



**A barna és fehér zsírszövet szerepe a hideg-indukált
h termelésben**

Ph.D. értekezés tézisei

Jakus Péter

Témavezet k:

Prof. Dr. Sümegi Balázs

Prof. Dr. Sándor Attila

Pécs Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2010.

RÖVIDÍTÉSEK

ACC	acetyl-CoA karboxiláz
AKT	Akt1, protein kináz B (PKB)
BZS	barna zsírszövet
cAMP	adenozin 3',5'-ciklikus monofoszfát
CitLy	ATP-citrát liáz
ECL	kemilumineszcenciás reagens
GLUT4	glükóz transzporter-4
GSK3 β	glikogén-szintáz kináz-3 β
FZS	fehér zsírszövet
HSL	hormon szenzitív lipáz
MALDI	matrix-asszociált lézer deszorpció/ionizálás
NE	noradrenalin
P-ACC	foszforilált-ACC
P-AKT	foszforilált -AKT
PFK-1	foszfofruktokináz-1
P-GSK3	foszforilált -GSK3 β
PHD	piruvát-dehidrogenáz complex
PKA	protein kináz A
TOF	repülési idő ; tömegspekrométeres detektor típus
UCP	szétkapcsoló fehérje

BEVEZETÉS

Az emlősök testhőmérsékletüket állandó szinten tartják, függetlenül a külső hőmérséklet változásaitól. Az emlősöknek a hőtermelés három típusa különíthető el, mint a didergés, a hőmérséklet-által szabályozott és az anyagcsere által szabályozott hőtermelés. Az anyagcsere által szabályozott hőtermelés a hőegyensúly és a testtömeg között teremt kapcsolatot. A dolgozat a hőmérséklet-által szabályozott hőtermelés néhány aspektusát vizsgálja.

Az alacsony hőmérséklet által kiváltott elsődleges hőtermelés a didergés, ami a vázizom összehúzódása által keletkezik. Hosszabbtávú hideg hatására bizonyos emlősökben a didergés átvált a hőmérséklet-által szabályozott hőtermelésre. Ennek az emlősökre jellemző hőtermelési folyamatnak nincs szüksége izom-összehúzódásra.

Kezdetben a barna zsírszövet szerepét félreismerték, a csecsemőmirigy egy részének gondolták. Csak a korai 1960-as években tisztázódott pontos szerepe, hogy a hőtermelésben vesz részt, Donhoffer és Smith munkássága által.

Kétféle zsírszövetet különböztethetünk meg, úgymint barna- és fehér zsírszövetet. A két zsírszövet szerepe és szövettani képe is eltér. A fehér zsírszövet (FZS) a zsírok raktározására specializálódott jellegzetesen univacuolaris zsírsejtek építik fel, amelynek citoplazmája és sejtmagja a szélre nyomódott. Más szövetek zsírsavval való ellátását tudja biztosítani. A FZS-nek jelentős szerepe van a szervezet hőszigetelésében is, segítve a testhőmérséklet fenntartását. A vérben szállított zsírsavak elsősorban a szív- és izomszövet tápanyagellátását biztosítja. Az inzulin felszabadulása a hormon-szenzitív lipáz (HSL) inaktiválódásához vezet, és gátolja a zsírsavak lebontását, míg ezzel szemben a glukagon ellentétes hatást vált ki, és a zsírsavak felszabadulásához vezet foszforilációs kaskád révén, többek között foszforilálva a perilipin nevű fehérjét és a HSL-t. A szabad zsírsav a véráramba jutva albuminhoz kötődve szállítódik, míg a trigliceridek 1 származó glicerinnel a májban glükoneogenezisre vagy energiatermelésre fordítható.

A hideg hatásnak kitett barna zsírszövet (BZS) rendeltetése más, és elkülönül a környezetétől a barnás-vöröses színével, amely a nagy számú mitokondrium és azon belül is a jelentős citokrómoknak köszönhető. Szöveti képe jellemző, hogy a zsírcseppek multivacuoláris megjelenésűek, és a szövet gazdagon behálózott kapilláris vérerekkel. A BZS fő szerepe a jelentős mitokondrium mennyiségből adódik, amely a zsírok oxidációjából származó energiát hőtermelésre fordítja, így közreműködik a testhőmérséklet fenntartásában. Ez a folyamat csak a részben szétkapcsolt mitokondrium állapotában lehetséges. A barna zsírszövet stimulálása, pl. noradrenalinral a tárolt trigliceridek gyors hidrolíziséhez vezet, amely rögtön belépnek a β -oxidációba. A kísérletek sorozata a 70-es években abba az irányba mutatott, hogy a barna zsírszövetnek egy atipikus ionáteresztő képességgel kell rendelkeznie, és ezen kísérletek feltételezték egy speciális fehérje jelenlétét a mitokondrium belső membránjában, amely felelős lehet az eddig megismert nem természetes ion-áram vezetéséért. Ez a protein a termogenin nevet kapta illetve szétkapcsoló fehérje vagy uncoupling protein-1 (UCP1). Az UCP1 fehérje a mitokondrium belső membránjában található homodimer formában, purin nukleotidok allosztérikusan szabályozzák a működését, az ADP, GDP aktiválják, az ATP, GTP csökkenti aktivitását.

Az UCP1 felelős a proton visszaáramlásáért a mitokondrium intermembrán teréből a mátrixba, megkerülve az F_0F_1 ATP-ázt. Ezáltal a membránpotenciál energiájának egy része hőenergiává alakul. A UCP fehérjék részt vesznek a respirációs lánc regulációjában is.

