

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

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

Írta: **Vámos Attila**
okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-
és Immunbiológia Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Kristóf Endre Károly, MD, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora
A bírálóbizottság tagjai: Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Demény Máté Ágoston, PhD
Dr. Vas Virág, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. október 07. 11:00 óra

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 nők, mind 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 és a szisztémás gyulladás. Számos egészségügyi szervezet különböző kritériumokat állapított meg a MetS meghatározásához.

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. 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 glükózintolerancia, az inzulinrezisztencia és a diszlipidémia, az elhízással összefüggésben számos vizsgálat középpontjában áll.

2.2. Az elhízás

Az elmúlt néhány évtizedben az elhízás előfordulása drámaian megnőtt világszerte. A krónikus elhízás különféle rákos megbetegedésekhez, 2-es típusú diabetes mellitushoz (DM-hoz), szív- és érrendszeri betegségekhez vezethet. Ezért az elhízást az elhalálozás és rokkantság egyik vezető okaként azonosították világszerte, és a világ különböző régióiban a halálozások 10-13%-áért felelős. Az elhízás megállapításának legelterjedtebb módszere a Testtömeg Index (TTI) kiszámítása, mely a kilogrammban mért testtömeg és a testmagasság méterben kifejezett négyzetének a hányadosa. Az elhízás fő patofiziológiai okának az energiahomeosztázis egyensúlyhiányát azonosították, amikor az energiafelvétel lényegesen nagyobb, mint az energiafelhasználás. Az elhízás azonban egy többtényezős betegség, amely más összetevőkből is eredhet, beleértve a szociális, életmódbeli, viselkedési hálózatokat és az egyének genetikai hátterét.

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.

2.3. A zsírszövet és az adipocita típusok

A rágcsálókban az adipocitákat három típusba sorolják. Az energiát tároló fehér zsírsejtek, melyek a fehér zsírszövetben (WAT) helyezkednek el, egy nagy uniloculáris lipidcseppel és alacsony mitokondriális sűrűséggel rendelkeznek. A barna zsírszövetben (BAT) található barna adipociták aktív termogén sejtek, magas mitokondriális tartalommal, fragmentációval és UCP1 expresszióval, valamint számos kis lipidcseppel a citoplazmában. A „barna-fehérben” („brown-like-in-white”/brite) vagy bézs sejtek hidegben indukálható termogén potenciállal és multiloculáris lipidcseppel rendelkeznek. A bézs adipociták a WAT-ban elszórtaan találhatóak. 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, amelyet a sejtekben lezajló barnulásnak nevezett folyamat során alakul ki. A lágyéki WAT-ot a bézs adipociták legjellemzőbb depójaként fedezték fel, amelyben a zsírsejtek multiloculáris morfológiával és termogénikus génexpressziós profillal rendelkeztek válaszul a termogénikus ingerekre.

Kezdetben a BAT-t olyan szövetnek tekintették embereknél, amely csak csecsemőknél van jelen, és nehezen elérhető anatómiai helyeken található. Számos pozitronemissziós tomográfiát (PET) használó tanulmány bizonyította, hogy a felnőttek is jelentős mennyiségű BAT-tal rendelkeznek, leggyakrabban a nyaki-kulcsfont feletti (cervikális-szupraklavikuláris) depót jellemezte magas glükózfelvétel, különösen hideg expozíció után. 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. 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 és a magzati lapockák közti zsírszövetből származó primer zsírsejtek 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. Egy másik tanulmány, amelyben különböző anatómiai helyekről származó zsírbiopsziákból izolált teljes RNS-t alkalmaztak, beleértve az 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.

2.4. A barna és bézs adipociták termogenezisben betöltött szerepe

A termogenikus barna és bézs zsírsejteket tartalmazó BAT hőtermelés révén képes az energia felszabadítására, amelyet főként az UCP1-függő protoncsorgás közvetít, amely szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt az ATP-szintézistől a mitokondriumban. 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 grádiens 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 zsírából izolált mitokondriumokban azonosították, korlátozott ADP jelenlétében, majd megerősítették, hogy mind egér, mind humán barna zsírsejteket létezik. 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 kreatin-kináz B-t (CKB) is, a termogenikus cAMP jelátvitel révén felszabályozódnak. Ezenkívül az egerek termogenikus zsírsejtjeiben a kreatinszint csökkenése a kreatin bioszintézis sebességkorlátozó enzimének, a glicin-amidinoztransferáznak kiütésével csökkenti az energiafelhasználást a gátolt termogenezis miatt, és táplálkozás által kiváltott elhízást okoz. Ennek a ciklusnak a megléte a BAT-ban alátámasztja azt az elképzelést, hogy a mitokondriális ATP szintézis növelése az energia szétkapcsolást elősegítő megközelítésként használható.

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 $FADH_2$ 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. 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. A glükóz és a zsírsavak mellett az aktív barna/bézs zsírsejtek az elágazó láncú aminosavakat is katabolizálják, hogy kielégítsék nagy energiaigényüket. Korábbi tanulmányunk is hangsúlyozta 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. 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. Az ASC-1 transzporter korábban fehér zsírsejtekre specifikus sejt felszíni markerként volt ismert. 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 embereknél, valamint elősegíti a mitokondriális légzést és az inzulin által stimulált glükózfelvételt. 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.

