



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Φαρμακευτικής

Διδακτορική Διατριβή

Ρύθμιση του μεταβολισμού από το υδρόθειο

Αντωνία Κατσούδα
Φαρμακοποιός, MSc

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών

Αθήνα, 2021



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Διδακτορική Διατριβή

Ρύθμιση του μεταβολισμού από το υδρόθειο

Αντωνία Κατσούδα
Φαρμακοποιός, MSc

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών

Αθήνα, 2021

Η διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών-Ερευνητικά Προγράμματα Αριστείας Ι.Κ.Υ.-Siemens (11/3056) και από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας-1^η Προκήρυξη υποτροφιών ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ για υποψήφιους διδάκτορες.



IKY

ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ
STATE SCHOLARSHIPS FOUNDATION



ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



ΕΛΙΔΕΚ.
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανδρέας Παπαπετρόπουλος

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Επιβλέπων Καθηγητής

Ιωάννα Ανδρεάδου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Κυριάκος Κυπραίος

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Χαράλαμπος Αντωνιάδης

Καθηγητής, Radcliffe Department of Medicine, University of Oxford

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Κωνσταντίνος Δροσάτος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Lewis Katz School of Medicine, Temple University

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Απόστολος Κλινάκης

Ερευνητής Α', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Τριαντάφυλλος Χαβάκης,

Καθηγητής, Faculty of Medicine, Technische Universität Dresden

Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

877 Ημέρες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Καθηγητή κύριου Ανδρέα Παπαπετρόπουλου, στο κέντρο Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Ευχαριστώ τον κύριο Παπαπετρόπουλο, επιβλέποντα της συγκεκριμένης εργασίας, για κάθε βήμα στο δρόμο της έρευνας και της γνώσης που μου επέτρεψε να κάνω δίπλα του. Με μία πρόταση: I couldn't have asked for a better mentor.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κυρία Ιωάννα Ανδρεάδου και τον Καθηγητή κύριο Κυριάκο Κυπραίο για το ενδιαφέρον και την προθυμία που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ τον Ερευνητή Α' κύριο Απόστολο Κλινάκη για την πολύτιμη βοήθεια που απλόχερα μου προσέφερε και συζητήσεις μας. Ευχαριστώ τον Καθηγητή κύριο Χαράλαμπο Αντωνιάδη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Δροσάτο και τον Καθηγητή κύριο Τριαντάφυλλο Χαβάκη, τους οποίους γνωρίζω από το επιστημονικό τους έργο, για τη συμμετοχή στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τον Ακαδημαϊκό κύριο Δημήτρη Θάνο για τις εύστοχες παρατηρήσεις του όσον αφορά τη πειραματική διαδικασία του ChIP-Seq που παρουσιάζεται στη συγκεκριμένη εργασία, καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα, μέλος της ερευνητικής του ομάδας, Δημήτρη Βαλάκο, για τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων και την ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια του. Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Βασίλη Διονέλλη για τη βιοπληροφορική ανάλυση του RNA-seq πειράματος και τη Δρ. Σεβαστή Καραλιώτα για τη συμβολή της στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραματικών διαδικασιών που αναφέρονται στα CLAMS. Ευχαριστώ τον Δρ. Παναγιώτη Εφεντάκη για την προθυμία του να βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή.

Ευχαριστώ τον Αντώνη, τη Βαρβάρα, το Δημήτρη για τις όμορφες στιγμές εντός και εκτός εργαστηρίου. Ευχαριστώ τη μητέρα μου, τον πατέρα

μου και τη Νάντια για την αμέριστη και με όλους τους τρόπους υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΣΤΟ ΑΠΙΑΣΤΟ

Περιέχομενα

Εικόνες	15
Συντμήσεις	18
Περίληψη	23
Abstract	26
1. Εισαγωγή	28
1.1 Ο λιπώδης ιστός	29
1.1.1 Το λιποκύτταρο ως λειτουργική μονάδα του λιπώδους ιστού	29
<u>Λευκό, φαιό και μπεζ λιποκύτταρο</u>	29
<u>Αναπτυξιακή προέλευση λιποκυττάρων</u>	31
<u>Το λιποκύτταρο ως ρυθμιστής της ενεργειακής ομοιόστασης</u>	32
<u>Η επίδραση της ινσουλίνης στη λειτουργία του λιποκυττάρου</u>	35
<u>Το λιποκύτταρο ως μηχανή θερμογένεσης</u>	37
1.1.2 Η ετερογένεια του λιπώδους ιστού σύμφωνα με τη θέση αναπόθεσης του	38
1.1.3 Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο	40
1.1.4 Η επέκταση του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία	42
<u>Η αναδιαμόρφωση του λιπώδους ιστού κατά την επέκταση των λιποκυττάρων του</u>	44
1.1.5 Ο λιπώδης ιστός ως θεραπευτικός στόχος	46
<u>Λιπεκτομή</u>	46
<u>Θειαζολιδινεδιόνες (Thiazolidinediones, TZDs)</u>	47
<u>Επαγωγή φαιών και μπεζ λιποκυττάρων</u>	48
<u>Λιποκίνες</u>	49
1.2 Το υδρόθειο	51
1.2.1 Η ενδογενής παραγωγή του υδροθείου	52
<u>Β-συνθετάση της κυσταθειονίνης</u>	54
<u>Γ-λυάση της κυσταθειονίνης</u>	55
<u>Σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού</u>	56

1.2.2 Φαρμακολογικές προσεγγίσεις ρύθμισης των επιπέδων του H ₂ S στο οργανισμό	57
<u>Δότες υδροθείου</u>	58
<u>Αναστολείς των ενζύμων σύνθεσης υδροθείου</u>	59
1.2.3 Το υδρόθειο ως σηματοδοτικό μόριο	61
<u>Μηχανισμοί σηματοδότησης που καταλύονται από τη δράση του H₂S</u>	61
<u>Βιολογικές δράσεις του υδροθείου</u>	63
2. Σκοπός	66
3. Μεθοδολογία	68
3.1 Πειραματόζωα	68
3.2 Έμμεση θερμιδομετρία	70
3.3 Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (Glucose Tolerance Test, GTT)	70
3.4 Δοκιμασία ανοχής στην ινσουλίνη (Insulin Tolerance Test, ITT)	71
3.5 Δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR)	71
3.6 Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών προ-λιποκυττάρων	72
3.7 Διαφοροποίηση προ-λιποκυττάρων	72
3.8 Καλλιέργεια και διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς 3T3-L1	73
3.9 Φαρμακολογική αύξηση των επιπέδων του H ₂ S	74
3.10 Φαρμακολογική αναστολή του MPST	75
3.11 Φαρμακολογική αναστολή της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω του TIM/TOM complex	75
3.12 Φαρμακολογική επαγωγή του HIF1α	75
3.13 Δημιουργία συνθηκών υποξίας	76
3.14 Αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων <i>Tomm7</i> , <i>Tomm40l</i> , <i>Timm50</i> και <i>Timm17b</i> με παροδική διαμόλυνση	76
3.15 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών MPST και HIF1α με παροδική διαμόλυνση	76
3.16 Χρώση Αιματοξυλίνης & Ηωσίνης (Hematoxylin & Eosin, H&E)	77
3.17 Χρώση Oil Red O	78

3.18 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative (q-RT) polymerase chain reaction (PCR))	78
3.19 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση RNA αλληλούχισης (RNA sequencing)	80
3.20 Προσδιορισμός αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA (mtDNA) copy number)	81
3.21 Απομόνωση πρωτεϊνών	81
3.22 Σήμανση σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών (Dimedone Switch Method)	83
3.23 Ανάλυση πρωτεϊνικών επιπέδων με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	84
3.24 Μέτρηση των επιπέδων H ₂ S με τη μέθοδο μπλε του μεθυλενίου (Methylene Blue Assay).	85
3.25 Προσδιορισμός επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου	86
3.26 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) ακολουθούμενη από αλληλούχιση (Sequencing, Seq)	86
3.27 Μεταβολομική ανάλυση	88
3.28 Στατιστική ανάλυση	88
4. Αποτελέσματα	89
4.1 Η παχυσαρκία συνδέεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου MPST στον λιπώδη ιστό	89
4.2 Η απαλοιφή του <i>Mpst</i> οδηγεί σε αύξηση σωματικού βάρους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας ή τη γήρανση	92
4.3 Τα <i>Mpst</i> ^{-/-} HFD ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο μεταβολικό ρυθμό και αυξημένη ανοχή στη γλυκόζη και την ινσουλίνη	95
4.4 Η έλλειψη του <i>Mpst</i> συνδέεται με αυξημένη συσσώρευση λίπους	98
4.5 Η φαρμακολογική αναστολή του <i>Mpst</i> επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων	102
4.6 Ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός των <i>Mpst</i> ^{-/-} μυών χαρακτηρίζεται από ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση του TIM/TOM	103

4.7 Η διαμεσολαβούμενη από το TIM/TOM μεταφορά πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων είναι μειωμένη στο iWAT των <i>Mpst^{-/-}</i> HFD μυών	115
4.8 Μειωμένα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων του TIM/TOM ή αναστολή της λειτουργίας του σε λιποκύτταρα, επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων	119
4.9 Υποξία ή ενεργοποίηση του HIF1α σχετίζεται με ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης TIM/TOM υπομονάδων	124
4.10 Ο HIF1α εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα στους πυρήνες των κυττάρων του λευκού υποδόριου λιπώδους ιστού των <i>Mpst^{-/-}</i> HFD μυών	128
4.11 Ο HIF1α προσδένεται στους υποκινητές TOM υπομονάδων στον ιστό iWAT των <i>Mpst^{-/-}</i> HFD μυών	130
4.12 Αύξηση των επιπέδων του MPST λειτουργεί θετικά έναντι της συσσώρευσης λιπιδίων	134
4.13 Η χορήγηση SG1002 σε παχύσαρκους μύες μειώνει τη συσσώρευση λίπους στον iWAT και βελτιώνει τον φαινότυπο αύξησης βάρους	136
4.14 Το Na ₂ S ₃ δρα θετικά έναντι της αύξησης σωματικού βάρους και της συσσώρευσης λίπους	144
5. Συζήτηση	146
6. Βιβλιογραφία	159
Δημοσίευση	191

Εικόνες

Εικόνα 1.1: Το ενδιαφέρον για τη βιολογία του λιπώδους ιστού αυξάνεται συνεχώς με το πέρασμα των χρόνων.	29
Εικόνα 1.2: Μορφολογικές διαφορές λιποκυττάρων.	31
Εικόνα 1.3: Η διαφορετική προέλευση των φαιών, λευκών και μπεζ λιποκυττάρων.	32
Εικόνα 1.4: Απεικόνισή των κύριων μηχανισμών που εμπλέκονται στην αύξηση και μείωση της αποθήκευσης λιπιδίων.	37
Εικόνα 1.5: Η αναδιαμόρφωση του λιπώδους ιστού κατά την υπερτροφική παχυσαρκία.	46
Εικόνα 1.6: Η βιολογία του υδροθείου αποτελεί αντικείμενο μελέτης με αυξανόμενο ενδιαφέρον τις τελευταίες δύο δεκαετίες.	52
Εικόνα 1.7: Ενδοκυττάρια αποθήκες δεσμευόμενου θείου στον οργανισμό.	53
Εικόνα 1.8: Βιοσυνθετικές οδοί του υδροθείου στα κύτταρα θηλαστικών	57
Εικόνα 1.9: Χημική σύσταση του SG1002.	60
Εικόνα 1.10: Αντιδράσεις σχηματισμού S-σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών.	63
Εικόνα 3.1: Ανατομική θέση των ιστών iWAT, gWAT και iBAT στο ποντίκι.	69
Εικόνα 4.1: Σωματικό βάρος, βάρος και μορφολογία λιπώδους ιστού WT μυών μετά τη λήψη CD ή HFD.	90
Εικόνα 4.2: Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης των CBS, CSE και MPST σε ιστούς λίπους παχύσαρκων ποντικών.	91
Εικόνα 4.3: Το σωματικό βάρος των <i>Mpst^{-/-}</i> μυών είναι αυξημένο κατά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας και τη γήρανση.	94
Εικόνα 4.4: Μετρήσεις παραμέτρων του μεταβολισμού WT και <i>Mpst^{-/-}</i> μυών κατά τη χορήγηση HFD.	95
Εικόνα 4.5: Τα <i>Mpst^{-/-}</i> HFD ποντίκια χαρακτηρίζονται από αυξημένη αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη.	97
Εικόνα 4.6: Η γενετική απαλοιφή του <i>Mpst</i> συνδέεται με αλλαγές στο βάρος και τη μορφολογία του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού.	99
Εικόνα 4.7: Τα <i>Mpst^{-/-}</i> ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη εναπόθεση λίπους στο ήπαρ σε συνθήκες λήψης HFD ή κατά τη γήρανση.	101

Εικόνα 4.8: Αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων σε WT διαφοροποιημένα λιποκύτταρα μετά από φαρμακολογική αναστολή του MPST.	103
Εικόνα 4.9: Πρόσληψη τροφής και συνολική δραστηριότητα WT, και <i>Mpst^{-/-}</i> μυών σε συνθήκες HFD.	104
Εικόνα 4.10: GO ανάλυση στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT και <i>Mpst^{-/-}</i> μυών μετά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας.	107
Εικόνα 4.11: Τα επίπεδα έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα είναι μειωμένα στο iWAT των <i>Mpst^{-/-}</i> HFD ποντικών.	108
Εικόνα 4.12: Απεικόνιση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των TIM/TOM υπομονάδων μετά την απαλοιφή του <i>Mpst</i> και κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας.	109
Εικόνα 4.13: Αποσιώπηση του <i>Mpst</i> κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας οδηγεί σε ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης πολλών υπομονάδων του TIM/TOM συμπλόκου.	113
Εικόνα 4.14: Τα <i>Mpst^{-/-}</i> HFD ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών στη μήτρα των μιτοχονδρίων του iWAT και ελαττωμένα επίπεδα μεταβολιτών της β-οξειδωσης και του κύκλου του Krebs.	117
Εικόνα 4.15: Αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων μετά την αποσιώπηση γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση του μεταφορέα TIM/TOM.	121
Εικόνα 4.16: Αναστολή της λειτουργίας του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών έχει αρνητική δράση έναντι της συσσώρευσης λιπιδίων.	123
Εικόνα 4.17: Επίδραση της ενεργοποίησης του HIF1α στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-υπομονάδων του TIM/TOM.	127
Εικόνα 4.18: Ο HIF1α εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στους πυρήνες του λευκού υποδόριου λίπους των <i>Mpst^{-/-}</i> HFD μυών.	129
Εικόνα 4.19: Θερμικός χάρτης που προέκυψε από HIF1α-ChIP σε ιστούς iWAT <i>Mpst^{-/-}</i> HFD μυ.	132
Εικόνα 4.20: Ο HIF1α εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που υποεκφράζονται στον ιστό iWAT <i>Mpst^{-/-}</i> HFD και συμμετέχουν στη συγκρότηση του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών και της αναπνευστικής αλυσίδας.	133
Εικόνα 4.21: Υπερέκφραση του MPST σε λιποκύτταρα συνδέεται με ελαττωμένη συσσώρευση λιπιδίων.	135

Εικόνα 4.22: Το SG1002 οδηγεί σε ελαττωμένη αύξηση βάρους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας.	137
Εικόνα 4.23: Η χορήγηση SG1002 αυξάνει το μεταβολικό ρυθμό και βελτιώνει την αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη των παχύσαρκων μυών.	139
Εικόνα 4.24: Η αποθήκευση λίπους είναι μειωμένη στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT μυών που έλαβαν υπερθερμιδική διαίτα παρουσία SG1002.	140
Εικόνα 4.25: Πρόσληψη τροφής και συνολική δραστηριότητα WT HFD μυών παρουσία ή απουσία του SG1002.	141
Εικόνα 4.26: Η χορήγηση SG1002 αντιστρέφει τον φαινότυπο πρόωρης παχυσαρκίας που εμφανίζουν τα <i>Mpst</i> ^{-/-} ποντίκια κατά τη λήψη HFD.	143
Εικόνα 4.27: Η δράση του Na ₂ S ₃ στη συσσώρευση λίπους και το σωματικό βάρος.	145
Εικόνα 5.1: Ο ρόλος του <i>Mpst</i> στην ενεργειακή ομοιόσταση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας.	147

Συντμήσεις

3-MP	3-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ
<i>Mpst</i>^{-/-}	Γενετικά τροποποιημένοι μύες με απαλοιφή του γονιδίου <i>Mpst</i>
Myf 5	Myogenic factor 5
TZDs	Θειαζολιδινεδιόνες, Thiazolidinediones
ΧΑΠ	Χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια
ANP,BNP	Νατριουρητικό πεπτίδιο τύπου A, B Natriuretic peptides A, B
ΑΟΑΑ	Άμινο οξικό οξύ Aminoxyacetic acid
ATGL	Λιπάση των τριγλυκεριδίων Adipose triglyceride lipase
AUC	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη Area under the curve
BCA	β--κύανο-L-αλανίνη β-cyano-L-alanine
BMP	Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη Bone morphogenetic protein
CBS	β-συνθάση της κυσταθειονίνης Cystathionine β synthase
CD	Φυσιολογική διαίτα Chow diet
CD36	Αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη IV Platelet glycoprotein IV
CGI 58	Comparative gene identification 58
CO	Μονοξείδιο του άνθρακα
COX2	Κυκλοξυγενάση 2 Cyclooxygenase 2
CPT1	Παλμιτουλο-τρανσφεράση-I της καρνιτίνης Carnitine acyltransferase I
CSE	γ-λυάση της κυσταθειονίνης

	Cystathionine γ lyase
DAD	Διαλλυλο δισουλφίδιο Diallyl disulfide
DAT	Διαλλυλο τρισουλφίδιο Diallyl trisulfide
DEGs	Διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια Differentially expressed genes
FA	Συμπλήρωμα λιπαρών οξέων Fatty acids supplement
FABP4	Δεσμεύουσα με λιπαρά οξέα πρωτεΐνη 4 Fatty acid-binding protein 4
FASN	Συνθάση λιπαρών οξέων Fatty acid synthase
FATP	Οικογένεια πρωτεϊνών μεταφοράς λιπαρών οξέων Fatty acid transport proteins
FFAs	Ελεύθερα λιπαρά οξέα Free fatty acids
FGF21	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 21 Fibroblast growth factor 21
G3P	3-φωσφορική γλυκερόλη Glyceraldehyde 3- phosphate
GAPDH	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,
GLUT4	Μεταφορέας γλυκόζης 4 Glucose transporter 4
GO	Γονιδιακή οντολογία Gene ontology
GPR81	Συζευγμένος με G πρωτεΐνη υποδοχέας 81 G-protein coupled receptor 81
gWAT	Σπλαχνικός λευκός λιπώδης ιστός Gonadal white adipose tissue
HFD	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους High fat diet

HIF1α	Επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1α Hypoxia-inducible transcription factor 1α
HOMA-IR	Homeostatic model assessment for insulin resistance
HSL	Ορμονοευαίσθητη λιπάση Hormone-sensitive lipase
iBAT	Φαίος λιπώδης ιστός Interscapular brown adipose tissue
iWAT	Υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός Inguinal white adipose tissue
KEAP1	Πρωτεΐνη Kelch like ECH-associated protein 1
Lcn2	Λιποκαλίνη 2 Lipocalin
MGL	Λιπάση των μονογλυκεριδίων Monoglyceride lipase
MPST	Σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
NAFLD	Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος Nonalcoholic fatty liver disease
NEFAs	Μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα Non-esterified fatty acids
NFκB	Υπομονάδα 65 του πυρηνικού παράγοντα ενισχυτή της κ-ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων Β κυττάρων Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
PAG	L-προπαργυλογλυκίνη L-propargylglycine
PAM	Κινητήρας υποβοήθησης εισόδου Presequence translocase-associated motor
Pax7	Paired box 7
PDE3B	Φωσφοδιεστεράση 3B Phosphodiesterase 3B
PHD2	Υδροξυλάση της προλίνης 2 Prolyl 2 hydroxylase

PKA	Πρωτεϊνική κινάση Α
PKB	Πρωτεϊνική κινάση Β Protein kinase B
PLN1	Περιλιπίνη 1
PLP	Φωσφορική πυριδοξάλη Pyridoxal-5'-phosphate
PPAR	Υποδοχείς ενεργοποιούμενοι από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωμάτων Peroxisome proliferator-activated receptors
RBP4	Δεσμεύουσα τη ρετινόλη πρωτεΐνη 4 Retinol-binding protein 4
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου Reactive oxygen species
SAM	S-αδενοσυλο-μεθειονίνης S-adenosyl-L-methionine
SQR	Sulfide quinone oxidoreductase
SVF	Αγγειακό κλάσμα του στρώματος Stromal vascular fraction
TG	Τριγλυκερίδια Triacylglycerol
TIM	Translocase of inner membrane
TOM	Translocase of outer membrane
UCP1	Πρωτεΐνη αποσύνδεσης 1 Uncoupling protein 1
WT	Άγριου τύπου Wild type

Περίληψη

Η παχυσαρκία αποτελεί χρόνια, πολυπαραγοντική ασθένεια, η ανάπτυξη της οποίας σχετίζεται με αυξημένη εναπόθεση λίπους. Θεωρείται μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου και συνδέεται άμεσα με την εκδήλωση πολλαπλών νοσημάτων. Το συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό υπέρβαρων ασθενών που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια, καθιστά την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι της παχυσαρκίας, πεδίο εντατικής έρευνας. Το υδρόθειο (H_2S) ένα αέριο ευρέως γνωστό για την τοξικότητα του, αναγνωρίζεται πλέον ως σηματοδοτικό μόριο του οργανισμού. Συντίθεται ενδογενώς από τη δράση των ενζύμων: γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CSE), β-συνθάση της κυσταθειονίνης (CBS) και σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (MPST) και η εμπλοκή του σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και παθολογικές καταστάσεις, έχει αποδειχθεί. Η διερεύνηση του ρόλου του ενδογενώς παραγόμενου και εξωγενώς χορηγούμενου H_2S στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού και την παθογένεια της παχυσαρκίας αποτέλεσε το αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης.

Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των ενζύμων CBS, CSE και MPST στον λιπώδη ιστό και της παχυσαρκίας, ποντίκια άγριου τύπου (WT) έλαβαν φυσιολογική (CD) ή δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους (HFD) για διάστημα 16 εβδομάδων. Οι λιπώδης ιστοί: υποδόριος λευκός (iWAT), σπλαχνικός λευκός (gWAT) και φαιός (iBAT), απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ακολούθως, για western blot ανάλυση. Αν και καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση των CBS και CSE μεταξύ των CD και HFD ποντικών, μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης του MPST ανιχνεύθηκαν και στους τρεις υπό μελέτη ιστούς λίπους των παχύσαρκων μυών. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η συγκέντρωση του H_2S βρέθηκε ελαττωμένη στον λευκό λιπώδη ιστό των ποντικών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα.

Ο ρόλος του MPST στην αύξηση σωματικού βάρους διερευνήθηκε περαιτέρω. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένοι μύες με απαλοιφή του γονιδίου *Mpst* (*Mpst*^{-/-}). Τα νεαρά *Mpst*^{-/-} ποντίκια που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα εκδήλωσαν πρόωρο φαινότυπο παχυσαρκίας. Επιπροσθέτως, εμφάνισαν μειωμένη κατανάλωση O₂, παραγωγή CO₂ και μεταβολικό ρυθμό, καθώς επίσης και αυξημένη αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη. Το βάρος των gWAT και iBAT παρέμεινε αμετάβλητο μετά την απαλοιφή του *Mpst*, ωστόσο αυξημένη βρέθηκε η μάζα και το μέγεθος των λιποκυττάρων του iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Τα ηλικιωμένα *Mpst*^{-/-} ποντίκια που έλαβαν φυσιολογική δίαιτα παρουσίασαν επίσης φαινότυπο αυξημένου σωματικού βάρους και μάζας του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού. Ανάλυση RNA-αλληλούχισης που πραγματοποιήθηκε στον iWAT WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών, αποκάλυψε ότι η έλλειψη του ενζύμου συνδέεται με αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη φλεγμονής και ελαττωμένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση της αναπνευστικής αλυσίδας και του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών (translocase of outer/inner membrane, TIM/TOM). Όπως αποδείχθηκε, τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης TIM/TOM υπομοναδών, σχετίζονται με μειωμένη μεταφορά πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων και ελαττωμένα επίπεδα των προϊόντων της β-οξειδωσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος στον ιστό. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την υπολειτουργία του TIM/TOM στον iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Αναστολή του μιτοχονδριακού μεταφορέα με τη χρήση γενετικών ή φαρμακολογικών προσεγγίσεων σε λιποκύτταρα, οδήγησε σε επαγωγή της συσσώρευσης λιπιδίων, υπογραμμίζοντας τη σημαντικότητα της ορθής λειτουργίας του συμπλόκου για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και την αύξηση σωματικού βάρους. Συνθήκες υποξίας αποδείχθηκε ότι συνδέονται με ελαττωμένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης TIM/TOM υπομοναδών στα λιποκύτταρα. Η ενεργοποίηση του HIF1α οδήγησε επίσης σε παρόμοια αποτελέσματα. Τα επίπεδα του HIF1α βρέθηκαν αυξημένα στους πυρήνες των κυττάρων του υποδόριου λευκού

λιπώδους ιστού των *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στο iWAT των γενετικά τροποποιημένων μυών, αποκάλυψε την εμπλοκή του HIF1α στη μεταγραφή πολλών διαφορεικά εκφραζόμενων, μεταξύ των δύο γονότυπων, γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων υπομονάδων του TIM/TOM και της αναπνευστικής αλυσίδας. Η πρόσδεση του HIF1α στους υποκινητές των γονιδίων *Tomm6* και *Tomm7* επιβεβαιώθηκε.

Η θεραπευτική χορήγηση του δότη πολυσουλφιδίων, SG1002, ανέστρεψε τις αλλαγές στην αύξηση σωματικού βάρους, στο μέγεθος των λιποκυττάρων, στο μεταβολικό ρυθμό και στην αντίσταση στη γλυκόζη που παρατηρούνται στους παχύσαρκους ποντικούς. Επιπλέον, μειωμένο σωματικό βάρος μυών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα παρατηρήθηκε παρουσία του δότη Na₂S₃. Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων του MPST/H₂S και της αύξησης σωματικού βάρους και υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του ενζύμου στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού και στη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από το MPST θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προσεγγίσεων έναντι της παχυσαρκίας.

Abstract

Obesity is a multifactorial, chronic disease, resulting from excessive fat accumulation. It is directly related to multiple diseases and considered as one of the leading causes of death. Therefore, its prevention and treatment are of great importance in modern western societies. Hydrogen sulfide (H₂S) is an endogenously produced signaling molecule with multiple roles in homeostasis and disease. H₂S is synthesized by cystathionine γ -lyase (CSE), cystathionine β -synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfutransferase (MPST). Herein, we investigated the role of H₂S in the development and treatment of obesity using genetic and pharmacological approaches.

To determine the expression of H₂S-producing enzymes in adipose tissues of obese subjects, wild-type (WT) mice fed a chow (CD) or a high fat diet (HFD) for 16 weeks and subcutaneous white adipose tissue (iWAT), epididymal white adipose tissue (gWAT) and interscapular brown adipose tissue (iBAT) were isolated and used for western blot analysis. Although no differences were observed in CBS and CSE expression, MPST protein levels were reduced in all three adipose tissues of HFD mice. In line with this, H₂S concentration was lower in white adipose tissue of obese mice.

To further investigate the role of the MPST enzyme in weight gain, mice with global deletion of *Mpst* (*Mpst*^{-/-}) were used. Young *Mpst*^{-/-} mice fed a high fat diet gained more weight than WT animals. Moreover, they exhibited decreased O₂ consumption, CO₂ production and metabolic rate, as well as impaired glucose/insulin tolerance. The weight of gWAT and iBAT remained unaltered after the deletion of *Mpst*, however increased mass and adipocyte size was observed in iWAT of *Mpst*^{-/-} HFD mice. Interestingly, aged normal chow-fed *Mpst*^{-/-} also presented an overweight phenotype besides with hypertrophic adipocytes and increased mass of inguinal white fat. Whole transcriptome analysis, performed in iWAT of WT and *Mpst*^{-/-} HFD mice, provided evidence for upregulation of inflammatory mediators and

downregulation of mitochondrial respiratory chain subunits and translocase of outer/inner membrane (TIM/TOM) components in adipose tissue of deficient mice. Attenuated expression of several TIM/TOM subunits, hampered the translocation of nucleus-encoded mitochondrial proteins and was associated with suppressed levels of TCA and β -oxidation metabolites, indicating the reduced function of the mitochondrial translocase in iWAT of *Mpst*^{-/-} HFD mice. Genetic and pharmacological inhibition of adipocyte TIM/TOM complex enhanced lipid accumulation, underlining its crucial role in fatty acids degradation and weight gain. Hypoxia conditions inhibited the gene expression of several TIM/TOM components in adipocytes. Similar results observed by HIF1 α activation. Nuclear HIF1 α was more abundant in inguinal white fat of *Mpst*^{-/-} HFD mice. Chromatin immunoprecipitation in iWAT of deficient mice, demonstrated that several of the differentially expressed genes between two genotypes, including TIM/TOM and respiratory chain subunits, are HIF1 α targets. HIF1 α binding to the *Tomm6* and *Tomm7* promoter was confirmed.

Therapeutic administration of the polysulfide donor SG1002 reversed the changes in weight gain, adipocyte size, metabolic rate and glucose tolerance in obese mice. Furthermore, reduced body weight of obese mice was also detected in the presence of the donor Na₂S₃. Taken together the above data provide evidence that MPST controls mitochondrial metabolic functions and has profound effects on adipose tissue biology. MPST-regulated pathways offer novel drug targets for obesity.

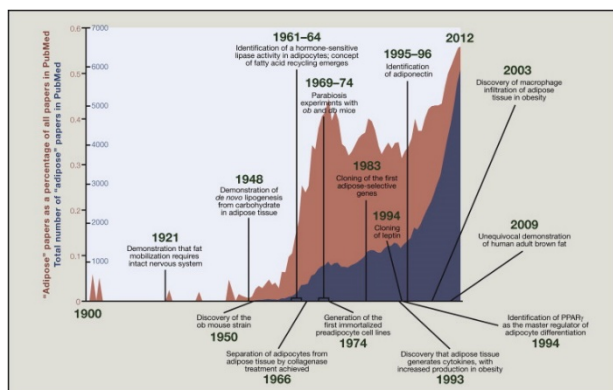
1. Εισαγωγή

1.1 Ο λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο όργανο που συγκροτείται από διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων και έχει ως κύρια λειτουργία του την αποθήκευση ενέργειας (Rosen & Spiegelman, 2014). Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1940, ο λιπώδης ιστός χαρακτηριζόταν ως ένας τύπος συνδετικού ιστού που περιείχε λιποσταγονίδια και η λειτουργία του δεν είχε συνδεθεί ουσιαστικά με το μεταβολισμό. Η θεωρία αυτή άρχισε σταδιακά να αλλάζει όταν ανακαλύφθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των θρεπτικών ουσιών, χρησιμεύοντας είτε ως αποθήκη ενέργειας, κατά τη σίτιση, είτε ως πηγή παροχής ελεύθερων λιπαρών οξέων, κατά τη διάρκεια της νηστείας. Μερικά χρόνια μετά, στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όταν ανιχνεύθηκαν στον ορό του αίματος μόρια (όπως η αδιψίνη και η λεπτίνη) που παράγονται από τα λιποκύτταρα, ο λιπώδης ιστός άρχισε να αναγνωρίζεται ως ενδοκρινής αδένας με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης του οργανισμού (Rosen and Spiegelman, 2014). Ακολούθησε πλήθος μελετών σχετικών με την ανάπτυξη, τη λειτουργία και την παθοφυσιολογία του. Η ραγδαία αύξηση του παγκόσμιου ποσοστού παχυσαρκίας που σημειώθηκε τα επόμενα χρόνια έντεινε ακόμα περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την κατανόηση της βιολογίας αυτού (Haslam and James, 2005) (Εικόνα 1.1).

Σήμερα ο λιπώδης ιστός θεωρείται ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρώπινου οργανισμού που επηρεάζει τη λειτουργία πολλών άλλων οργάνων και ασκεί σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της όρεξης, την ομοιόσταση της γλυκόζης και της ινσουλίνης, τη γήρανση και τη θερμοκρασία του σώματος (Berry et al., 2013). Αναγνωρίζεται επίσης ως ένας δυναμικός ιστός, ικανός να ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα (Kershaw and Flier, 2004). Η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που διέπουν τις λειτουργίες

του λιπώδους ιστού εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας.



Εικόνα 1.1: Το ενδιαφέρον για τη βιολογία του λιπώδους ιστού αυξάνεται συνεχώς με το πέρασμα των χρόνων. Απεικόνιση του αριθμού μελετών, σχετικών με το λιπώδη ιστό, που δημοσιεύθηκαν από το 1900 έως το 2012 (Rosen and Spiegelman, 2014).

1.1.1 Το λιποκύτταρο ως λειτουργική μονάδα του λιπώδους ιστού

Λευκό, φαιό και μπεζ λιποκύτταρο

Ο λιπώδης ιστός αποτελείται κυρίως από ώριμα λιποκύτταρα και το ετερογενές αγγειακό κλάσμα του στρώματος (stromal vascular fraction, SVF), όπου συναντάται πληθώρα κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικό βαθμό ωρίμανσης, συμπεριλαμβανομένων των: βλαστοκυττάρων, πρόδρομων λιποκυττάρων, ενδοθηλιακών, λείων μυικών, νευρικών και κυττάρων του ανοσοποιητικού (Riordan et al., 2009; Schipper et al., 2012). Τα ώριμα

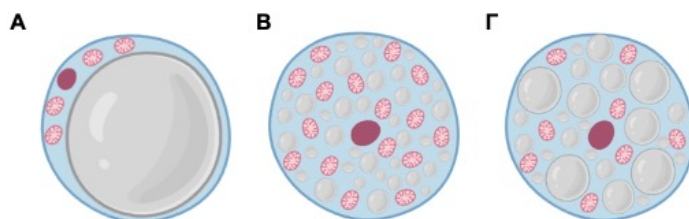
λιποκύτταρα απαντώνται σε τρεις διακριτούς, τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά, τύπους: τα λευκά, τα φαιά και τα μπεζ λιποκύτταρα, στους οποίους βασίζεται και η αντίστοιχη κατηγοριοποίηση του ιστού (Rosen and Spiegelman, 2014) (Εικόνα 1.2).

Τα λευκά λιποκύτταρα αποτελούνται από μία μεγάλη λιποσταγόνα που καταλαμβάνει το 95% περίπου του συνολικού όγκου του κυττάρου και επομένως καθορίζει το μέγεθος του. Χαρακτηρίζονται επίσης από την παρουσία έκκεντρου πυρήνα και μικρού αριθμού μιτοχονδρίων (Εικόνα 1.2 Α). Έχουν ως κύρια λειτουργία τους την αποθήκευση ενέργειας για τις μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού και είναι ο μείζων τύπος λιποκυττάρων που απαντάται στο σύνολο του λιπώδους ιστού (Lee et al., 2013).

Τα φαιά λιποκύτταρα χαρακτηρίζονται από αρκετά μικρού μεγέθους λιποσταγονίδια και πολυάριθμα μιτοχόνδρια (Weber, 2004) (Εικόνα 1.2 Β). Είναι εξαιρετικά εξειδικευμένα κύτταρα που μετατρέπουν τα θρεπτικά συστατικά σε χημική ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Ο ρόλος αυτός των φαιών λιποκυττάρων, καταλύεται από την ειδική για αυτά τα κύτταρα, πρωτεΐνη αποσύνδεσης 1 (uncoupling protein 1, UCP1) και θεωρείται ότι ευθύνεται για το εξελικτικό πλεονέκτημα των θηλαστικών να επιβιώνουν και να είναι ενεργά σε συνθήκες ψύχους (Cannon and Nedergaard, 2004).

Στα τρωκτικά, παρατεταμένη έκθεση στο ψύχος ή επαγωγή της σηματοδότησης του αδρενεργικού συστήματος, μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση συστάδων κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη UCP1 και έχουν μορφολογία παρόμοια με αυτή του φαιού λιποκυττάρου. Για δεκαετίες, τα κύτταρα αυτά είχαν χαρακτηριστεί ελάχιστα και θεωρούνταν φαιά λιποκύτταρα. Σήμερα αναγνωρίζονται ως ο τρίτος τύπος λιποκυττάρων του οργανισμού που δημιουργείται κυρίως σε απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα και αναφέρονται ως μπεζ λιποκύτταρα (brown- like cells, brite ή beige cells). Τα μπεζ λιποκύτταρα παρουσιάζουν ενδιάμεση μορφολογία μεταξύ λευκών και φαιών λιποκυττάρων (Εικόνα 1.2 Γ) κι έχουν διπλό ρόλο. Μπορούν να

αποθηκεύουν ενέργεια ή να παράγουν θερμότητα, ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται (Wu et al., 2012b).

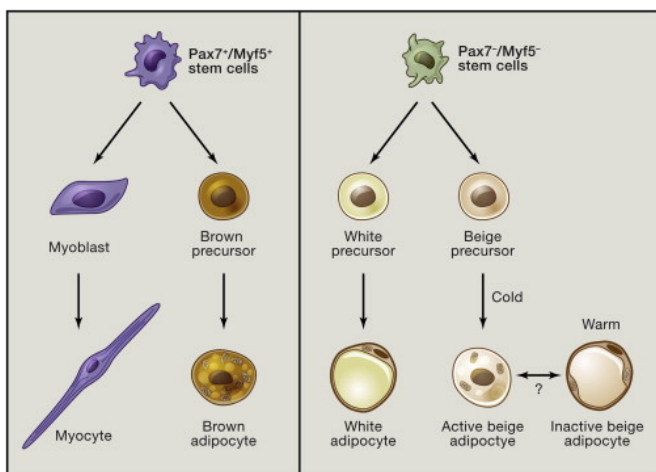


Εικόνα 1.2: Μορφολογικές διαφορές λιποκυττάρων. Α. Λευκό, Β. φαιό και Γ. μπεζ λιποκύτταρο (Δημιουργήθηκε στο: <https://biorender.com/>)

Αναπτυξιακή προέλευση λιποκυττάρων

Αναπτυξιακά, τα λευκά και τα φαιά λιποκύτταρα φαίνεται να προέρχονται από διαφορετικά πρόδρομα κύτταρα. Τα φαιά λιποκύτταρα υποστηρίζεται ότι μοιράζονται κοινό πρόδρομο με τα μυικά. Πρόκειται για αρχέγονα κύτταρα που εκφράζουν τους παράγοντες myogenic factor 5 ($Myf5^+$) και paired box 7 ($Pax7^+$) (Seale et al., 2008). Αρχέγονα κύτταρα που δεν εκφράζουν τους παραπάνω παράγοντες ($Myf5^-$, $Pax7^-$) μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λευκά (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014). Τα πρόδρομα μπεζ λιποκύτταρα προκύπτουν επίσης από τα $Myf5^-$, $Pax7^-$ αρχέγονα κύτταρα ωστόσο η διαφοροποίησή τους επάγεται σε απάντηση σε συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα, απουσία των οποίων μπορούν να αποκτήσουν τη μορφολογία λευκών λιποκυττάρων (Rosenwald et al., 2013) (Εικόνα 1.3). Νέες πληροφορίες όσον αφορά την αναπτυξιακή προέλευση

των λιποκυττάρων δημοσιεύονται συνεχώς και επομένως η αποκρυπτογράφηση αυτής εξακολουθεί να βρίσκεται σε εξέλιξη.



Εικόνα 1.3: Η διαφορετική προέλευση των φαιών, λευκών και μπεζ λιποκυττάρων (Rosen and Spiegelman, 2014).

Το λιποκύτταρο ως ρυθμιστής της ενεργειακής ομοιόστασης

Το λιποκύτταρο αποτελεί μία εξαιρετικά δυναμική δομή που ρυθμίζει την ενεργειακή ομοιόσταση σε απάντηση στα εξωτερικά ερεθίσματα. Κατά την πρόσληψη τροφής η περίσσεια των μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (non-esterified fatty acids-NEFAs) εισάγεται στα λιποκύτταρα μέσω ειδικών πρωτεϊνών σύνδεσης και μεταφοράς όπως η αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη IV (platelet glycoprotein IV, CD36) και τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών μεταφοράς λιπαρών οξέων (fatty acid transport proteins, FATP) (Large et al., 2004). Κατά τη μεταφορά τους εντός των λιποκυττάρων τα NEFAs

εστεροποιούνται σε χημικά αδρανή τριγλυκερίδια (triacylglycerol, TG) και αποθηκεύονται στις ήδη υπάρχουσες λιποσταγόνες, οδηγώντας σε αύξηση του μεγέθους τους (Konige et al., 2014). Το λιποκύτταρο έχει επιπροσθέτως την ικανότητα να συνθέτει λιπίδια από υδατάνθρακες μέσω της διαδικασίας της *de novo* λιπογένεσης που καταλύεται από τα ένζυμα: συνθάση λιπαρών οξέων (fatty acid synthase, FASN) και καρβοξυλάση του ακέτυλ-συνενζύμου A (acetyl-CoA carboxylase) 1 (Herman et al., 2012). Τα νέα λιπίδια εστεροποιούνται επίσης σε τριγλυκερίδια και συμβάλουν στην επέκταση της λιποσταγόνας (Εικόνα 1.4).

Σε συνθήκες αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων τα TG υδρολύονται, με τη διαδικασία της λιπόλυσης, σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids, FFAs) και γλυκερόλη (Kershaw and Flier, 2004) οδηγώντας σε μείωση των αποθηκών λίπους του κυττάρου. Τα FFAs εξέρχονται του λιποκυττάρου και μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας σε ιστούς που χρειάζονται ενέργεια, όπως στους μύες ή την καρδιά ενώ η γλυκερόλη προσλαμβάνεται κυρίως από το ήπαρ (Konige et al., 2014). Στην επιφάνεια της λιποσταγόνας εντοπίζεται πληθώρα δομικών πρωτεϊνών και μεταβολικών ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις των ομοιοστατικών μηχανισμών του λιποκυττάρου. Συγκεκριμένα, η λιπόλυση των τριγλυκεριδίων επιτελείται από τη διαδοχική δράση των ενζύμων: λιπάση των τριγλυκεριδίων (adipose triglyceride lipase, ATGL), ορμονοευαίσθητη λιπάση (hormone-sensitive lipase, HSL) και λιπάση των μονογλυκεριδίων (monoglyceride lipase, MGL) (Lass et al., 2011). Η ATGL μετακινείται στην επιφάνεια της λιποσταγόνας και ασκεί την υδρολυτική της δράση συνδεδεμένη με τον συν-ενεργοποιητή της comparative gene identification 58 (CGI 58) (Lass et al., 2006). Το στάδιο αυτό που αποτελεί το πρώτο της διαδικασίας της λιπόλυσης οδηγεί στη δημιουργία διγλυκεριδίων και FFAs (Zimmermann et al., 2004). Ακολουθεί υδρόλυση των διγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια και FFAs, αντίδραση που καταλύεται από την HSL (Osuga

et al., 2000), και απελευθέρωση γλυκερόλης και FFAs από τα μονογλυκερίδια με τη δράση της MGL (Karlsson et al., 1997) (Εικόνα 1.4).