Jelentős mérföldkő volt a szétkapcsoló fehérjék vizsgálatában, amikor az UCP1 homológjait emberi szövetekben is felfedezték (UCP2 és UCP3). Fontos szempont, hogy az UCP2 és UCP3 jóval kisebb mennyiségben fejeződnek ki, mint az UCP1, így ezek a fehérjék mérsékelt szétkapcsoló hatással rendelkeznek. Az UCP2 expressziója általános az emlős szervezetben, a legtöbb szövetben megtalálható. Az UCP3 kifejeződése a barna zsírszövetre és az izomszövetre jellemző. Habár az UCP2-nek és UCP3-nak szintén jelentős a barna zsírszövetben az mRNA szintje, neutrális hőmérsékleten csupán az UCP3-nak van érdemi fehérje kifejeződése, az UCP2 elhanyagolható

A szétkapcsoló fehérjék közül az UCP1- és UCP3-nak kifejezése ellentétes a hideg adaptációban, a barna zsírszövetben. Az UCP1 expressziója emelkedik, az UCP3-é csökken, míg mRNA szintjük egyaránt magas. A jelenség nem ismeretlen, a háttérben poszt-transzkripció és poszt-transzlációs folyamatokat kell feltételeznünk. A jelenség viszont egybevág az UCP1 és UCP3 purin nukleotidok általi aktivitásbeli szabályozásával, miszerint az UCP3 aktiválódik magasabb ATP, és gátlódik magasabb ADP szint mellett.

A barna zsírszövet hormonális szabályozásában az inzulin és a noradrenalin (NE) játssza a legfontosabb szabályozó szerepet. Az emelkedett inzulinszint az inzulin-receptor szignál fehérje (IRS-1) foszforilálásával aktiválódik a foszfatidil-inozitol-3 kináz (PI-3K), amely a protein-dependes kináz (PDK) által foszforilációval aktiválja a protein kináz B-t (AKT). Az AKT aktivációja a glikogén szintáz kináz (GSK3 β) inaktiválódásához vezet, így a glikogén szintáz foszforilációja lecsökken, és ezzel párhuzamosan növekszik a foszfoprotein-foszfatáz (PP1) aktivitás, így eredetileg a glikogén szintáz aktiválódik. Mindez egy igen jelentős glikogén felhalmozódást tesz lehetővé a BAT-ban például hideg-hatás utáni reakklimatizációnál (Farkas és mtsi., 1999).

Az értekezés kiindulási pontja az a megfigyelés volt, hogy drámai glikogén felhalmozódás volt megfigyelhető a barna zsírszövetben hideg környezethez való alkalmazkodást követően neutrális hőmérsékletre való visszatérést követően, miközben a BZS atrófiát szenved (Farkas és mtsi., 1999).

A kifejlett barna zsírszövet sejtjein a noradrenalin három α receptoron keresztül fejti ki hatását: β_1 , β_2 és β_3 . A BZS hőtermelésére β_3 -receptorokon keresztül valósul meg.

A barna és fehér zsírszövet között hideg környezeti hatás alatt együttműködés jön létre. A megemelkedett noradrenalin szintnek köszönhetően a fehér zsírszövetben az NE szignál cAMP szint emelkedésén keresztül protein kináz aktiválódást eredményez foszforilálva a perilipint és a HSL-t, zsírsav felszabadulást eredményezve. A együttműködés eredményeképp a NE hatására cAMP, PKA útvonalon keresztül fokozódik az β -oxidáció és UCP1 génexpressziója kifejezése a BZS-ben, így a fehér zsírszövet zsírsavakkal látja el a barna zsírszövetet, biztosítva, hogy a BZS ATP- és hőtermelésre egyaránt energiát tudjon fordítani. A BZS-ben érdekes módon emelkedik a

zsírsavszintézis fluxusa, amellyel párhuzamosan a zsírsav lebontás szintén emelkedést mutat jóval nagyobb mértékben. A zsírsav szintézis mértékét trícium beépülésével vizsgáltuk mind BZS, mind FZS-ben. A háttérben meghúzódó részben lipogénikus enzimek mint, citrát szintáz (CitLy) és az acetyl koenzim-A karboxiláz (ACC), részben a glikogén anyagcserében részvevő enzimek mint a piruvát dehidrogenáz (PDH) és a foszfofruktó-kináz változásait vizsgáltuk párhuzamosan barna zsírszövetben hideg adaptációban és azt követő reakklimatizációban. A lipogénikus enzimek változásait fehér zsírszövetben is nyomon követtük.

CÉLKIT ZÉSEK

- 1) Hideg adaptációban észrevettük, hogy fokozott kifejezést mutat a citrát-liáz és az acetil koenzim-A karboxiláz patkány barna zsírszövetben. Szétkapcsolt mitokondrium mellett tisztázni kívántuk, hogy milyen mérték a zsírsavszintézis barna zsírszövetben. Tanulmányozni kívántuk az UCP1-et nem tartalmazó fehér zsírszövet hozzájárulását a termogenezishez, azaz a kétfajta zsírszövet együttes működését a lipogénikus enzimek részletesebb viselkedését mindkét zsírszövetben.
- 2) Korábban Farkas és mtsi. (1999) által megfigyelt hidegadaptációt követő reakklimatizációban jelentős a barna zsírszövet glikogén felhalmozása a szövet atrófiája mellett. A háttérben álló jelátviteli szabályozás leírását célul tűztük ki. A vizsgálatot izomszöveten is megneztük.
- 3) A hideg adaptáció és a 24 / 48 órás reakklimatizáció során az intenzív barna zsírszöveti atrófiával párhuzamosan a jelentős glikogén felhalmozás mellett felmerült a szétkapcsoló fehérjék szerepe is. Szándékunkban volt megvizsgálni a szétkapcsoló fehérjék esetleges változását, mint fehérje, mint mRNS szinten.

