírsejtek termogenezisében.

Az elhízott egyének kevesebb aktív BAT-tal, de több „barnítható” zsírral rendelkeznek, mint a soványak [Leitner és mtsai., 2017]. Ezek a „barnítható” depók nagy mennyiségben tartalmazhatnak bézs zsírsejteket, amelyekben az autofágia és a mitofágia nagyon aktív. Ezt támasztja alá az a tény, hogy az *ATG* és az autofagoszómákkal kapcsolt gének jelentős mértékben expresszálódnak az elhízott betegek zsigeri és sWAT-jában [Kosacka és mtsai., 2015; Haim és mtsai., 2015]. A jövőben jól alkalmazható molekuláris markerekre és szövettani vagy sejtszeparálási módszerekre lesz szükség a fehér, aktív bézs és az átalakuláson átesett bézs zsírsejtek megkülönböztetésére a különböző anatómiai területeken. Ez lehetővé teheti a

kutatóknak, hogy elemezzék a génexpressziós változásokat az egyes sejtekben a konverzió során, ami feltárhatja azokat az új molekuláris célpontokat, amelyek irányítják ezt a folyamatot. További vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy az autofágia gátlását betegségek gyógyítására használják, de vannak erre irányuló biztató eredmények. Például García-Pérez és munkatársai összefoglalták, hogy az autofágia célzása a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) fertőzések korai stádiumában potenciális terápiás stratégia lehet a vírusreplikáció ellen és a fokozott gyulladási válasz szabályozásában [García-Pérez és mtsai., 2020]. A bézs-fehér átalakulást meghatározó kulcsfontosságú molekuláris események jobb megértése új lehetőségeket kínálhat ennek a folyamatnak a specifikus gátlására a hőtermelő zsírsejtek aktív állapotának fenntartása érdekében. Ezek a sejtek farmakológiailag aktiválhatók vagy transzplantálhatók lehetnek például emberekbe az energia-anyagcsere javítása és az elhízás elleni küzdelem érdekében.

6.2. Humán abdominális szubkután adipocitákban az elhízás rizikó *FTO* rs1421085 allél jelenléte az energiafelszabadítás zavarát okozza

Az abdominális zsír SC és intraabdominális zsírra osztható, amely főként zsigeri vagy intraperitoneális WAT-ból áll [Mårin és mtsai., 1992; Wajchenberg, 2000]. Számos tanulmányban leírták, hogy a zsigeri WAT felhalmozódása erősen korrelál az anyagcsere-rendellenességek kockázatával [Matsuzawa és mtsai., 1995; Fujimoto és mtsai., 1994; Banerji és mtsai., 1999], míg más vizsgálatok azt állították, hogy az abdominális sWAT védő szerepet tölthet be [McLaughlin és mtsai., 2011; Patel és Abate, 2013]. Egy újabb tanulmányban PET/CT technika alkalmazásával megerősítették, hogy emberekben BAT vagy barnítható zsírszövet található a nyaki, szupraklavikuláris, hónalj, mediasztinális, paravertebrális és abdominális depókban [Leitner és mtsai., 2017]. Doktori munkám során RNS-seq analízist végeztünk humán abdominális SC eredetű preadipocitákon, melyeket *FTO* rs1421085 rizikómentes vagy elhízás rizikójú genotípusú egyénekből izoláltunk és háromféle protokoll alkalmazásával differenciáltattunk fehér, aktív vagy inaktív bézs adipocitákká. Azt találtuk, hogy az *FTO* genotípusoktól függetlenül a fehér vagy inaktív bézs adipocitákhoz képest az aktív bézs adipociták nagyobb termogenikus potenciállal rendelkeztek, melyet a termogenikus gének magasabb expressziója és - a ProFAT nyílt hozzáférésű alkalmazás felhasználásával számszerűsített - magasabb barnulási kapacitás jellemzett. Eredményeink arra utalnak, hogy a humán abdominális SC adipociták jelentős termogenikus potenciállal rendelkeznek, ha PPAR γ agonista és adrenerg stimuláció által vezérelt aktív bézs differenciációs protokoll segítségével aktiválódnak. Ez a potenciál azonban csökken, amikor az adipociták inaktiválódnak a bézs-

fehér átalakulás során. 100, illetve 164 gént találtunk, amelyek magasabban, illetve alacsonyabban expresszálódtak az aktív bézs adipocitákban mind a fehér mind az inaktív bézs zsírsejtekhez képest. Számos jól ismert termogenezis marker - mint például a *CITED1*, *PM20D1*, *PLIN5*, *GK* és *AQP3* - felszabályozódott az aktív bézs zsírsejtekben, mind a fehér mind az inaktív bézs adipocitákhoz viszonyítva (16. ábra). Nem találtunk DEG-eket a fehér és inaktív bézs adipociták összehasonlításakor, ami a génexpressziós profilok nagy hasonlóságát jelzi ebben a két differenciációs programban.

A dibutiril-cAMP-t széles körben használják az *in vivo* termogenezis imitálására, mivel képes áthatolni a sejtmembránon [Cypess és mtsai., 2013]. A cAMP-vel ellentétben - amelyet a foszfodiészteráz (PDE) tud hidrolizálni - a dibutiril-cAMP ellenáll a PDE általi lebontásnak [Jarett és Smith, 1974; Blecher, 1971]. A cAMP aktiválja a PKA-t, amely különféle fehérjéket foszforilál és további protein-kinázok aktiválásának egymást követő kaszkádjait indítja el [Daniel és mtsai., 1998]. Az utóbbi időben a PKA-nak fontos szerepet tulajdonítanak a géntranszkripció szabályozásának egyik fontos elemeként [London és Stratakis, 2022], mely során a CREB aktiválása az egyik legtöbbet vizsgált kapcsolat a PKA és a megvalósult génexpressziós szabályozás között [Daniel és mtsai., 1998]. Amikor a dibutiril-cAMP-t alkalmaztunk az aktív és inaktív bézs differenciációs programok közepén (a 14. napon 4 órán keresztül), azt tapasztaltuk, hogy a vegyület termogénikus gének expressziójára gyakorolt hatása az aktív bézs differenciáció végéig fennmaradt. Ez arra utal, hogy a dibutiril-cAMP génexpressziót befolyásoló hatása hosszú ideig fenntartható a bézs adipocitákban.

A tanulmány fő célja az *FTO* gén rs1421085 T→C SNP hatásának vizsgálata volt, amely megbontja az *ARID5B* represszor kötőhely konzervált motívumát, ami az *IRX3* és *IRX5* fokozott expresszióját eredményezi az adipociták differenciációjának korai szakaszában. Ennek következtében a prekursor sejtek elkötelezettsége a bézs helyett a fehér program irányába tolódik el és fokozódik a lipidraktározás [Claussnitzer és mtsai., 2015]. Amikor a három különböző adipocita típus génexpressziós profilját elemeztük az *FTO* rs1421085 rizikó-mentes TT és elhízás rizikó CC allélhordozó minták elkülönítésével, érdekes módon azt találtuk, hogy az SNP befolyásolta az aktív bézs adipociták génexpressziós profilját, különösen a termogénikus markerek (*CITED1*, *CIDEA*, *PLIN1*, *LIPE*, *CKMT2* és *S100b*) kifejeződését. Azonban ez a hatás nem volt megfigyelhető a fehér és az inaktív bézs adipocitákban (20. ábra). A *CIDEA*, *PLIN1* és *LIPE* - lipidcsepp-asszociált fehérjék, melyek szabályozzák a triglicerid akkumulációt és a lipolízist [Wolins és mtsai., 2006; Puri és mtsai., 2008] - génjeinek csökkent expressziója az elhízás rizikó *FTO* allélekkel rendelkező aktív bézs adipocitákban hozzájárulhat

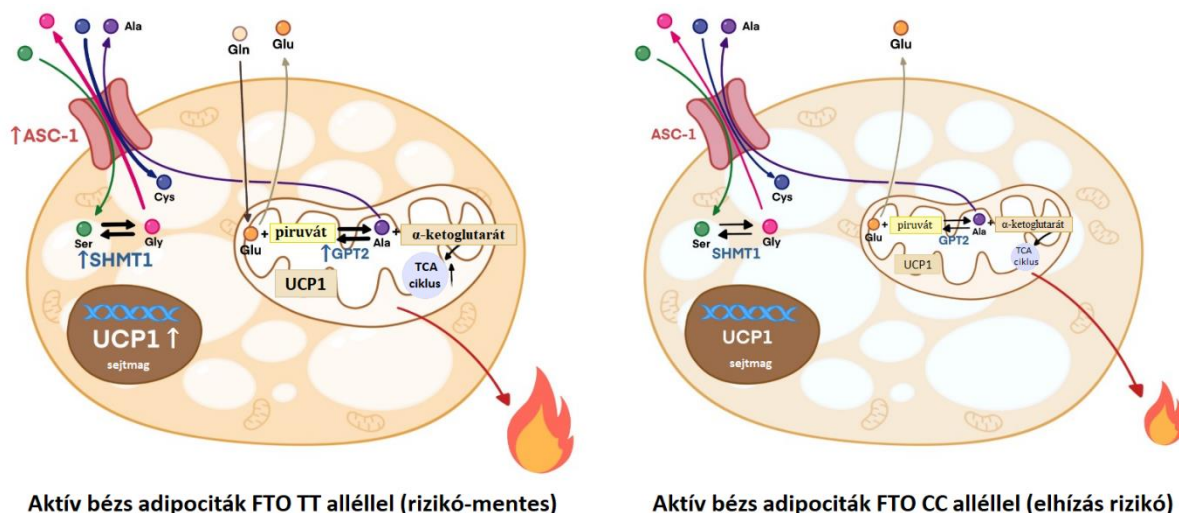
a lipolízis csökkenéséhez az érintett egyének SC zsírszövetében. A CKMT1a/b és CKMT2 mitokondriális kreatin-kinázok foszforilálják a kreatint, foszfo kreatint termelve, és hozzájárulnak az UCP1-től független hőtermeléshez a kreatin vezérelt szubsztrát cikluson keresztül [Kazak és mtsai., 2015]. Feltételezték, hogy az S100b fehérje szerepet játszik a termogénikus zsírszövet szimpatikus beidegzésében azáltal, hogy stimulálja a szimpatikus neuronokból a neurit növekedést a kalszinténin (CLSTN) 3 β tengelyen keresztül [Zeng és mtsai., 2019]. Az S100b csökkent expressziója vagy funkcióvesztése zavart szimpatikus beidegzést eredményezhet, ami a barna vagy bézs adipociták termogenezisének csökkenéséhez vezethet. Megjegyzendő, hogy a közelmúltban kimutatták, hogy a zsírszövet-specifikus CLSTN3 β ^{-/-} egerek nem rendelkeztek defektussal a BAT szimpatikus beidegzésében és adrenerg jelátvitelében [Qian és mtsai., 2023]. Az S100b csökkent expressziója az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozó abdominális SC adipocitákban azonban részben hozzájárulhat az abdominális sWAT alacsonyabb termogénikus kapacitásához, még akkor is, ha az adipociták hőtermelés céljából aktiválódnak. Fontos, hogy a metabolikus - különösen az energia-anyagcserével kapcsolatos - útvonalakban, mint például a TCA-ciklusban, a lipolízisben, a piruvát-metabolizmusban és a PPAR-jelátvitelben felülreprezentált gének az elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipocitákban leszabályozódtak a rizikó-mentes allélhordozókhoz képest, ami alacsonyabb energia-felszabadítási képességre utal a CC allélt hordozó aktív bézs adipocitákban (19B, C. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy az *FTO* rs1421085 C alléljai elnyomják a humán abdominális SC adipociták termogénikus aktivációját; még a hosszú távú rozigitazon kezelés sem tudja kompenzálni az elhízás rizikó genotípus hatását. Ezen túlmenően azt is megfigyeltük, hogy az elhízás rizikó *FTO* alléleket hordozó aktív bézs adipociták hasonló transzkriptomikai profilt mutattak, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták. Ez megerősíti a korábbi tanulmányunkban közölt eredményeket, melyek azt mutatták, hogy az *FTO* elhízás rizikó genotípust hordozó, termogenezisre hajlamos humán nyaki eredetű adipocitákban alacsonyabb volt a termogénikus markerek - mint például a *CKMT1A/B*, *CITED1*, *PPARGC1A/B* és *CPT1B* - valamint a mitokondriális elektrontranszport és a zsírsav-anyagcsere génjeinek expressziója [Tóth és mtsai., 2020].