A BAT kulcsszerepet játszik az állandó magi testhőmérséklet fenntartásában a didergés nélküli termogenezis révén, és ígéretes terápiás lehetőségeket nyithat meg az elhízás elleni küzdelemben. A BAT hat anatómiai régióban (nyaki, szupraklavikuláris, hónalji, mediasztinális, paraszpinális és abdominális) található meg felnőttekben, ami az összes zsír 4,3%-át és a teljes testtömeg 1,5%-át teszi ki. Matematikai modellezések alapján a BAT évente körülbelül 4 kg zsírt képes oxidálni felnőttekben, és termogén aktivitása akár 5%-kal is hozzájárulhat az alap anyagcseréhez. Az aktív barna/bézs adipociták magas metabolikus szubsztrát-felhasználás révén növelik az energiafelhasználást, így elősegíthetik a fogyást és potenciális farmakológiai célponttá válhatnak az elhízás és a kapcsolódó anyagcserebetegségek 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-5-öt (*Myf5*), *engrailed 1*-et (*En1*) és *paired box 7*-et (*Pax7*) fejeznek ki átmenetileg, melyek a mezodermális eredetét jelzik a vázrendszer miogén sejtjeinek. Ez az izom-szerű génextpressziós mintázat, valamint az izomsejtekhez hasonló mitokondriális proteóm arra enged következtetni, hogy sejtontológiai

kapcsolat van a klasszikus barna adipociták és az izomsejtek között. Egér modellben leírták, hogy az embriogenezis során kialakult primitív BAT-raktárakat hiperproliferatív fibroblaszt-szerű sejtek generálják, amelyek lipidszegények maradnak egészen a szülés utáni időszakig. Embriionális prekursorok korai „fate-mapping” vizsgálatai kimutatták, hogy a barna zsírsejtek a dermomiótómán belüli korai szomiták (összselvények) paraxiális mezodermaiból származnak. 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. A szomitákban expresszálódó MyoD gátolja meg, hogy a prekursorok barna adipocitákká alakuljanak.

A klasszikus barna adipocitákkal ellentétben a bézs adipociták embrionális eredete ez ideig nem teljes mértékben tisztázott. E két sejt valószínűleg különböző sejtvonalakból eredeztethető, mivel a SC zsírraktárakban nem található Myf5+ sejtek. „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. „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-t (SMA-t), Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α -t vagy PDGFR β -t expresszálnak. 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.

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.

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) farmakológiai aktiválása révén egerekben. Mindkét mechanizmus átmeneti és folyamatos ingereket igényel. 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. 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. 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 termogénikus kapacitás megszerzése érdekében, miközben egyidejűleg fokozták az anyagcsere aktivitását. 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 felehasználást eredményez a BAT-ban. Bár a legújabb bizonyítékok arra utalnak, hogy a β 3-AR talán nem nélkülözhetetlen, és barnulás előfordulhat β 3-AR jelenléte nélkül is, az a tény, hogy a β 3-AR részt vesz az adrenerg stimuláció aktiválási kaszkádjában, széles körben megerősített. 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, ami arra utal, hogy az emberek és a rágcsálók eltérőek 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. 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. A PKA emellett foszforilálja a mammalian target of rapamycint (mTOR-t), amely a celluláris mikro környezetben a sejtmetabolizmus és a tápanyagokra adott válasz kulcsfontosságú szabályozója, illetve szükséges a barna morfológia kialakításához a zsírszövetekben. Kimutatták, hogy a PKA szerepe a BAT stimulációban és metabolikus modulációban korrelál a PGC-1 α transzkripció faktorral, amely az adaptív termogenezishez szükséges mitokondriális metabolizmus kulcsfontosságú szabályozója. 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. A β -AR-n 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. 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, 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. A TR specifikus izoformái a BAT-ban nagymértékben különbözhetnek a különböző fajoktól függően. A pajzsmirigyhormonnak (TH) két fő izoformája van. A kevésbé aktív tiroxin izoforma (T4) a II-es típusú dehidrogenáz (DIO2) hatására átalakulhat aktív formájává, 3,3',5-trijódtironinná (T3). A TH fontos szerepet játszik az anyagcsere szabályozásában a különböző szövetekben a növekedés és fejlődés során. Megállapítást nyert, hogy az interszkapuláris BAT-ban (iBAT) 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. Egy másik tanulmányban feltárták, hogy a T3 indukálta a forkhead box O1-t (FOXO1), mely a szirtuin 1 (SIRT1) downstream célpontja, amelynek enzimaktivitása a celluláris NAD^+ -tól függ. 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 zsírsejtek megnövekedett autofág és lizoszómális génexpressziójához vezetett, ami fokozott mitokondriális turnover-t és biogenezist, valamint a BAT termogenezisének javulását eredményezte. 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. Az UCP3 termogenezisben betöltött szerepét számos szövetben kimutatták, beleértve a váz- és a szívizomzatot. Bár az UCP3 részt vehet a BAT termogenezisében és nélkülözhetetlen a nem-didergéses hőtermelésben hörcsögökben, az egér BAT-ban csak az UCP1 termogenikus funkciójának kiegészítője lehet, ami arra utal, hogy az UCP1 minden esetben a fő termogenin 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, 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 szekréciójával 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 tápláléknak kitett egér modellekben. Lipodisztrófiás egér modellben a leptin növeli a Pgc-1a, 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. A leptin BAT termogenezisére és metabolizmusára gyakorolt hatásának molekuláris hatását korlátozottan vizsgálták, azonban a leptin energiafelhasználást növelő hatása összefüggésbe hozható a hipotalamusz TH szabályozásával. 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 befolyását 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) szekréció és leptin expresszió kíséri. A bézs zsír depókban az ingerek megvonása után észlelt fenotípusos és morfológiai átalakulás nem figyelhető meg a klasszikus barna zsírsejtekben. 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. 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. Érdekes módon a bézs adipociták apoptózisát és halálát nem találták a bézs fenotípus elvesztésének okaként. Ezzel szemben kimutatták, hogy a BAT fehéritése növeli a sejthalált azáltal, hogy fokozza a zsírszövet gyulladását, ami a BAT plaszticitásának hiányára utal. 2015-ben Kozak és kutatócsoportja sokkal nagyobb dinamikáról számolt be az UCP1 és a mitokondriális forgalomban a bézs zsírban, a BAT-hoz képest. 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. Kutatócsoportunk az elmúlt években leírta, hogy a differenciált humán primer SC és Simpson–Golabi–Behmel-szindróma (SGBS) zsírsejtekben a cAMP által kiváltott termogenezis aktiváció leszabályozta a mitofágiát, blokkolva a bézs-fehér átalakulást. 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 termogenezis bézs adipociták szabályozásában