MÓDSZEREK

Állatkísérletek feltételei

Hím Wistar patkányokon (200-250g között) végeztük megfigyeléseinket. Az állatokat neutrális hőmérsékleten tartottuk, majd egy hetes hideg környezetbe helyeztük, ezek után 6, 24, és 48 órás neutrális hőmérsékletre visszavettük. A hideg környezet +5°C-ot, a neutrális +29 °C-ot jelent a kísérletek során.

Western blot

A fehérjeminták 12%-os poliakrilamid gélen voltak elválasztva, majd nitocellulóz membránra blottolva, amelyet a következő antitestekkel történt előhívás követett: UCP1-antitestért köszönet Barbara Cannon-nak (Stockholm University, Sweden), UCP3 (Linco Research Inc. St. Charles, USA). Ezen antitest specifikus az UCP3-ra azon belül is csak az UCP3 –hosszabb formájára (UCP3L). AKT, P-AKT, GSK3, P-GSK3, CitLy, P-CitLy, ACC, P-ACC előleges antitestek a Cell Signaling cégtől kerültek beszerzésre (Kvalitex Kft., Bp. Magyarország). A második antitestek (anti-nyúl-peroxidáz kapcsolt) a Sigma Magyarországi képviseletétől, az anti-tengerimalac-peroxidáz kapcsolt antitest a Rockland cégtől (Gilbertsvill, USA) lettek megrendelve. A blottokat ECL-plus oldattal hívtuk elő (Amersham Pharmacia UK) Röntgen-filmen.

Antitest előállítás frataxin ellen

A humán frataxint kódoló cDNS ember agyi cDNS könyvtárból lett előhívásítva a következő primerek használatával:

A forward primer szekvenciája: AAAAGATCTATGATAGCAGCGGCAGGAGGA, míg a reverse primer szekvenciája: AAACCTCGAAGAGAGTCGATGGATAAGTG. A felszaporított termék pGEX 4T-1 plazmidba lett inszertálva fuzionáltatva glutathion-S-tanszferázzal (GST). A fúziós fehérje BL21-es Echeria Coli baktériumokban lett kifejezve és glutathion sepharose-on

választottuk el (Pharmacia). Az izolált GST-frataxin fúziós fehérjét használtuk, mint antigént és ellene nyúlban poliklonális antitestet termeltettünk.

mRNS vizsgálat (Northern blot)

Totál RNS az interscapuláris barna zsírszövetből izoláltuk fenol-kloroformos módszerrel, majd 1,2%-os formaldehides agaróz gélen választottuk el. Ezután az RNS mintát Hybond-N membránra blotoltuk. A UCP1 és UCP3-hoz a DNS próbát Barbara Cannontól kaptuk (Stockholm University, Sweden). A blotokat HP-Camberra PhosphoImager-plattformon detektáltuk, és az adatokat OptiQuant szoftverrel analizáltuk.

Tömegspektrofotometriás analízis

Az emésztett minták ZipTipC18 tippel lettek megtisztítva (Millipore, Bradford, MA, USA) a gyártó utmutatásai alapján 1 µl eluátum a ZipTip-ről 1:1 arányban lett összekeverve telített DHB mátrix (2,5-dihidroxibenzoéssavval) oldattal és Anchor chip MALDI plate-re feltéve. Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) pozitív ion reflektív módban m-ködött készlettel extrakcióval. Önemésztett tripszin volt a belső standard a tömegkalibrációhoz. Az összes peptid ion jelének monoisotopikus tömegének spektrum adatai össze lettek gyűjtve, majd a spektrumok adatbázis keresésben Mascot programmal lettek kiértékelve (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com>)

Enzim aktivitások

A piruvát dehidrogenáz, foszfofruktokináz, acetyl-CoA karboxiláz, citrát-liáz aktivitások spektrofotometriás módszerrel lettek meghatározva a jelölt cikkekben leírtak alapján.

Glükóz felvétel

A glükóz felvételt 2-deoxy-[¹⁴C] glükózzal volt nyomon követve. Az intraperitoneális radioaktív cukor (7.4 kBq) beadása után 1 órával a glükóz koncentrációt meghatároztuk a

vérplazmából, míg a radioaktivitás a barna zsírszövetben és a vérplazmából szintén meg lettek mérve. A plazma specifikus radioaktivitásának értékéből számoltuk a glükóz felvételt.

In vivo zsírsav szintézis

$^3\text{H}_2\text{O}$ beépüléssel vizsgáltuk a de novo zsírsavszintézist, amely független a szénforrástól. 370 kBq tríciumos víz intraperitoneálisan lett beinjektálva, majd egy óra múlva az állatok elaltatva. A zsírsavak radioaktivitása barna és fehér zsírszövetben folyadék-szcintillációs méterrel lettek meghatározva. Az eredmények a beépült $\mu\text{g H atom/ 1g szövetre/ 1óra}$ egységre lettek megadva.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az ACC és CitLy változásai

Az acetyl-CoA karboxiláz (ACC) és a citrát liáz (CitLy) mint lipogénikus enzimek ellentétesen változásai barna és fehér zsírszövetben fontos szerepet töltenek be a két szövet típus kooperációjában a hőtermelés szempontjából hideg adaptációban. A fehér zsírszövet elsősorban zsírsavszolgáltató, míg a barna zsírszövet zsírsav felhasználó.

Az emelkedett ACC és CitLy aktivitások barna zsírszövetben, hideg környezetben erőteljes zsírsavszintézisre utalnak. Ezzel ellentétben a zsírszintézis fenti két kulczenzímjének aktivitása lecsökken fehér zsírszövetben. A tríciumos beépülés a zsírsavakba és az enzimaktivitás vizsgálata egyértelműen mutatja a két enzim ellentétesen szabályozott. Az emelkedett zsírsavszintézis mellett sokkal jelentősebb a β -oxidáció barna zsírszövetben, hidegben, amelyre a zsírtartalom megmérése adja az indirekt bizonyítékot.