Az aktív hőtermelő adipociták nagyobb mennyiségű tápanyagot - például glükózt, zsírsavakat és aminosavakat - használnak fel, hogy elegendő „üzemanyagot” biztosítsanak a termogenezishez. E molekulák sejtekbe való juttatásának közvetítésében fontos szerepet játszanak az SLC transzporterek [Cypess és mtsai., 2009; Virtanen és mtsai., 2009; Wu és mtsai., 2006; Yoneshiro és mtsai., 2019]. Adataink azt mutatták, hogy a rizikó-mentes

genotípust hordozó aktív bézs adipociták magasabb ETO-R oxigénfogyasztást mutattak (23A. ábra), ami a fokozott szénhidrát- és aminosav-felhasználásukat tükrözi. Ezen sejtekben az *SLC7A10* gén által kódolt ASC-1 semleges aminosav-transzporter nagyobb mértékben fejeződött ki a fehér, illetve az inaktív bézs adipocitákhoz képest, melyek azonos TT genotípussal rendelkeztek, míg nem volt különbség az elhízás rizikó *FTO* allélokot hordozó három adipocita típus összehasonlításakor (23B, C. ábra). Az ASC-1-et a közelmúltban a humán SC zsírszövet energiametabolizmusának új szabályozójaként azonosították, amely fokozza a mitokondriális légzést, és megakadályozza a zsírsejt hipertrófia és az inzulinrezisztencia kialakulását [Jersin és mtsai., 2021]. Korábbi tanulmányunk arról számolt be, hogy a szerin, a cisztein és a glicin ASC-1 által közvetített felvétele elengedhetetlen a hatékony adrenerg stimulációra adott termogenikus válaszhoz humán nyaki eredetű adipocitákban [Arianti és mtsai., 2021]. Az ASC-1 szerepét a zsírszövetben Jersin és munkatársai átfogóan megvizsgálták, mely során kiemelték jótékony hatását a mitokondriális aktivitás fokozására, valamint a fehér zsírsejtek reaktív oxigéngyökök termelésének csökkentésére [Jersin és mtsai., 2022]. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a szerin és a cisztein fogyasztása magasabb volt a rizikó-mentes *FTO* alléleket hordozó aktív bézs adipocitákban, mint a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtekben (23E, F. ábra). Ezen aminosavak alacsonyabb fogyasztását figyeltük meg az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipocitákban a rizikó-mentes allélhordozókhoz képest. Ezen túlmenően megfigyeltük, hogy az elhízás rizikó *FTO* alléleket hordozó aktív bézs adipociták kevesebb glicint bocsátanak ki, mint a rizikó-mentes allélokkal rendelkezők (23G. ábra). A szerin fontos metabolikus forrás az emlőssejtekben az egy-szénatomos töredékek létrehozásához [de Koning és mtsai., 2003], amelyeket az SHMT enzim mindkét izoformája - az SHMT1 (citoszolikus) és az SHMT2 (mitokondriális) - termel. A reakció során emellett glicin keletkezik. Adataink azt mutatták, hogy az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív bézs adipociták alacsonyabb mértékben expresszálják az SHMT1-et, mint a rizikó-mentes allélhordozók, ami arra utal, hogy az elhízás rizikó genotípusú termogenikus adipocitákban alacsonyabb az egy-szénatomos töredékek termelése (24A, B. ábra). Azt is megfigyeltük, hogy az egy-szénatomos töredékek anyagcseréjének génexpressziós útvonala - amelyben az SHMT1 és a GPT2 részt vesz - kevésbé expresszálódik az elhízás rizikó *FTO* alléleket hordozó aktív bézs adipocitákban (19B, C. ábra). Az egy-szénatomos töredékek metabolizmusa funkcionális kölcsönhatást alakít ki a mitokondriális oxidatív foszforilációval, amely kulcsfontosságú az ATP vagy a hőtermelés szempontjából emlőssejtekben [Lucas és mtsai., 2018]. Az alacsonyabb szerin felvétel, amely az egy-szénatomos töredékek szintjének csökkenését eredményezheti, az I., II. és IV.

mitokondriális komplexek alegységének alacsonyabb mennyiségéhez vezethet az *FTO* elhízás rizikó genotípust hordozó aktív bézs adipocitákban. Ennek eredményeként, a stimulált maximális és a protoncsorgásos légzés - amely pozitív korrelációt mutat az UCP1 aktivitással - valamint az extracelluláris savasodás csökkent az elhízás rizikó *FTO* genotípusú aktív bézs adipocitákban (21, 22. ábra).

A rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipociták nagyobb mennyiségű glutamint fogyasztottak, mint az azonos allélokot hordozó fehér vagy inaktív bézs zsírsejtek. Az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozó adipociták azonban nem fogyasztottak glutamint, függetlenül az alkalmazott differenciációs protokolltól (25C. ábra). A glutamin a legnagyobb mennyiségben előforduló szabad aminosav a keringésben [Hall és mtsai., 1996] és az alkalmazott DMEM-F12 sejttenyésztő tápfolyadékban, így az egyik fő „üzemanyag”-forrás a sejtek számára a TCA-ciklus működtetéséhez és az ATP (vagy hő) előállításához [Scalise és mtsai., 2016]. A GPT2 alacsonyabb expressziója és a mérsékelt glutamin fogyasztás hozzájárulhat a piruvát metabolizmus és a TCA ciklus lelassulásához az elhízás rizikó allélokkal rendelkező aktív bézs adipocitákban. Ezenkívül egér WAT-ban a nátrium-függő 2-es típusú semleges aminosav transzporter (ASCT2)/SLC1A5 által közvetített glutaminfelvétel fontos a hisztonok acetilezésében és metilációjában. Az elhízott egerek WAT-jában, az alacsonyabb PPAR γ expresszió következményeként, az ASCT2 leszabályozása csökkent glutaminfelvételhez vezetett, mely korrelált a H3K27ac és H3K4me3 csökkenésével a *Bmal1* promoterénél [Wang és mtsai., 2022]. Egy nemrégiben megjelent publikáció arról számolt be, hogy adipocitákban az ASC-1 működésének zavara a lipidraktározás növekedéséhez vezetett, és a zsírsejtek a glutamát és aszpartát kibocsátás helyett fogyasztották azokat [Jersin és mtsai., 2023]. Adataink azt mutatták, hogy az *FTO* rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipociták - amelyek a legnagyobb mértékben expresszálták az ASC-1-et - kevesebb aszpartátot fogyasztottak, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták. A glutamátot fogyasztó fehér adipocitákkal ellentétben az aktív bézs adipociták az extracelluláris térbe bocsátották ki azt (25. ábra). Eredményeink összességében azt sugallják, hogy az elhízás rizikó *FTO* alléleket hordozó abdominális SC szövetből származó adipociták többféle aminosavból – melyek intracelluláris metabolikus folyamatok szubsztrátjai lehetnek – kevesebbet vesznek fel, ami hozzájárulhat az energiefelhasználás csökkenéséhez (27. ábra).



27. ábra: Az elhízás rizikó *FTO* allélokkal rendelkező aktív bézs adipociták alacsonyabb ASC-1 semleges aminosav transzporter expressziót és kevesebb Ala, Ser, Cys és Gly fogyasztást mutattak a rizikó-mentes hordozókhoz képest

Az *FTO* rs1421085 SNP és az elhízás vagy a megnövekedett TTI közötti pozitív korrelációt számos populációban megfigyelték, mint például észt [Katus és mtsai., 2020] és kínai gyermekeknél [Wang és mtsai., 2013], iráni felnőtteknél [Najd-Hassan-Bonab és mtsai., 2022], arab [Hebbar és mtsai., 2020], pakisztáni [Rana és Bhatti, 2020], balinéz [Priliani és mtsai., 2020] és mexikói maja lányoknál [González-Herrera és mtsai., 2019]. Több mint 100 000 európai származású, cukorbetegségben nem szenvedő egyén adatainak GWAS meta-analízise során kiderült, hogy az *FTO* rs1421085 SNP szignifikánsan összefügg az éhgyomri inzulinszinttel [Scott és mtsai., 2012]. Laber és munkatársai (2021) kimutatták, hogy egerekben az rs1421085 konzervált cisz-szabályozó moduljának delécioja megakadályozta a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízást, csökkentette a teljes test zsírtömegét és megnövelte a mitokondriumok számát a WAT-ban. Bemutatott adataink rávilágítanak az *FTO* rs1421085 SNP kritikus hatására a humán abdominális SC adipocitákban, amennyiben azok termogenezisre aktiválódnak. Leitner és munkatársai (2017) arról számoltak be, hogy nagy mennyiségben barnítható zsírsejtek találhatóak az abdominális SC zsírban, amelyek *in vivo* relevanciája embereknél még mindig nem tisztázott. Ezenkívül továbbra is kihívást jelent ezeknek a zsírsejteknek az aktiválása embereknél a túlsúly csökkentése érdekében. Bár ezek a sejtek potenciálisan aktiválhatók, korábbi [Tóth és mtsai., 2020] és jelenlegi eredményeink rámutattak az *FTO* rs1421085 SNP elhízás rizikó genotípusának – melynek prevalenciája magas az európai populációban [Dina és mtsai., 2007; Babenko és mtsai., 2019; Hudek és mtsai., 2017] és mexikói gyerekek esetében (12,93%–18,67%) [González-Herrera és mtsai., 2019] – erős hatására, melyet le kell küzdeni a hatékony termogenezis és a súlycsökkenés

érdekében. Eredményeink tovább bizonyítják a genetikai háttér jelentőségét nemcsak az elhízás patogenezisében, hanem a termogenezishez kapcsolódó, energiefel szabadítást célzó új terápiás megközelítések potenciális hatékonyságában is.