Η αυξημένη έκκριση κατεχολαμινών και η πρόσδεση αυτών στους β-αδρενεργικούς υποδοχείς (β-AR) των λιποκυττάρων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ενεργοποιητές της λιπόλυσης (Cannon and Nedergaard, 2004). Συγκεκριμένα οι β-AR μέσω της σύζευξης τους με τη διεγερτική G-πρωτεΐνη (Ga) ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση που με τη σειρά της καταλύει την παραγωγή του κυκλικού AMP (cAMP) (Connolly et al., 1986). Η αυξημένη συγκέντρωση του AMP διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) που πυροδοτεί μία σειρά αντιδράσεων φωσφορυλίωσης που ενεργοποιούν την HSL και απενεργοποιούν την περιλιπίνη 1 (perilipin 1, PLN1) (Blanchette-Mackie et al., 1995). Η PLN 1 σε συνθήκες ενεργειακής επάρκειας βρίσκεται προσδεμένη στο συνένζυμο CGI58 εμποδίζοντας τη δράση της ATGL και προστατεύοντας τα τριγλυκερίδια από την αποικοδόμηση τους. Η φωσφορυλίωση της οδηγεί σε απελευθέρωση του CGI58 που αλληλεπιδρά με την ATGL και καθιστά δυνατή την έναρξη της δράσης της (Lass et al., 2006). Η επαγόμενη από την PKA φωσφορυλίωση της PLN1 οδηγεί επίσης στην πρόσδεση αυτής στην HSL με αποτέλεσμα τη μεταφορά της λιπάσης στη θέση δράσης της στην επιφάνεια της λιποσταγόνας (Blanchette-Mackie et al., 1995).

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από τη λιπόλυση, ενεργοποιούνται και σχηματίζουν μόρια ακυλ-συνενζύμου A (acyl-CoA), μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο συνθάση του acyl-CoA (acyl-CoA synthetase). Στη συνέχεια, με τη δράση της παλμιτοϋλο-τρανσφεράσης-I της καρνιτίνης (carnitine acyltransferase I, CPT1) μετατρέπονται σε ακυλ-καρνιτίνη (acylcarnitine) στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και μετατρέπονται πάλι σε acyl-CoA μέσω της παλμιτοϋλο-τρανσφεράσης-II της καρνιτίνης (carnitine acyltransferase II, CPT2) στην εσωτερική μεμβράνη αυτών. Με τις αντιδράσεις της βήτα

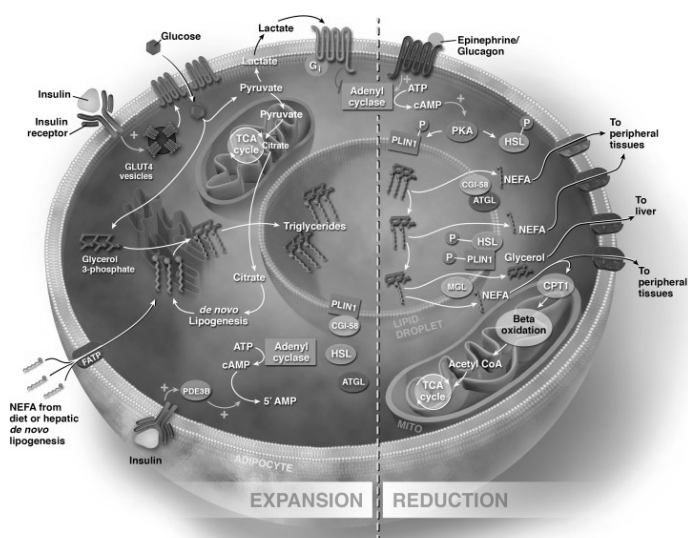
οξειδωσης που ακολουθούν, από τα FFAs (acyl-coA) παράγονται μόρια ακετυλ-συνενζύμου A (acetyl-CoA), που εισάγονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) και μέσω μια ακολουθίας διαδοχικών αντιδράσεων σχηματίζονται μόρια NADH και FADH₂ που επανοξειδώνονται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Purdom et al., 2018). Η απελευθέρωση πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων που ακολουθεί είναι η κινητήριος δύναμη για την παραγωγή ενέργειας με μορφή ATP (Rutkowski et al., 2015) (Εικόνα 1.4).

Η επίδραση της ινσουλίνης στη λειτουργία του λιποκυττάρου

Ιδιαίτερα σημαντική όσον αφορά τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποκυττάρων είναι η δράση της ινσουλίνης, η οποία πυροδοτεί μία σειρά γεγονότων που συμβάλουν στη σύνθεση/αποθήκευση θρεπτικών συστατικών και αναστέλλουν τον καταβολισμό τους. Συγκεκριμένα, κατά τη λήψη τροφής, τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στην κυκλοφορία συνδέονται στον υποδοχέα αυτής στα λιποκύτταρα και σηματοδοτούν τη μετατόπιση του μεταφορέα γλυκόζης 4 (glucose transporter 4, GLUT4) από το κυτοσόλιο στην κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας έτσι την αυξημένη ροή γλυκόζης εντός του κυττάρου (Kahn and Cushman, 1985). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο επαγόμενος από την ινσουλίνη μεταφορέας γλυκόζης GLUT4 αποτελεί τον πιο σημαντικό τύπο της οικογένειας GLUT που απαντάται στα λιποκύτταρα, ωστόσο παρών είναι και ο μεταφορέας GLUT1. Η γλυκόζη που εισέρχεται εντός των λιποκυττάρων υφίσταται τη διαδικασία της γλυκόλυσης, στα προϊόντα της οποίας συγκαταλέγεται και η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (glyceraldehyde 3-phosphate, G3P) που χρησιμεύει στο σχηματισμό της δομής των τριγλυκεριδίων (Guan et al., 2002). Όταν τα επίπεδα της κυτταρικής γλυκόζης είναι χαμηλά, τα λιποκύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν πρόδρομα μόρια

αυτής όπως το γαλακτικό ή αμινοξέα για να δημιουργήσουν G3P μέσω της γλυκονογένεσης (Forest et al., 2003).

Κατά τη διάρκεια λήψης τροφής η ινσουλίνη δρα επίσης καταστέλλοντας τη διαδικασία της λιπόλυσης κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Μέσω της διαμεσολαβούμενης από την πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB, ή AKT) φωσφορυλίωσης και κατά συνέπεια ενεργοποίησης της φωσφοδιεστεράσης 3B (phosphodiesterase 3B, PDE3B), η ινσουλίνη ασκεί αρνητική δράση στη λιπόλυση μειώνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδα του cAMP και αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των ATGL και HSL (Choi et al., 2010). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι η ινσουλίνη καταστέλλει έμμεσα τη διαδικασία της λιπόλυσης ως αποτέλεσμα της αυξημένης εισροής γλυκόζης που προκαλείται από την ενεργοποίηση του GLUT4. Συγκεκριμένα, η γλυκόζη μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό και εισέρχεται στο κύκλο του κιτρικού οξέος, ωστόσο, ένα μέρος του παραγόμενου πυροσταφυλικού μεταβολίζεται σε γαλακτικό το οποίο εξέρχεται από το λιποκύτταρο και διαμεσολαβεί στην ινσουλινοεξαρτώμενη αναστολή της λιπόλυσης μέσω της πρόσδεσης του στον υποδοχέα συζευγμένο με G πρωτεΐνη 81 (G-protein-coupled receptor 81, GPR81) που αναστέλλει τον σχηματισμό του cAMP και την ακολουθούμενη ενεργοποίηση της PKA (Ahmed et al., 2010) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Απεικόνιση των κύριων μηχανισμών που εμπλέκονται στην αύξηση και μείωση της αποθήκευσης λιπιδίων (Rutkowski et al., 2015).

Το λιποκύτταρο ως μηχανή θερμογένεσης

Η θερμότητα στα φαιά και μπεζ λιποκύτταρα αποδίδεται μέσω της δράση της ειδικής για αυτά πρωτεΐνης, της πρωτεΐνης αποσύνδεσης 1 η οποία εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων τους (Cannon and Nedergaard, 2004). Η UCP1 ανήκει στην οικογένεια μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μεταφοράς και απαντάται σε πολυμερή που σχηματίζουν ειδικούς διαύλους κατιόντων. Κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και της γλυκόζης οι ανηγμένοι φορείς ηλεκτρονίων (NADH και FADH_2), που προκύπτουν, επανοξειδώνονται στα ενζυμικά συμπλέγματα που συγκροτούν την αναπνευστική αλυσίδα. Ηλεκτρόνια απελευθερώνονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και πρωτόνια μετακινούνται στο διαμεμβρανικό χώρο, δημιουργώντας ηλεκτροχημική βαθμίδωση κατά μήκος αυτής. Στα

μιτοχόνδρια των διαφόρων κυτταρικών τύπων η βαθμίδωση της συγκέντρωσής των πρωτονίων που δημιουργείται μεταξύ των μιτοχονδριακών διαμερισμάτων αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη μετατροπή του ADP σε ATP από το ενζυμικό σύμπλεγμα, συνθάση του ATP, που καταλύει αυτή την αντίδραση, αντλώντας τα πρωτόνια πίσω στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Στα φαιά και τα μπεζ ωστόσο λιποκύτταρα, η παρουσία του UCP1 παρέχει εναλλακτικό τρόπο μεταφοράς των πρωτονίων στη μήτρα των μιτοχονδρίων οδηγώντας έτσι σε αποσύζευξη της οξειδωσης των υποστρωμάτων από τη σύνθεση ATP και σε απόδοση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας (Cannon and Nedergaard, 2004; Chouchani et al., 2019). Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα όσον αφορά τον ακριβή μηχανισμό μέσω του οποίου δρα η UCP1 με πρόσφατη μελέτη να υποστηρίζει ότι λειτουργεί ως συνμεταφορέας ανιόντων λιπαρών οξέων/πρωτονίων (Fedorenko et al., 2012). Η δράση του UCP1 οδηγεί σε ταχύτατο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και κατά συνέπεια σε μείωση του μεγέθους των λιποσταγονιδίων. Η παρουσία φαιών και μπεζ λιποκυττάρων στον λιπώδη ιστό θεωρείται ιδιαίτερα ευεργετική για τη μεταβολική υγεία (Kajimura et al., 2015).

1.1.2 Η ετερογένεια του λιπώδους ιστού σύμφωνα με τη θέση εναπόθεσης του

Ο λιπώδης ιστός αποτελείται από πολυάριθμες αποθήκες που αναπτύσσονται σε πολλαπλές διακριτές θέσεις του οργανισμού. Ο φαιός λιπώδης ιστός συναντάται σε μεγάλο ποσοστό στη βρεφική ηλικία όπου εντοπίζεται στη μεσοπλάτια και την υπερκλείδια χώρα καθώς επίσης και γύρω από τα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία (Gregoire et al., 1998; Spiegelman and Flier, 2001). Ωστόσο, με τη πάροδο του χρόνου η μάζα του ελαττώνεται σημαντικά. Η ύπαρξη του φαιού λιπώδους ιστού στην ενήλικη ζωή υποστηρίζεται από πολλές μελέτες ενώ ο εντοπισμός του είναι περιορισμένος κυρίως στη βάση

της κεφαλής και στον αυχένα (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

Ο λευκός λιπώδης ιστός κατατάσσεται σε δύο κύριες κατηγορίες σύμφωνα με το ανατομικό διαμέρισμα εντοπισμού του: τον υποδόριο (εντοπίζεται κάτω από το δέρμα καλύπτοντας όλο το σώμα) και τον σπλαχνικό (εντοπίζεται μεταξύ των οργάνων του σώματος). Η διάκριση αυτή βασίζεται στη διαφορετική φυσιολογία των δύο, ωστόσο πρόκειται για απλουστευμένη προσέγγιση (αφού διαφορές εντοπίζονται και μεταξύ των σπλαχνικών αποθηκών λίπους όπως π.χ. περιγωναδικές, μεσεντέριες και οπισθοπεριτοναϊκές), στην επικράτηση της οποίας έχει συμβάλει και η μη ύπαρξη ακριβούς συσχέτισης πολλών αποθηκών στον άνθρωπο με το ποντίκι (Lee et al., 2013).

Ιστολογικά ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια αφού αποτελείται από ώριμα λιποκυττάρια με μία ή περισσότερες λιποσταγόνες. Αντίθετα στο σπλαχνικό λίπος απαντώνται λιποκύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία των λευκών (Tchernof et al., 2006; Tchkonja et al., 2007). Σημαντικές διαφορές έχουν εντοπιστεί στις κατηγορίες λιπώδους ιστού όσον αφορά τη συμπεριφορά των λιποκυττάρων τους στα εξωτερικά ερεθίσματα, την έκκριση λιποκινών, τη λιπόλυση και τη σύνθεση τριγλυκεριδίων (Tchkonja et al., 2013). Οι υποθέσεις που έχουν προταθεί προκείμενου να εξηγήσουν το συγκεκριμένο φαινόμενο αναφέρονται στη διαφορετική σχέση της κάθε αποθήκης με το αγγειακό σύστημα, αλλά και τη διαφορετική αυτόνομη ρύθμιση των κυττάρων που τις απαρτίζουν. Μελέτες μεταμόσχευσης έδειξαν ότι η τοποθέτηση του σπλαχνικού λίπους σε υποδόρια θέση έχει ελάχιστη επίδραση στη μεταβολική υγεία ωστόσο μεταμόσχευση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού στο σπλαχνικό διαμέρισμα οδηγεί σε μείωση του βάρους και βελτίωση στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Tran and Kahn, 2010). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την

ύπαρξη εγγενών διαφορών μεταξύ των αποθηκών και υποδεικνύουν την πιθανή θετική δράση που μπορεί να έχει το υποδόριο λίπος στο μεταβολισμό.

1.1.3 Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο

Τα λιποκύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν και να εκκρίνουν πολυάριθμα μόρια τα οποία δρουν ρυθμιστικά σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες και επιτρέπουν την επικοινωνία του λιπώδους ιστού με άλλα όργανα. Η πυκνή αιμάτωση του λιπώδους ιστού επιτρέπει στα εκκριτικά αυτά προϊόντα να δρουν με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας συγκεντρώνεται στα μόρια πρωτεϊνικής φύσης τα οποία χαρακτηρίζονται συνολικά ως λιποκίνες (Kershaw and Flier, 2004). Στις ουσίες αυτές συμπεριλαμβάνονται κυτταροκίνες (όπως οι: TNFα, και IL-6), παράγοντες ανάλογοι του συμπληρώματος (όπως οι: αδιπονεκτίνη και αδιψίνη), χημειοκίνες (όπως η MCP1), παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (όπως η λεπτίνη και η ρεζιστίνη), συστατικά του συνδετικού ιστού (όπως το κολλαγόνο) και αγγειογενετικοί παράγοντες (όπως ο VEGF).

Η αδιψίνη και ο TNFα αποτελούν τα πρώτα παραδείγματα εκκρινόμενων από τον λιπώδη ιστό προϊόντων, ωστόσο η ανακάλυψη της λεπτίνης θεωρείται ως το σημείο καμπής του πεδίου αφού αποκάλυψε ότι τα μόρια που προέρχονται από τα λιποκύτταρα μπορεί να έχουν σημαντική δράση στη μεταβολική υγεία δίνοντας ελπίδα για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών θεραπειών έναντι της παχυσαρκίας (Considine, 2001). Η λεπτίνη χαρακτηρίζεται ως ανορεξιογόνος ορμόνη που συντίθεται και εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα σε απάντηση στις μεταβολές των αποθηκών λίπους. Ασκήει τη δράση της συνδεόμενη σε ειδικούς υποδοχείς στο κεντρικό νευρικό σύστημα και την περιφέρεια και μεταξύ των κύριων λειτουργιών της

συγκαταλέγονται οι: μείωση της πρόσληψης τροφής, αύξηση της ενεργειακής δαπάνης, αντιδιαβητική και προφλεγμονώδης δράση (La Cava and Matarese, 2004; Leininger et al., 2009; Moon et al., 2013).

Η αδιπονεκτίνη (λιπονεκτίνη) αποτελεί επιπλέον μία λιποκίνη με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για τη μεταβολική υγεία. Οι υποδοχείς της συναντώνται σε πολλούς ιστούς του οργανισμού και επομένως η δράση της επηρεάζει πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών. Μερικές από τις σημαντικότερες δράσεις της είναι: η επαγωγή της οξειδωσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ, η καταστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης, η βελτίωση της λειτουργίας των β-κυττάρων και η ενίσχυση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Turer and Scherer, 2012). Ωστόσο η αδιπονεκτίνη δεν προάγει την απώλεια βάρους, αντίθετα μελέτες υποστηρίζουν ότι υπερέκφραση αυτής οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση λίπους (Kim et al., 2007) και έτσι η χρησιμότητα της μελετάται κυρίως σε θεραπευτικές παρεμβάσεις που αφορούν τη ρύθμιση της ινσουλινοευαισθησίας.

Η ρεζιστίνη εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό και εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στην κυκλοφορία παχύσαρκων μυών. Αύξηση αυτής προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη ενώ η μείωση της οδηγεί σε αντίθετα αποτελέσματα (Steppan and Lazar, 2004). Αν και η παραπάνω συσχέτιση είναι δύσκολο να αποδειχθεί στον άνθρωπο, πιθανόν γιατί εκεί η ρεζιστίνη παράγεται κυρίως στα μακροφάγα, μελέτες υποστηρίζουν ότι αυξημένα επίπεδα αυτής συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αθηροσκλήρωσης και επομένως θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δείκτης του ανθρώπινου μεταβολικού συνδρόμου (Chen et al., 2009; Savage et al., 2001).

Τέλος σημαντικές λιποκίνες θεωρούνται και οι: δεσμεύουσα τη ρετινόλη πρωτεΐνη 4 (retinol-binding protein 4, RBP4) και λιποκαλίνη 2 (lipocalin 2, Lcn2), οι οποίες εκφράζονται στον λιπώδη ιστό, εντοπίζονται στην κυκλοφορία σε υψηλότερα επίπεδα κατά την παχυσαρκία και οι δράσεις τους

σχετίζονται με την ομοιόσταση της γλυκόζης και λειτουργία της ινσουλίνης. Η RBP4 εκφράζεται κυρίως στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό και μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε τρωκτικά όσο και σε ανθρώπους υποστηρίζουν ότι αυξάνει την αντίσταση στην ινσουλίνη (Graham and Kahn, 2007). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για τη δράση της Lcn2 σε *in vitro* μοντέλα λιποκυττάρων και ηπατοκυττάρων (Yan et al., 2007b). Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές άλλες λιποκίνες έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί και νέα μόρια ανακαλύπτονται συνεχώς. Καίριο παραμένει το ερώτημα αν ο καφέ λιπώδης ιστός εκκρίνει ειδικές για αυτόν λιποκίνες, με τα δεδομένα να υποστηρίζουν ότι παράγει τις ίδιες με τον λευκό λιπώδη ιστό, ωστόσο σε διαφορετικά επίπεδα (Villarroya et al., 2013).

1.1.4 Η επέκταση του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία

Ένα από τα μοναδικά χαρακτηριστικά του λιπώδους ιστού είναι ικανότητά του να αλλάζει τις διαστάσεις του σύμφωνα με τα εξωτερικά ερεθίσματα που δέχεται. Η επέκταση του λιπώδους ιστού μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω της αύξησης του μεγέθους των λιποκυττάρων (υπερτροφία) είτε μέσω της δημιουργίας νέων λιποκυττάρων από την επαγωγή της διαφοροποίησης των πρόδρομων λιποκυττάρων που εντοπίζονται στον ιστό (υπερπλασία). Κατά την υπερκατανάλωση τροφής η περίσσεια λιπαρών οξέων αποθηκεύεται στα λιποκύτταρα με τη μορφή τριγλυκεριδίων οδηγώντας αρχικά σε υπερτροφία. Όταν ξεπεραστεί το όριο αποθηκευτικής ικανότητας των κυττάρων, σήματα που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό ή/και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων, απελευθερώνονται (Krotkiewski et al., 1983).

Στον άνθρωπο η αυξημένη κατανάλωση τροφής για διάστημα αρκετών μηνών, προκαλεί αύξηση του μεγέθους αλλά όχι του αριθμού των κυττάρων

(Salans et al., 1971). Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερτροφία προκαλείται στις υποδόριες λιποαποθήκες στο υποδόριο λίπος του ανώτερου σώματος, ενώ στις λιποαποθήκες που εντοπίζονται κάτω από τη μέση δημιουργείται υπερπλασία (Tchoukalova et al., 2010). Μελέτες σε τρωκτικά υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση υπερθερμιδικής δίαιτας αυξάνει το ποσοστό θανάτου των λιποκυττάρων στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό ως και 80%, ενώ το ίδιο ποσοστό για τον υποδοροίο λιπώδη ιστό φτάνει μόλις το 3% (Strissel et al., 2007). Το ποσοστό αυτό αντισταθμίζεται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων και έτσι η μάζα του ιστού εξακολουθεί να αυξάνεται καθώς ο φαινότυπος της παχυσαρκίας επιδεινώνεται. Η παρατήρηση αυτή ωστόσο, προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας στο μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω αφού η υπερτροφία ακολουθείται από τον κυτταρικό θάνατο και την εμφάνιση νέων λιποκυττάρων. Η χρόνια ωστόσο αυξημένη πρόσληψη τροφής οδηγεί σε παχυσαρκία και τις δυσμενείς συνέπειες που συνδέονται με αυτή.