Hideg környezetben csak az ACC1 izoenzim foszforilálódik csak (amely a zsírsavszintézisért felelős) és nem az ACC2 (amely a karnitin aciltranszferáz regulációjáért felelős) barna zsírszövetben. Az ACC1 foszforilációja, amely az inaktív formája, mennyiségileg nem jelentős, összehasonlítva a teljes ACC szint emelkedésével. Ez érthető, hiszen hideg környezetben a BZS-ban jelentősebb zsírsav szintézis indul meg. A CitLy hideg környezetben jelentősen mértékben foszforilálódik. Arra a kérdésre, hogy mi okozza a zsírsavszint növekedését, amely mellett a zsírsav lebontás fluxusa még jelentősebb, többféle mechanizmus adhat magyarázatot. A UCP1 fehérjék proton transzport folyamatai még ma sem pontosan tisztázódtak, van olyan elképzelés, amely zsírsav feltételéhez köti közvetlenül a proton transzportot. A növekvő β -oxidáció kompenzálását szolgálhatja a növekvő zsírsav szintézis.

A glikogén akkumuláció molekuláris háttere

A glükóz felvétel jelentősen megnövekedett hideg adaptációban, és emelkedett szintet mutat visszavétel hatására is. A glükóz transzporter-4 (GLUT-4) mennyisége szintén megnövekszik hideg környezetben és emelkedet marad visszavételnél is. A szérumban az inzulin szint enyhén csökkenést mutat, a foszfofruktó-kináz aktivitása érdemben nem változik hőmérsékletváltozás hatására. A piruvát dehidrogenáz (PDH) aktivitása hidegben enyhén csökkenést, majd visszavételnél szignifikáns csökkenést mutat, miközben a glikogén mennyisége jelentős mértékben fokozódik. Ez arra a következtetésre utal, hogy a felvett jelentős mennyiség glükóz lebontása gátolt, így szabad szénhidrát forrás áll rendelkezésre a glikogén szintézishez. A glikogén szintézis ismert jelátviteli útvonalát megvizsgáltuk BZS-ban és izomszövetben egyaránt, úgymint az AKT és GSK3 β foszforilációs változásait. Az eredmények jól mutatják a hideg hatására inaktiválódik a glikogén szintáz, ami a csökkent a glikogén szintézisben közvetlenül mérhető. BZS-ban visszavételnél pedig a glikogén szintézis mértéke drámaian megemelkedik, ahogy azt a p-AKT (aktív) szint emelkedése és a p-GSK3 β (inaktív) emelkedése mutatja. Az izomszövet jelentős glikogén raktárral rendelkezik. Fontos szempont, hogy a glikogéntároláshoz vezető jelátviteli út izomszövetben, csupán a reaktiválódás során aktiválódik, hideg hatására az útvonal nem mutat változást. A hideg hatására bekövetkező inzulin szint csökkenésre a BZS sokkal érzékenyebben reagál, mint az izomszövet.

A szétkapcsoló fehérjék változása

Az UCP1 és UCP3 fehérje vizsgálatakor kiderült, hogy az UCP1 mennyisége jelentősen megemelkedik hideg környezetben, és még 24 órát követően visszavételnél is megtartja emelkedett szintjét a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az UCP3 kifejeződése jelentősen csökken ugyanilyen feltételek mellett, és 24 órás visszavételnél enyhén visszatérést mutat a hideg mintákhoz képest. Összevetve az UCP1 és UCP3 fehérjeváltozásait, ellentétesen módon jelentős mennyiségi változás mutatnak hideg környezetben, ezzel szemben a mRNS-ük szintje mindkét fehérjének párhuzamosan

megn tt. A vizsgálat egyértelm en mutatja a termogenezisben az UCP1 játssza kizárólagosan a f szerepet, az UCP3 inkább a respirációs lánc szabályozásában vesz részt. Ez a fehérjeszinten megnyilvánuló ellentétes kifejezés egybevág a két fehérje allosztérikus szabályozásával is, miszerint a nagyobb ADP/ATP arány az UCP1 aktivitásának kedvez és gátolja az UCP3-at, és fordítva.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezet imnek Dr. Sümegi Balázs, Dr. Sándor Attila professzoroknak, akik lehetővé tették számomra az itt bemutatott eredmények elérését. Köszönöm Dr. Sümegi Balázsnak tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat lehetővé tette a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben. Köszönöm Dr. Sándor Attila professzor úrnak, hogy vezette és irányította munkámat. Szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának.

9. PUBLIKÁCIÓK

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZ PUBLIKÁCIÓK

1. JAKUS P.B., SIPOS K, KISPAL G, SANDOR A.

Opposite Regulation of Uncoupling Protein 1 and Uncoupling Protein 3 in vivo in Brown Adipose Tissue of Cold-exposed Rats.

FEBS Lett. 2002 May 22; 519(1-3):210-214. (IF.: 3,9)

2. JAKUS P.B., SANDOR A, JANAKY T, FARKAS V.

Cooperation between brown- and white adipose tissues of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in brown adipose tissue during reacclimation.

J Lipid Res. 2008 Feb ;49(2):332-339. (IF.: 4,3 (2006))

EGYÉB PUBLIKÁCIÓ

3. KOCSIS B, KUSTOS I, KILÁR F, NYUL A, JAKUS PB, KERESKES S, VILLARREAL V, PRÓKAI L, LÓRÁND T.

Antifungal unsaturated cyclic Mannich ketones and amino alcohols: Study of mechanism of action.

Eur J Med Chem. 2009 May;44(5):1823-9. Epub 2008 Nov 7. (IF.: 2,3 (2007))

Összesített impact faktor: 10,5

HIVATKOZHATÓ ABSZTRAKTOK

1. P.B. JAKUS, V. FARKAS, A. SANDOR

Signal transduction leading to dramatic accumulation of glycogen in brown adipose tissue.

Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, Brussels, Belgium, July 1 – July 9. 2003

2. Z. BOGNAR G. VARBIRO, B. RADNAI, A. TAPODI, K. HANTO, P.B. JAKUS, F. GALLYAS JR AND B. SUMEGI

The effect of Poly-(ADP)-Ribose Polymerase inhibitors on Taxol induced cell death in cultured cells.

30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference; Budapest, Hungary 2-7 July 2005.

3. B. RADNAI, B. VERES, K. HANTO, **P.B. JAKUS**, A. TAPODI, G. VARBIRO, Z. BOGNAR, S. VETO, B. SUMEGI

The Effect of a Novel Poly-(ADP)-Ribose Polymerase inhibitor HO-3089 on the LPS Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage Cells

30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary 2-7, July, 2005

EL ADÁSOK

1. **JAKUS P.B.**, TAPODI A., VARBIRO G.

Analysis of the amiodarone induced geneexpression changing by DNA-array
A Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpoziuma, Pécs, 2002. december 11.

2. SÜMEGI B., KOVÁCS K., VERESB., RADNAI B., HANTÓ K., **JAKUS P.B.**

Effect of the Poly-(ADP)-Ribose Polymerase inhibition on the LPS induced signalling pathways and gene expressions

XII. sejt-és fejl désbiológiai napok, Pécsi Akadémiai Bizottság, Pécs, 2004 április 16-18.

3. **JAKUS P.B.**, FARKAS V., SZABÓ A., SÁNDOR A.

A new role of the glycogen synthase kinase-3: regulation of the fatty acid synthesis by phosphorylation of acetyl-CoA-carboxylase.

35. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2005. május 24-27

EGYÉB ABSZTRAKT

1. LÓRÁND TAMÁS, KUSTOS ILDIKÓ, KILÁR FERENC, NYÚL ADRIENN, KEREKES SZILÁRD, **JAKUS P.B.**, KOCSIS BÉLA;

Analysis of antifungal mechanism of Mannich ketones and amino alcohols;

Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechológiai Szimpózium 2007, Eger, 2007. szeptember 27-28



Role of Brown and White Adipose Tissue in Cold-Induced Thermogenesis

Ph.D. Dissertation

Péter Jakus

Department of Biochemistry and Medical Chemistry

Faculty of Medicine

University of Pécs

Hungary

2010

Head of Doctoral School: Prof. Balázs Sümegei, D.Sc.

Supervisor: Prof. Attila Sándor, D.Sc.

LIST OF ABBREVIATIONS

ACC acetyl-CoA carboxylase

AKT	Akt1, also known as "Akt" or protein kinase B (PKB)
BAT	brown adipose tissue
cAMP	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
CitLy	ATP-citrate lyase
ECL	Chemiluminescent reagent
GLUT4	glucose transporter-4
GSK3	glycogen-synthase kinase 3 β , it is a serine/threonine protein kinase
HSL	hormone sensitive lipase
MALDI	matrix-assisted laser desorption / ionization
MS	mass spectrometry
NE	norepinephrine
P-ACC	phosphorylated-ACC
P-AKT	phosphorylated -AKT
PFK-1	phosphofuctokinase-1
P-GSK3	phosphorylated -GSK3 β
PHD	pyruvate dehydrogenase complex
PKA	protein kinase A
TOF	time of flying, mass spectrograph detector
UCP	uncoupling protein
WAT	white adipose tissue

INTRODUCTION

There are different kinds of heat production like shivering and non-shivering thermogenesis (their collective name are *thermoregulatory thermogenesis*) and the nutrition related: this thermogenesis is called *metaboloregulatory thermogenesis*. Metaboloregulatory thermogenesis connects heat balance with body weight regulation. We focus on thermoregulatory thermogenesis, especially non-shivering thermogenesis in this dissertation.

The first mechanism of heat production activated in the situation of an acute cold exposure is shivering, in which heat is released by skeletal muscle. This process is regulated by the hypothalamus. During extended periods in the cold, mammals switch from shivering to non-shivering thermogenesis. This mammalian-specific mechanism (non-shivering thermogenesis) of heat production does not require muscle contraction under conditions of severe cold stress.

Initially, brown adipose tissue was generally mistaken for a part of the thymus. Only in the early 1960-ies, was evidence provided that brown adipose tissue is a site of thermogenesis.

There are two types of adipose tissues, white and brown adipose tissue (WAT, BAT), and there are some distinctive differences between them. The functions and histological appearance of these tissues are quite different. White adipose tissue store fat as an energy reserve, and release the fat to the blood stream as fatty acids to be used by other organs. WAT has a typical univacuolar cells. Upon release of insulin from the pancreas, insulin receptors of white adipose cells cause a dephosphorylation cascade that lead to the inactivation of hormone-sensitive lipase (HSL). Upon release of glucagon from the pancreas, glucagon receptors cause a phosphorylation cascade that activates HSL, causing the breakdown of the stored fat to fatty acids, which are exported into the blood and bound to albumin, and glycerol is exported into the blood freely. Fatty acids are taken up by muscle and cardiac tissue as a fuel source, and the liver takes up glycerol for gluconeogenesis or

producing energy. WAT has a considerable role in the heat conservation also helping to maintain body temperature.