7. Összefoglalás

Korábban rágcsgáló modellekben kimutatták, hogy a barnulást kiváltó inger megszűnésekor, a parkin-függő mitofágia aktiválódik, és inaktív bézs adipociták jönnek létre. Emberben azonban eddig még nem vizsgálták részletesen a bézsből fehérbe történő átalakulás molekuláris eseményeit. Kísérleteink során a humán primer SC abdominális preadipocitákat 14 napig bézs adipocitává differenciáltattuk, majd vagy a bézs tenyésztési körülményeket alkalmaztuk további 14 napig, vagy fehér differenciációs médiummal helyettesítettük azt. A kontroll fehér zsírsejteket 28 napon át specifikus hormonális koktéllal differenciáltattuk. A PPAR γ -vezérelt bézs differenciáció megnövekedett mitokondriális biogenezist, UCP1 expressziót, fragmentációt és légzést eredményezett a fehérhez képest. Az átalakuláson átesett adipociták morfológiája, UCP1-tartalma, mitokondriális fragmentációja és bazális légzése, valamint a mitofágia indukciója nem tért el szignifikánsan a kontroll fehér adipocitákhoz hasonlítva. A bézs-fehér átalakuláson átesett adipociták azonban erősebben reagáltak az adrenerg ingert utánzó dibutiril-cAMP-re, mint a kontroll fehér zsírsejtek. A génexpressziós változások azt mutatták, hogy a mitofágia az átalakuló adipocitákban parkin-függő és -független útvonalakat is magában foglalhat. A bézs adipociták inaktív állapotba kerülésének megakadályozása fenntarthatja a folyamatos, magas termogenezist és energia felszabadítást.

RNS-szekvenálást végeztünk a különböző *FTO* allélokot hordozó adipociták génexpressziós mintázatának vizsgálatára. Kísérleteink során a korábban használt bézs differenciációs protokollt kiegészítettük egy 4 órás 500 μ M-os dibutiril-cAMP kezeléssel, mellyel nagyobb termogenikus potenciállal rendelkező aktív bézs adipocitákat kaptunk. Megfigyeltük, hogy a rizikó-mentes TT alléleket hordozó aktív bézs adipociták magasabb barna adipocita tartalommal és barnulási kapacitással rendelkeztek, mint a fehér vagy az inaktív bézs sejtek, azonban az elhízás rizikó CC genotípusúak esetében nem tapasztaltunk hasonló szignifikáns különbséget. Az *FTO* CC alléleket hordozó aktív bézs adipociták alacsonyabb termogenikus génexpresszióval (például *UCP1*, *PM20D1*, *CIDEA*) és protoncsorgásos légzéssel mért termogenezissel rendelkeztek, mint a TT hordozók. Ezen túlmenően, a CC allélokkal rendelkező aktív bézs adipociták alacsonyabb ASC-1 (*SLC7A10* kódolja) semleges aminosav transzporter expressziót és kevesebb Ala, Ser, Cys és Gly fogyasztást mutattak a rizikó-mentes genotípusúakéhoz képest. Az *FTO* rs1421085 SNP vizsgálata során vizsgáltuk annak kizárólagos és kritikus hatását a zsírsejtek termogenezisre történő aktivációjára, azonban a fehér és az inaktív bézs adipocitákra nem figyeltük meg szignifikáns hatását.

Summary

It has previously been shown in rodent models that when the browning stimulus is removed, parkin-dependent mitophagy is activated and inactive beige adipocytes are generated. However, in humans the molecular mechanisms of this beige to white transition have not yet been investigated in detail. In our experiments, human primary subcutaneous abdominal preadipocytes were differentiated into beige adipocytes for 14 days, then either the beige culture medium was used for another 14 days, or it was replaced with the white differentiation medium. The control white adipocytes were differentiated with a specific hormonal cocktail for 28 days. PPAR γ -driven beige differentiation resulted in increased mitochondrial biogenesis, UCP1 expression, fragmentation, and respiration compared to white. Cellular morphology, UCP1 content, mitochondrial fragmentation, basal respiration, and mitophagy induction of the transitioned adipocytes were similar to those of control white adipocytes. However, adipocytes undergoing beige to white transition responded more robustly to dibutyryl-cAMP - which mimics the adrenergic stimulus - than control white ones. Gene expression changes indicated that mitochondrial removal in transitioning adipocytes may involve both parkin-dependent and independent pathways. The avoidance of the inactive state of beige adipocytes can maintain continuous high thermogenesis and energy release.

Next, RNA-sequencing was performed to examine the gene expression pattern of adipocytes carrying different *FTO* alleles. In our experiments, we supplemented the previously used beige differentiation protocol with a 4-hour 500 μ M dibutyryl-cAMP treatment, which resulted in active beige adipocytes with higher thermogenic potential. We observed that active beige adipocytes carrying risk-free TT alleles have a higher brown adipocyte content and browning capacity than the white or inactive beige adipocytes, however, no similar significant difference was observed in the case of obesity-risk CC genotype carriers. Active beige adipocytes carrying *FTO* CC alleles had lower thermogenic gene expression (e.g. *UCP1*, *PM20D1*, *CIDEA*) and thermogenesis measured by proton leak respiration than TT carriers. In addition, active beige adipocytes with CC alleles showed lower ASC-1 (encoded by *SLC7A10*) neutral amino acid transporter expression and less consumption of Ala, Ser, Cys, and Gly compared to risk-free allele carriers. We did not observe an effect of the *FTO* rs1421085 SNP on white and inactive beige adipocytes, highlighting its exclusive and critical effect on adipocyte thermogenesis activation.

8. Irodalomjegyzék

1. Altshuler-Keylin S., Kajimura S. (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal.* 10, eaai9248. doi: 10.1126/scisignal.aai9248.
2. Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., Yang, Y., Perera, R.M., Debnath, J., Kajimura, S. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* 24, 402-419. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.002.
3. Arianti R., Vinnai B.Á., Tóth B.B., Shaw A., Csősz É., Vámos A., Győry F., Fischer-Posovszky P., Wabitsch M., Kristóf E., Fésüs L. (2021). ASC-1 transporter-dependent amino acid uptake is required for the efficient thermogenic response of human adipocytes to adrenergic stimulation. *FEBS Lett.* 595, 2085-2098. doi: 10.1002/1873-3468.14155.
4. Babenko V., Babenko R., Gamiieldien J., Markel A. (2019). FTO haplotyping underlines high obesity risk for European populations. *BMC Med Genomics.* 12, 46. doi: 10.1186/s12920-019-0491-x.
5. Banerji M.A., Faridi N., Atluri R., Chaiken R.L., Lebovitz H.E. (1999). Body composition, visceral fat, leptin, and insulin resistance in Asian Indian men. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 137-44. doi: 10.1210/jcem.84.1.5371.
6. Basse A.L., Isidor M.S., Winther S., Skjoldborg N.B., Murholm M., Andersen E.S., Pedersen S.B., Wolfrum C., Quistorff B., Hansen J.B. (2017). Regulation of glycolysis in brown adipocytes by HIF-1 α . *Sci Rep.* 7, 4052. doi: 10.1038/s41598-017-04246-y.
7. Blecher M. (1971). Biological effects and catabolic metabolism of 3',5'-cyclic nucleotides and derivatives in rat adipose tissue and liver. *Metabolism.* 20, 63-77. doi: 10.1016/0026-0495(71)90060-6.
8. Boissel S., Reish O., Proulx K., Kawagoe-Takaki H., Sedgwick B., Yeo G.S., Meyre D., Golzio C., Molinari F., Kadhom N., Etchevers H.C., Saudek V., Farooqi I.S., Froguel P., Lindahl T., O'Rahilly S., Munnich A., Colleaux L. (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet.* 85, 106-11. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.002.
9. Boutant M., Joffraud M., Kulkarni S.S., García-Casarrubios E., García-Roves P.M., Ratajczak J., Fernández-Marcos P.J., Valverde A.M., Serrano M., Cantó C. (2015). SIRT1 enhances glucose tolerance by potentiating brown adipose tissue function. *Mol Metabol.* 4, 118–131. doi: 10.1016/j.molmet.2014.12.008.
10. Brownstein A.J., Veliova M., Acin-Perez R., Liesa M., Shirihai O.S. (2022). ATP-consuming futile cycles as energy dissipating mechanisms to counteract obesity. *Rev Endocr Metab Disord.* 23, 121-131. doi: 10.1007/s11154-021-09690-w.
11. Altshuler-Keylin S., Kajimura S. (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal.* 10, eaai9248. doi: 10.1126/scisignal.aai9248.
12. Cancellato R., Zingaretti M.C., Sarzani R., Ricquier D., Cinti S. (1998). Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology.* 139, 4747–7. doi: 10.1210/endo.139.11.6434.
13. Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003.
14. Cantó C., Houtkooper R.H., Pirinen E., Youn D.Y., Oosterveer M.H., Cen Y., Fernandez-Marcos P.J., Yamamoto H., Andreux P.A., Cettour-Rose P., Gademann K., Rinsch C., Schoonjans K., Sauve A.A., Auwerx J. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide

- riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* 15, 838–847. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.022.
14. Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3057-67. doi: 10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004.
 15. Chan, M., Lim, Y. C., Yang, J., Namwanje, M., Liu, L., & Qiang, L. (2019). Identification of a natural beige adipose depot in mice. *The Journal of biological chemistry.* 294, 6751–6761. doi: 10.1074/jbc.RA118.006838.
 16. Cheng Y, Jiang L, Keipert S, Zhang S, Hauser A, Graf E, Strom T, Tschöp M, Jastroch M, Perocchi F. (2018). Prediction of Adipose Browning Capacity by Systematic Integration of Transcriptional Profiles. *Cell Rep.* 23, 3112-3125. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.021.
 17. Cheng, L., Wang, J., Dai, H., Duan, Y., An, Y., Shi, L., Lv, Y., Li, H., Wang, C., Ma, Q., Li, Y., Li, P., Du, H., & Zhao, B. (2021). Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte.* 10, 48–65. doi.org/10.1080/21623945.2020.1870060.
 18. Chitraju C., Fischer A.W., Farese R.V. Jr., Walther T.C. (2020). Lipid Droplets in Brown Adipose Tissue Are Dispensable for Cold-Induced Thermogenesis. *Cell Rep.* 33, 108348. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108348. Altshuler-Keylin S., Kajimura S. (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal.* 10, eaai9248. doi: 10.1126/scisignal.aai9248.
 19. Christakis, N. A., & Fowler, J. H. (2007). The spread of obesity in a large social network over 32 years. *The New England journal of medicine.* 357, 370–379. doi: 10.1056/NEJMsa066082.
 20. Christopher LR, Edward MM. (2020). UCP3 plays a complementary role to UCP1 in brown adipose tissue mitochondrial bioenergetics. *bioRxiv* 2020.03.24.003442.
 21. Church C., Moir L., McMurray F., Girard C., Banks G.T., Teboul L., Wells S., Brüning J.C., Nolan P.M., Ashcroft F.M., Cox R.D. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 42, 1086-92. doi: 10.1038/ng.713.
 22. Cinti S., Frederich R.C., Zingaretti M.C., De Matteis R., Flier J.S., Lowell B.B. (1997). Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology.* 138, 797–804. doi: 10.1210/endo.138.2.4908.
 23. Cohen, P, Kajimura, S. (2021). The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22, 393-409, doi:10.1038/s41580-021-00350-0.
 24. Corsa, C.A.S., Pearson, G.L., Renberg, A., Askar, M.M., Vozheiko, T., MacDougald, O.A., Soleimanpour, S.A. (2019). The E3 ubiquitin ligase parkin is dispensable for metabolic homeostasis in murine pancreatic β cells and adipocytes. *J. Biol. Chem.* 294, 7296-7307. doi: 10.1074/jbc.RA118.006763.
 25. Costa J., Braga P.C., Rebelo I., Oliveira P.F., Alves M.G. (2023). Mitochondria Quality Control and Male Fertility. *Biology (Basel).* 12, 827. doi: 10.3390/biology12060827.
 26. Cypess, A M, White, A P, Vernochet, C, Schulz, TJ, Xue, R, Sass, CA, Huang, TL, Roberts-Toler, C, Weiner, LS, Sze, C, Chacko, AT, Deschamps, LN., Herder, LM, Truchan, N, Glasgow, AL, Holman, AR, Gavrilu, A, Hasselgren, PO, Mori, MA, Molla, M, Tseng, YH (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature medicine.* 19, 635–639. doi: 10.1038/nm.3112.

27. Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509-17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780.
28. Daniel P.B., Walker W.H., Habener J.F. (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr.* 18, 353-83. doi: 10.1146/annurev.nutr.18.1.353.
29. de Araujo, T. M. Razolli D.S., Correa-da-Silva F., de Lima-Junior J.C., Gaspar R.S., Sidarta-Oliveira D., Victorio S.C., Donato J. Jr, Kim Y.B., Velloso L.A. (2019). The partial inhibition of hypothalamic IRX3 exacerbates obesity. *EBioMedicine* 39, 448–460. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.048
30. de Koning T.J., Snell K., Duran M., Berger R., Poll-The B.T., Surtees R. (2003). L-serine in disease and development. *Biochem J.* 371, 653-61. doi: 10.1042/BJ20021785.
31. Dina C., Meyre D., Gallina S., Durand E., Körner A., Jacobson P., Carlsson L.M., Kiess W., Vatin V., Lecoœur C., Delplanque J., Vaillant E., Pattou F., Ruiz J., Weill J., Levy-Marchal C., Horber F., Potoczna N., Hercberg S., Le Stunff C., Bougnères P., Kovacs P., Marre M., Balkau B., Cauchi S., Chèvre J.C., Froguel P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 39, 724-6. doi: 10.1038/ng2048.
32. Doan-Xuan QM, Sarvari AK, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Balajthy Z, Fesus L, Bacso Z. (2013). High content analysis of differentiation and cell death in human adipocytes. *Cytometry A.* 83, 933-43. doi: 10.1002/cyto.a.22333.
33. Dolman, N.J., Chambers, K.M., Mandavilli, B., Batchelor, R.H., Janes, M.S. (2013). Tools and techniques to measure mitophagy using fluorescence microscopy. *Autophagy.* 9, 1653-62. doi: 10.4161/auto.24001.
34. Dranka, B.P., Benavides, G.A., Diers, A.R., Giordano, S., Zelickson, B.R., Reily, C., Zou, L., Chatham, J.C., Hill, B.G., Zhang, J., et al. (2011). Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1621-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005.
35. Dykstra, J.A., Facile, T., Patrick, R.J., Francis, K.R., Milanovich, S., Weimer, J.M., Kota, D.J. (2017). Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1096-1108. doi: 10.1002/sctm.16-0337.
36. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, Pénicaud L, Kristiansen K, Bouloumié A, Casteilla L, Dani C, Ailhaud G, Amri EZ. (2009). Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells.* 27, 2753-60. doi: 10.1002/stem.200.
37. Fedorenko, A, Lishko, PV, Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 151, 400-413, doi:10.1016/j.cell.2012.09.010.
38. Fischer J., Koch L., Emmerling C., Vierkotten J., Peters T., Brüning J.C., Rütter U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature.* 458, 894-8. doi: 10.1038/nature07848.
39. Fischer-Posovszky P., Newell F.S., Wabitsch M., Tornqvist H.E. (2008). Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts.* 1, 184-9. doi: 10.1159/000145784.
40. Forner F., Kumar C., Lubber C.A., Fromme T., Klingenspor M., Mann M. (2009) Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab.* 10, 324-35. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.014.

41. Frayling T.M., Timpson N.J., Weedon M.N., Zeggini E., Freathy R.M., Lindgren C.M., Perry J.R., Elliott K.S., Lango H., Rayner N.W. Shields B., Harries L.W., Barrett J.C., Ellard S., Groves C.J., Knight B., Patch A.M., Ness A.R., Ebrahim S., Lawlor D.A., Ring S.M., Ben-Shlomo Y., Jarvelin M.R., Sovio U., Bennett A.J., Melzer D., Ferrucci L., Loos R.J., Barroso I., Wareham N.J., Karpe F., Owen K.R., Cardon L.R., Walker M., Hitman G.A., Palmer C.N., Doney A.S., Morris A.D., Smith G.D., Hattersley A.T., McCarthy M.I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 316, 889-94. doi: 10.1126/science.1141634.
42. Frühbeck, G., Kiortsis, D. N., & Catalán, V. (2018). Precision medicine: diagnosis and management of obesity. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 6, 164–166. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30312-1.
43. Frühbeck, G., Toplak, H., Woodward, E., Yumuk, V., Maislos, M., Oppert, J. M., & Executive Committee of the European Association for the Study of Obesity (2013). Obesity: the gateway to ill health - an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. *Obesity facts*. 6, 117–120. doi: 10.1159/000350627.
44. Fujimoto W.Y., Abbate S.L., Kahn S.E., Hokanson J.E., Brunzell J.D. (1994). The visceral adiposity syndrome in Japanese-American men. *Obes Res*. 2, 364-71. doi: 10.1002/j.1550-8528.1994.tb00076.x.
45. Funcke, J.B., Scherer, P.E. (2019). Beyond adiponectin and leptin: Adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J Lipid Res*. 60, 1648-1684. doi: 10.1194/jlr.R094060.
46. García-Pérez, B.E., González-Rojas, J.A., Salazar, M.I., Torres-Torres, C., Castrejón-Jiménez, N.S. (2020). Taming the Autophagy as a Strategy for Treating COVID-19. *Cells*. 9, 2679. doi: 10.3390/cells9122679.
47. Gerken T., Girard C.A., Tung Y.C., Webby C.J., Saudek V., Hewitson K.S., Yeo G.S., McDonough M.A., Cunliffe S., McNeill L.A., Galvanovskis J., Rorsman P., Robins P., Prieur X., Coll A.P., Ma M., Jovanovic Z., Farooqi I.S., Sedgwick B., Barroso I., Lindahl T., Ponting C.P., Ashcroft F.M., O'Rahilly S., Schofield C.J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 318, 1469-72. doi: 10.1126/science.1151710.
48. Giordano A., Coppari R., Castellucci M., Cinti S. (2001). Sema3a is produced by brown adipocytes and its secretion is reduced following cold acclimation. *J Neurocytol*. 30, 5–10. doi: 10.1023/A:1011916822633.
49. Gong D.W., He Y., Karas M., Reitman M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*. 272, 24129–24132. doi: 10.1074/jbc.272.39.24129.
50. González-Herrera L., Zavala-Castro J., Ayala-Cáceres C., Pérez-Mendoza G., López-González M.J., Pinto-Escalante D., Canto-Cetina T., García-Escalante M.G., Rubi-Castellanos R., Contreras-Capetillo S., Herrera-Sanchez F., Méndez-Domínguez N., Alcocer-Gamboa A. (2019). Genetic variation of FTO: rs1421085 T>C, rs8057044 G>A, rs9939609 T>A, and copy number (CNV) in Mexican Mayan school-aged children with obesity/overweight and with normal weight. *Am J Hum Biol*. 31, e23192. doi: 10.1002/ajhb.23192.