Η υπερτροφική παχυσαρκία θεωρείται η πιο κοινή αιτία ανάπτυξης συστηματικής αντίστασης στην ινσουλίνη η οποία εκδηλώνεται με τη μορφή υπερινσουλιναϊμίας παρουσία υπεργλυκαιμίας και δυσλιπιδαιμίας (Reaven, 2011) (Εικόνα 1.5). Η αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αυτής ως προς τη ρύθμιση της λιπόλυσης, αύξηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων NEFA, έκτοπη εναπόθεση τους σε μη λιπώδης ιστούς όπως το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες, ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και λιποτοξικότητα. Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) που προκαλείται από αύξηση της εισροής λιπαρών οξέων στο ήπαρ αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα των αρνητικών επιπτώσεων της απορρύθμισης της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό (Samuel et al., 2004).

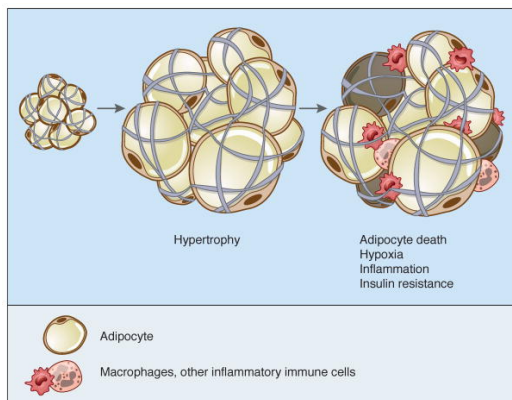
Η αναδιαμόρφωση του λιπώδους ιστού κατά την επέκταση των λιποκυττάρων του

Η ιδιότητα του λιπώδους ιστού να αλλάζει το μέγεθός του σε απόκριση στις διατροφικές απαιτήσεις υποδεικνύει την ικανότητα αναδιαμόρφωσης που αυτός διαθέτει, ωστόσο οι μηχανισμοί που την καθιστούν δυνατή δεν έχουν αποκρυπτογραφηθεί πλήρως. Η υποξία φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο και υπάρχουν αρκετές μελέτες που εξετάζουν τη συμμετοχή της στο φαινόμενο. Καθώς τα λιποκύτταρα επεκτείνονται τα επίπεδα οξυγόνου στις λιποαποθήκες μειώνονται και ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1α (hypoxia-inducible transcription factor 1α, HIF1α) ενεργοποιείται (Trayhurn, 2013). Η ανάπτυξη υποξίας στον λιπώδη ιστό κατά την παχυσαρκία φαίνεται να αναπτύσσεται λόγω της μεγάλης απόστασης των υπερτροφικών λιποκυττάρων από το αγγειακό σύστημα, που συχνά ξεπερνά την απόσταση διάχυσης του O₂ εντός του ιστού (Trayhurn, 2014). Έχει επίσης αναφερθεί ότι αύξηση των λιπαρών οξέων μπορεί να οδηγήσει σε αποσύνδεση της αναπνευστικής αλυσίδας (mitochondria uncoupling) με αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου και τη δημιουργία υποξίας στα λιποκύτταρα (Lee et al., 2014). Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί όσον αφορά τις δράσεις του HIF1α στα υπερτροφικά λιποκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των: καταστολή της β-οξειδωσης και αύξησης της ίνωσης και της φλεγμονής (Halberg et al., 2009; Krishnan et al., 2012) (Εικόνα 1.5).

Η ίνωση αποτελεί κύριο δείκτη της υγείας του λιπώδους ιστού. Τα λιποκύτταρα εκφράζουν πληθώρα πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, τα επίπεδα των οποίων υποστηρίζεται ότι ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από αλλαγές στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Maquoi et al., 2002). Κατά την παχυσαρκία παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στη διατήρηση της δομής του λιποκυττάρου. Κατά την επέκταση αυτού οριοθετούν την

αποθηκευτική του ικανότητα, γεγονός που οδηγεί σε ενεργοποίηση οδών που σχετίζονται με την υποξία, τη φλεγμονή, τον κυτταρικό θάνατο και την έκτοπη εναπόθεση λιπιδίων σε άλλους ιστούς (Sun et al., 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω αποτελεί το γονίδιο *Col6a1* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κολλαγόνο τύπου VI. Έλλειψη του *Col6a* σε ποντίκια οδηγεί σε ανάπτυξη μεγαλύτερου μεγέθους λιποκυττάρων και αυξημένο σωματικό βάρος σε συνδυασμό ωστόσο με μειωμένη φλεγμονή και βελτιωμένες παραμέτρους που σχετίζονται με την ομοιόσταση της γλυκόζης (Khan et al., 2009).

Το κυτταρικό στρες που παρατηρείται κατά την υπερτροφία του λιπώδους ιστού είναι επιπροσθέτως άμεσα συνδεδεμένο με την αύξηση του αριθμού των μακροφάγων στον ιστό (Chawla et al., 2011). Φαινοτυπικά τα μακροφάγα διακρίνονται σε M1 και M2 με τα πρώτα να ενεργοποιούνται κλασσικά και να έχουν προφλεγμονώδη δράση και τα δεύτερα να ενεργοποιούνται εναλλακτικά και να έχουν επουλωτική δράση. Τα M2 είναι ο κυρίαρχος τύπος μακροφάγων στον λιπώδη ιστό των αδύνατων ζώων, ωστόσο κατά την παχυσαρκία αυξάνεται εκλεκτικά ο αριθμός των M1 μακροφάγων, και κατά συνέπεια ο λόγος M1/M2, ευνοώντας την ανάπτυξη μίας προφλεγμονώδους κατάστασης στον ιστό (Oh et al., 2012) (Εικόνα 1.5). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι όλες οι κατηγορίες κυττάρων του ανοσοποιητικού έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη φλεγμονής του λιπώδους ιστού που παρατηρείται κατά την παχυσαρκία, ενώ τα ακριβή εναρκτήρια σήματα που οδηγούν σε αυτή και η χρονική στιγμή κατά την εξέλιξη της νόσου που εμφανίζεται, παραμένουν ασαφή (Mathis, 2013).



Εικόνα 1.5: Η αναδιαμόρφωση του λιπώδους ιστού κατά την υπερτροφική παχυσαρκία (Rosen and Spiegelman, 2014).

1.1.5 Ο λιπώδης ιστός ως θεραπευτικός στόχος

Δεδομένου του κεντρικού ρόλου του λιπώδους ιστού στη μεταβολική υγεία του οργανισμού και την ανάπτυξη της παχυσαρκίας, η πιθανότητα αξιοποίησης των γνώσεων της βιολογίας αυτού για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών και συνεχίζει να διερευνάται. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά τα αποτελέσματα ορισμένων από αυτές.

Λιπεκτομή

Μία απλή προσέγγιση για την απώλεια βάρους είναι η χειρουργική αφαίρεση της περίσσειας λιπώδους ιστού. Στα τρωκτικά, αφαίρεση του σπλαχνικού λίπους οδηγεί σε βελτίωση των μεταβολικών παραμέτρων

βραχυπρόθεσμα, ωστόσο αφαίρεση του ιστού που εντοπίζεται υποδόρια έχει μικρή επίδραση (Shi et al., 2007). Στον άνθρωπο απομάκρυνση του υποδόριου λιπώδους ιστού σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40% δεν συνδέεται με σημαντική βελτίωση της μεταβολικής υγείας (Klein et al., 2004). Δεν είναι σαφές αν η έλλειψη αποτελεσματικότητας της λιποαναρρόφησης σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών του λευκού λίπους ή αν έγκειται στην αδυναμία της τεχνικής να διορθώσει την ενεργειακή ανισορροπία που χαρακτηρίζει την επέκταση του ιστού. Είναι επίσης σαφές ότι αφαίρεση αποθηκών λίπους χειρουργικά που δεν συνοδεύεται από ταυτόχρονη διόρθωση της ενεργειακής ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει σε επαναδημιουργία μάζας λίπους είτε στο σημείο εκτομής είτε σε άλλες θέσεις εναπόθεσης. Στα τρωκτικά, το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται μέσα σε διάστημα μερικών εβδομάδων (Mauer et al., 2001), ενώ στον άνθρωπο η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει μήνες (Hernandez et al., 2011).

Θειαζολιδινεδιόνες (Thiazolidinediones, TZDs)

Οι TZDs δρουν ως αγωνιστές των ενεργοποιούμενων από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωμάτων υποδοχέων (peroxisome proliferator-activated receptors PPAR γ) και παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις στον λιπώδη ιστό συμπεριλαμβανομένων των: αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, επαγωγή της δημιουργίας μπεζ λιποκυττάρων και αντιφλεγμονώδης δράση. Η κλινική ωστόσο χρησιμότητα των TZDs είναι περιορισμένη λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών που προκύπτουν από τη χρήση τους, παραδείγματα των οποίων αποτελούν η κατακράτηση υγρών, η οστεοπόρωση και η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (Ahmadian et al., 2013; Lebovitz, 2019).

Επαγωγή φαιών και μπεζ λιποκυττάρων

Δεδομένου του πολύ υψηλού μεταβολικού ρυθμού του φαιού λιπώδους ιστού, η εκλεκτική επαγωγή μπεζ και φαιών λιποκυττάρων με στόχο τη μείωση του συνολικού σωματικού λίπους αποτελεί προσέγγιση που διερευνάται. Ενεργοποίηση των β3-αδρενεργικών υποδοχέων έχει αποδειχθεί ότι δρα θετικά στη διαδικασία της θερμογένεσης. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη αγωνιστών ειδικών για τους συγκεκριμένους υποδοχείς στο παρελθόν ήταν μεγάλο. Ωστόσο αν κι ορισμένα από τα μόρια που μελετήθηκαν βρέθηκε να επάγουν τη θερμογένεση, η απόλυτη εκλεκτικότητα τους για τους β3 υποδοχείς ήταν δύσκολο να επιτευχθεί και η βιοδιαθεσιμότητα τους κατά την από του στόματος χορήγηση δεν είναι ικανοποιητική, με αποτέλεσμα τα δημοσιευμένα αποτελέσματα από μελέτες αρχικών σταδίων να μην είναι ενθαρρυντικά (Arch, 2002). Οι θειαζολιδινεδιόνες, όπως προαναφέρθηκε, υποστηρίζεται ότι αυξάνουν τη δημιουργία μπεζ λιποκυττάρων στο λευκό λίπος ωστόσο το παράδοξο είναι ότι προκαλούν αύξηση και όχι απώλεια βάρους (Ahmadian et al., 2013).

Μεταξύ των παραγόντων που η παρουσία ή η δράση τους έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καφέ και μπεζ λιποκυττάρων συμπεριλαμβάνονται και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες 7 και 8b (bone morphogenetic protein 7 and 8b, BMP7, BMP8b), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21), τα νατριουρητικά πεπτίδια τύπου A και B (natriuretic peptides A and B, ANP, BNP) και η κυκλοξυγενάση 2 (cyclooxygenase 2, COX2). Η πιθανότητα βελτίωσης της μεταβολικής υγείας μέσω της ρύθμισης των επιπέδων τους στον οργανισμό έχει εξεταστεί. Η χρησιμότητα ωστόσο προσεγγίσεων που αφορούν τους παραπάνω παράγοντες προς κλινικό όφελος περιορίζεται είτε από τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν όσον αφορά την αύξηση βάρους, είτε από τις ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω της ύπαρξης πληθώρας άλλων,

πέραν της θερμογένεσης, δράσεων (Becker et al., 2010; Vegiopoulos et al., 2010; Woo et al., 2013).

Λιποκίνες

Η ανακάλυψη της λεπτίνης και των θετικών δράσεων της στη μεταβολική υγεία υπέδειξε ότι χορήγηση αυτής θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτική προσέγγιση για την παχυσαρκία. Τα αποτελέσματα ωστόσο που προέκυψαν από τη χρήση της δεν υποστήριξαν την παραπάνω υπόθεση (Heymsfield et al., 1999; Mittendorfer et al., 2011). Επιπροσθέτως, η ανακάλυψη ότι οι παχύσαρκοι ασθενείς αναπτύσσουν αντίσταση στη λεπτίνη και επομένως χαρακτηρίζονται από αυξημένα και όχι ελαττωμένα επίπεδα αυτής (Myers et al., 2012) οδήγησε σε δοκιμές συγχορήγησης της με άλλους παράγοντες που προάγουν την απώλεια βάρους, με το σκεπτικό ότι η μείωση της αντοχής στη λεπτίνη θα μπορούσε να ενισχύσει τη δράση της. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες, όπως η αμυλίνη, η μετφορμίνη, ο FGF21 και η εξενδίνη-4, οδήγησαν σε θετικά αποτελέσματα σε μελέτες που έγιναν σε τρωκτικά, ωστόσο στον άνθρωπο τα δεδομένα που προέκυψαν δεν ήταν εξίσου εντυπωσιακά (Kim et al., 2006; Roth et al., 2008; Woo et al., 2013). Οι ερευνητικές μελέτες συνεχίζονται ενώ η χορήγηση της λεπτίνης προς το παρόν αποτελεί εγκεκριμένη ένδειξη σε σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με συγγενή ανεπάρκεια αυτής ή συγγενή λιποδυστροφία (Montague et al., 1997).

Η αδιπνονεκτίνη ανήκει επίσης στις λιποκίνες των οποίων η χρήση προς κλινικό όφελος έχει εξεταστεί. Οι δυσκολίες που προκύπτουν στην άμεση χορήγηση αυτής λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που απαιτούνται για τον πολυμερισμό της, σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ημιζωής της στον οργανισμό και τα υψηλά επίπεδα της υπό φυσιολογικές συνθήκες, έστρεψαν τις προσπάθειες στην αναζήτηση έμμεσων

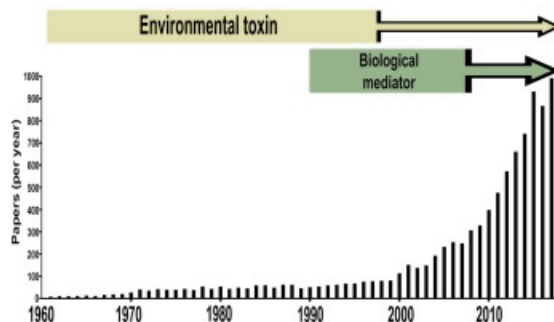
προσεγγίσεων αύξησης των επιπέδων ή της ενεργότητας της. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων προσεγγίσεων που διερευνώνται είναι οι TZDs, που υποστηρίζεται ότι προωθούν τη σύνθεση και έκκριση της αδιπονεκτίνης καθώς επίσης και μόρια που αποτελούν ενεργοποιητές των υποδοχέων της (Okada-Iwabu et al., 2013; Shetty et al., 2009).

Τέλος, η αναστολή λιποκινών με αρνητική δράση για τον μεταβολισμό αποτελεί επίσης προσέγγιση που διερευνάται. Χορήγηση της φενρετινίδης σε παχύσαρκα τρωκτικά μειώνει τα επίπεδα της RBP4 στον ορό, οδηγεί σε απώλεια βάρους και βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την ανοχή στη γλυκόζη (Campos-Sandoval et al., 2011; Yang et al., 2005a). Ωστόσο η θετική δράση της στην απώλεια βάρους παρατηρείται και σε πειραματόζωα με έλλειψη της RBP4 (Preitner et al., 2009). Φαρμακολογική αναστολή της δεσμεύουσας με λιπαρά οξέα πρωτεΐνης 4 (fatty acid-binding protein 4, FABP4) έχει βρεθεί επίσης να δρα θετικά έναντι της αντίστασης στην ινσουλίνη και της αθηροσκλήρωσης σε μοντέλα τρωκτικών (Furuhashi and Hotamisligil, 2008).

1.2 Το υδρόθειο

Για πάρα πολλές δεκαετίες το υδρόθειο (H_2S) ήταν ευρέως γνωστό κυρίως για την τοξικότητά του και η πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών σχετικά με τις βιολογικές του δράσεις, εστίαζαν σε αυτή. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, παραγωγή του H_2S ανιχνεύτηκε σε βακτηριακά είδη ενώ το 1942 το υδρόθειο αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως προϊόν που συντίθενται στα θηλαστικά. Οι ερευνητικές μελέτες ωστόσο που αποκαλύπτουν τις πολλαπλές ρυθμιστικές λειτουργίες του H_2S στον οργανισμό έχουν διεξαχθεί κυρίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες, χρονικό διάστημα κατά το οποίο σημειώθηκε και ραγδαία αύξηση του αριθμού των σχετικών με το υδρόθειο δημοσιευμένων άρθρων (Szabó, 2007) (Εικόνα 1.6).

Σήμερα το H_2S αναγνωρίζεται πλέον ως ενδογενές σηματοδοτικό μόριο, που εμπλέκεται σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών και παθολογικών καταστάσεων (Kimura, 2014a; Szabo, 2018; Wang, 2012). Θεωρείται επίσης το τρίτο μέλος της οικογένειας των φυσιολογικών αέριων διαβιβαστών η οποία συμπληρώνεται από τα: μονοξείδιο του αζώτου (NO) και μονοξείδιο του άνθρακα (CO) (Gadalla and Snyder, 2010). Η κατανόηση των δράσεων του υδροθείου, η ταυτοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων τις ασκεί και η διερεύνηση της πιθανότητας χρήσης αυτών προς κλινικό όφελος εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας.



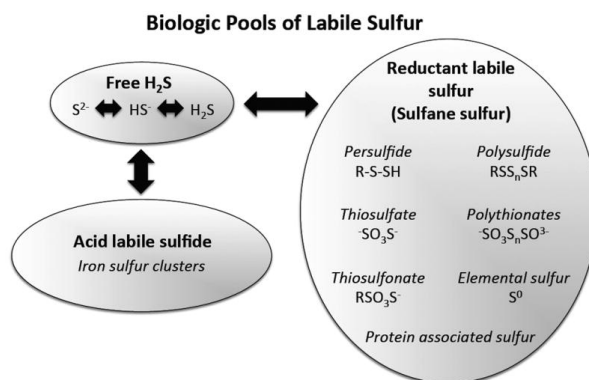
Εικόνα 1.6: Η βιολογία του υδροθείου αποτελεί αντικείμενο μελέτης με αυξανόμενο ενδιαφέρον τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Απεικόνιση του αριθμού των σχετικών με το υδρόθειο άρθρων που δημοσιεύθηκαν από το 1960 έως το 2017 (Szabo, 2018).

1.2.1 Η ενδογενής παραγωγή του υδροθείου

Στον ανθρώπινο οργανισμό το υδρόθειο μπορεί να συντεθεί μέσω ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αλλά και μη ενζυμικών οδών. Η βιοσύνθεση του πραγματοποιείται μέσω της δράσης των ενζύμων: β-συνθάση της κυσταθειονίνης (cystathionine β synthase, CBS), γ-λυάση της κυσταθειονίνης (cystathionine γ lyase, CSE) και σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, MPST ή 3-MST). Τα CBS, CSE και MPST παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον τρόπο ρύθμισης τους, τα συνένζυμα και τα υποστρώματα που απαιτούν για τη δράση τους, τον κυτταρικό τους εντοπισμό και το προφίλ έκφρασης τους στους ιστούς.

Το ενδογενές υδρόθειο από τη στιγμή που θα παραχθεί στον οργανισμό μπορεί είτε να ασκήσει άμεσα τις δράσεις του, είτε να αποθηκευτεί ως "δεσμευμένο θείο" δημιουργώντας ενδοκυττάρια αποθήκες αυτού.

Παραδείγματα τέτοιων μορφών αποτελούν τα: θειοθειικό ιόν (thiosulfate, $S_2O_3^{2-}$), οργανικά πολυσουλφίδια (polysulfides, $R-S_n-R$), και στοιχειακό θείο (elemental sulfur, S^0) (Ishigami et al., 2009; Shen et al., 2012) (Εικόνα 1.7). Η απελευθέρωση του H_2S πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Δεσμευμένο θείο εντοπίζεται επίσης σε πρωτεΐνες που έχουν τροποποιηθεί με την αντίδραση της S-σουλφυδριλίωσης και μπορούν να αποδώσουν υδρόθειο μη ενζυμικά ή μέσω της δράσης της θειορεδοξίνης (Wedmann et al., 2016). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ακριβής συμβολή των ενζυμικών έναντι των μη ενζυμικών πηγών H_2S στα επίπεδα του σε βιολογικά συστήματα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.



Εικόνα 1.7: Ενδοκυττάρειες αποθήκες δεσμευμένου θείου στον οργανισμό (Shen et al., 2012).

B-συνθετάση της κυσταθειονίνης

Το CBS εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο η παρουσία του ωστόσο έχει ταυτοποιηθεί σε μικρότερο βαθμό και σε άλλους ιστούς όπως στην καρδιά, τα αγγεία, τους πνεύμονες και τον γαστρεντερικό σωλήνα (Bucci et al., 2014; Kimura, 2014b; Whiteman et al., 2011). Ενδοκυτταρικά εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα με μελέτες να υποστηρίζουν ότι υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να παρατηρηθεί μετατόπιση του στα μιτοχόνδρια (Szabo et al., 2013; Teng et al., 2013). Έχει αναφερθεί επιπροσθέτως, ότι το ένζυμο υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση (σουμοϋλίωση) ικανή να ρυθμίζει τον πυρηνικό του εντοπισμό, ωστόσο η σημαντικότητα της παρουσίας του στον πυρήνα δεν έχει διευκρινιστεί (Kabil et al., 2006) .