A mitokondriumok kulcsfontosságúak a sejtek homeosztázisában. Olyan létfontosságú funkciókat látnak el, mint a bioenergetika, a bioszintézis és a sejtes jelátvitel. Fontos szerepet töltenek be a klasszikus barna és bézs adipociták termogenezis 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. A károsodott vagy nem kívánt mitokondriumok szelektív autofágiával, az

úgynevezett mitofágiával eltávolíthatók, amelyet a mitokondriális minőség-ellenőrzés kulcsfontosságú mechanizmusának tartanak.

Az autofágia egy részletesen leírt intracelluláris katabolikus folyamat, amelyben a fehérje-aggregátumokat vagy a sérült organellumokat kettős membránnal határolt struktúrák, úgynevezett autofagoszómák juttatják a lizoszómákba lebontásra, és komponenseiket újrahasznosítják. 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-ből és a focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa-ból (FIP200-ból) áll, mely elindítja az izolációs membrán kialakulását a meglévő membránforrásokból, például az endoplazmatikus retikulumból (ER-ből) vagy a Golgiból. 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. 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. Amint az autofagoszóma kifejlődött, egyesül a lizoszómával, és egy autolizoszómát (egy membránnal határolt savas vezikulát) képez, ahol a lizoszómális hidrolitikus enzimek, például a katepszinek 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).

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-interacting régió (LIR-en) keresztül. 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 és közvetlen, ubikvitin-független mitofágia.

Az adapter-mediált mitofágia, amelyet a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN)-indukált putatív kináz 1 (PINK1) és a Parkin E3 ubikvitin ligáz közvetít, megköveteli a cél ubikvitinációját. 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. 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. Az adapterfehérjék két meghatározó domént tartalmaznak: egy ubikvitin-kötő domént (UBD) 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. 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. 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.

2.9. Az *FTO* gén

A poligénes betegségek hátterében álló biológiai mechanizmusok jobb megértése érdekében a genom asszociációs tanulmányok (genome-wide association study, GWAS) célja, hogy jobban megértsük az emberi genom genetikai változatait. Ezen első GWAS-ok rámutattak, hogy az *FTO*-nak elhízásra hajlamosító hatása van, valamint felfedeztek két egy-nukleotid polimorfizmust (single-nucleotide polymorphism, SNP), melyek a gén első intronjában találhatóak (rs9930506, rs9939609). Ezek a tanulmányok végül az *FTO* elhízásra gyakorolt hatásának vizsgálatához vezettek.

Az *FTO* egy az emberekben a 16-os kromoszómán található 9 exonból és 8 intronból álló gén, mely az AlkB DNS javító dioxigenáz enzimsaládba 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 (m^3U), 3-

metiltimin (m^3T)), azonban fő szubsztrátja a N^6 -metiladenozin (m^6A). Az FTO többféle RNS-hez kötődhet, beleértve az mRNS-t, snRNS-t és tRNS-t, és demetilálhatja az m^6A -t és az $N^6,2'$ -O-dimetiladenozint (m^6Am) az mRNS-ben, az m^6A -t az U6RNS-ben, az m^6Am -et az snRNS-ekben és az N^1 -metiladenozint (m^1A) a tRNS-ben.

Az m^6A metilációs módosítása az adenin hatodik nitrogénatomján a leggyakoribb mRNS-metiláció, mely a 3'-nem translált régióban (3'-UTR-ek) feldúsult a stop és start kodon között. Az m^6A 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). Dinamikus szabályozás alapján látható, hogy a m^6A fontos szerepet játszik olyan transzkripciót követő szabályozó folyamatokban, mint például az RNS splicing, a nukleáris termelés, a degradáció és a transláció. A DNS javító és posztranszlációs szabályozások mellett az FTO enzim a zsírsav metabolizmusban is részt vesz.

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. 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 rágcsálókban túltermeltetett *FTO* jelentősen megnövelte az abdominális WAT zsírtömegét mind normál, mind magas kalóriatartalmú étrend mellett.

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.

A GWAS-okban használt technikák fejlődésével sikerült megtalálni azt az oki SNP-t, melynek jelenléte megbont egy konzervált motívumot az *FTO* lókuszán belül. A zsírszövetek

differentiálódásának 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 differentiálódnak, mely ötszörösére csökkenti mitokondriális termogenezist.

Miután kimutathatóvá vált, hogy az *FTO* lokusz mely része hajlamosít elhízásra, a következő feladat annak kiderítése volt, mely szövet szabályozza az SNP működését. 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. Egér modellben leírták, hogy a hipotalamikus *Irx3* kifejeződés részleges gátlásával csökkent az *Ucp1* expresszió, mely súlyosbította az elhízást. 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.