BAT serves another purpose and it separates from environment by its brown-reddish colour. Its colour is a result of large number of mitochondria, thus large amount of red cytochromes. Their major function of BAT comes from the existence of many mitochondria, which produce heat by fatty acid oxidation, and thereby contribute to maintain the body temperature and regulation of energy expenditure. It is possible only in the partially uncoupled mitochondria, because the coupled mitochondria are ADP dependent. Stimulation of brown adipocytes with e.g. norepinephrine (NE) leads to a rapid hydrolysis of stored lipid droplets. The resulting fatty acids are oxidised at high rate in the abundant mitochondria. A series of experiments performed in the 1970-ies indicated that brown fat mitochondria possess “atypical” ion permeability properties, and it was suggested that a specific protein in the mitochondrial inner membrane is responsible for the abnormal ion conductance of these mitochondria. Such a protein was identified and called thermogenin, presently known as uncoupling protein-1 (UCP1).

UCP proteins are responsible for the re-entry of proton gradient bypassing the F_0F_1 ATP-ase dissipates energy of H^+ gradient as heat. UCP proteins also regulate respiratory chain also. UCP1 is located in the inner membrane of the mitochondria of brown adiposities, and is likely to function as a homodimer. UCPs are regulated by purin nucleotides.

It was a milestone when sequence homologues of UCP1 were discovered. It is very important that UCP2 and UCP3 occur in the human tissues. Nevertheless, we should keep in mind that UCP2 and UCP3 are expressed relatively very poor amount compared to UCP1 and can be regarded as mild uncoupling proteins. The UCP2 is located ubiquitous in mammals. UCP3 has a skeletal muscle- and BAT-specific expression. Although the mRNA levels of UCP2 and UCP3 are rather high in brown adipose tissue, the protein level may not be well expressed.

As cold acclimation-recruited norepinephrine-induced nonshivering thermogenesis is intact in both UCP2- and UCP3-ablated mice, these proteins are apparently not essential for the

thermogenic process of brown adipose tissue. Since no detailed studies of brown adipose tissue or brown fat mitochondria have been reported in UCP2- or UCP3-ablated mice, more subtle effects of the absence of these proteins on BAT function may have gone unnoticed.

UCP1 and UCP3 have an opposite protein expression in cold environment in BAT. Protein level of UCP1 is increased while the protein level of UCP3 decreased in cold environment. Both mRNA level of UCP1 and UCP3 have been shown an increased transcription.

The most important hormonal regulation of BAT depends on insulin and glucagons. The increased level of insulin leads to phosphorylation of insulin-receptor signal (IRS-1) protein. Activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activates the protein dependent kinase (PDK). Protein kinase B (AKT) is a substrate of PDK, and phospho-AKT is the active form of AKT. GSK3 β will be phosphorylated by AKT, phospho-GSK3 β is the inactive form of GSK3 β . The net result of insulin signalling leads to the activation of glycogen synthase and phosphoprotein phosphatase, and glycogen content of BAT is increased dramatically under reacclimatization.

In mature brown adipocytes, norepinephrine interacts with three types of adrenergic receptors: α_1 , α_2 , and β_1 . The most significant and the most studied pathway is the pathway for β_3 -adrenergic stimulation of thermogenesis. NE generates cAMP, it activates protein kinase A, then it phosphorylates perilipin and hormone sensitive lipase (HSL), resulting fatty acids releasing in WAT. Another effect of NE is the up-regulation of UCP1 transcription in BAT.

There is cooperation between BAT and WAT under cold environment. WAT provides the BAT with free fatty acid to allow the enough energy for thermogenesis and ATP synthesis. The flux of the fatty acid is increased in BAT parallel with a much more intensive β -oxidation.

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and citrate lyase (CitLy) is the most significant enzyme of lipogenesis. Acetyl-CoA carboxylase is the committed step of fatty acid synthesis. CitLy converts the cytosolic citrate to acetyl-CoA and oxaloacetate. Cytosolic acetyl-CoA is the carbon source of lipid synthesis. We investigated the ACC, CitLy activity and the enzymes of glycogen metabolism in cold adapted and reacclimatized rats of BAT and WAT. Tricium (^3H) incorporation shows the rate

of fatty acid synthesis. Tritium incorporation was measured into the newly synthesised fatty acid, and the total fat of BAT.

This part of the works has been based on the observation that there is a dramatic accumulation of glycogen after cold-exposure in BAT. The glycogen accumulation was detected as early as 3h after the replacement to neutral temperature from 1-week cold exposure, and was peaked by the 24th hour exceeding the control value 16-fold and reaching. Glycogen repletion during the recovery from cold exposure was also observed in muscle of rats; however, in these tissues glycogen levels did not significantly exceed the original control values.

AIMS OF THE STUDY

- 1.) Large protein bands were discovered under the gel electrophoresis in cold acclimated BAT. Mass-spectroscopy analysis shows ACC and CitLy enzymes were increased in cold exposure. We wanted clarify the flux of the fatty acid synthesis at the uncoupled mitochondrion in BAT. We wanted analyse the contribution of the WAT in the thermogenesis focusing on the two-lipogenic enzyme feature.
- 2.) Farkas et al. (1999) discovered a dramatic glycogen accumulation after re-acclimatization in the BAT of rats that has an intensive atrophy under reacclimatization. We planed the investigation of signal transudation of BAT in the background of glycogen synthesis. We were curious that muscle tissue has or has not similar feature.
- 3.) A question was arising about the role of UCPs connecting with atrophy in BAT. We investigated the changes in the level of mRNA of UCP1 and UCP3 and their protein expression under the cold and reacclimatized condition, to clarify the role of the UCPs in cold induced thermogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Rat treatment

Male Wistar rats weighing 200-250 g were used. A group of cold exposed animals was replaced for 6, 24 and 48 hours to neutral temperature. Throughout the text, cold means +5°C, while neutral temperature means +29°C.