51. Gospodarska E., Nowialis P., Kozak L.P. (2015). Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *J Biol Chem.* 290, 8243–55. doi: 10.1074/jbc.M115.637785.
52. Guennoun, A., Kazantzis, M., Thomas, R., Wabitsch, M., Tews, D., Seetharama Sastry, K., Abdelkarim, M., Zilberfarb, V., Strosberg, A.D., Chouchane, L. (2015). Comprehensive molecular characterization of human adipocytes reveals a transient brown phenotype. *J. Transl. Med.* 13, 135. doi: 10.1186/s12967-015-0480-6.
53. Haim, Y., Blüher, M., Slutsky, N., Goldstein, N., Klöting, N., Harman-Boehm, I., Kirshtein, B., Ginsberg, D., Gericke, M., Guiu Jurado, E., et al. (2015). Elevated autophagy gene expression in adipose tissue of obese humans: A potential non-cell-cycle-dependent function of E2F1. *Autophagy.* 11, 2074-2088. doi: 10.1080/15548627.2015.1094597.
54. Halbgebauer, D., Dahlhaus, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Tews, D. (2020). Browning capabilities of human primary adipose-derived stromal cells compared to SGBS cells. *Sci. Rep.* 10, 9632. doi: 10.1038/s41598-020-64369-7.
55. Hall J.C., Heel K., McCauley R. (1998). Glutamine. *Br J Surg.* 83, 305-12. doi: 10.1002/bjs.1800830306.
56. Hallberg, M., Morganstein, D.L., Kiskinis, E., Shah, K., Kralli, A., Dilworth, S.M., White, R., Parker, M.G., Christian, M. (2008). A functional interaction between RIP140 and PGC-1 α regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol.* 28, 6785-95. doi: 10.1128/MCB.00504-08.
57. Hanna R.A., Quinsay M.N., Orogo A.M., Giang K., Rikka S., Gustafsson Å.B. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem.* 287, 19094–19104. doi: 10.1074/jbc.M111.322933.
58. Heaton J.M. (1972). The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat.* 112, 35-9.
59. Hebbar P., Abu-Farha M., Mohammad A., Alkayal F., Melhem M., Abubaker J., Al-Mulla F., Thanaraj T.A. (2020). FTO Variant rs1421085 Associates With Increased Body Weight, Soft Lean Mass, and Total Body Water Through Interaction With Ghrelin and Apolipoproteins in Arab Population. *Front Genet.* 10, 1411. doi: 10.3389/fgene.2019.01411.
60. Heo J.M., Ordureau A., Paulo J.A., Rinehart J., Harper J.W. (2015). The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell.* 60, 7–20. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.016.
61. Herman M.A., Rosen E.D. (2015). Making Biological Sense of GWAS Data: Lessons from the FTO Locus. *Cell Metab.* 22, 538-9. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.018.
62. Heymsfield, S. B., & Wadden, T. A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*, 376, 254–266. doi: 10.1056/NEJMra1514009.
63. Hilse K.E., Kalinovich A.V., Rupprecht A., Smorodchenko A., Zeitz U., Staniek K., Erben R.G., Pohl E.E. (2016). The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1857, 72–78. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.10.011.
64. Hoffmann A., Ebert T., Hankir M.K., Flehmig G., Klöting N., Jessnitzer B., Lössner U., Stumvoll M., Blüher M., Fasshauer M., Tönjes A., Miehle K., Kralisch S. (2021). Leptin

- improves parameters of brown adipose tissue thermogenesis in lipodystrophic mice. *Nutrients*. 13, 2499. doi: 10.3390/nu13082499.
65. Huang, J., Linares, J.F., Duran, A., Xia, W., Saltiel, A.R., Müller, T.D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J. (2021). NBR1 is a critical step in the repression of thermogenesis of p62-deficient adipocytes through PPAR γ . *Nat. Commun.* 12, 2876. doi: 10.1038/s41467-021-23085-0.
 66. Huđek A., Škara L., Smolkovič B., Kazazić S., Ravlić S., Nanić L., Osvatić M.M., Jelčić J., Rubelj I., Bačun-Družina V. (2017). Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085, and GG rs17817449 and saliva containing *Staphylococcus aureus* in obese women in Croatia. *Nutr Res.* 50, 94-103. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.005.
 - Altshuler-Keylin S., Kajimura S. (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal.* 10, eaai9248. doi: 10.1126/scisignal.aai9248.
 67. Ikeda K., Maretich P., Kajimura S. (2018) The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab.* 29, 191-200. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.001.
 68. Jarett L., Smith R.M. (1974). Mode of action of N⁶-O^{2'}-dibutyryl cyclic 3',5' AMP on fat cell metabolism. *Diabetes.* 23, 29-40. doi: 10.2337/diab.23.1.29.
 69. Jeninga, E.H., Bugge, A., Nielsen, R., Kersten, S., Hamers, N., Dani, C., Wabitsch, M., Berger, R., Stunnenberg, H.G., Mandrup, S., et al. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the anti-lipolytic G-protein-coupled receptor 81 (GPR81/Gpr81). *J. Biol. Chem.* 284, 26385-93. doi: 10.1074/jbc.M109.040741.
 70. Jersin R.Å., Jonassen L.R., Dankel S.N. (2022). The neutral amino acid transporter SLC7A10 in adipose tissue, obesity and insulin resistance. *Front Cell Dev Biol.* 10, 974338. doi: 10.3389/fcell.2022.974338.
 71. Jersin R.Å., Sri Priyanka Tallapragada D., Skartveit L., Bjune M.S., Muniandy M., Lee-Ødegård S., Heinonen S., Alvarez M., Birkeland K.I., André Drevon C., Pajukanta P., McCann A., Pietiläinen K.H., Claussnitzer M., Mellgren G., Dankel S.N. (2023). Impaired Adipocyte SLC7A10 Promotes Lipid Storage in Association With Insulin Resistance and Altered BCAA Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 108, 2217-2229. doi: 10.1210/clinem/dgad148.
 72. Jersin R.Å., Tallapragada D.S.P., Madsen A., Skartveit L., Fjære E., McCann A., Lawrence-Archer L., Willems A., Bjune J.I., Bjune M.S., Våge V., Nielsen H.J., Thorsen H.L., Nedrebø B.G., Busch C., Steen V.M., Blüher M., Jacobson P., Svensson P.A., Fernø J., Rydén M., Arner P., Nygård O., Claussnitzer M., Ellingsen S., Madsen L., Sagen J.V., Mellgren G., Dankel S.N. (2021). Role of the Neutral Amino Acid Transporter SLC7A10 in Adipocyte Lipid Storage, Obesity, and Insulin Resistance. *Diabetes.* 70, 680-695. doi: 10.2337/db20-0096.
 73. Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Dagaard, S., Homøe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., et al. (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17, 798-805. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.011.
 74. Jimenez-Munoz, C.M., López, M., Albericio, F., Makowski, K. (2021). Targeting Energy Expenditure-Drugs for Obesity Treatment. *Pharmaceuticals (Basel).* 14, 435. doi:10.3390/ph14050435.

75. Katsuragi, Y., Ichimura, Y., Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 282, 4672-8. doi: 10.1111/febs.13540.
76. Katus U., Villa I., Ringmets I., Vaht M., Mäestu E., Mäestu J., Veidebaum T., Harro J. (2020). Association of FTO rs1421085 with obesity, diet, physical activity, and socioeconomic status: A longitudinal birth cohort study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 30, 948-959. doi: 10.1016/j.numecd.2020.02.008.
77. Kazak L., Chouchani E.T., Jedrychowski M.P., Erickson B.K., Shinoda K., Cohen P., Vetrivelan R., Lu G.Z., Laznik-Bogoslavski D., Hasenfuss S.C., Kajimura S., Gygi S.P., Spiegelman B.M. (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell.* 163, 643-55. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.035.
78. Kazak L., Chouchani E.T., Lu G.Z., Jedrychowski M.P., Bare C.J., Mina A.I., Kumari M., Zhang S., Vuckovic I., Laznik-Bogoslavski D., Dzeja P., Banks A.S., Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2017). Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity. *Cell Metab.* 26, 660–71.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.009.
79. Kazak L., Rahbani J.F., Samborska B., Lu G.Z., Jedrychowski M.P., Lajoie M., Zhang S., Ramsay L., Dou F.Y., Tenen D., Chouchani E.T., Dzeja P., Watson I.R., Tsai L., Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2019). Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nat Metab.* 1, 360–370. doi: 10.1038/s42255-019-0035-x.
- Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., Yang, Y., Perera, R.M., Debnath, J., Kajimura, S. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* 24, 402-419. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.002.
80. Kirkin V., Lamark T., Sou Y.S., Bjørkøy G., Nunn J.L., Bruun J.A., Shvets E., McEwan D.G., Clausen T.H., Wild P., Bilusic I., Theurillat J.P., Øvervatn A., Ishii T., Elazar Z., Komatsu M., Dikic I., Johansen T. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell.* 33, 505–516. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020
81. Klusóczki Á., Veréb Z., Vámos A., Fischer-Posovszky P., Wabitsch M., Bacso Z., Fésüs L., Kristóf E. (2019). Differentiating SGBS adipocytes respond to PPAR γ stimulation, irisin and BMP7 by functional browning and beige characteristics. *Sci. Rep.* 9, 5823. doi: 10.1038/s41598-019-42256-0.
82. Koppen, A., Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: The PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett.* 584, 3250-9. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.035.
83. Kosacka, J., Kern, M., Klötting, N., Paeschke, S., Rudich, A., Haim, Y., Gericke, M., Serke, H., Stumvoll, M., Bechmann, I., et al. (2015). Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 409, 21-32. doi: 10.1016/j.mce.2015.03.015.
84. Kotzbeck P., Giordano A., Mondini E., Murano I., Severi I., Venema W., Cecchini M.P., Kershaw E.E., Barbatelli G., Haemmerle G., Zechner R., Cinti S. (2018). Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res.* 59, 784–94. doi: 10.1194/jlr.M079665.
85. Kovács G és Szász D. (2012). Az elhízás. *TÁMOP-6 1.2-11/1-2012-1441.*
86. Kristóf E., Doan-Xuan Q.M., Bai P., Bacso Z., Fésüs L. (2015). Laser-scanning cytometry can quantify human adipocyte browning and proves effectiveness of irisin. *Sci Rep.* 5, 12540. doi: 10.1038/srep12540.
87. Kristóf E., Klusóczki Á., Veress R., Shaw A., Combi Z., Varga K., Gyóry F., Balajthy Z., Bai P., Bacso Z., Fésüs L. (2019). Interleukin-6 released from differentiating human beige