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 inaktívulodnak 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 inaktívulációja során a mitofágia aktiválódásának hátterében álló molekuláris mechanizmus tanulmányozása

2015-ben azonosították azt az oki SNP-t (rs1421085), melynek jelenléte megbontja az *FTO* lókuszn 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 Helsinki 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 pórus átmérőjű 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, majd 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).

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: szérummentes DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomycin + 10 μ g/ml humán-apotranszferrin + 20 nM humán inzulin + 100 nM kortizol + 200 pM trijód-trionin + 2 μ M roziglitazon (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) + 25 nM dexametazon + 500 μ M 3-izobutiril-1-metilxantin. A harmadik napot követően a differenciáció további 25 napjáig nem tettünk a médiumhoz roziglitazont, dexametazont és 3-izobutiril-1-metilxantint. A tápfolyadékot minden harmadik nap lecseréltük. Az aktív bézs differenciáltatás a következő médiumban történt három napig: szérum-mentes DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 1% penicillin/sztreptomycin + 10 μ g/ml humán-apotranszferrin + 0,85 μ M humán inzulin + 200 pM trijód-trionin + 25 nM dexametazon + 500 μ M 3-izobutiril-1-metilxantin. A harmadik nap után a dexametazont, 3-izobutiril-1-metilxantint elhagytuk, és 500 nM roziglitazont adtunk a médiumhoz. A differenciáció 14. napján egy 4 órán át tartó 500 μ M dibutiril-cAMP kezelést hajtottunk végre, hogy *in vitro* utánozzuk a hideg-indukált termogenezist. 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 roziglitazon-, dexametazon- és 3-izobutiril-1-metilxantin-mentes fehér koktéllra cseréltük további 14 napra. Az aktív és inaktív bézs adipociták tápfolyadékát minden harmadik napon lecseréltük.

A mitofágia vizsgálatához fehér és bézs differenciációt, valamint bézs-fehér átalakulást modelleztük. A hASC-eket 6-lyukú lemezekben (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 hozzáadásával és 500 nM roziglitazon eltávolításával indítottuk el. A humán inzulin koncentrációja 42,5-szeresére csökkent az átmenet indukálásakor. 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. A színtelen fázisokhoz 500 µl izopropanolt adtunk, majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ezt követte 10 perc centrifugálás 4°C-on 2000 g-n. Ezután a pelletekről eltávolítottuk a felülúszót, majd mostuk 1000 µl 70%-os etanollal, majd ismét centrifugáltuk 5 percig 4°C-on 2000 g-n. A pelletekről 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) készüléssel ellenőriztük, majd kihígítottuk őket 50 ng/µl koncentrációjúra.

4.6. Genomiális DNS izolálása TRIzol reagens felhasználásával

A 4.5-ös fejezetben nyert magenta színű fázisokból 300 µl 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 mosofolyadék 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) készüléssel 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 mintát három technikai párhuzamossal vizsgáltunk. 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 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 (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 felülreprezentált KEGG útvonalakat a 0,05-nél kisebb hamis felfedezési arány (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.

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 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 mitokondriális genomként fejeztük ki diploid sejtmagokra normalizálva.

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. 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 kép analízis

A hASC-eket nyolc lyukú 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 premeabilizáltuk, 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. 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 (NA 1,35) 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 (pixel^2) alapján határoztuk meg, 50-végtelen AU és cirkuláris 0-1 AU-val. A fragmentált mitokondriumokat a bináris TOM20 immunfestés képekből elemeztük, 0-100 AU méretű (pixel^2) 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 ellenőrzésének 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.

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 sejttenyésztő lemezekre oltottuk. Ezen sejteket növekedési tápfolyadékban tartottuk leghosszabb ideig 24 órán keresztül, majd elindítottuk a 4.4. fejezetben részletezett differenciációs folyamatot. Az alapszintű oxigénfogyasztás rögzítése után a sejtek egy 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. 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.

4.14. Statisztikai analízis és ábra készítés

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 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 és barna/bézs adipogén differenciálódási protokollokat optimalizálta. Ezek a differenciációs médiumok változatos összetételben tartalmaznak hormonokat, amelyekben a PPAR γ agonista roziglitazon a barnulás fő mozgatórugója. 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. A korábbi eredményekkel összhangban a folyamatos PPAR γ stimuláció az UCP1 gén- és fehérjeexpressziójának jelentős növekedését eredményezte a bézs irányba differenciált adipocitákban a fehérkéhez képest. Az UCP1 kifejeződés tovább emelkedett, amikor a bézs irányba differenciálást három vagy négy hétig végeztük. Amikor a bézs 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 differenciálódásnak voltak kitéve. Két héttel a roziglitazon megvonása után az UCP1 gén és fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a bézs adipocitákhoz képest, és a fehér zsírsejtekéhez hasonló génexpressziós szintet mutatott. Az UCP1 expresszió csökkenése lassabb volt fehérjeszinten, mint mRNS-szinten. Egy másik termogenikus markergén, a sejthalált indukáló DFFA-szerű effektor A (*CIDEA*) expressziója követte az *UCP1* mRNS expressziós mintáját. Ezzel szemben a fehér adipocint, a leptint kódoló *LEP* gén alacsony szinten expresszáldott mind a preadipocitákban, mind a bézs zsírsejtekben; azonban erősen felszabályozódott, amikor az adipociták folyamatosan a fehér koktél jelenlétében differenciálódtak, vagy amikor a bézs kezelést a fehér váltotta fel.