Το CBS καταλύει αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται η κυστεΐνη, η σερίνη και η ομοκυστεΐνη. Οι κυριότερες από αυτές αφορούν την μετατροπή της L-κυστεΐνης και L-ομοκυστεΐνης σε L-κυσταθειονίνη και H₂S, καθώς επίσης και την υδρόλυση της L-κυστεΐνης από την οποία προκύπτουν: H₂S, L-σερίνη και L-λανθιονίνη. (Kabil and Banerjee, 2014; Singh et al., 2009) (Εικόνα 1.8). Το CBS έχει ιδιαίτερα πολύπλοκη δομή και ρύθμιση, ανήκει στην κατηγορία των εξαρτώμενων από φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal-5'-phosphate, PLP) ενζύμων και είναι το μόνο ένζυμο της κατηγορίας που απαιτεί ως προσθετική ομάδα την αίμη (Singh and Banerjee, 2011). Ο λειτουργικός ρόλος της αίμης στη δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει ασαφής (Banerjee and Zou, 2005; Meier et al., 2001). Το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου παρουσιάζει αυτο-ανασταλτικό ρόλο. Πρόσδεση του αλλοστερικού ενεργοποιητή του CBS, S-αδενοσυλο-μεθειονίνης (S-adenosyl-L-methionine, SAM) στην περιοχή, δρα θετικά έναντι της αυτο-αναστολής του οδηγώντας σε αλλαγή της διαμόρφωσης και επακόλουθη ενεργοποίηση του (Ereno-Orbea et al., 2014; Shan and Kruger, 1998).

Γ-λυάση της κυσταθειονίνης

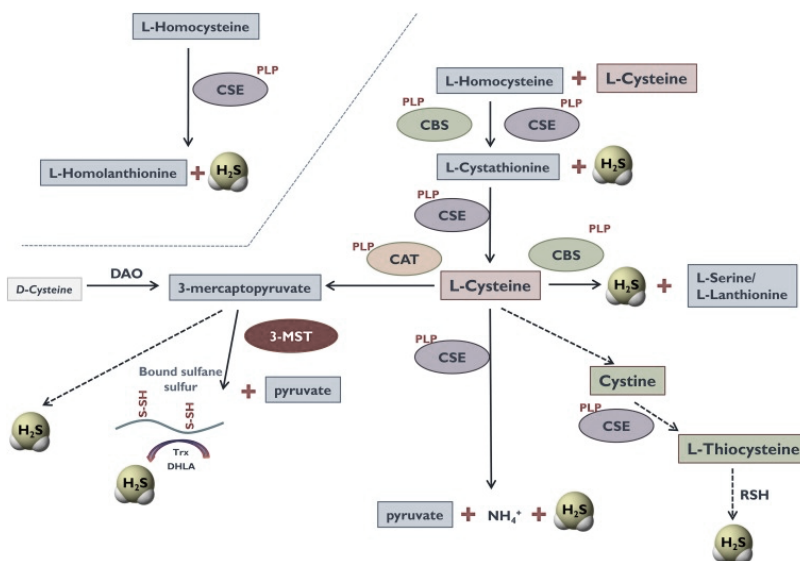
Το CSE αποτελεί την κύρια πηγή ενδογενώς παραγόμενου υδρόθειου των περιφερειακών οργάνων ενώ η συνεισφορά του στα επίπεδα του H₂S στο κεντρικό νευρικό σύστημα δεν θεωρείται σημαντική (Kabil et al., 2011; Kimura, 2014b; Vitvitsky et al., 2006). Το CSE σε επίπεδο πρωτεΐνης ανιχνεύεται επίσης σε πολλά άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένων του, καρδιαγγειακού συστήματος, του αναπνευστικού συστήματος, των νεφρών, του ήπατος και της μήτρας, με διαφορετικό ωστόσο ποσοστό συμμετοχής στα συνολικά επίπεδα του H₂S σε κάθε ιστό (Kabil and Banerjee, 2014; Kimura, 2014a; Wang, 2012). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το CSE εντοπίζεται στο κυτοσόλιο, ενώ έχει αναφερθεί και ικανότητα αυτού να μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια μετά από παρατεταμένη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Δεν έχει αναφερθεί κανένα φυσιολογικό ερέθισμα που να μεταβάλλει την υποκυτταρική κατανομή του CSE (Fu et al., 2012).

Το CSE χρησιμοποιώντας ως κύρια υποστρώματα την κυσταθειονίνη και την L-κυστεΐνη προκαλεί απελευθέρωση H₂S, αμμωνίας και πυροσταφυλικού (Singh et al., 2009; Sun et al., 2009) (Εικόνα 1.8). Η ομοκυστεΐνη έχει επίσης αναφερθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα από το ένζυμο για την παραγωγή υδροθείου (Kabil and Banerjee, 2014). Το CSE όπως και το CBS ανήκει στην κατηγορία των PLP-εξαρτώμενων ενζύμων και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι το ασβέστιο με την καλμοδουλίνη καθώς επίσης και οι δότες μονοξειδίου του αζώτου, μπορούν να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στην ενεργότητα του (Coletta et al., 2012; Singh and Banerjee, 2011; Sun et al., 2009; Yang et al., 2008).

Σουλφοτρανσφεράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού

Η παρουσία του MPST έχει ανιχνευθεί σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών, παρατήρηση που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με το μοτίβο του υποκινητή του, που παρουσιάζει χαρακτηριστά παρόμοια με αυτά των γονιδίων οικιακής οικονομίας (Kimura, 2015; Nagahara et al., 2004). Τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου ωστόσο, διαφέρουν μεταξύ των ιστών, με τους: εγκέφαλο, ήπαρ, νεφρούς, και θύμο αδένες να εμφανίζουν την υψηλότερη έκφραση αυτού (Shibuya et al., 2013; Tomita et al., 2016). Σε επίπεδο κυττάρου το MPST υπό φυσιολογικές συνθήκες συναντάται στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια (Shibuya et al., 2009).

Το MPST απαιτεί ψευδάργυρο για τη δράση του και παράγει H₂S με τη συζευγμένη δράση του ενζύμου CAT (PLP-εξαρτώμενο ένζυμο) από την κυστεΐνη. Παρουσία του CAT η κυστεΐνη μετατρέπεται σε 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ (3-MP), ακολούθως το MPST καταλύει την αντίδραση μεταβολισμού του 3-MP σχηματίζοντας H₂S και πυροσταφυλικό (Mikami et al., 2011). Το υδρόθειο που προκύπτει βρίσκεται στη δεσμευμένη του μορφή και απελευθερώνεται παρουσία αναγωγικών συνθηκών. Ο μηχανισμός κατάλυσης του ενζύμου περιλαμβάνει τη μεταφορά θείου από το 3-MP στην πυρηνόφιλη κυστεΐνη 247 αυτού (Nagahara, 2013; Nagahara et al., 2007). Το σχηματιζόμενο δισουλφίδιο αποδίδει υδρόθειο παρουσία αναγωγικών παραγόντων ή ειδικών ενζύμων (Mikami et al., 2011; Nagahara, 2013) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Βιοσυνθετικές οδοί του H₂S στα κύτταρα θηλαστικών (Szabo and Papapetropoulos, 2017).

1.2.2 Φαρμακολογικές προσεγγίσεις ρύθμισης των επιπέδων του H₂S στον οργανισμό

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η διερεύνηση των δράσεων του υδροθείου και των σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων αυτές ασκούνται καθώς επίσης και να εξεταστεί η πιθανή χρησιμότητα της ρύθμισης των επιπέδων του H₂S στον οργανισμό προς κλινικό όφελος, έχουν αναπτυχθεί αρκετά γενετικά μοντέλα και φαρμακολογικές προσεγγίσεις για τη μελέτη του. Όσον αφορά τις δεύτερες, μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του υδροθείου έχει επιτευχθεί με τη φαρμακολογική αναστολή των ενζύμων ενδογενούς παραγωγής του, ενώ αύξηση των επιπέδων αυτού με τη χορήγηση μορίων-δοτών του. Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι κυριότεροι αντιπρόσωποι των δύο αυτών κατηγοριών.

Δότες υδροθείου

Ως δότες H_2S χαρακτηρίζονται μόρια που αυθόρμητα ή με αντιδράσεις με άλλες ενώσεις (πχ αναγωγικές ουσίες) ή με το μεταβολισμό, απελευθερώνουν υδρόθειο. Με βάση τη χημική τους δομή και τον ρυθμό απελευθέρωσης του H_2S μπορούν να ταξινομηθούν σε: ανόργανους ή οργανικούς και σε ταχείας ή παρατεταμένης απελευθέρωσης, δότες. Ανόργανες ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για αύξηση των επιπέδων υδροθείου στον οργανισμό αποτελούν τα: υδροσουλφίδιο του νατρίου ($NaHS$), θειούχο νάτριο (Na_2S) και τρισουλφίδιο του νατρίου (Na_2S_3). Και οι τρεις αυτοί δότες έχουν αποτελέσει εργαλεία για πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών ωστόσο παρουσιάζουν το μειονέκτημα της ταχείας αποδέσμευσης μεγάλων ποσοτήτων υδροθείου. Όπως γίνεται αντιληπτό η δράση τους είναι αδύνατον να προσομοιάσει την αργή και παρατεταμένη ενδογενή, ενζυμική παραγωγή υδροθείου που πραγματοποιείται στον οργανισμό, ενώ η απότομη, υψηλής συγκέντρωσης απελευθέρωση υδροθείου που επιτυγχάνουν, μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές αποκρίσεις (Papapetropoulos et al., 2015). Η δραστική ένωση SG1002 αναγνωρίζεται επιπροσθέτως ως δότης υδροθείου και παρέχει τα πλεονεκτήματα της από του στόματος χορήγησης και της αργής απελευθέρωσης (Kondo et al., 2013). Στην πραγματικότητα, πρόκειται για μείγμα διαφόρων μορίων με κύριο συστατικό ένα κυκλικό οκταμελές μόριο θείου (92%) (Εικόνα 1.9). Η αποτελεσματικότητα του SG1002 ως προς την αύξηση των επιπέδων του υδροθείου, (στην ελεύθερη και τη δεσμευμένη μορφή του), στο αίμα και στους ιστούς, υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες ωστόσο η σχετική συμβολή των διαφόρων συστατικών του στην παρατηρούμενη αύξηση δεν έχει διευκρινιστεί (Barr et al., 2015; E. et al., 2016; Kondo et al., 2013).

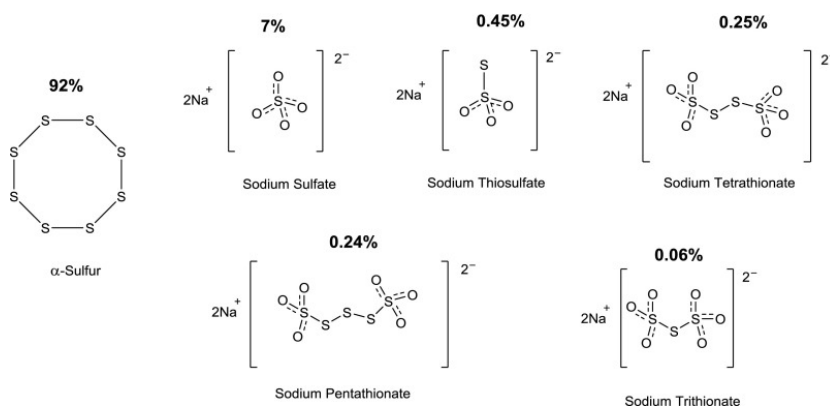
Οι οργανικοί δότες υποστηρίζεται ότι οδηγούν σε σταδιακή απελευθέρωση υδροθείου και καταφέρνουν να διατηρήσουν τα επίπεδα αυτού σταθερά. Η συνθετική ένωση GYY4137 και τα θειοαμινοξέα

(θειογλυκίνη και θειοβαλίνη) αποτελούν αντιπροσωπευτικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα παραδείγματα της συγκεκριμένης κατηγορίας δοτών (Li et al., 2008; Zhou et al., 2012). Οργανικά μόρια προερχόμενα από φυσικές πηγές έχουν επίσης χαρακτηριστεί ως μόρια με ικανότητα απελευθέρωσης υδροθείου. Πρόκειται για τα οργανικά πολυσουλφίδια: διάλλυλο δισουλφίδιο και διάλλυλο τρισουλφίδιο (diallyl disulfide, DADs, και diallyl trisulfide, DATs), που εντοπίζονται στο σκόρδο και λειτουργούν ως δότες κατά την αντίδραση τους με γλουταθειόνη (Liang et al., 2015). Το AP39 αποτελεί επίσης αναγνωρισμένο δότη υδροθείου που διαφοροποιείται από τους άλλους της κατηγορίας του, όσο αφορά τη θέση απελευθέρωσης του H₂S. Το AP39 έχει σχεδιαστεί για να στοχεύει στα μιτοχόνδρια (Szczeny et al., 2014). Ως δότες μπορούν επίσης να δράσουν τα υποστρώματα των ενζύμων ενδογενούς ενζυματικής βιοσύνθεσης του υδροθείου, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η ικανότητα απελευθέρωσης H₂S του 3-MP έχει αναφερθεί και απουσία του MPST (Mitidieri et al., 2018). Τέλος, εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα έχουν συνδεθεί με τμήματα που αποδεσμεύουν υδροθείο και εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη δραστηριότητα και την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Οι υβριδικές αυτές ενώσεις αφορούν κυρίως ανάλογα μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (S-MΣΑΦ), όπως της ασπιρίνης και της ναπροξένης (Chattopadhyay et al., 2012; Wallace et al., 2010).

Αναστολείς των ενζύμων σύνθεσης υδροθείου

Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη μορίων με εκλεκτικότητα και ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των ενζύμων που συμμετέχουν στην ενδογενή παραγωγή υδροθείου αποτελεί σήμερα αντικείμενο εντατικής έρευνας. Οι ενώσεις L-προπαργυλογλυκίνη (L-propargylglycine, PAG) και β-κυανο-L-αλανίνη (β-cyano-L-alanine, BCA) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών ως αναστολείς του ενζύμου CSE (Szabó, 2007). Ωστόσο

παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών και επομένως απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις ώστε να εκδηλώσουν τις δράσεις τους. Οι PAG και BCA δρουν εμποδίζοντας την πρόσδεση και τη λειτουργία του PLP, επομένως δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα για τα ένζυμα παραγωγής του υδροθείου (Asimakoroulou et al., 2013). Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η τριφθοροαλανίνη (trifluoroalanine). Το άμινο οξικό οξύ (aminoxyacetic acid, AOAA) για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι δρα ως εκλεκτικός αναστολέας του CBS, πρόσφατες μελέτες ωστόσο υποστηρίζουν την ύπαρξη ανασταλτικής δράσης αυτού και έναντι του CSE (Asimakoroulou et al., 2013). Το 2017, τέλος, δημοσιεύθηκε η ταυτοποίηση ενώσεων που δρουν ως αναστολείς του ενζύμου MPST με το μόριο 2-4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl-sulfanyl-1-naphthalen-1-yl-ethan-1-one (IMST-3) να παρουσιάζει την υψηλότερη εκλεκτικότητα για το συγκεκριμένο ένζυμο (Hanaoka et al., 2017).



Εικόνα 1.9: Χημική σύσταση του **SG1002** (Szabo and Papapetropoulos, 2017).

1.2.3 Το υδρόθειο ως σηματοδοτικό μόριο

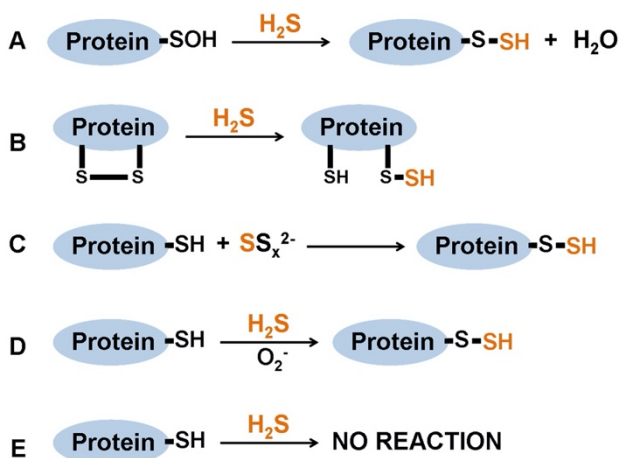
Το H_2S διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες χωρίς να απαιτεί τη δράση συγκεκριμένων μεταφορέων (Riahi and Rowley, 2014). Υπολογίζεται μάλιστα ότι το ενδογενές υδρόθειο που προέρχεται από ένα μόνο κύτταρο, μπορεί να επηρεάσει περισσότερα από 200 γειτονικά αυτού (Cuevasanta et al., 2012). Το H_2S δεν ασκεί τις δράσεις του μέσω ενός συγκεκριμένου μονοπατιού ή υποδοχέα αλλά επηρεάζει τη δράση πλήθους κυτταρικών μορίων με τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το είδος του ιστού και του οργανισμού. Παρακάτω περιγράφονται ορισμένοι από τους σημαντικότερους μηχανισμούς που υποστηρίζεται ότι εκκινούνται από το υδρόθειο και ακολούθως μερικές από τις κυριότερες δράσεις αυτού στον οργανισμό.

Μηχανισμοί σηματοδότησης που καταλύονται από τη δράση του H_2S

Η S-σουλφυδριλίωση αποτελεί τον κύριο μηχανισμό σηματοδότησης του υδροθείου. Πρόκειται για μια μετα-μεταφρασική τροποποίηση που πραγματοποιείται σε κατάλοιπα κυστεΐνης των πρωτεϊνών οδηγώντας σε μεταβολές στη λειτουργικότητα τους (Iciek et al., 2016; Mustafa et al., 2009; Nagy, 2015) (Εικόνα 1.10). Η S-σουλφυδριλίωση αποτελεί εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία και οι πρωτεΐνες-στόχοι της αποτελούν αντικείμενο έρευνας (Zivanovic et al., 2020). Μεταξύ των πρωτεϊνών που έχει αποδειχθεί ότι υφίστανται S-σουλφυδριλίωση συμπεριλαμβάνονται οι ακόλουθες: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (glyceraldehyde 3-phosphosphate dehydrogenase, GAPDH), πρωτεΐνη Kelch like ECH-associated protein 1 (KEAP1) και υπομονάδα 65 του πυρηνικού παράγοντα ενισχυτή της κ-ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells, NFκB) (Xie et al., 2016).

Το H_2S αναστέλλει άμεσα την καταλυτική δράση των φωσφοδιεστερασών, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) και κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) (Bucci et al., 2010)(Módis et al., 2013). Έχουν επίσης αναφερθεί πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του H_2S και του NO καθώς και συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αέριων διαβιβαστών (Szabo, 2017).

Πρόσφατες εργασίες υποστηρίζουν τη σημαντικότητα της δράσης του H_2S στα μιτοχόνδρια. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το υδρόθειο λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της δράσης του στο ένζυμο sulfide quinone oxidoreductase (SQR) (Szabo et al., 2014). Μπορεί επίσης να επηρεάζει τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, ασκώντας αντιοξειδωτική δράση, επιδρώντας στην επιδιόρθωση των βλαβών του μιτοχονδριακού DNA και διεγείροντας τη λειτουργία της ATP συνθάσης (Kabil and Banerjee, 2014; Módis et al., 2016; Szczesny et al., 2016). Υψηλότερες συγκεντρώσεις H_2S οδηγούν σε αναστολή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και κατά συνέπεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Nicholls and Kim, 1982; Nicholls et al., 2013).



Εικόνα 1.10: Αντιδράσεις σχηματισμού S-σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών. Η S-σουλφυδριλίωση καταλύεται από τη δράση του H₂S στις ομάδες **A.** σουλφονικών οξέων (sulfenic acids, Cys - SOH), **B.** δισουλφιδίων (disulfides, -S-S) και **Δ,Ε.** οξειδωμένων θειολών ή **Γ.** από τη δράση των πολυσουλφιδίων στις ομάδες θειόλης (thiols, Cys - SH,), των καταλοίπων κυστεΐνης των πρωτεϊνών (Meng et al., 2018).

Βιολογικές δράσεις του υδροθείου

Στο καρδιαγγειακό σύστημα το υδροθείο επάγει ενδογενείς μηχανισμούς που προστατεύουν το μυοκάρδιο από την ισχαιμία και τις βλάβες που ακολουθούνται από την επαναιμάτωση (Dongó et al., 2011). Απαλοιφή του ενζύμου CSE σε μύες οδηγεί σε μειωμένη αγγειοχάλαση και υπέρταση ενώ εξωγενής χορήγηση υδροθείου προκαλεί δόσο-εξαρτώμενη χάλαση στα λεία μυϊκά κύτταρα σε διάφορους τύπους αγγείων, όπως η αορτή και η πυλαία φλέβα (Hosoki et al., 1997). Το H₂S εμφανίζει επίσης αντιφλεγμονώδη δράση και προστατεύει τα αγγεία από ενδεχόμενη ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης

(Wang et al., 2009; Zanardo et al., 2006). Όσον αφορά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, το υδρόθειο επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγώντας σε αύξηση αυτής (Papapetropoulos et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η απαλοιφή ή η αποσιώπηση των CSE και MPST προκαλεί αντίθετα αποτελέσματα σε διάφορα συστήματα (Coletta et al., 2015; Papapetropoulos et al., 2009; Peleli et al., 2020; Saha et al., 2016; Szabó and Papapetropoulos, 2011).