- adipocytes improves browning. *Exp Cell Res.* 377, 47-55. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.02.015.
88. Laber S., Forcisi S., Bentley L., Petzold J., Moritz F., Smirnov K.S., Al Sadat L., Williamson I., Strobel S., Agnew T., Sengupta S., Nicol T., Grallert H., Heier M., Honecker J., Mianne J., Teboul L., Dumbell R., Long H., Simon M., Lindgren C., Bickmore W.A., Hauner H., Schmitt-Kopplin P., Claussnitzer M., Cox R.D. (2021). Linking the FTO obesity rs1421085 variant circuitry to cellular, metabolic, and organismal phenotypes in vivo. *Sci Adv.* 7, eabg0108. doi: 10.1126/sciadv.abg0108.
 89. Lamb C.A., Yoshimori T., Tooze S.A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774. doi: 10.1038/nrm3696.
 90. Lan N., Lu Y., Zhang Y., Pu S., Xi H., Nie X., Liu J., Yuan W. (2020). FTO - A Common Genetic Basis for Obesity and Cancer. *Front Genet.* 16,11, 559138. doi: 10.3389/fgene.2020.559138.
 91. Lazarou M., Sliter D.A., Kane L.A., Sarraf S.A., Wang C., Burman J.L., Sideris D.P., Fogel A.I., Youle R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 524, 309–314. doi: 10.1038/nature14893.
 92. Lee M.K., Lee B., Kim C.Y. (2021). Natural extracts that stimulate adipocyte browning and their underlying mechanisms. *Antioxidants.* 10, 308. doi: 10.3390/antiox10020308.
 93. Lee, P., Greenfield, J.R., Ho, K.K., Fulham, M.J. (2010). A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E601-6. doi: 10.1152/ajpendo.00298.2010.
 94. Lee, P., Werner, C.D., Kebebew, E., Celi, F.S. (2014). Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes.* 38, 170-6. doi: 10.1038/ijo.2013.82.
 95. Lehrke, M., Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell.* 123, 993-9. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.026.
 96. Leitner, B.P., Huang, S., Brychta, R.J., Duckworth, C.J., Baskin, A.S., McGehee, S., Tal, I., Dieckmann, W., Gupta, G., Kolodny, G.M., et al. (2017). Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 8649-8654. doi: 10.1073/pnas.1705287114.
 97. Lemos G.O., Torrinhas R.S., Waitzberg D.L. (2023). Nutrients, Physical Activity, and Mitochondrial Dysfunction in the Setting of Metabolic Syndrome Nutrients. 15, 1217. doi: 10.3390/nu15051217.
 98. Lepper C., Fan C.M. (2010) Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis.* 48, 424-36. doi: 10.1002/dvg.20630.
 99. Levine B., Kroemer G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 176, 11–42. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048.
 100. Liebig M., von Praun C., Heldmaier G., Klingenspor M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiol Biochem Zool.* 77, 116–126. doi: 10.1086/381464
 101. Liesa, M., Shirihai, O.S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 17, 491-506. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.002.
 102. Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in endocrinology*, 12, 706978. doi: 10.3389/fendo.2021.706978.
 103. Liu L., Feng D., Chen G., Chen M., Zheng Q., Song P., Ma Q., Zhu C., Wang R., Qi W., Huang L., Xue P., Li B., Wang X., Jin H., Wang J., Yang F., Liu P., Zhu Y., Sui S.,

- Chen Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 14, 177–185. doi: 10.1038/ncb2422.
104. Liu S., Shen S., Yan Y., Sun C., Lu Z., Feng H., Ma Y., Tang Z., Yu J., Wu Y., Gereben B., Mohácsik P., Fekete C., Feng X., Yuan F., Guo F., Hu C., Shao M., Gao X., Zhao L., Li Y., Jiang J., Ying H. (2022). Triiodothyronine (T3) promotes brown fat hyperplasia via thyroid hormone receptor α mediated adipocyte progenitor cell proliferation. *Nat Commun.* 13, 3394. doi: 10.1038/s41467-022-31154-1.
105. London E, Stratakis CA. (2022). The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health. *Pharmacol Ther.* 237, 108113. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108113.
106. Loos, R. J. F., & Yeo, G. S. H. (2013). The bigger picture of FTO—the first GWAS-identified obesity gene. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 51–61. doi.org/10.1038/nrendo.2013.227
107. Lőrincz P., Juhász G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *J. Mol. Biol.* 432, 2462–2482. doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.028.
108. Lu X., Altshuler-Keylin S., Wang Q., Chen Y., Henrique Sponton C., Ikeda K., Maretich P., Yoneshiro T., Kajimura S. (2018). Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism. *Sci Signal.* 24, 11(527):eaap8526. doi: 10.1126/scisignal.aap8526.
109. Lu, X. (2019). Maintaining mitochondria in beige adipose tissue. *Adipocyte.* 8, 77-82. doi: 10.1080/21623945.2019.1574194.
110. Lucas S., Chen G., Aras S., Wang J. (2018). Serine catabolism is essential to maintain mitochondrial respiration in mammalian cells. *Life Sci Alliance.* 1, e201800036. doi: 10.26508/lsa.201800036.
111. Magkos, F., Fraterrigo, G., Yoshino, J., Luecking, C., Kirbach, K., Kelly, S. C., de Las Fuentes, L., He, S., Okunade, A. L., Patterson, B. W., & Klein, S. (2016). Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell metabolism.* 23, 591–601. doi: 10.1016/j.cmet.2016.02.005.
112. Mårin P., Andersson B., Ottosson M., Olbe L., Chowdhury B., Kvist H., Holm G., Sjöström L., Björntorp P. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 41, 1242-8. doi: 10.1016/0026-0495(92)90016-4.
113. Matsuzawa Y., Shimomura I., Nakamura T., Keno Y., Kotani K., Tokunaga K. (1995). Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Obes Res.* 3 Suppl 2:187S-194S. doi: 10.1002/j.1550-8528.1995.tb00462.x.
114. McLaughlin T., Lamendola C., Liu A., Abbasi F. (2011). Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 96, E1756-60. doi: 10.1210/jc.2011-0615.
115. Mendrick D.L., Diehl A.M., Topor L.S., Dietert R.R., Will Y., La Merrill M.A., Bouret S., Varma V., Hastings K.L., Schug T.T., Emeigh Hart S.G., Bureson F.G. (2018). Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic *Toxicol Sci.* 162, 36-42. doi: 10.1093/toxsci/kfx233.
116. Mills, E. L., Pierce, K. A., Jedrychowski, M. P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., Yoneshiro, T., Spinelli, J. B., Lu, G. Z., Kazak, L., Banks, A. S., Haigis, M. C., Kajimura, S., Murphy, M. P., Gygi, S. P., Clish, C. B., & Chouchani, E. T. (2018). Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature.* 560, 102–106. doi: 10.1038/s41586-018-0353-2.

117. Min, S.Y., Desai, A., Yang, Z., Sharma, A., DeSouza, T., Genga, R.M.J., Kucukural, A., Lifshitz, L.M., Nielsen, S., Scheele, C., et al. (2019). Diverse repertoire of human adipocyte subtypes develops from transcriptionally distinct mesenchymal progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 17970-17979. doi: 10.1073/pnas.1906512116.
118. Min, S.Y., Kady, J., Nam, M., Rojas-Rodriguez, R., Berkenwald, A., Kim, J.H., Noh, H.L., Kim, J.K., Cooper, M.P., Fitzgibbons, T., et al. (2016). Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat. Med.* 22, 312-8. doi: 10.1038/nm.4031.
119. Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 140, 313-26. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
120. Morales, P.E., Arias-Durán, C., Ávalos-Guajardo, Y., Aedo, G., Verdejo, H.E., Parra, V., Lavandero, S. (2020). Emerging role of mitophagy in cardiovascular physiology and pathology. *Mol. Asp. Med.* 71, 100822. doi: 10.1016/j.mam.2019.09.006.
121. Mottillo E.P., Balasubramanian P., Lee Y.H., Weng C., Kershaw E.E., Granneman J.G. (2014). Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res.* 55, 2276–2286. doi: 10.1194/jlr.M050005.
122. Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 94, 355–382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
123. Murakawa T., Yamaguchi O., Hashimoto A., Hikoso S., Takeda T., Oka T., Yasui H., Ueda H., Akazawa Y., Nakayama H., Taneike M., Misaka T., Omiya S., Shah A.M., Yamamoto A., Nishida K., Ohsumi Y., Okamoto K., Sakata Y., Otsu K. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun.* 6, 7527. doi: 10.1038/ncomms8527.
124. Müller, T.D., Lee, S.J., Jastroch, M., Kabra, D., Stemmer, K., Aichler, M., Abplanalp, B., Ananthakrishnan, G., Bhardwaj, N., Collins, S., et al. (2013). p62 links β -adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis. *J. Clin. Investig.* 123, 469-78. doi: 10.1172/JCI64209.
125. Nagy L., Rauch B., Szerafin T., Uray K., Tóth A., Bai P. (2022). Nicotinamide-riboside shifts the differentiation of human primary white adipocytes to beige adipocytes impacting substrate preference and uncoupling respiration through SIRT1 activation and mitochondria-derived reactive species production. *Front Cell Dev Biol.* 10, 979330. doi: 10.3389/fcell.2022.979330.
126. Najd-Hassan-Bonab L., Safarpour M., Moazzam-Jazi M., Azizi F., Daneshpour M.S. (2022). The role of FTO variant rs1421085 in the relationship with obesity: a systematic review and meta-analysis. *Eat Weight Disord.* 27, 3053-3062. doi: 10.1007/s40519-022-01509-0.
127. Narendra D.P., Jin S.M., Tanaka A., Suen D.F., Gautier C.A., Shen J., Cookson M.R., Youle R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLOS Biol.* 8:e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
128. Ning, S., Wang, L. (2019). The Multifunctional Protein p62 and Its Mechanistic Roles in Cancers. *Curr. Cancer Drug Targets.* 19, 468-478. doi: 10.2174/1568009618666181016164920.
129. Oguri, Y., Shinoda, K., Kim, H., Alba, D.L., Bolus, W.R., Wang, Q., Brown, Z., Pradhan, R.N., Tajima, K., Yoneshiro, T., et al. (2020). CD81 Controls Beige Fat Progenitor Cell Growth and Energy Balance via FAK Signaling. *Cell.* 182, 563-577.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.021.

130. Onogi Y., Ussar S. (2022). Regulatory networks determining substrate utilization in brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab.* 33, 493-506. doi: 10.1016/j.tem.2022.04.001.
131. Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20, 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
132. Panic, V., Pearson, S., Banks, J., Tippetts, T. S., Velasco-Silva, J. N., Lee, S., Simcox, J., Geoghegan, G., Bensard, C. L., van Ry, T., Holland, W. L., Summers, S. A., Cox, J., Ducker, G. S., Rutter, J., & Villanueva, C. J. (2020). Mitochondrial pyruvate carrier is required for optimal brown fat thermogenesis. *eLife.* 9, e52558. doi: 10.7554/eLife.52558.
133. Parzych K.R., Klionsky D.J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
134. Patel P., Abate N. (2013). Body fat distribution and insulin resistance. *Nutrients.* 5, 2019-27. doi: 10.3390/nu5062019.
135. Perdikari A., Leparc G.G., Balaz M., Pires N.D., Lidell M.E., Sun W., Fernandez-Albert F., Müller S., Akchiche N., Dong H., Balazova L., Opitz L., Röder E., Klein H., Stefanicka P., Varga L., Nuutila P., Virtanen K.A., Niemi T., Taittonen M., Rudofsky G., Ukropec J., Enerbäck S., Stupka E., Neubauer H., Wolfrum C. (2018). BATLAS: Deconvoluting Brown Adipose Tissue. *Cell Rep.* 25, 784-797.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.044.
136. Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 285, 7153-64. doi: 10.1074/jbc.M109.053942.
137. Picca, A., Mankowski, R.T., Burman, J.L., Donisi, L., Kim, J.S., Marzetti, E., Leeuwenburgh, C. (2018). Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 543-554. doi: 10.1038/s41569-018-0059-z.
138. Pisani, D.F., Barquissau, V., Chambard, J.C., Beuzelin, D., Ghandour, R.A., Giroud, M., Mairal, A., Pagnotta, S., Cinti, S., Langin, D., et al. (2018). Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. *Mol. Metab.* 7, 35-44. doi: 10.1016/j.molmet.2017.11.007.
139. Priliani L., Oktavianthi S., Hasnita R., Nussa H.T., Inggriani R.C., Febinia C.A., Bowolaksono A., Puspitaningrum R., Nugroho R.A., Suastika K., Malik S.G. (2020). Obesity in the Balinese is associated with FTO rs9939609 and rs1421085 single nucleotide polymorphisms. *PeerJ.* 8, e8327. doi: 10.7717/peerj.8327.
140. Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* 286, 1368-71. doi: 10.1126/science.286.5443.1368.
141. Rana S., Bhatti A.A. (2020). Association and interaction of the FTO rs1421085 with overweight/obesity in a sample of Pakistani individuals. *Eat Weight Disord.* 25, 1321-1332. doi: 10.1007/s40519-019-00765-x.
142. Rangwala, S.M., Lazar, M.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 331-6. doi: 10.1016/j.tips.2004.03.012.
143. Rial-Pensado E., Rivas-Limeres V., Grijota-Martínez C., Rodríguez-Díaz A., Capelli V., Barca-Mayo O., Nogueiras R., Mittag J., Diéguez C., López M. (2022). Temperature