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 mitokondriális DNS (mtDNS) száma magasabb volt a bézs adipocitákban, mint a fehér differenciált zsírsejtekben, és ezt követően csökkent a bézsből fehérbe való átalakulás eredményeként. 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.

Ezt követően extracelluláris fluxus analízist végeztünk a differenciált zsírsejtek funkcionális paramétereinek feltárására. A korábban közölt adatokkal összhangban 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 fehérek, de alacsonyabbat, mint a bézs adipociták, amelyek ugyanilyen 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. 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. A korábbi eredményekkel összhangban a bazális extracelluláris savasodási ráta (ECAR) megnövekedett a bézs adipocitákban a fehér zsírsejtekhez képest, míg az 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. 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*. Elsőként az autofagoszóma kialakulását irányító *ATG* gének expresszióját vizsgáltuk. Az átalakulás során az *ATG5* a második héten

felszabályozódott; ez a különbség azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. Az *ATG7* és *ATG12* mRNA 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 ugyanolyan mértékben fejeződtek ki a fehér és bézs zsírsejtekben.

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. 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. Ezt megerősítettük, amikor az LC3 szubcelluláris eloszlását immunfestéssel tettük láthatóvá. 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. 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 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. 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, mely során számszerűsítettük az autofagoszóma és a mitokondriális marker kolokalizációját a PCC értékekkel. Összhangban a megnövekedett autofágia aktivitással, 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.

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. A parkin kis mértékben expresszálódott a preadipocitákban mind mRNS, mind fehérjeszinten. Az alkalmazott adipogén protokollok hasonlóan fokozták a parkin expresszióját. A fehér-bézs átalakulás nem változtatta meg a parkin expresszióját sem gén, sem fehérjeszinten. 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.

A fehér zsírsejtek NBR1 fehérjetartalma hasonló volt, mint a differenciálatlan progenitoroké, és 28 napos differenciálódást követően csökkenő tendenciát mutatott. A p62 fehérje állandó, mérsékelt szinten volt kimutatható a preadipocitákban és a fehér zsírsejtekben. 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 barnulást indukáló roziglitazon differenciációs tápfolyadékból való eltávolítása után az NBR1 és a p62 mennyisége szignifikánsan csökkent egy, illetve két hét elteltével. Adataink arra utalnak, hogy a mitokondriumok szelektív autofágián keresztül történő degradációja fokozódik a bézs-fehér átalakulás során.

Ezt követően mértük az autofágia adapterhez és a parkin-függő mitofágia útvonalhoz kapcsolódó egyéb markergének, az *OPTN* és a *CALCOCO2/NDP52* expresszióját. Mindkét gén alacsony szinten expresszálódott a preadipocitákban. Az *OPTN* ugyanolyan mértékben expresszálódott a fehér és a bézs zsírsejtekben, és időfüggő felszabályozódást mutatott, de a bézs-fehér átalakulás nem befolyásolta az mRNS-szintet. A *CALCOCO2/NDP52* expressziója megnövekedett a fehér adipogenezis és az átalakulás során a végig bézs irányba differenciált adipocitákhoz képest; ez a mitokondrium tartalom fokozott eltávolításának lehetőségét sugallja az NDP52-függő útvonalon.

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 ebben az útvonalon: *FUNDC1*, *BNIP3*, *BNIP3L/NIX*, FKBP Prolil Izomeráz 8 (*FKBP8*) és *BCL2L13*. 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 voltak. Ez arra utal, 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-ből 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, ami arra utal, hogy a differenciálódási arányuk hasonló volt. A termogenikus markerek, mint például az *UCP1*, *ELOVL3*, *PGC1 α* , *CIDEA*, *CITED1*, *AQP3*, *GK*, *CKMT1 α /b* és *PM20D1* magasabb expressziót mutattak aktív bézs adipocitákban, mint a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtekben. Ezután a globális transzkriptomikai adatainkat nyílt hozzáférésű web-eszközökkel analizáltuk; a BATLAS

segítségével számszerűsítettük a barna adipocita tartalmat, a ProFAT alkalmazásával pedig a barnulási kapacitást jól definiált markergének expressziós szintjei alapján. Nem találtunk szignifikáns különbséget a barna zsírsejt tartalomban, azonban az aktív bézs zsírsejtek magasabb barnulási kapacitást mutattak, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták. 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, melyek között termogénikus markereket - mint például a *GK*, *PM20D1*, *PLIN5*, *CITED1* és *AQP3* - találtunk. Érdekes módon az ASC-1-et kódoló *SLC7A10*, amelyet a termogénikus aktiválás során fontos transzporterként írtak le, mindkét összehasonlításban megtalálható volt a felregulált gének között. 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. A fehér és az inaktív bézs zsírsejtek génexpressziós profiljának összehasonlításakor nem találtunk DEG-eket.

Elemeztük a mitofágia sebességét és a mitokondriális morfológiát ebben a kísérleti elrendezésben is, az LC3 és a TOM20 együttes immunfestésével. Alacsonyabb sejtenkénti LC3 punktátum-számot és PCC-értékeket figyeltünk meg az aktív bézs, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipocitákban. Azt is megállapítottuk, hogy az aktív bézs zsírsejtekben nagyobb mennyiségű fragmentált mitokondrium - amelyekről bizonyított, hogy elősegítik a szétkapcsolt légzést és a fokozott energiafelhasználást - volt megtalálható, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipocitákban. 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.