Immunoblotting analyses (Western blotting)

Protein components were separated on 12% acryl amide gels and blotted onto nitro-cellulose membrane, which was followed by immunoblotting with appropriate antibodies. Rabbit antibody for UCP1 was a kind gift from Barbara Cannon (Stockholm University, Sweden), which was tested not to cross-react with UCP3. Guinea pig antibody for UCP3 was purchased from Linco Research, Inc. (St. Charles, USA). This antibody was specific for UCP3; however, it reacted only with the long form of UCP3 (UCP3L) Rabbit antibodies for Akt, P-Akt; GSK-3, P- GSK-3; ATP-citrate lyase, P-ATP citrate lyase, acetyl-CoA carboxylase and P-Acetyl-CoA carboxylase were purchased from Cell Signaling (Kvalitex Kft., Budapest, Hungary) Anti-rabbit peroxidase conjugated secondary antibody was purchased from Sigma-Aldrich, (Budapest, Hungary).. Anti-guinea pig peroxidase conjugated secondary antibody was bought from Rockland, (Gilbertsvill, USA). Blots were developed with ECL plus (Amersham Pharmacia, UK.) on X-ray films.

Production of antibodies against human frataxin

A cDNA fragment encoding human frataxin was amplified from a human brain cDNA library using AAAAGATCTATGATAGCAGCGGCAGGAGGA as forward and AAACCTCGAAGAGAGTCGATGGATAAGTG as reverse primers. Product of the reaction was cloned into pGEX 4T-1 plasmid resulting in a fusion between glutathione-S-transferase (GST) and frataxin. The fusion protein was expressed in BL21 *E.coli* cells and isolated using glutathione

sepharose as suggested by the supplier (Pharmacia). Isolated GST-frataxin fusion protein was used as antigen to generate antibodies in rabbits.

Northern blot analyses

Total RNA from rat interscapular BAT was purified and separated in a 1.2% agarose gel containing formaldehyde and transferred to Hybond-N membranes. The DNA probes both for UCP1 and UCP3 were kind gifts from Barbara Cannon (Stockholm University, Sweden). PhosphorImager detected the blots and the data were analysed by OptiQuant software.

Identification of proteins by mass spectrometry following SDS-PAGE separation

Digests were purified with ZipTipC18 pipette tips (Millipore, Bedford, MA, USA) using a procedure recommended by the manufacturer. One μL elute from the ZipTips was mixed at a 1:1 ratio with saturated DHB matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid) solution and applied to an Achor chip MALDI plate (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). A Bruker Reflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) was used in positive ion reflector mode with delayed extraction. Autolysis products of trypsin served as internal standards for mass calibration. The monoisotopic masses for all peptide ion signals in the acquired spectra were determined and the information was entered in a database searching against a non-redundant database (NCBI), using the Mascot program (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com/>).

Materials for enzyme activities, glucose uptake and in vivo fatty acid synthesis

2-Deoxy-D-[U- ^{14}C]glucose (Amersham), $^3\text{H}_2\text{O}$ and [^{32}P]ATP were purchased from the Institute of Isotopes Co. (Budapest, Hungary). GSK3 was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Insulin determination kit was from Crystal Chemicals (Downers Grove, IL, USA). Antibody against actin, amyloglycosidase and other chemicals were from Sigma-Aldrich (Budapest,

Hungary). SB 415286 specific GSK-3 inhibitor was from Tocris, (Avonmouth, UK). GSK-3 substrate peptide derived from Upstate (USA).

Enzyme activities

Pyruvate dehydrogenase enzyme (PDH) and phosphofructokinase-1 (PFK-1) acetyl-CoA carboxylase (ACC), citrate lyase (CitLy) and GSK3 activities were measured spectrophotometrically as reported in the original papers of the author. Glycogen content was measured as previously described.

Glucose uptake

Glucose uptake was measured by using 2-deoxy-[¹⁴C]glucose, basically as described. Briefly, 1h after an intraperitoneal injection of 7.4 kBq radioactive 2-deoxy-glucose, glucose concentration was measured in the plasma, while radioactivity was measured in the plasma and BAT. The plasma specific radioactivity was then used to calculate glucose uptake.

In vivo fatty acid synthesis

Fatty acid (FA) synthesis was evaluated in vivo by measuring incorporation of ³H₂O into FA. This method measured rate of de novo FA synthesis independent of the precursor carbon source. An intraperitoneal injection of 370 kBq tritiated water in 1 mL saline was administered to the animals and 1 h later they were killed. The tissues were processed and radioactivity in FA in BAT and WAT was counted in a liquid scintillation counter. Results were given as µg H atom incorporated into 1g tissues in 1h.

RESULTS AND DISCUSSION

The opposite regulation of lipid synthesis by ACC and CitLy in BAT and WAT plays an important role in the cooperation between the two organs in favour of thermogenesis. WAT acts primarily as a net FFA provider, whereas BAT acts as a net FFA user. The level of fatty acid synthesis is increased parallel with β -oxidation. Flux of β -oxidation is much higher than fatty acid synthesis. The situation is not unknown in BAT. ACC1 isoenzyme is phosphorylated under cold environment only in BAT. ACC2 is not phosphorylated in the same condition in BAT. ACC2 is responsible for regulation of carnitine acyl transferase. The question is: what is the explanation of increased fatty acids synthesis and β -oxidation. Detailed mechanism of uncoupling is not clear yet. A theory is indicating that UCPs need fatty acid for uncoupling the mitochondria. Increased fatty acid synthesis may be a compensation mechanism of increased level of fatty acid oxidation.

The considerable increasing of active forms of ACC and CitLy indicates a massive FA synthesis in cold in BAT. On the contrary the activity of FFA synthesis down regulated in WAT by both lipogenic enzymes. The ^3H incorporation shows clearly a converse regulation of FFA synthesis between BAT and WAT. To understanding the deeper relation between BAT and WAT we have measured the FFA content in BAT in cold and reacclimatized environment. We have gotten indirect evidence that the FFA oxidation (β -oxidation) is much intensive than FFA synthesis in BAT.