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα το υδρόθειο ασκεί αντιφλεγμονώδη και νευροπροστατευτική δράση και η πιθανή χρησιμότητα του σε θεραπευτικές προσεγγίσεις νευροεκφυλιστικών νόσων διερευνάται. Ασθενείς με Alzheimer παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα H_2S ενώ η νευροφλεγμονή που εμφανίζουν περιορίζεται με τη χορήγηση H_2S (Eto et al., 2002; Tang et al., 2008). Σε άτομα με ασθένεια Huntington παρατηρείται υποέκφραση του CSE ενώ η χορήγηση κυστεΐνης οδηγεί σε αναστροφή του φαινοτύπου μυών που αποτελούν ζωικό μοντέλο για τη συγκεκριμένη νόσο (Paul et al., 2014).

Αν και η οξεία έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις υδρόθειου έχει συνδεθεί με ερεθισμό του αναπνευστικού βλεννογόνου, χρόνια έκθεση φαίνεται να έχει ευεργετική δράση στο αναπνευστικό σύστημα, ασκώντας αντιαποπρωτική και αντιφλεγμονώδη δράση στα κύτταρα του αναπνευστικού δέντρου (Faller et al., 2010; Reiffenstein et al., 1992; Wang et al., 2011) Μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των: σοβαρότητα του άσθματος και μειωμένη συγκέντρωση H_2S , υποδεικνύοντας την πιθανή χρησιμότητα των επιπέδων του εκπνεόμενου H_2S για γρήγορη διάγνωση της νόσου (Wang et al., 2011; Wu et al., 2008). Η χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) συνδέεται με αυξημένα επίπεδα H_2S στον ορό (Chen et al., 2005).

Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, το H_2S φαίνεται να επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης, οδηγώντας σε αλλαγές στην έκκριση της ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι υπερέκφραση ή αποσιώπηση

του γονιδίου CSE έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή ή την επαγωγή της έκκρισης ινσουλίνης αντίστοιχα (Yang et al., 2005b). Μειωμένα επίπεδα υδροθείου στην κυκλοφορία διαβητικών ασθενών και πειραματικών μοντέλων υπεργλυκαιμίας και διαβήτη έχουν επίσης αναφερθεί (Brancaleone et al., 2008; Jain et al., 2010; Whiteman et al., 2010).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη θετική δράση του υδροθείου έναντι της φυσιολογικής διαδικασίας της γήρανσης. Τα επίπεδα του CSE και του H₂S βρέθηκαν αυξημένα σε μοντέλα πειραματοζώων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Η αξία μάλιστα της αυξημένης συγκέντρωσης υδροθείου έναντι της γήρανσης επιβεβαιώθηκε σε μοντέλα: ζυμομύκητα, σκουληκιού, μύγας και μυ (Hine et al., 2015). Έχει αποδειχθεί ότι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση S-σουλφυδριλίωση είναι συντηρημένη εξελικτικά, με τη γήρανση να συνδέεται με μειωμένα επίπεδα συνολικών σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών και την παρατεταμένη επιβίωση να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα S-σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών (Zivanovic et al., 2020).

Τέλος οι δράσεις του υδροθείου έχουν διερευνηθεί εκτενώς και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν διπλό ρόλο αυτού ως προ-καρκινικό ή αντι-καρκινικό παράγοντα, ανάλογα με το είδος του όγκου που μελετάται. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα προκύπτουν από μελέτες που εξετάζουν το ρόλο του CBS στον καρκίνο του παχέος εντέρου και των ωοθηκών, τα οποία υποστηρίζουν ότι οι δύο αυτοί τύποι καρκίνου σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα του ενζύμου και η αναστολή αυτού οδηγεί σε περιορισμό της ανάπτυξης του όγκου (Bhattacharyya et al., 2013; Szabo et al., 2013). Χρήση του αναστολέα AOAA με ταυτόχρονη χορήγηση χημειοθεραπείας σε μοντέλα μυών, έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων (Chao et al., 2014).

2. Σκοπός

Η παχυσαρκία θεωρείται μια πολυπαραγοντική και χρόνια νόσος η οποία πλήττει το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού και αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στις Η.Π.Α.. Συνδέεται άμεσα με την εκδήλωση πολλαπλών νοσημάτων μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η αρτηριακή υπέρταση, η καρδιαγγειακή νόσος, το σύνδρομο άπνοιας ύπνου καθώς και οι ορμονοεξαρτώμενοι τύποι καρκίνου (Kahn et al., 2006; Williams et al., 2015). Η κλινική εκτίμηση της παχυσαρκίας στηρίζεται κυρίως στη μέτρηση του δείκτη μάζας σώματος που αντικατοπτρίζει το συνολικό σωματικό λίπος, ωστόσο μελέτες των τελευταίων ετών αποκάλυψαν ότι ο λιπώδης ιστός παρουσιάζει ετερογένεια και κατά συνέπεια ο κίνδυνος για την υγεία σχετίζεται επιπροσθέτως και με τη μορφολογία και τη θέση εναπόθεσης αυτού στο σώμα (Rosen and Spiegelman, 2014; Rutkowski et al., 2015). Η ανάπτυξη φαρμακευτικών προσεγγίσεων έναντι της παχυσαρκίας αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα. Μέχρι σήμερα τέσσερα εγκεκριμένα φάρμακα έχουν αποσυρθεί λόγω σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ αμφισβήτηση υπάρχει όσον αφορά την αποτελεσματικότητα ή/και την ασφάλεια των ορλιστάτη, λορκασερίνη και φαιντερμίνη/τοπιραμάτη που χρησιμοποιούνται σήμερα μακροχρόνια κατά της παχυσαρκίας (Li, 2011; Tchernof and Després, 2013; Williams, 2010). Η ανάπτυξη νέων υποψήφιων φαρμάκων για την απώλεια βάρους αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας. Η αποκάλυψη νέων σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη ρύθμιση των λειτουργιών του λιπώδους ιστού και της ενεργειακής ομοιόστασης των λιποκυττάρων κατά την αύξηση σωματικού βάρους, θα μπορούσε να υποδείξει νέους μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών προσεγγίσεων κατά της παχυσαρκίας.

Το υδρόθειο (H_2S) είναι ένα άχρωμο, εύφλεκτο αέριο που για πάρα πολλές δεκαετίες ήταν ευρέως γνωστό μόνο για την τοξικότητα του. Μελέτες

των τελευταίων ετών απέδειξαν ότι συντίθεται στους ζωντανούς οργανισμούς και ότι τα CBS, CSE και MPST καταλύουν την ενδογενή ενζυμική σύνθεση του (Szabo, 2018). Οι δράσεις του υδροθείου σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού έχουν διερευνηθεί και εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο μελέτης. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι πολλές παθολογικές καταστάσεις χαρακτηρίζονται από μεταβολές στα επίπεδα του H₂S, υποδεικνύοντας ότι ρύθμιση της συγκέντρωσης του θα μπορούσε πιθανόν να έχει θετική δράση στην αντιμετώπιση αυτών (Szabo and Papapetropoulos, 2017). Αρκετά μόρια που δρουν ως δότες υδροθείου ή ως αναστολείς της ενδογενούς παραγωγής του, και επομένως θα μπορούσαν να μεταβάλουν τα επίπεδα του στον οργανισμό, έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα (Szabo and Papapetropoulos, 2017).

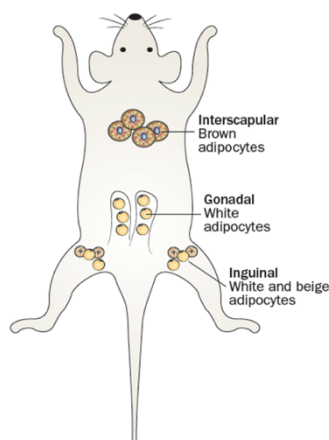
Σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του ενδογενώς παραγομένου και εξωγενώς χορηγούμενου υδροθείου στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού και την παθογένεια της παχυσαρκίας με στόχο την αποκάλυψη νέων σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αυτής καθώς επίσης και πιθανών υποψήφιων στόχων για την αντιμετώπιση της.

3. Μεθοδολογία

3.1 Πειραματόζωα

Όλα τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες που περιγράφονται παρακάτω στεγάστηκαν σε αυτόνομα εξαεριζόμενους κλωβούς σε συνθήκες απουσίας ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free, SPF) και σε πλήρη συμμόρφωση με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Association, FELASA), στην Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA). Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν σταθερές και η εναλλαγή ημέρας και νύχτας ήταν προγραμματισμένη ανά 12 ώρες. Η πρόσβαση στο νερό και την τροφή ήταν ελεύθερη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μύες μεικτής γενεαλογίας, αρσενικού φύλου και διαφόρων ηλικιών. Οι μύες άγριου τύπου (wild type, WT), γενετικού υποβάθρου C57BL/6, παραχωρήθηκαν από τη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του IIBEAA. Τα ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου *Mpst* (*Mpst* knockout, *Mpst*^{-/-}) δωρίστηκαν από τον Καθηγητή Noriyuki Nagahara (Nippon Medical School). Για τις μελέτες που περιγράφονται στο μοντέλο λήψης διαίτας υψηλής περιεκτικότητας λίπους (High Fat Diet, HFD), στα ποντίκια χορηγήθηκε τροφή με σύσταση: 45% λίπος, 20% πρωτεΐνη και 35% υδατάνθρακες (D12451, Research Diets, NJ., USA. ή E15744-34, Ssniff, Germany). Στα ποντίκια αναφοράς χορηγήθηκε διαίτα φυσιολογικής περιεκτικότητας λίπους (Chow Diet, CD) με σύσταση: 10% λίπος, 20% πρωτεΐνη και 70% υδατάνθρακες (D12450K, Research Diets, NJ, USA ή E157452-04, Ssniff, Germany, αντίστοιχα). Σε όλες τις άλλες μελέτες που περιγράφονται οι μύες έλαβαν διαίτα φυσιολογικής περιεκτικότητας λίπους (4RF22, Mucedola, Italy). Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που αφορούν σύγκριση γονοτύπων (WT, *Mpst*^{-/-}) σε HFD πραγματοποιήθηκαν από τη 10^η

έως τη 16^η εβδομάδα χορήγηση της δίαιτας. Οι πειραματικές διαδικασίες που αφορούν χορήγηση CD ή HFD παρουσία δότη υδροθείου πραγματοποιήθηκαν από τη 18^η έως την 20^η εβδομάδα χορήγησης της δίαιτας. Η θυσία των μυών έγινε με ακαριαία διαρραγή του νωτιαίου μυελού, μετά από αναισθησία με σεβοφλουράνιο (4456, AbbVie, Ελλάδα). Τα είδη λίπους που μελετήθηκαν ήταν: υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός (inguinal white adipose tissue, iWAT), σπλαχνικός λευκός λιπώδης ιστός (gonadal white adipose tissue, gWAT) και φαιός λιπώδης ιστός (interscapular brown adipose tissue, iBAT) (Εικόνα 3.1). Για τον προσδιορισμό του βάρους των ιστών χρησιμοποιήθηκαν τα iWAT, gWAT και iBAT της δεξιάς πλευράς του πειραματόζωου. Για τον προσδιορισμό βάρους του ήπατος χρησιμοποιήθηκε ο αριστερός πλευρικός λοβός. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εγκρίθηκαν από την Θεσμική Επιτροπή για την Ηθική των Πειραμάτων σε Ζώα του ΙΙΒΕΑΑ και τη διεύθυνση Κτηνιατρικής, Γενική Διεύθυνση Περιφέρειας Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Αττικής, σύμφωνα με εθνική καταχώρηση (Προεδρικό διάταγμα 56/2013) σε εναρμόνιση με το Ευρωπαϊκό διάταγμα 63/2010.



Εικόνα 3.1: Ανατομική θέση των ιστών iWAT, gWAT και iBAT στο ποντίκι (Bartelt and Heeren, 2014).

3.2 Έμμεση θερμιδομετρία

Η μελέτη μεταβολικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος έμμεσης θερμιδομετρίας: Columbus Instruments Comprehensive Lab Animal Monitoring System, CLAMS (Columbus Instruments, OH, USA) και του υπολογιστικού λογισμικού Oxymax 4.73. Οι μύες αφού στεγάστηκαν σε μεμονωμένα κλουβιά για διάστημα 72 ωρών, ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν στους ειδικά σχεδιασμένους κλωβούς του συστήματος, για 96 ώρες σε συνθήκες: ελεύθερης πρόσβασης σε τροφή, προγραμματισμένης εναλλαγής ημέρας και νύχτας ανά 12 ώρες και θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Οι τιμές της κατανάλωσης οξυγόνου (VO_2), της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα (VCO_2) και του μεταβολικού ρυθμού, προσδιορίστηκαν υπό τις εξής ρυθμίσεις του συστήματος Oxymax: 0,6 L/λεπτό ροή αέρα και 0,5 L/λεπτό ροή δείγματος. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις των VO_2 και VCO_2 , το σύστημα βαθμονομήθηκε με τη χρήση μείγματος αερίων γνωστών συγκεντρώσεων. Η κατανάλωση οξυγόνου, η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, ο μεταβολικός ρυθμός, η πρόσληψη τροφής και η δραστηριότητα αξιολογήθηκαν για περίοδο 72 ωρών. Οι πρώτες 24 ώρες παραμονής των ζώων στο σύστημα CLAMS θεωρήθηκαν περίοδος εγκλιματισμού των πειραματόζωων.

3.3 Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (Glucose Tolerance Test, GTT)

Μετά από νηστεία 16 ωρών οι μύες ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (intraperitoneal i.p.) με διάλυμα γλυκόζης (A16828, Alfa Aesar, Germany) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline (PBS), P04-36500, PAN-Biotech, Germany) και δόση 1g/kg. 0, 15, 30, 60, 90 και 120 λεπτά μετά την ένεση γλυκόζης, συλλέχθηκε αίμα από τις ουρές των μυών και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα σακχάρου με τη χρήση γλυκόμετρου (Contour

XT, Bayer, Germany) και ταινιών μέτρησης γλυκόζης (Contour Next, Bayer, Germany.).

3.4 Δοκιμασία ανοχής στην ινσουλίνη (Insulin Tolerance Test, ITT)

Μετά από νηστεία 5 ωρών οι μύες ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με διάλυμα ινσουλίνης (HI 0319, Humulin NPH, Lilly, Greece.) σε PBS και δόση 0,25 U/kg (CD ομάδα) ή 1U/kg (HFD ομάδα). 0,15, 30, 60, 90 και 120 λεπτά μετά την ένεση ινσουλίνης, συλλέχθηκε αίμα από τις ουρές των μυών και προσδιορίστηκαν επίπεδα σακχάρου με τη χρήση γλυκομέτρου και ταινιών μέτρησης γλυκόζης.

3.5 Δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR))

Μετά από νηστεία 16 ωρών οι μύες αναισθητοποιήθηκαν και ακολούθησε λήψη αίματος από την οπίσθιο-οφθαλμική φλέβα με τη χρήση ηπαρινισμένων τριχοειδών σωλήνων (22-362-566, Fisher Scientific, U.S.A.) Αφού μετρήθηκαν τα επίπεδα σακχάρου (όπως στην παράγραφο 3.3), το αίμα φυγοκεντρήθηκε (8.000rpm, 4°C, 10 λεπτά) και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων ινσουλίνης στον ορό. Οι τιμές ινσουλίνης προέκυψαν με ανοσοπροσοφητική ενζυμική μέθοδο στερεάς φάσης (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA, 10-1247-01, Mercodia, Sweden), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ο υπολογισμός των επιπέδων του δείκτη HOMA-IR υπολογίστηκε με το μαθηματικό μοντέλο: $HOMA-IR = \frac{\text{επίπεδα ινσουλίνης νηστείας (}\mu\text{U/mL)}}{\text{επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (mg/dL)}} \times 405$ (Matthews et al., 1985b).

3.6 Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών προ-λιποκυττάρων

Ιστοί iWAT μυών 10 εβδομάδων, απομονώθηκαν, τεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα πέψης (digestion buffer) με σύσταση: κολλαγενάση 10mg/ml (collagenase D, 11088882001, Roche, Switzerland), dispasell 1X (04942078001, Roche, Switzerland), 10mM χλωριούχο ασβέστιο (calcium chloride (CaCl₂), 223506, Sigma-Aldrich, MO, USA) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin (P/S), LM-A4118, BioSera, France) σε PBS, στους 37°C για 45 λεπτά. Τα ώριμα λιποκύτταρα απορρίφθηκαν με τη χρήση φίλτρου κυττάρων (cell strainer) με διάμετρο πλέγματος 100μm και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (500g, 10 λεπτά) μετά την προσθήκη τριπλάσιου όγκου θρεπτικού μέσου DMEM/F-12 (10565018, Gibco, MA, USA) εμπλουτισμένου με 10% ορό (fetal bovine serum (FBS), 10270-106, Gibco, MA, USA) και 1% P/S (complete DMEM/F-12, cDMEM/F-12). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα που αποτελούνταν από το αγγειακό κλάσμα στρώματος (stromal vascular fraction, SVF) πλύθηκε και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκε σε cDMEM/F-12. Τυχόν εναπομείναντα λιποκύτταρα απορρίφθηκαν με τη χρήση φίλτρου κυττάρων διαμέτρου πλέγματος 40μm. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (500g, 10 λεπτά) και το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε cDMEM/F-12. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε φλάσκες και στη συνέχεια σε κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂, 21% O₂). Η αλλαγή θρεπτικού μέσου γίνονταν κάθε 48 ώρες και η ανακαλλιέργεια όταν η πυκνότητα των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας έφτανε το 70% με τη χρήση θρυψίνης (LM-T1705/100, BioSera, France).

3.7 Διαφοροποίηση προ-λιποκυττάρων

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα 12 ή 24 πηγαδιών και όταν παρατηρήθηκε πυκνότητα 100% (ημέρα διαφοροποίησης 0) το θρεπτικό μέσο

αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης με σύσταση: 850nM ινσουλίνη (I5500, Sigma-Aldrich, MO, USA), 2μM δεξαμεθαζόνη (D4902, Sigma-Aldrich, MO, USA), 0,5mM 3-ισοβούτυλο-10-μεθυλοξανθίνη (3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), i5879, Sigma-Aldrich, MO, USA) και 1μM ροσιγλιταζόνη (R2408, Sigma-Aldrich, MO, USA) σε cDMEM/F-12. Την 2^η ημέρα διαφοροποίησης το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μέσο που περιείχε 850nM ινσουλίνη και 1μM ροσιγλιταζόνη και την 4^η ημέρα από θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο 850nM ινσουλίνη. Η αλλαγή θρεπτικού μέσου συνέχισε να πραγματοποιείται κάθε 48 ώρες με cDMEM/F-12 εμπλουτισμένο με ινσουλίνη. Την 7^η ημέρα διαφοροποίησης τα προλιποκύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί πλέον σε λευκά λιποκύτταρα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πειραματικές διαδικασίες. Όλες οι μελέτες που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν την 7^η-10^η ημέρα. Το συμπλήρωμα λιπαρών οξέων (fatty acids supplement (FA), F7050, Sigma-Aldrich, MO, USA) προστέθηκε στα κύτταρα, στις μελέτες που αναφέρεται, τις τελευταίες 23-24 ώρες του πειράματος και σε αναλογία 0,5X.

3.8 Καλλιέργεια και διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς 3T3-L1

Η καλλιέργεια των κυττάρων 3T3-L1 (ATCC, VA, USA) έγινε σε θρεπτικό μέσο DMEM (P04-03590, PAN-Biotech, Germany) εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% P/S (complete DMEM, cDMEM) και συνθήκες επώασης 37°C, 5% CO₂, 21% O₂. Η αλλαγή θρεπτικού μέσου γίνονταν κάθε 72 ώρες και η ανακαλλιέργεια όταν η πυκνότητα των κυττάρων στην επιφάνεια του πιάτου έφτανε το 70%, με τη χρήση θρυψίνης. Για τη διαδικασία της διαφοροποίησης τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα 12 πηγαδιών και όταν παρατηρήθηκε πυκνότητα 100% (ημέρα διαφοροποίησης 0) το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης με σύσταση: 10μg/ml ινσουλίνη, 1μM δεξαμεθαζόνη και 0,5mM IBMX σε cDMEM. Την 3^η ημέρα

διαφοροποίησης το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο 10μg/ml ινσουλίνη και η αλλαγή του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου συνέχισε να πραγματοποιείται κάθε 72 ώρες. Την 7^η ημέρα τα 3T3-L1 έχουν διαφοροποιηθεί πλέον σε λευκά λιποκύτταρα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πειραματικές διαδικασίες. Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω και αφορά τα 3T3-L1 πραγματοποιήθηκε την 7^η -9^η ημέρα.

3.9 Φαρμακολογική αύξηση των επιπέδων του H₂S

Για την αύξηση των επιπέδων του υδροθείου χρησιμοποιήθηκαν οι φαρμακολογικοί δότες αυτού: SG1002 (Sulfagenix, AZ, USA), και τρισουλφίδιο του νατρίου (sodium trisulfide (Na₂S₃), SB03-10, Dojindo, Japan). Το SG1002 τοποθετήθηκε στις τροφές CD (E157452-04, Ssniff, Germany) και HFD (E15744-34, Ssniff, Germany) από την εταιρεία παραγωγής και χορηγήθηκε στα ποντίκια σε δόση 40mg/kg/ημέρα (40mg SG1002 ανά kg σωματικού βάρους ποντικού) για διάστημα 10 εβδομάδων. Το Na₂S₃ διαλύθηκε σε PBS και χορηγήθηκε στα ποντίκια σε δόση 5mg/kg/ημέρα (5mg Na₂S₃ ανά kg σωματικού βάρους ποντικού) με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (intraperitoneal injection, i.p.) για διάστημα 7 εβδομάδων. Αντίστοιχη ποσότητα PBS/ημέρα χορηγήθηκε i.p. στα ποντίκια της ομάδας αναφοράς. Στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα το Na₂S₃ προστέθηκε σε συγκέντρωση 100μM (σε PBS) για διάστημα 24 ωρών. Ως ομάδα αναφοράς (vehicle) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία προστέθηκε ίδια ποσότητα PBS για το ίδιο χρονικό διάστημα.