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 részt vevő 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. Ezután 4 homozigóta TT (rizikó-mentes) és 4 homozigóta CC (elhízás rizikó) genotípusú egyedből választottuk ki a mintákat további elemzésre. Megállapítottuk,

hogy az elhízás rizikó *FTO* allélokot hordozó aktív bézs adipociták alacsonyabb BATLAS-szerint számszerűsített barna zsírsejt tartalmat mutattak, ugyanakkor a fehér vagy az inaktív bézs zsírsejtekben az allélek eloszlásnak nem volt hatása a BATLAS értékekre. Azt is megfigyeltük, hogy a rizikó-mentes genotípust hordozó aktív bézs zsírsejtek tendenciózusan nagyobb BATLAS és szignifikánsan magasabb ProFAT értékkel rendelkeztek, mint az azonos TT genotípust hordozó fehér adipociták. Érdekes módon az *FTO* elhízás rizikó genotípust hordozó aktív bézs adipociták hasonló barna zsírsejt tartalmat és barnulási kapacitást mutattak a fehér zsírsejtekhez képest, 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. Csak 10 gén (ebből 7 közös volt mindkét összehasonlításban) expresszáldott kisebb mértékben CC-t hordozó inaktív bézs zsírsejtekben a TT alléleket hordozókhöz képest. 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. 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. 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 az 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.

5.2.3. A termogenikus marker gének 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 az rizikó-mentes *FTO* allélt hordozták, azonban ez a különbség nem volt megfigyelhető az elhízás rizikó allélt hordozó sejtekben. 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. 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. 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. 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.

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. Azonban nem találtunk különbséget a háromféle differenciálódási program között, amikor az adipociták az elhízás rizikó allélt hordozták. Az elhízás rizikó *FTO* alléllal rendelkező aktív bézs adipocitákban a

mitokondriális komplex I., II. és IV. alegységek expressziója alacsonyabb volt, mint a rizikómentes hordozókban. Hasonló - de statisztikailag nem szignifikáns - tendenciát figyeltünk meg a mitokondriális komplex III. alegység esetében, míg a komplex V. alegység expressziója egyforma volt minden adipocita típusban, függetlenül az *FTO* rs1421085 genotípusától.

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. A stimulált ATP-függő légzést nem befolyásolták jelentős mértékben sem az alkalmazott differenciációs protokollok, sem az *FTO* rs1421085 genotípus. 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. 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.

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

Az aktív termogenikus adipociták metabolikus szubsztrátokat, például szénhidrátokat, zsírsavakat vagy aminosavakat használnak fel a hőtermeléshez. 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. 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. Bár az egér barna zsírsejtek képesek kompenzálni a lipidcseppekből származó zsírsavak hiányát, *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. A termogenikus 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 magasabb volt az *FTO* rizikó-mentes genotípusú aktív bézs adipocitákban, mint az azonos *TT* genotípust hordozó fehér vagy inaktív bézs adipocitákban. Az elhízás rizikó *FTO* alléllal rendelkező aktív bézs adipociták ETO-R oxigénfogyasztása alacsonyabb volt, mint a rizikó-mentes hordozóké. 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. 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. Ez a hatás megfigyelhető volt az ASC-1 fehérje szintjén is. Az *FTO* rs1421085 SNP jelenléte az *SLC7A10* alacsonyabb expresszióját eredményezte aktív bézs adipocitákban; ez a hatás fehérjeszinten statisztikailag szignifikáns volt, mRNS-szinten azonban nem. 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. Az *FTO* rizikó-mentes genotípusú adipociták esetében azt találtuk, hogy az aktív bézs zsírsejtek nagyobb mennyiségű szerint és ciszteint fogyasztottak, és több glicint bocsátottak ki, mint a fehér vagy az inaktív bézs adipociták. A fent említett génexpressziós 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, azonban az SNP-nek nem volt szignifikáns hatása a szerinfogyasztásra, 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 expresszáldott aktív bézs adipocitákban, melyek az elhízás rizikó *FTO*

allélt hordozták, összehasonlítva a rizikó-mentes hordozókkal. Az SHMT1 expressziójára vonatkozó RNS-seq adatainkat RT-qPCR-ral és immunoblot-vizsgálattal validáltuk. 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.

A metabolomikai analízis és RNS-seq adataink a rizikó-mentes allél aminosav anyagcserére - azon belül is a *GPT2* expresszióra - gyakorolt hatására engedtek következtetni. 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* allélokot hordozó adipociták esetében az aktív bézs adipociták több *GPT2*-t expresszáltak mind mRNS, mind pedig fehérje szinten a fehér adipocitákhoz képest. Alacsonyabb *GPT2* kifejeződést is megfigyeltünk az *FTO* elhízás rizikó genotípusú aktív és inaktív bézs adipocitákban a rizikó-mentes allélhordozókkal szemben. 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. 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. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TT *FTO* allélokot 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.

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. Az aktív BAT-raktárak nukleáris képképző módszerekkel felnőtt emberekben történő kimutatását követően erős negatív korrelációt tártak fel az elhízás és az aktív BAT mennyisége között. Független tanulmányok azt sugallják, hogy a felnőtt emberek BAT-raktárai túlnyomórészt bézs adipocitákból állnak. A humán bézs zsírsejtek transzplantációja javította az étrend által kiváltott elhízást és a szisztémás anyagcserét egerekben, ami rávilágít a bézs sejtbeültetés terápiás alkalmazásának lehetőségére az elhízás és a MetS kezelésében. 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, azonban ezek a depók tartalmazznak olyan progenitorokat, amelyek bézs adipocitákat eredményezhetnek. Viszonylagosan könnyű hozzáférhetősége miatt az abdominális SC zsírbiopsziák vagy aspirációk sztomális-vaszkuláris frakcióiból (SVF) izolált hASC-ket gyakran használják a kutatásban és a regeneratív medicinában.