Glucose uptake is increased at cold environment and at reacclimatization phase also in BAT. Glucose transporter-4 (GLUT4) shows over expression under both environments in BAT. Insulin level of serum is decreased under cold acclimatization and started to return to normal level at neutral temperature. Activity of phosphofructokinase-1 did not change significantly in BAT at same temperature condition see above. Activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) decreased in cold environment and this trend line was followed under reacclimatization. While PDH activity was repressed the glycogen amount of BAT was increased. This effect showed that glucose was taken

up and its degradation is inhibited by glycolysis, so there is a free way to glycogen conversation of glucose. We investigated the signal pathway of glycogen synthesis in BAT and muscle tissue. AKT and GSK3 β were studied and their phosphorylation. The results showed that glycogen synthase is inhibited in cold, which was well presented in the measurement of glycogen content in BAT. The glycogen amount of BAT is dramatically elevated under reacclimatization as it has been shown on the changes of p-AKT and (active) and p-GSK3 β (inactive). Muscle tissue has a remarkable content of glycogen. It is mentionable that the upstream signalling pathway of glycogen accumulation is activated only in the reacclimatization phase of rats in muscle.

We have showed that UCP1 protein expression increased markedly during the cold exposure and their level is maintained after 24h-reacclimatized condition to neutral temperature. On the contrary to the UCP3 protein expression has decreased greatly in the same condition but started to a gentle return to normal level on neutral temperature. mRNAs of UCP1 and UCP3 are markedly increased in cold adaptation, but the protein expression didn't followed it. It would be suppose a post-transcription and post-translation mechanism in the background. This results show that UCP1 has a key regulator function in the thermogenesis. UCP3 takes plays especially in regulation of respiratory chain.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude to my colleagues who have helped me :

I would like to thank for my supervisor Prof. Dr. Balázs Sümegi for giving me the opportunity to work in his lab and providing me with scientific freedom.

I would like to thank for my supervisor Prof. Dr. Attila Sándor for his inspiration, wealth of ideas.

I would like to thank for Dr. Viktória Farkas for her perfect enzymatic activity analyses and protein separation.

I would like to thank for Associate Professor Dr. Gyula Kispal and Dr. Katalin Sipos for our collaboration and their big help in the Northern-blot assay.

I would like to thank for Zsuzsa Hillebrandt, Ilona Hajnik of their excellent technical assistance.

PUBLICATION

ORIGINAL PAPERS BASED ON THE DISSERTATION

1. JAKUS P.B., SIPOS K, KISPAL G, SANDOR A.

Opposite Regulation of Uncoupling Protein 1 and Uncoupling Protein 3 in vivo in Brown Adipose Tissue of Cold-exposed Rats

FEBS Lett. 2002 May 22; 519(1-3):210-214. **(IF.: 3,9)**

2. JAKUS P.B., SANDOR A, JANAKY T, FARKAS V.

Cooperation between brown- and white adipose tissues of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in brown adipose tissue during reacclimatization.

J Lipid Res. 2008 Feb ;49(2):332-339. **(IF.: 4,3 (2006))**

ADDITIONAL ORIGINAL PAPER

3. KOCSIS B, KUSTOS I, KILÁR F, NYUL A, JAKUS PB, KERÉKES S, VILLARREAL V, PRÓKAI L, LÓRÁND T.

Antifungal unsaturated cyclic Mannich ketons and amino alcohols: Study of mechanism of action.

Eur J Med Chem. 2009 May;44(5):1823-9. Epub 2008 Nov 7. **(IF.: 2,3 (2007))**

Cumulate impact factor: 10,5

PUBLISHED ABSTRACT

1. P.B. JAKUS, V. FARKAS, A. SANDOR

Signal transduction leading to dramatic accumulation of glycogen in brown adipose tissue.

Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, Brussels, Belgium, July 1 – July 9. 2003

2. Z. BOGNAR G. VARBIRO, B. RADNAI, A. TAPODI, K. HANTO, P.B. JAKUS, F. GALLYAS JR AND B. SUMEGI

The effect of Poly-(ADP)-Ribose Polymerase inhibitors on Taxol induced cell death in cultured cells. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference; Budapest, Hungary 2-7 July 2005.

3. B. RADNAI, B. VERES, K. HANTO, P.B. JAKUS, A. TAPODI, G. VARBIRO, Z. BOGNAR, S. VETO, B. SUMEGI

The Effect of a Novel Poly-(ADP)-Ribose polymerase inhibitor HO-3089 on the LPS Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage Cells. 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary 2-7, July, 2005

PRESENTATIONS

1. JAKUS P.B., TAPODI A., VARBIRO G.

Analysis of the amiodarone induced gene expression changing by DNA-array.

A Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpoziuma, Pécs, 2002. december 11.

2. SÜMEGI B., KOVÁCS K., VERESB., RADNAI B., HANTÓ K., JAKUS P.B.

Effect of the Poly-(ADP)-Ribose Polymerised inhibition on the LPS induced signalling pathways and gene expressions. XII. sejt-és fejl désbiológiai napok, Pécsi Akadémiai Bizottság, Pécs, 2004 április 16-18.

3. JAKUS P.B., FARKAS V., SZABÓ A., SÁNDOR A.

A new role of the glycogen synthase kinase-3: regulation of the fatty acid synthesis by phosphorylation of acetyl-CoA-carboxylase. 35. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2005. május 24-27

ADDITIONAL ABSTRACTS

LÓRÁND TAMÁS, KUSTOS ILDIKÓ, KILÁR FERENC, NYÚL ADRIENN, KEREKES SZILÁRD, **JAKUS P.B.**, KOCSIS BÉLA;

Analysis of antifungal mechanism of Mannich ketones and amino alcohols; Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium 2007, Eger, 2007. szeptember 27–28