- modulates systemic and central actions of thyroid hormones on BAT thermogenesis. *Front Physiol.* 13, 1017381. doi: 10.3389/fphys.2022.1017381.
144. Ribeiro M.O., Carvalho S.D., Schultz J.J., Chiellini G., Scanlan T.S., Bianco A.C., Brent G.A. (2001). Thyroid hormone–sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform–specific. *J Clin Investig.* 108, 97–105. doi: 10.1172/JCI200112584.
 145. Riley C.L., Dao C., Kenaston M.A., Muto L., Kohno S., Nowinski S.M., Solmonson A.D., Pfeiffer M., Sack M.N., Lu Z., Fiermonte G., Sprague J.E., Mills E.M. (2016). The complementary and divergent roles of uncoupling proteins 1 and 3 in thermoregulation. *Journal Of Physiology.* 594, 7455–7464. doi: 10.1113/JP272971.
 146. Rodriguez, A., Durán, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3, 211–22. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.011.
 147. Rogers R.C., Barnes M.J., Hermann G.E. (2009). Leptin “gates” thermogenic action of thyrotropin-releasing hormone in the hindbrain. *Brain Res.* 1295, 135–141. doi: 10.1016/j.brainres.2009.07.063.
 148. Roh H.C., Tsai L.T.Y., Shao M., Tenen D., Shen Y., Kumari M., Lyubetskaya A., Jacobs C., Dawes B., Gupta R.K., Rosen E.D. (2018). Warming induces significant reprogramming of beige, but not brown, adipocyte cellular identity. *Cell Metab.* 27, 1121–37.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.005.
 149. Rosenwald M., Perdikari A., Rüllicke T., Wolfrum C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 15, 659–67. doi: 10.1038/ncb2740.
 150. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., He, C. (2017). Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* 169, 1187–1200. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045.
 151. Rutter A.R., Fradley R.L., Garrett E.M., Chapman K.L., Lawrence J.M., Rosahl T.W., Patel S.(2007). Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *Eur J Neurosci.* 25, 1757–66. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05446.x.
 152. Saklayen M.G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 20, 12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
 153. 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 Metab.* 16, 348–62. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.003.
 154. Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., Guertin, D. A. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends in cell biology.* 26, 313–326. doi: 10.1016/j.tcb.2016.01.004.
 155. Sarraf S.A., Raman M., Guarani-Pereira V., Sowa M.E., Huttlin E.L., Gygi S.P., Harper J.W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature.* 496, 372–376. doi: 10.1038/nature12043.
 156. Sarraf S.A., Youle R.J. (2018). Parkin mediates mitophagy during beige-to-white fat conversion. *Sci Signal.* 11(527):eaat1082. doi: 10.1126/scisignal.aat1082.
 157. Sárvári A.K., Veréb Z., Uray I.P., Fésüs L., Balajthy Z. (2014). Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 450, 1383–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.005.

158. Scalise M., Pochini L., Galluccio M., Indiveri C. (2016). Glutamine transport. From energy supply to sensing and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 1857, 1147-1157. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.006.
159. Scott R.A., Lagou V., Welch R.P., Wheeler E., Montasser M.E., Luan J., Mägi R., Strawbridge R.J., Rehnberg E., Gustafsson S., Kanoni S., Rasmussen-Torvik L.J., Yengo L., Lecoeur C., Shungin D., Sanna S., Sidore C., Johnson P.C., Jukema J.W. et al. (2012). Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet.* 44, 991-1005. doi: 10.1038/ng.2385.
160. Scuteri A., Sanna S., Chen W.M., Uda M., Albai G., Strait J., Najjar S., Nagaraja R., Orrú M., Usala G., Dei M., Lai S., Maschio A., Busonero F., Mulas A., Ehret G.B., Fink A.A., Weder A.B., Cooper R.S., Galan P., Chakravarti A., Schlessinger D., Cao A., Lakatta E., Abecasis G.R. (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 3, e115.
161. Seale P., Bjork B., Yang W., Kajimura S., Chin S., Kuang S., Scimè A., Devarakonda S., Conroe H.M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Rudnicki M.A., Beier D.R., Spiegelman B.M. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 454, 961-7. doi: 10.1038/nature07182.
162. Seiler, S., Xu, D., Ho, J.P., Lo, K.A., Buehrer, B.M., Ludlow, Y.J., Kovalik, J.P., & Sun, L. (2015). Characterization of a primary brown adipocyte culture system derived from human fetal interscapular fat. *Adipocyte.* 4, 303–310. doi: 10.1080/21623945.2015.1042192.
163. Sentis S.C., Oelkrug R., Mittag J. (2021). Thyroid hormones in the regulation of brown adipose tissue thermogenesis. *Endocr Connect.* 10, R106–r15. doi: 10.1530/EC-20-0562.
164. Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., Kajimura, S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS one,* 7, e49452. doi: 10.1371/journal.pone.0049452.
165. Shaw A., Tóth B.B., Arianti R., Csomós I., Póliska S., Vámos A., Bacso Z., Győry F., Fésüs L., Kristóf E. (2021). BMP7 Increases UCP1-Dependent and Independent Thermogenesis with a Unique Gene Expression Program in Human Neck Area Derived Adipocytes. *Pharmaceuticals (Basel).* 14, 1078. doi: 10.3390/ph14111078.
166. Shi, F., Collins, S. (2017). Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: An integrative perspective. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 31 doi: 10.1515/hmbci-2017-0062.
167. Shinoda, K., Luijten, I.H., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S.B., Kim, M., Xue, R., Chondronikola, M., Cypess, A.M., Tseng, Y.H., Nedergaard, J., Sidossis, L.S., Kajimura, S. (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nature medicine.* 21, 389–394. doi: 10.1038/nm.3819.
168. Sidossis, L., Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans: Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Investig.* 125, 478-86. doi: 10.1172/JCI78362.
169. Smemo S., Tena J.J., Kim K.H., Gamazon E.R., Sakabe N.J., Gómez-Marín C., Aneas I., Credidio F.L., Sobreira D.R., Wasserman N.F., Lee J.H., Puvion-Vandier V., Tam D., Shen M., Son J.E., Vakili N.A., Sung H.K., Naranjo S., Acemel R.D., Manzanares M., Nagy A., Cox N.J., Hui C.C., Gomez-Skarmeta J.L., Nóbrega M.A. (2014). Obesity-associated

- variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 507, 371-5. doi: 10.1038/nature13138.
170. Speliotes E.K., Willer C.J., Berndt S.I., Monda K.L., Thorleifsson G., Jackson A.U., Lango Allen H., Lindgren C.M., Luan, J., Mägi R. et al. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*. 42, 937-48. doi: 10.1038/ng.686.
 171. Sun, C., Mao, S., Chen, S., Zhang, W., Liu, C. (2021). PPARs-Orchestrated Metabolic Homeostasis in the Adipose Tissue. *Int. J. Mol. Sci*. 22, 8974. doi: 10.3390/ijms22168974.
 172. Szabo I., Zoratti M. (2017). Now UCP(rotein), Now You Don't: UCP1 Is Not Mandatory for Thermogenesis. *Cell Metab*. 25, 761-762. doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.013.
 173. Szatmári-Tóth M., Shaw A., Csomós I., Mocsár G., Fischer-Posovszky P., Wabitsch M., Balajthy Z., Lányi C., Győry F., Kristóf E., Fésüs L. (2020). Thermogenic Activation Downregulates High Mitophagy Rate in Human Masked and Mature Beige Adipocytes. *Int J Mol Sci*. 21, 6640. doi: 10.3390/ijms21186640.
 174. Taylor, D., Gottlieb, R.A. (2017). Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white adipose tissue. *Obesity*. 25, 704-712. doi: 10.1002/oby.21786.
 175. Terán-García, M., Bouchard, C. (2007). Genetics of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*. 32, 89-114. doi: 10.1139/h06-102.
 176. Tews, D., Pula, T., Funcke, J.B., Jastroch, M., Keuper, M., Debatin, K.M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P. (2019). Elevated UCP1 levels are sufficient to improve glucose uptake in human white adipocytes. *Redox Biol*. 26, 101286. doi: 10.1016/j.redox.2019.101286.
 177. Tóth B.B., Arianti R., Shaw A., Vámos A., Veréb Z., Póliska S., Győry F., Bacso Z., Fésüs L., Kristóf E. (2020). FTO Intronic SNP Strongly Influences Human Neck Adipocyte Browning Determined by Tissue and PPAR γ Specific Regulation: A Transcriptome Analysis. *Cells*. 16,9, 987. doi: 10.3390/cells9040987.
 178. Townsend K.L., Tseng Y.H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 25, 168-77. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.004.
 179. Turco, E., Savova, A., Gere, F., Ferrari, L., Romanov, J., Schuschnig, M., Martens, S. (2021). Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat. Commun*. 12, 5212. doi: 10.1038/s41467-021-25572-w.
 180. Ussar S., Lee K.Y., Dankel S.N., Boucher J., Haering M.F., Kleinridders A., Thomou T., Xue R., Macotela Y., Cypess A.M., Tseng Y.H., Mellgren G., Kahn C.R. (2014). ASC-1, PAT2, and P2RX5 are cell surface markers for white, beige, and brown adipocytes. *Sci Transl Med*. 6, 247ra103. doi: 10.1126/scitranslmed.3008490.
 181. van Marken Lichtenbelt, W.D., Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301, R285-296, doi:10.1152/ajpregu.00652.2010.
 182. van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med*. 360, 1500-8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
 183. Van Thi-Tuong Nguyen, Van Vu V., Van Pham P. (2023). Brown adipocyte and browning thermogenesis: metabolic crosstalk beyond mitochondrial limits and physiological impacts. *Adipocyte*. 12, 2237164. doi: 10.1080/21623945.2023.2237164.

184. Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518-25. doi: 10.1056/NEJMoa0808949.
185. Wabitsch, M., Brenner, R.E., Melzner, I., Braun, M., Möller, P., Heinze, E., Debatin, K.M., Hauner, H. (2001). Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 8-15. doi: 10.1038/sj.ijo.0801520.
186. Wajchenberg B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21, 697-738. doi: 10.1210/edrv.21.6.0415.
187. Wang H., Liu L., Lin J.Z., Aprahamian T.R., Farmer S.R. (2016) Browning of White Adipose Tissue with Roscovitine Induces a Distinct Population of UCP1+ Adipocytes. *Cell Metab* 24, 835-847. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.005.
188. Wang L., Yu Q., Xiong Y., Liu L., Zhang X., Zhang Z., Wu J., Wang B. (2013). Variant rs1421085 in the FTO gene contribute childhood obesity in Chinese children aged 3-6 years. *Obes Res Clin Pract.* 7, e14-22. doi: 10.1016/j.orcp.2011.12.007.
189. Wang Q.A., Tao C., Gupta R.K., Scherer P.E. (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med.* 19, 1338-44. doi: 10.1038/nm.3324.
190. Wang S., Lin Y., Gao L., Yang Z., Lin J., Ren S., Li F., Chen J., Wang Z., Dong Z., Sun P., Wu B. (2022). PPAR- γ integrates obesity and adipocyte clock through epigenetic regulation of Bmal1. *Theranostics.* 12, 1589-1606. doi: 10.7150/thno.69054.
191. Wang, C.H., Lundh, M., Fu, A., Kriszt, R., Huang, T.L., Lynes, M.D., Leiria, L.O., Shamsi, F., Darcy, J., Greenwood, B.P., et al. (2020). CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci. Transl. Med.* 12, eaaz8664. doi: 10.1126/scitranslmed.aaz8664.
192. Warner A., Kjellstedt A., Carreras A., Böttcher G., Peng X.R., Seale P., Oakes N., Lindén D. (2016). Activation of beta3-adrenoceptors increases in vivo free fatty acid uptake and utilization in brown but not white fat depots in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 311, E901–e10. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2016.
193. Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., He P.C., Shi H., Cui X., Su R., Klungland A., Jia G., Chen J., He C. (2018). Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Mol. Cell* 71, 973.e5–985.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.011.
194. Weir G., Ramage L.E., Akyol M., Rhodes J.K., Kyle C.J., Fletcher A.M., Craven T.H., Wakelin S.J., Drake A.J., Gregoriades M.L., Ashton C., Weir N., van Beek E.J.R., Karpe F., Walker B.R., Stimson R.H. (2018). Substantial metabolic activity of human brown adipose tissue during warm conditions and cold-induced lipolysis of local triglycerides. *Cell Metab.* 27, 1348–55.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.04.020.
195. Weyer C., Tataranni P.A., Snitker S., Danforth E. Jr., Ravussin E. (1998). Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes.* 47, 1555-61. doi: 10.2337/diabetes.47.10.1555.
196. Wikstrom, J.D., Mahdavian, K., Liesa, M., Sereda, S.B., Si, Y., Las, G., Twig, G., Petrovic, N., Zingaretti, C., Graham, A., et al. (2014). Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J.* 33, 418-36. doi: 10.1002/emboj.201385014.

197. Wu Q., Ortegon A.M., Tsang B., Doege H., Feingold K.R., Stahl A. (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol.* 26, 3455-67. doi: 10.1128/MCB.26.9.3455-3467.2006.
198. Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 150, 366-76. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
199. Xue S., Lee D., Berry D.C. (2023) Thermogenic adipose tissue in energy regulation and metabolic health. *Front Endocrinol (Lausanne).* 20,14, 1150059. doi: 10.3389/fendo.2023.1150059.
200. Yau W.W., Singh B.K., Lesmana R., Zhou J., Sinha R.A., Wong K.A., Wu Y., Bay B.H., Sugii S., Sun L., Yen P.M. (2019). Thyroid hormone (T(3)) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy.* 15, 131–150. doi: 10.1080/15548627.2018.1511263.
201. Yau W.W., Yen P.M. (2020). Thermogenesis in adipose tissue activated by thyroid hormone. *Int J Mol Sci.* 21, 21. doi: 10.3390/ijms21083020.
202. Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Investig.* 123, 3404-8. doi: 10.1172/JCI67803.
203. Yoneshiro, T., Wang, Q., Tajima, K., Matsushita, M., Maki, H., Igarashi, K., Dai, Z., White, P. J., McGarrah, R. W., Ilkayeva, O. R., Deleye, Y., Oguri, Y., Kuroda, M., Ikeda, K., Li, H., Ueno, A., Ohishi, M., Ishikawa, T., Kim, K., Chen, Y., Kajimura, S. (2019). BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature.* 572, 614–619. doi.org/10.1038/s41586-019-1503-x.
204. Yoshii S.R., Mizushima N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1865. doi: 10.3390/ijms18091865.
205. Zeng X., Ye M., Resch J.M., Jedrychowski M.P., Hu B., Lowell B.B., Ginty D.D., Spiegelman B.M. (2019). Innervation of thermogenic adipose tissue via a calyntenin 3β-S100b axis. *Nature.* 569, 229-235. doi: 10.1038/s41586-019-1156-9. Altshuler-Keylin S., Kajimura S. (2017). Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal.* 10(468), eaai9248. doi: 10.1126/scisignal.aai9248.

9. Tárgyszavak

Elhízás, *FTO*, adipocita, termogenezis, UCP1, mitofágia, barnulás

Subject words

Obesity, *FTO*, adipocyte, thermogenesis, UCP1, mitophagy, browning

10. Köszönetnyilvánítás

Első körben szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kristóf Endrének a folyamatos támogatást, aki bevezetett engem az adipociták világába és akihez bármilyen körülmények között bizalommal fordulhattam.

Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, hogy csatlakozhattam a kutató csoportjához, ahol a heti megbeszélések és Journal Club-ok alkalmával csiszolhattam az angol tudásomat, valamint sok érdekes és hasznos információt tudhattam meg az adipocitákról.

Hálás vagyok a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, hogy biztosította a kutatás infrastrukturális hátterét.

Szeretném megköszönni a Sejtbiokémiai Kutató Laboratórium, vagy ahogy a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben ismerik, a Fésüs Labor minden dolgozójának a rengeteg segítséget, együttműködést és jó hangulatot, melyet kutatásom során biztosítottak. Külön kiemelném Dr. Szatmári-Tóth Máriát, Dr. Abhirup Shaw-t és Dr. Rini Arianti-t, akik közreműködésével létrejöhettek jelen disszertáció sorai.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Lányi Cecéliának és Dr. Balajthy Zoltánnak, hogy zsírszövet mintákat biztosítottak kísérleteinkhez.

Hálás vagyok kollaborációs partnereinknek: Dr. Póliska Szilárd (RNS-Seq); Prof. Dr. Csósz Éva és Guba Andrea (aminosav fluxus mérések); Dr. Csomós István, Dr. Mocsár Gábor és Dr. Bacsó Zsolt (mikroszkópia); Prof. Dr. Bai Péter (Seahorse mérések).

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00006, OTKA FK_19 131424, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 és ÚNKP-22-3-II-DE-25 pályázatok támogatták.

Szeretném megköszönni Egyetlen Feleségemnek, Budai Zsófinak a folyamatos támogatását és bátorítását, mellyel tartotta bennem a lelket ebben az időszakban.

Végül szeretném megköszönni Családom minden tagjának a támogatását, valamint a szünni nem akaró kíváncsiságát a disszertáció hogyanléte felől.



Nyilvántartási szám: DEENK/495/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vámos Attila

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vámos, A.**, Arianti, R., Vinnai, B. Á., Alrifai, R., Shaw, A., Póliska, S., Guba, A., Csósz, É., Csomós, I., Mocsár, G., Lányi, C., Balajthy, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Human Abdominal Subcutaneous-Derived Active Beige Adipocytes Carrying FTO rs1421085 Obesity-Risk Alleles Exert Lower Thermogenic Capacity. *Front. Cell. Dev. Biol.* 11, 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2023.1155673>
IF: 5.5 (2022)
2. **Vámos, A.**, Shaw, A., Varga, K., Csomós, I., Mocsár, G., Balajthy, Z., Lányi, C., Bacsó, Z., Szatmári-Tóth, M., Kristóf, E.: Mitophagy Mediates the Beige to White Transition of Human Primary Subcutaneous Adipocytes Ex Vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15 (3), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15030363>
IF: 4.6

További közlemények

3. Arianti, R., Vinnai, B. Á., Bartáné Tóth, B., Shaw, A., Csósz, É., **Vámos, A.**, Gyóry, F., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Kristóf, E., Fésüs, L.: ASC-1 transporter-dependent amino acid uptake is required for the efficient thermogenic response of human adipocytes to adrenergic stimulation. *FEBS Lett.* 595 (16), 2085-2098, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.14155>
IF: 3.864
4. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Arianti, R., Csomós, I., Póliska, S., **Vámos, A.**, Bacsó, Z., Gyóry, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: BMP7 increases UCP1-dependent and independent thermogenesis with a unique gene expression program in human neck area derived adipocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14 (11), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111078>
IF: 5.215





5. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Király, R., Arianti, R., Csomós, I., Póliska, S., **Vámos, A.**, Korponay-Szabó, I., Bacsó, Z., Győry, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: Irisin stimulates the release of CXCL1 from differentiating human subcutaneous and deep-neck derived adipocytes via upregulation of NF[κ]B pathway.
Front. Cell. Dev. Biol. 9, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.737872>
IF: 6.081
6. Bartáné Tóth, B., Arianti, R., Shaw, A., **Vámos, A.**, Veréb, Z., Póliska, S., Győry, F., Bacsó, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: FTO intronic SNP strongly influences human neck adipocyte browning determined by tissue and PPAR γ specific regulation: a transcriptome analysis.
Cells. 9 (4), 1-25, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9040987>
IF: 6.6
7. Klusóczki, Á., Veréb, Z., **Vámos, A.**, Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Bacsó, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Differentiating SGBS adipocytes respond to PPAR gamma stimulation, irisin and BMP7 by functional browning and beige characteristics.
Sci. Rep. 9 (1), 1-35, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42256-0>
IF: 3.998

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,858

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,1**

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, 2023.11.06.