A bézs adipociták aktiválása, például hideg expozíció vagy β -AR agonisták hatására szükséges a magas UCP1 expresszió fenntartásához. A hideg expozíció noradrenalin felszabadulását idézi elő a szimpatikus idegrendszerből, amely a β 3-AR-hoz kötődik. A β -adrenerg jelátviteli kaskád 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. 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.

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. 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. A PPAR γ célgének szabályozhatják a lipidtranszportot (FABP4), a zsírsavfelvételt (LPL, FATP/SLC27A1, OLR1), az intracelluláris zsírsavak újrahasonosítását (PEPCK/PCK1, GK, AQP7) és a lipolízist (GPR81). Ezenkívül a PPAR γ szabályozza az inzulinérzékenységet az adipokinek expresszióján keresztül.

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, mind fehérje szinten, illetve a *CIDEA* gén szintjén, míg fehér zsírsejtekben ezek a markerek folyamatosan expresszázódtak mérsékelt szinten. Ezt a jelenséget kutatócsoportunk reprodukálta az SGBS sejtvonal eredetű zsírsejtekkel, amely a humán fehér és bézs adipogenezis elfogadott és széles körben használt modellje.

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. Pisani és munkatársai kimutatták, hogy az UCP1-pozitív humán zsírsejtek többnyire fragmentált morfológiájú mitokondriumokat tartalmaznak. A közelmúltban azt találtuk, hogy a cAMP által vezérelt termogénikus stimuláció megnövekedett mitokondriális fragmentációt eredményezett humán inaktív és érett bézs zsírsejtekben, amelyek négy helyett két hét alatt differenciálódtak ugyanazon progenitor populációkból. Amikor fenntartottuk a bézs irányú differenciálódást, több mitokondrium fragmentálódott, ellentétben a fehér zsírsejtekkel, amelyekben ezek a dinamikus organellek elongálódtak.

A mitokondriális biogenezis és eltávolítás szabályozása fontos az energiahomeosztázis és a mitokondriumok optimális számának fenntartásához. A mitokondriális biogenezist számos sejtmagban kódolt transzkripciós kofaktor - mint például a PGC1 α - szabályozza. 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. Az mtDNS mennyisége azonban növekvő tendenciát mutatott a hosszú távú bézs adipogenezis során. 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 rozigitazon 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.

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. Hosszú távú differenciálódási körülmények között a tartós rozigitazon adagolás a mitofágia mérsékelt fékeődését is eredményezte, amit az LC3-I LC3-II-vé való átalakulásának lassulása, LC3-pozitív ponttátumok megjelenése, a ponttátumok és a mitokondriumok kolokalizációja, valamint az adapterfehérjék lebontása mutatott. További vizsgálatokra van szükség a háttérben zajló molekuláris mechanizmusok feltárásához, amelyek bizonyítják a mitofágia mérsékelt alacsony szintjét a bézs adipocitákban.

Hím egerekben bebizonyították, hogy a CL 316,243 β 3-adrenerg agonista intraperitoneális beadásával indukálódik a WAT bézsosodása hét egymást követő napon keresztül. Alacsony autofágia aktivitást figyeltek meg az újonnan differenciálódott bézs zsírsejtekben, ami összhangban van az itt bemutatott *ex vivo* eredményekkel. A termogénikus inger visszavonása után azt találták, hogy a bézs zsírsejtek elvesztették morfológiai és termogénikus jellemzőiket, és „fehér-szerű” zsírsejteké alakultak, amit a mitokondriumok eltávolítása váltott ki a mitofágán 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-adrenerg agonistával kezeltek.

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, *CIDEA* és *LEP* expressziója, a mitokondriumok fragmentációja és a bazális légzése 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. 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. Az autofágia hozzájárulását ehhez a váratlan eredményhez eddig nem vizsgálták.

Adataink összhangban vannak Kajimura munkacsoportja *in vivo* vizsgálatának korábbi 2016-ban publikált eredményeivel, 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. Az *ex vivo* átalakult bézs zsírsejtek azonban hatékonyabban reagáltak az adrenerg ingert utánzó dibutiril-cAMP-re az OCR, a protoncsorgásos légzés és az ECAR aktiválásával, mint a fehérek. Megjegyzendő, hogy az UCP1 fehérje jelentős mennyiségben expresszálódott kéthetes átalakulást követően, 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 emberekben.

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 roziglitazon kezelés hatására a fehérje expressziója csökkent. 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. Ezekkel az eredményekkel ellentétben Corsa és munkatársai azt találták, hogy az egér zsírsejtekben a parkin deléció nem befolyásolta az adipogenezist, a bézs-fehér átalakulást és a bézs zsírsejtek aktív állapotának fenntartását. 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. Kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a parkin gén- és fehérjeexpressziója nem változott a bézs-fehér átalakulás során. Azonban az NBR1 és a p62 szelektív adapterfehérjék szintje szignifikánsan csökkent, a *CALCOCO2/NDP52* és a vizsgált parkin-független mitofágiával kapcsolt gének 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. Beszámoltak arról, hogy a teljes testet érintő p62 knockout egerek elhízott fenotípust mutattak a megnövekedett zsírosodás és a csökkent energiafelhasználás miatt. Ezen túlmenően a BAT mitokondriális funkciója adipocita-specifikus p62^{-/-} egerekben károsodott, ami azt eredményezte, hogy a BAT nem reagált a β 3-adrenerg ingerekre. 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. 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. 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 SC WAT-jában. 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. 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 energiefelhasználás zavarát okozza