3.10 Φαρμακολογική αναστολή του MPST

Για την επίτευξη φαρμακολογικής αναστολής του ενζύμου MPST στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα προστέθηκαν 50μM IMST-3 (Molport, Latvia) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide (DMSO), A3672, PanReac AppliChem, Germany) για διάστημα 48 ωρών. Ομάδα αναφοράς: 1% DMSO, 48ώρες.

3.11 Φαρμακολογική αναστολή της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω του TIM/TOM complex

Ως φαρμακολογικοί αναστολείς της εισαγωγής πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιήθηκαν τα Mitobock 12 (M12) (522-51-0, Focus Biomolecules, PA, USA) και MitoBloCK 6 (M6) (505759, Merk, Germany). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 4μM και 5μM (24ώρες) αντίστοιχα. Οι ουσίες διαλύθηκαν σε DMSO και ως ομάδα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το 0,4% (για τις πειραματικές διαδικασίες με τη χρήση M12) και 0,1% (για τις πειραματικές διαδικασίες με τη χρήση M6) DMSO για 24ώρες.

3.12 Φαρμακολογική επαγωγή του HIF1α

Στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα προστέθηκε ο αγωνιστής του HIF1α διμεθυλοξαγλυκίνη (Dimethyloxallyl Glycine (DMOG), 71210, Cayman Chemical, Michigan, USA) σε συγκέντρωση 1mM σε DMSO για διάστημα 48 ωρών. Ομάδα αναφοράς: 0,1% DMSO, 48ώρες.

3.13 Δημιουργία συνθηκών υποξίας

Οι συνθήκες υποξίας επιτεύχθηκαν στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα είτε με έκθεση αυτών σε 1% O₂ για διάστημα 48 ωρών, είτε φαρμακολογικά, με την προσθήκη διαλύματος χλωριούχου κοβάλτιου (cobalt chloride (CoCl₂), 131257, PanReac AppliChem, Germany) σε PBS (300μM, 24 ώρες). Ίδια ποσότητα PBS προστέθηκε στην ομάδα αναφοράς.

3.14 Αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων *Tomm7*, *Tomm40l*, *Timm50* και *Timm17b* με παροδική διαμόλυνση

Η αποσιώπηση των *Tomm7*, *Tomm40l*, *Timm50* και *Timm17b* στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση siRNA ειδικών για το γονίδιο στόχο (s124785, s82717, s83419 και s75153, Invitrogen, CA, USA) και λιποφεκταμίνης (lipofectamine™ RNAimax transfection reagent, 13778150, Invitrogen, CA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Στα κύτταρα προστέθηκαν 12,5 pmol siRNA/πηγάδι (πίατο 24 πηγαδιών) και διατηρήθηκε στο θρεπτικό για 48 ώρες μετά την αρχική διαμόλυνση. Η ομάδα αναφοράς διαμολύνθηκε με μη ειδικό siRNA (Silencer™ negative control no. 1 siRNA, AM4611, Invitrogen, CA, USA).

3.15 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών MPST και HIF1α με παροδική διαμόλυνση

Η υπερέκφραση των MPST και HIF1α στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των πλασμιδιακών φορέων: V5-MPST-pCDNA 3.1 (προϋπήρχε στο εργαστήριο) και HA-HIF1α P402A/P564A-pcDNA3 (18955, Addgene, USA) αντίστοιχα και του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης (JetPrime 114-15, Polyplus transfection, NY,

USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Η ποσότητα πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1μg/πηγάδι (πίατο 12 πηγαδίων) και διατηρήθηκε στο θρεπτικό για 48 ώρες μετά την αρχική διαμόλυνση. Στην ομάδα αναφοράς προστέθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA 3.1.

3.16 Χρώση Αιματοξυλίνης & Ηωσίνης (Hematoxylin & Eosin, H&E)

Οι ιστοί απομονώθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε PBS (paraformaldehyde (PFA), P6148, Sigma-Aldrich, MO, USA) για 16 ώρες. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε 70% αιθανόλη και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Οι τομές παραφίνης πάχους 5μM που προέκυψαν με τη χρήση μικροτόμου (RM2265, Leica Biosystems, Germany), αποπαραφινοποιήθηκαν (60 °C για 10 λεπτά, ξυλόλη για 10 λεπτά (X2), 100% αιθανόλη για 3 λεπτά (X2), 95% αιθανόλη για 2 λεπτά, 75% αιθανόλη για 2 λεπτά, 50% αιθανόλη για 2 λεπτά και νερό βρύσης για 5 λεπτά) και ακολούθησε χρώση με αιματοξυλίνη (95057-844, VWR, PSU, USA) (1 λεπτό), πλύση με νερό (X3), χρώση με ηωσίνη (95057-848, VWR, PSU, USA) (1 λεπτό), και πλύση με νερό (X3). Οι τομές αφυδατώθηκαν (80% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, 90% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, 100% αιθανόλη για 1 λεπτό (X2)), τοποθετήθηκαν σε ξυλόλη (10 λεπτά (X2)) και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και συγκολλητικό υλικό (DPX 100504-938, VWR, PSU, USA). Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το φωτονικό μικροσκόπιο LEICA DMLS2 (Leica Biosystems, Germany) και για τις μετρήσεις της επιφάνειας των λιποκυτάτταρων το λογισμικό imageJ (NIH,MD, USA).

3.17 Χρώση Oil Red O

Τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα μονιμοποιήθηκαν για διάστημα 2 ωρών σε 10% διάλυμα φορμαλίνης (HT501128, Sigma-Aldrich, MO, USA), ξεπλύθηκαν με 60% ισοπροπανόλη και χρωματίστηκαν με διάλυμα 0,3% Oil Red O (Sigma-Aldrich, MO, USA) σε 60% ισοπροπανόλη (30 λεπτά). Ακολούθως ξεπλύθηκαν με νερό (3X) και παρατηρήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο. Η εκτίμηση των επιπέδων της συσσώρευσης λιπιδίων πραγματοποιήθηκε επίσης με τη μέτρηση της απορρόφησης του OilRedO (O0625, Sigma-Aldrich, MO, USA) στα 500nm, αφού τα κύτταρα αποχρωματίστηκαν με την προσθήκη 100% ισοπροπανόλης.

Όσον αφορά τη χρώση τομών ήπατος, οι ιστοί απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε OCT (optimal cutting temperature compound, Tissue-Tek, 4583, Sakura Finetek, Japan) στους -80°C. Οι τομές που προέκυψαν με τη χρήση κρουστούμου μονιμοποιήθηκαν σε 10% διάλυμα φορμαλίνης (10 λεπτά), ξεπλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκαν σε 60% ισοπροπανόλη (5 λεπτά). Ακολούθησε χρώση με διάλυμα 0,3% Oil Red O σε 60% ισοπροπανόλη (10 λεπτά). Οι τομές ξεπλύθηκαν με 60% ισοπροπανόλη, PBS, χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη (1λεπτό) και τοποθετήθηκαν σε νερό. Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε φωτονικό μικροσκόπιο.

3.18 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative (q-RT) polymerase chain reaction (PCR))

Ολικό RNA απομονώθηκε από ιστούς λίπους και διαφοροποιημένα λιποκύτταρα με τη χρήση φαινόλης (TRIzol™ ,15596026, Invitrogen, CA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Στο RNA που προέκυψε προστέθηκε DNAάση, (DNAase I, AM2222, Invitrogen, CA, USA) και τα

δείγματα τοποθετήθηκαν στους 37°C (30 λεπτά) προκειμένου να διασπαστούν τυχόν εναπομείναντα κομμάτια γονιδιωματικού DNA. Η DNAάση απενεργοποιήθηκε στους 75°C (10 λεπτά) και 500ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία cDNA με την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (PrimeScript RT Reagent Kit, RR037A, Japan). Οι αντιδράσεις q-RT PCR πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη του αντιδραστήριου KAPA SYBR Fast Master Mix (KK4618, Kapa Biosystems, Germany) και εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για τα γονίδια στόχους (Πίνακας 3.1), ακολουθώντας της οδηγίες του κατασκευαστή. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

	Αλληλουχία (5'--->3')
<i>β-Actin F</i>	CCCAGGCATTGCTGACAGG
<i>β-Actin R</i>	TGGAAGGTGGACAGTGAGGC
<i>18s F</i>	GTAACCCGTTGAACCCCATT
<i>18s R</i>	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Tomm6 F</i>	CGACTTCCGGAGGAAC TTGAT
<i>Tomm6 R</i>	CGGGGAAACACAGGAGA ACT
<i>Tomm7 F</i>	ACCGTCGGTTTTAAGCCTACTT
<i>Tomm7 R</i>	CCACTCTGCCACAGAATCGT
<i>Tomm40l F</i>	TTCCAAGATGGCGCCTACG
<i>Tomm40l R</i>	GCTAGACCATCTCAGACCATCC
<i>Timm17b F</i>	CAAAAGAGAAACGCTGGGCA
<i>Timm17b R</i>	GTCGAATTCCAACAGGGGCA
<i>Timm50 F</i>	CTCGGCGGCTCTGTTCTC
<i>Timm50 R</i>	CCCACGGTTGGCAATTT CAG
<i>mtDNA F</i>	ATGACCCCAATACGCAA AAT
<i>mtDNA R</i>	CGAAGTTTCATCATGC GGAG
<i>nuDNA F</i>	CCCGCAGCCGAGCCGC GGGG
<i>nuDNA R</i>	TCTTCCA ACTGCCTCTCTGGCCCTCCG

Πίνακας 3.1: Αλληλουχίες εκκινητών qRT-PCR.

3.19 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση RNA αλληλούχισης (RNA sequencing)

Τα πειράματα RNA αλληλούχισης που παρουσιάζονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (IIBEAA). Για την

προετοιμασία των βιβλιοθηκών για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν 500ng ολικού RNA που απομονώθηκαν από ιστούς iWAT σύμφωνα με την παράγραφο 3.18. Τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια και μονοπάτια μεταξύ των υπό σύγκριση γονοτύπων προέκυψαν μετά από βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τα εξής λογισμικά και αλγορίθμους: SAMtools v.1.9 (<http://www.htslib.org/>), HTSeq v.0.11.1 (<https://htseq.readthedocs.io/en/master/>), DESeq2 v.1.24.0 (Bioconductor R), gage v.2.34.0 (Bioconductor R) και clusterProfiler v.3.12.0 (Bioconductor R).

3.20 Προσδιορισμός αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA (mtDNA) copy number)

Ολικό DNA απομονώθηκε από ιστούς λίπους με τη χρήση του NucleoSpin Tissue Mini kit for DNA from cells and tissue (740952, Macherey-Nagel, PA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ως δείκτης για τα επίπεδα του mtDNA χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου *mt-cyb*. Για την ομαλοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα γονιδίου-δείκτη του πυρηνικού DNA (nuclear DNA, nucDNA). Ο προσδιορισμός των επιπέδων μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της qRT-PCR όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.18. Οι αλληλουχίες των ειδικά σχεδιασμένων, για να στοχεύουν στα προαναφερόμενα γονίδια, εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

3.21 Απομόνωση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικής πρωτεΐνης ιστοί λίπους ή διαφοροποιημένα λιποκύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα λύσης (RIPA buffer: 150mM

χλωριούχο νάτριο (sodium chloride (NaCl), 7760, Calbiochem, Germany), 1% NP-40 (74385, Sigma-Aldrich, MO, USA), 0,5% sodium deoxycholate (A1531,0025, AppliChem, Germany), 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS, A2572, PanReac AppliChem, Germany), 50mM Tris hydrochloride (Tris-HCL), pH=6,8 (T1503, Sigma-Aldrich, MO, USA)), εμπλουτισμένο με μείγμα αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitors (PI), 5892970001, Roche, Switzerland) και φωσφατασών (phosphatase inhibitors (PhoI), 4906837001, Roche, Switzerland). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm, 15 λεπτά, 4°C) και η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο υπολογίστηκε με τη μέτρηση απορρόφησης στα 280nm (NanoDrop™ 200/c, Thermo Fischer Scientific, MA, USA).

Για την απομόνωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ιστοί λίπους ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων (1mM (Ethylenedinitrilo)tetraacetic Acid, Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), 4005, Merk, Germany), 0,32M sucrose (573113, Sigma-Aldrich, MO, USA), 10mM Tris-HCL pH=7,4 σε νερό) εμπλουτισμένο με μείγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (4.500 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε ξανά (13.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Το ίζημα που προέκυψε, αποτελούνταν από τα μιτοχόνδρια του ιστού ενώ το υπερκείμενο από τις πρωτεΐνες του κυτοσολίου. Οι κυτοσολικές πρωτεΐνες συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Το ίζημα ξεπλύθηκε (X3) με το διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες λύθηκαν στη συνέχεια με την προσθήκη RIPA buffer που περιείχε PI και PhoI. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση (13.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C) και συλλογή του υπερκείμενου. Η ποσοτική μέτρηση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με τη μέτρηση απορρόφησης στα 280nm.

Για την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών ιστοί λίπους ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα απομόνωσης πυρήνων (50mM Hepes pH=7,9

(A3724,0250 AppliChem, Germany), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,25% Triton X-100 (T9284 Sigma-Aldrich, MO, USA)) εμπλουτισμένο με μείγμα αναστολέων πρωτεασών (PI) και φωσφατασών (Phol). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (4.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C) και το ίζημα των πυρήνων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα πλύσης (10mM Tris-HCl pH=8,1, 200mM NaCl, 1mM EDTA pH=8, 0,5mM EGTA pH=8 (A0878,0022, AppliChem, Germany)), ακολούθησε φυγοκέντρωση (4.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C) και απόρριψη του υπερκείμενου και η διαδικασία επαναλήφθηκε για τρεις ακόμα φορές. Οι πυρηνικές μεμβράνες λύθηκαν με την προσθήκη RIPA buffer και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm, 10 λεπτά, 4°C) προκειμένου να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm.

3.22 Σήμανση σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών (Dimedone Switch Method)

Ιστοί υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού ομογενοποιήθηκαν σε Hens Buffer (50mM Hepes, 1mM EDTA, 2% SDS, 0,1mM neucoprine (208745, Cayman, Chemical, Michigan, USA)) εμπλουτισμένο με 1% PI και 20mM 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBF-CL, 10199-89-0, Merk, Germany) προκειμένου να σημανθούν οι σουλφυδριλιωμένες κυστεΐνες των πρωτεϊνών. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm, 15 λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο επωάστηκε στους 37°C για 60 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση μεθανόλης και χλωροφόρμιου σε αναλογία: δείγμα (4)/ μεθανόλη (4)/ χλωροφόρμιο (1), ανάδευση με τη χρήση vortex και φυγοκέντρωση (13.000 rpm, 15 λεπτά, 4°C). Στο ίζημα που προέκυψε από κάθε δείγμα προστέθηκαν ακολούθως νερό (4)/ μεθανόλη (4)/ χλωροφόρμιο (1), τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγονεντρήθηκαν (13.000 rpm, 15 λεπτά, 4°C). Το ίζημα ξεπλύθηκε με μεθανόλη (2X) και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε

διάλυμα: 50mM Hepes, 1% SDS, 1% PI και 50μM cysteine sulfenic acid probe, DCP-Bio1 (NS1266, Merk, Germany) προκειμένου να επιτευχθεί ή σήμανση των σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών με βιοτίνη. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60 λεπτά και επανάληψη των πλύσεων: δείγμα (4)/ μεθανόλη (4)/ χλωροφόρμιο (1), νερό (4)/ μεθανόλη (4)/ χλωροφόρμιο (1) και μεθανόλη (2X) όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 50mM Hepes, 1% SDS, 1% PI και τα δείγματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση Western Blot. Η ανίχνευση των σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με τη χρήση αντισώματος ειδικού για τη βιοτίνη.

3.23 Ανάλυση πρωτεϊνικών επιπέδων με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Στα δείγματα πρωτεϊνών προστέθηκε διάλυμα με σύσταση: 4%SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη (M6250 Sigma-Aldrich, MO, USA), 20% γλυκερόλη (G1345, Melford), 0,004% μπλε της βρωμοφαινόλης (A2331,0025, AppliChem, Germany) και 0,125M Tris-HCL και ακολούθησε θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (1610156. Bio-Rad, CA, USA) παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS (SDS-Precast Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)) και ακολούθως οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδένιου (polyvinylidene difluorid (PVDF)). Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% γάλα (A0830, PanReac AppliChem, Germany) (1ώρα, RT) και στη συνέχεια σε πρωτογενές, ειδικό για τον επιθυμητό επίτοπο, αντίσωμα. Ακολούθησε επώαση των μεμβρανών σε δευτερογενές αντίσωμα (2 ώρες, RT) και εμφάνιση του ανοσοαποτυπώματος της πρωτεΐνης στη μεμβράνη με τη χρήση του αντιδραστηρίου Immobilon Classico Western HRP substrate

(WBLUC0500, Merk, Germany) και έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ (RX1318, FujiFilm, Japan). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: anti- β -Actin (ab8227, Abcam, MA, USA), anti- β -Tubulin (ab15568, Abcam, MA, USA), anti-MTCO1 (ab14705, Abcam, MA, USA), anti-CBS (14787-1-AP, Proteintech, United Kindom), anti-CSE (12217-1-AP, Proteintech, United Kindom ή ab151769 Abcam, MA, USA), anti-MPST (HPA001240, Atlas Antibodies, Sweden), anti-Citrate Synthase (ab96600, Abcam, MA, USA), anti-SOD2 (13141, Cell Signaling, MA, USA), anti-TOM40L (ab236421, Abcam, MA, USA), anti-TIM50 (ab109436, Abcam, MA, USA), anti-HIF1a (sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), anti-H3 (ab176842, Abcam, MA, USA), anti-V5 (AB3792, Merk Germany), anti-HA (3724, Cell Signaling, MA, USA) και anti-Biotin (HRP Conjugate) (5571, Cell Signaling, MA, USA). Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: anti-rabbit (AP132P, Merk, Germany) και anti-mouse (7076, Cell Signaling, MA, USA). Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό imageJ (NIH, MD, USA).

3.24 Μέτρηση των επιπέδων H₂S με τη μέθοδο μπλε του μεθυλενίου (Methylene Blue Assay).

Ιστοί λίπους ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (K_2HPO_4 , P3786, Sigma-Aldrich, MO, USA και KH_2PO_4 , 60353, Sigma-Aldrich, MO, USA), pH=7.4. Στα δείγματα προστέθηκαν 8 μ M φωσφορική πυριδοξάλη (P9255, Sigma-Aldrich, MO, USA), 0,4mM L-κυστεΐνη (168149, Sigma-Aldrich, MO, USA), 0,08mM ομοκυστεΐνη (H4628, Sigma-Aldrich, MO, USA) και 8 μ M 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό (90374, Sigma-Aldrich, MO, USA) και τοποθετήθηκαν στου 37°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 1% Zinc Acetate (ZnAc, Z0625, Sigma-Aldrich, MO, USA) για δέσμευση του υδροθείου, και 10%, τριχλωροξικού οξέος (TCA, T4885,

Sigma-Aldrich, MO, USA) για την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 20mM N,N-dimethyl-p-Phenylenediamine sulphate (DPD, 186384-25, Sigma-Aldrich, MO, USA) σε 7,2M υδροχλωρικό (HCL) και 30mM χλωριούχου σιδήρου (FeCl_3 , 31232, Sigma-Aldrich, MO, USA) σε 1,2M HCL. Τα δείγματα αφέθηκαν για 15 λεπτά στο σκοτάδι προκειμένου να σχηματιστεί το μπλε του μεθυλενίου και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 655nm. Τα επίπεδα του H_2S υπολογίστηκαν έναντι μιας πρότυπης καμπύλης συγκεντρώσεων 0-250 μM του δότη υδροθείου θειούχο νάτριο (sodium sulfide (Na_2S , 208043, Sigma-Aldrich, MO, USA).

3.25 Προσδιορισμός επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου

Ιστοί λευκού υποδόριου λιπώδους λίπους ομογενοποιήθηκαν σε PBS εμπλουτισμένο με PI και $\text{P}hoI$ και φυγοκεντρήθηκαν (2.000g, 10 λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και η ποσότητα πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέτρηση απορρόφησης στα 280nm. Σε 10 μg πρωτεΐνης προστέθηκαν 100 μM NADPH (N5130, Sigma-Aldrich, MO, USA), 100 μM AmpliFlue Red (90101, Sigma-Aldrich, MO, USA) 1U/ml Horse Radish Peroxidase (P8250, Sigma-Aldrich, MO, USA) και ο φθορισμός μετρήθηκε στους 37°C σύμφωνα με τις ρυθμίσεις: excitation=535nm, emission= 595 nm, gain= 50.

3.26 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) ακολουθούμενη από αλληλούχιση (Sequencing, Seq)

Οι ιστοί λίπους αφού ομογενοποιήθηκαν σε PBS, μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη 1% φορμαλδεΐδης (A0877,0250, AppliChem, Germany) για 15 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη γλυκίνης (S0046, Sigma-Aldrich, MO, USA), σε συγκέντρωση 0,125M και φυγοκέντρωση (4.000 rpm, 7 λεπτά, 4°C) των

δειγμάτων. Το ίζημα κυττάρων που προέκυψε ξεπλύθηκε με PBS (1X) και οι κυτταρικές μεμβράνες λύθηκαν μετά από επώαση (15 λεπτά, 4°C) με διάλυμα απομόνωσης πυρήνων (παράγραφος 3.21). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα πυρήνων που προέκυψε, αφού ξεπλύθηκε (3X) με διάλυμα πλύσης (παράγραφος 3.21), επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα (shearing buffer) με σύσταση: 0,1% SDS, 1mM EDTA pH=8, 10mM Tris-HCl pH=8,1. Μετά από επώαση μίας ώρας στους 4°C, η χρωματίνη κατακερματίστηκε με τη χρήση υπερήχων (Covaris S220, Covarism Inc, MA, USA) στις ακόλουθες συνθήκες: χρόνος: 12 λεπτά, peak power: 75, duty factor: 25, cycles per burst: 200. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000, 30 λεπτά, 4°C) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε. Ακολούθως προστέθηκαν Triton X-100 και NaCl σε τελικές συγκεντρώσεις 1% and 150mM, αντίστοιχα, και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση.