Az abdominális zsír SC és intraabdominális zsírra osztható, amely főként zsigeri vagy intraperitoneális WAT-ból áll. Számos tanulmányban leírták, hogy a zsigeri WAT felhalmozódása erősen korrelál az anyagcsere-rendellenességek kockázatával, míg más vizsgálatok azt állították, hogy az abdominális SC WAT védő szerepet tölthet be. Egy újabb tanulmányban PET/CT technika alkalmazásával megerősítették, hogy emberekben BAT vagy barnítható zsírszövet található a nyaki, szupraklavikuláris, hónalji, mediasztinális, paravertebrális és abdominális depókban. Doktori munkám során RNS-szekvencia 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. Nem találtunk DEG-eket a fehér és inaktív

bézs adipociták összehasonlításakor, ami a génextpressziós 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. A cAMP-vel ellentétben - amelyet a foszfodiészteráz (PDE) tud hidrolizálni - a dibutiril-cAMP ellenáll a PDE általi lebontásnak. A cAMP aktiválja a PKA-t, amely különféle fehérjéket foszforilál és további protein-kinázok aktiválásának egymást követő kaszkádjait indítja el. Az utóbbi időben a PKA-nak fontos szerepet tulajdonítanak a géntranszkripció szabályozásának egyik fontos elemeként, mely során a CREB aktiválása az egyik legtöbbet vizsgált kapcsolat a PKA és a megvalósult génextpressziós szabályozás között. 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 termogenikus gének expressziójára gyakorolt hatása az aktív bézs differenciáció végéig fennmaradt. Ez arra utal, hogy a dibutiril-cAMP génextpressziót 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 differenciójának korai szakaszában. Ennek következtében a prekursor sejtek elkötelezettsége a bézs helyett a fehér program irányába tolódik el és fokozódik a lipidraktározás. Amikor a három különböző adipocita típus génextpressziós 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 génextpressziós profilját, különösen a termogenikus markerek (*CITED1*, *CIDEA*, *PLIN1*, *LIPE*, *CKMT2* és *S100b*) kifejeződését. Azonban ez a hatás nem volt megfigyelhető a fehér és az inaktív bézs adipocitákban. A CIDEA, PLIN1 és LIPE - lipidcsepp-asszociált fehérjék, melyek szabályozzák a triglicerid akkumulációt és a lipolízist - géneinek 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. Feltételezték, hogy az S100b fehérje szerepet játszik a termogenikus zsírszövet szimpatikus beidegzésében azáltal, hogy stimulálja a szimpatikus neuronokból a neurit növekedést a kalszintenin (CLSTN) 3 β tengelyen keresztül. 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* $\beta^{-/-}$ egerek nem rendelkeztek defektussal a BAT szimpatikus beidegzésében és adrenerg jelátvitelében. Az S100b csökkent expressziója az elhízás rizikó *FTO* allélt hordozó abdominális SC adipocitákban azonban részben hozzájárulhat az abdominális SC WAT alacsonyabb termogenikus 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. Eredményeink arra utalnak, hogy az *FTO* rs1421085 C alléljai elnyomják a humán abdominális SC adipociták termogenikus aktivációját; még a hosszú távú roziglitazon 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 termogenikus markerek - mint például a *CKMT1A/B*, *CITED1*, *PPARGC1A/B* és *CPT1B* - valamint a mitokondriális elektrontranszport és a zsírsav-anyagcsere génjeinek expressziója.

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. Adataink azt mutatták, hogy a rizikó-mentes genotípust hordozó aktív bézs adipociták magasabb ETO-R oxigénfogyasztást mutattak, 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. 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. 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. 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. 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. 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. A szerin fontos metabolikus forrása az emlőssejtekben az egy-szénatomos töredékek létrehozásához, amelyeket az SHMT enzim mindkét izoformája, az SHMT1 (citoszolikus) és az SHMT2 (mitokondriális) termeli. 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. 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. Az egy-szénatomos töredékek metabolizmusa funkcionális kölcsönhatást alakít ki a mitokondriális oxidatív foszforilációval, amely kulcsfontosságú az ATP vagy a hőtermelés szempontjából emlőssejtekben. 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.

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. A glutamin a legnagyobb mennyiségben előforduló szabad aminosav a keringésben 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. 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. 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. 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. 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 energiafelszabadítás csökkenéséhez.

Az *FTO* rs1421085 SNP és az elhízás vagy a megnövekedett TTI közötti pozitív korrelációt számos populációban megfigyelték, mint például észt és kínai gyermekeknél, iráni felnőtteknél, arab, pakisztáni, balinéz és mexikói maja lányoknál. Több mint 100 000 európai származású, cukorbetegségben nem szenvedő egyén adatainak genomszintű asszociációs meta-analízise során kiderült, hogy az *FTO* rs1421085 SNP szignifikánsan összefügg az éhgyomri inzulinszinttel. Laber és munkatársai (2021) kimutatták, hogy egerekben az rs1421085 konzervált cisz-szabályozó moduljának deléciója 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 és jelenlegi eredményeink rámutattak az *FTO* rs1421085 SNP elhízás rizikó genotípusának – melynek prevalenciája magas az európai populációban és mexikói gyerekek esetében (12,93%–18,67%) – 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, energiefelzabarást 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* allélokat 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.



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.