10μg αντισώματος (anti-HIF1α, ab2185, abcam, MA, USA) προστέθηκαν σε 15μg χρωματίνης και τα δείγματα επωάστηκαν για 16 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων πρωτεΐνης G (Dynabeads™ protein G, 10003D, Invitrogen, CA, USA) και επώαση 4 ωρών στους 4°C με περιστροφή. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν με RIPA buffer (3X) και διάλυμα TE/10 (10mM Tris HCL, pH=8, 0,1mM EDTA) και η χρωματίνη εκλούσθηκε με την προσθήκη διαλύματος : 0,5% SDS, 20mM HEPES pH=7,9, 1mM EDTA και επώαση στους 65°C για 30 λεπτά. Στα δείγματα προστέθηκαν 20mg RNAάση (A3832,0250 AppliChem, Germany) και τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησε προσθήκη 30mg πρωτεϊνάσηςK (031158360, Roche, Switzerland) και επώαση για 30 λεπτά στους 50°C. Τέλος στα δείγματα προστέθηκε 0,8M NaCl και τοποθετήθηκαν για 16 ώρες στους 65°C. Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση beads (NucleoMag™ NGS Beads, 15889167, Macherey-Nagel, PA, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ποσότητα χρωματίνης που δεν επωάστηκε με το

αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς για την αλληλούχιση (input DNA).

Η προετοιμασία των βιβλιοθηκών και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ίδρυμα Γονιδιωματικής. Η βιοπληροφορική ανάλυση από την οποία προέκυψαν τα γονίδια στόχοι που παρουσιάζονται πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Ακαδημαϊκού Δημήτρη Θάνου.

3.27 Μεταβολομική ανάλυση

Ιστοί υποδόριου λευκού λίπους WT και *Mpst*^{-/-} μυών απομονώθηκαν και στάλθηκαν στο Institute for Vascular Signalling του Vascular Research Centre (Frankfurt, Germany). Η προετοιμασία των δειγμάτων, η πειραματική ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Καθηγήτριας Ingrid Fleming.

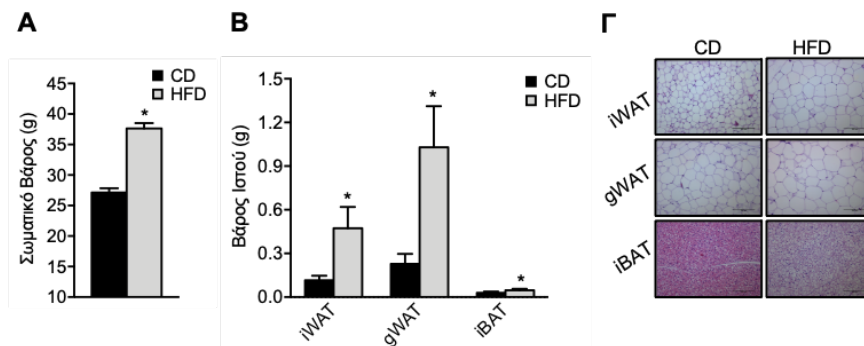
3.28 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM). Στις συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων, η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με τη χρήση του Student's t-test με δίπλευρο κριτήριο ελέγχου (two-tailed). Πολλαπλές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του one way ANOVA. Τιμές με p value (p)<0,05 θεωρήθηκαν ως σημαντικές.

4. Αποτελέσματα

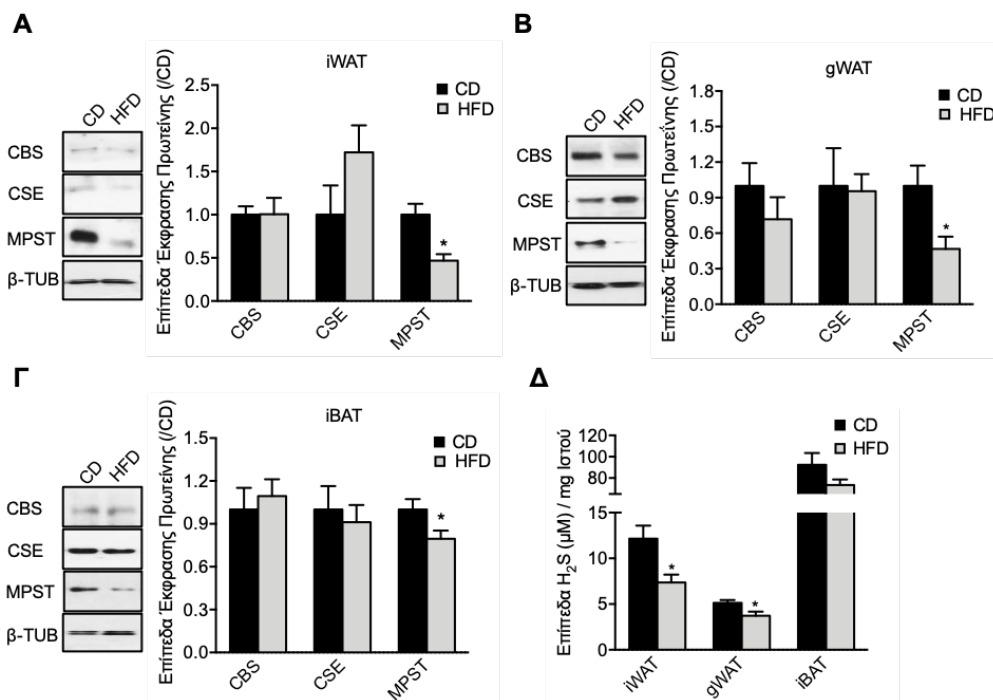
4.1 Η παχυσαρκία συνδέεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου MPST στον λιπώδη ιστό

Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ του ενδογενώς παραγόμενου υδροθείου και της αύξησης σωματικού βάρους, εξετάστηκαν αρχικά τα επίπεδα των CBS, CSE και MPST στον λιπώδη ιστό παχύσαρκων ποντικών. Μύες άγριου τύπου χωρίστηκαν σε δύο ομάδες σύμφωνα με τη διαίτα που έλαβαν: CD ή HFD. Η χορήγηση της διαίτας διήρκησε 14-16 εβδομάδες και ακολούθως οι δύο κύριες αποθήκες λίπους που συναντώνται στα θηλαστικά, iWAT και gWAT, καθώς επίσης και η κύρια αποθήκη καφέ λιπώδους ιστού iBAT, απομονώθηκαν. Όπως ήταν αναμενόμενο η χορήγηση HFD οδήγησε σε αύξηση του σωματικού βάρους και του βάρους των ιστών λίπους (Εικόνα 4.1 A, B). Η δημιουργία παχυσαρκίας επιβεβαιώθηκε επιπλέον με ιστολογικές μελέτες, τα αποτελέσματα των οποίων απέδειξαν την ύπαρξη αυξημένης συσσώρευσης λιπιδίων και στους τρεις υπό μελέτη ιστούς μετά τη λήψη της υψηλής σε περιεκτικότητα λίπους, διαίτας. (Εικόνα 4.1 Γ).



Εικόνα 4.1: Σωματικό βάρος, βάρος και μορφολογία λιπώδους ιστού WT μυών μετά τη λήψη CD ή HFD. Α. Σωματικό βάρος, **Β.** Βάρος των ιστών iWAT, gWAT, iBAT, **Γ.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές iWAT, gWAT, iBAT με χρώση H&E. Μπάρα κλίμακας: 300μM. (Α, Β) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (Α-Β) $N=8$ και (Γ) $N=4$ ποντίκια/ομάδα.

Τα επίπεδα των ενζύμων ελέγχθηκαν ακολούθως, ως προς την πρωτεϊνική έκφραση ενώ παράλληλα εξετάστηκαν και τα επίπεδα υδροθείου στον λιπώδη ιστό των υπό μελέτη μυών. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης των CBS και CSE στους ιστούς iWAT, gWAT, iBAT μεταξύ των φυσιολογικού βάρους και παχύσαρκων μυών. Ωστόσο, η έκφραση του MPST ήταν μειωμένη μετά τη λήψη HFD και στους τρεις τύπους λιπώδους ιστού που εξετάστηκαν (Εικόνα 4.2 Α-Γ). Σε συμφωνία με τη μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου MPST, τα επίπεδα υδροθείου στις αποθήκες λευκού λίπους των παχύσαρκων μυών βρέθηκαν επίσης ελαττωμένα (Εικόνα 4.2 Δ).



Εικόνα 4.2: Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης των CBS, CSE και MPST σε ιστούς λίπους παχύσαρκων ποντικών. Επίπεδα των πρωτεϊνών CBS, CSE, MPST τα οποία προέκυψαν από ανάλυση western blot στους ιστούς **A.** iWAT, **B.** gWAT, **Γ.** iBAT, WT ποντικών μετά από λήψη CD ή HFD τροφής για 14-16 εβδομάδες. Η έκφραση παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα που έλαβε CD. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-τουμπουλίνης. **Δ.** Επίπεδα υδροθείου στις αποθήκες λίπους μυών μετά τη χορήγηση CD η HFD. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (A-Γ) N=7-10 και (Δ) N=6-7 ποντίκια/ομάδα.

4.2 Η απαλοιφή του *Mpst* οδηγεί σε αύξηση σωματικού βάρους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας ή τη γήρανση

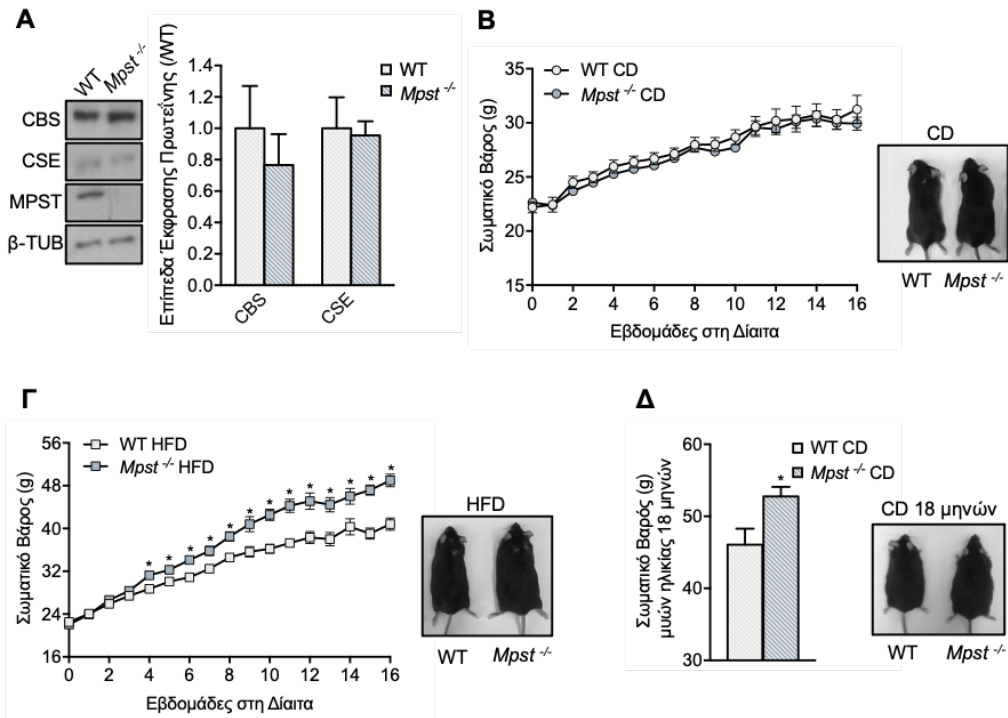
Έχοντας αποδείξει ότι η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα του MPST στο λιπώδη ιστό, ο ρόλος του ενζύμου διερευνήθηκε ακολούθως στην παθογένεια της παχυσαρκίας. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μύες με γενετική τροποποίηση που οδηγεί σε απαλοιφή του γονιδίου *Mpst*. Η επιτυχημένη απαλοιφή του *Mpst* στον λιπώδη ιστό επιβεβαιώθηκε με έλεγχο των πρωτεϊνικών του επιπέδων. Παράλληλα εξετάστηκε το ενδεχόμενο η έλλειψη του *Mpst* να οδηγεί σε αλλαγή έκφρασης των CBS και CSE. Στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των *Mpst*^{-/-} μυών δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του MPST και δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα των CBS και CSE συγκριτικά με τα WT ποντίκια (Εικόνα 4.3 Α).

Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια εκτέθηκαν ακολούθως σε συνθήκες πρόσληψης δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας λιπιδίων. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε σε μύες ηλικίας 6-7 εβδομάδων και είχε διάρκεια 4 μηνών. Κατά το διάστημα χορήγησης της δίαιτας το σωματικό βάρος των υπό μελέτη μυών ελέγχονταν εβδομαδιαία και συγκρίνονταν με αυτό των WT ποντικίων που είχαν εκτεθεί στις ίδιες συνθήκες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απέδειξαν ότι αν και η απαλοιφή του *Mpst* δεν οδηγεί σε αλλαγές στο σωματικό βάρος μυών νεαρής ηλικίας που τρέφονται με φυσιολογική δίαιτα, σε συνθήκες λήψης δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας λιπιδίων το σωματικό βάρος των *Mpst*^{-/-} μυών είναι αυξημένο (Εικόνα 4.3 Β, Γ).

Η ύπαρξη συσχέτισης της έλλειψης του ενζύμου MPST με την αύξηση σωματικού βάρους επιβεβαιώθηκε σε ένα επιπλέον μοντέλο μυών. Δεδομένου ότι η λειτουργία του μεταβολισμού επιβραδύνεται κατά τη γήρανση (Azzu and Valencak, 2017), το σωματικό βάρος των *Mpst*^{-/-} ποντικίων σε συνθήκες λήψης φυσιολογικής δίαιτας εξετάστηκε για διάστημα 18 μηνών. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη χορήγηση υπερθερμιδικής δίαιτας σε νεαρής ηλικίας ποντίκια, οι γηρασμένοι γενετικά

τροποποιημένοι μύες, παρουσίασαν αυξημένο σωματικό βάρος συγκριτικά με τους WT αντίστοιχης ηλικίας (Εικόνα 4.3 Δ). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφορά βάρους μεταξύ των δύο γονοτύπων παρατηρήθηκε μετά το πέρας των 10 μηνών.

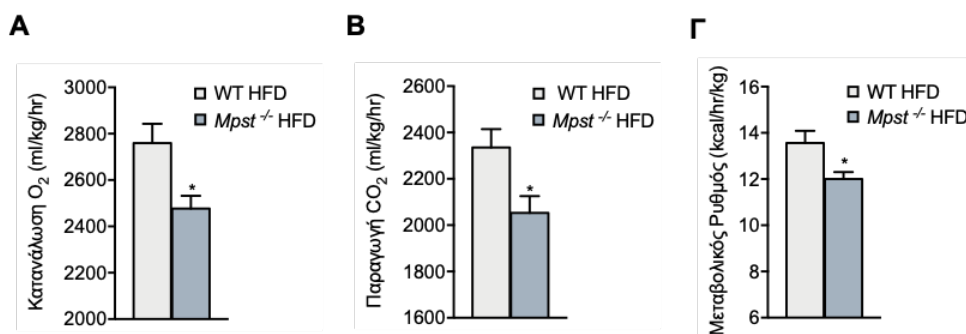
Συγκεντρωτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι απαλοιφή του *Mpst* στα ποντίκια, συνδέεται με την εκδήλωση πρόωρου φαινοτύπου παχυσαρκίας σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του όπως κατά τη διάρκεια λήψης υπερθερμιδικής δίαιτας και κατά τη γήρανση. Η κύρια αιτία εμφάνισης παχυσαρκίας στις ημέρες μας είναι η αυξημένη κατανάλωση τροφής σε συνδυασμό με τη μειωμένη σωματική άσκηση, επομένως το μοντέλο της λήψης υπερθερμιδικής δίαιτας επιλέχθηκε για τις επόμενες μελέτες και τα κύρια ευρήματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκαν επιπροσθέτως στο μοντέλο της γήρανσης.



Εικόνα 4.3: Το σωματικό βάρος των *Mpst*^{-/-} μυών είναι αυξημένο κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας και τη γήρανση. Α. Επίπεδα των πρωτεϊνών CBS, CSE, MPST τα οποία προέκυψαν από ανάλυση western blot στον iWAT, WT κα *Mpst*^{-/-} ποντικών ηλικίας 10 εβδομάδων. Η έκφραση παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα WT. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-τουμπουλίνης. Καμπύλη σωματικού βάρους και αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες WT και *Mpst*^{-/-} μυών κατά τη χορήγηση **Β.** CD και **Γ.** HFD για 16 εβδομάδες. **Δ.** Σωματικό βάρος και αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες WT και *Mpst*^{-/-} μυών που έλαβαν CD για διάρκεια 18 μηνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), * $p < 0,05$, N=6-7 ποντίκια/ομάδα.

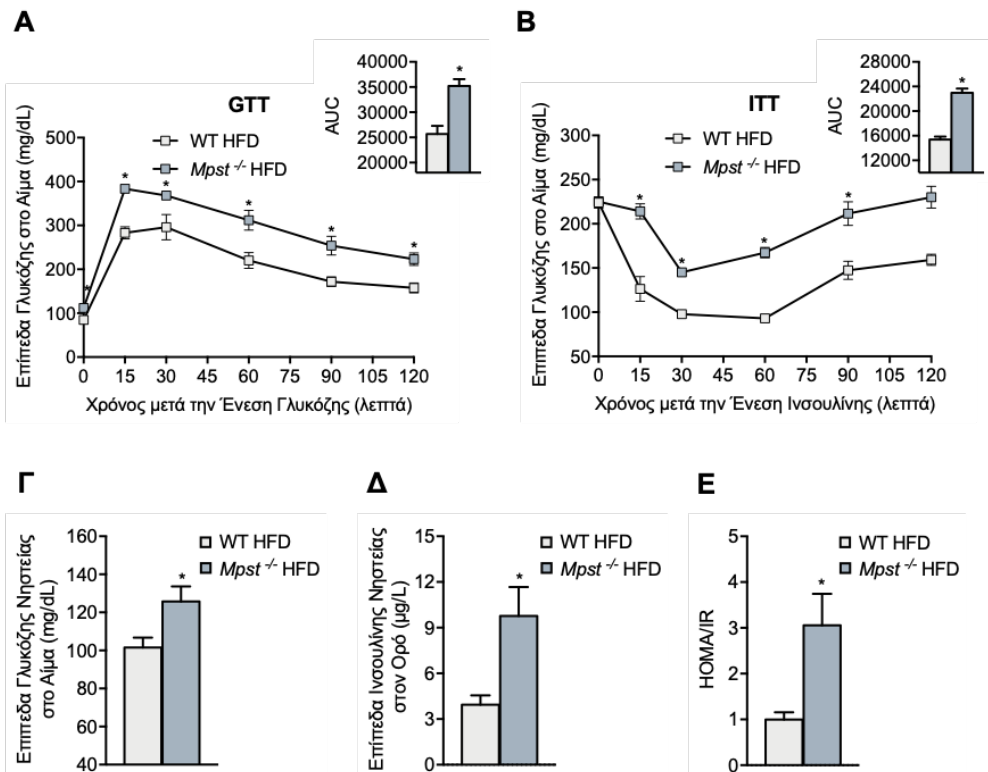
4.3 Τα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο μεταβολικό ρυθμό και αυξημένη ανοχή στη γλυκόζη και την ινσουλίνη

Προκείμενου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μεταβολικός φαινότυπος των *Mpst*^{-/-} HFD μυών, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε επιπλέον μετρήσεις και δοκιμασίες. Συγκεκριμένα, κατά την 11^η εβδομάδα χορήγησης δίαιτας εξετάστηκαν σημαντικές παράμετροι του μεταβολισμού με τη χρήση του συστήματος Columbus Instruments Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS). Η κατανάλωση οξυγόνου (O₂), η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και ο μεταβολικός ρυθμός αξιολογήθηκαν για διάρκεια 72 ωρών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η έλλειψη του γονιδίου *Mpst* συνδέεται με μείωση των προαναφερόμενων παραμέτρων, γεγονός που υποδηλώνει τον μειωμένο ρυθμό μεταβολισμού των *Mpst*^{-/-} HFD μυών (Εικόνα 4.4 Α-Γ).



Εικόνα 4.4: Μετρήσεις παραμέτρων του μεταβολισμού WT και *Mpst*^{-/-} μυών κατά τη χορήγηση HFD. Μέτρηση Α. κατανάλωσης O₂, Β. παραγωγής CO₂ και Γ. μεταβολικού ρυθμού, κατά τη χορήγηση HFD, σε WT και *Mpst*^{-/-} ποντίκια. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), **p*<0,05, N=7 ποντίκια/ομάδα.

Δεδομένου ότι η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με υψηλή πιθανότητα εκδήλωσης διαβήτη (Chobot et al., 2018), ελέγχθηκαν επίσης ορισμένες παράμετροι που αποτελούν δείκτες διάγνωσης της μεταβολικής αυτής ασθένειας. Κατά τη 12^η και 13^η εβδομάδα λήψης δίαιτας, πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες: ανοχής στη γλυκόζη (glucose tolerance test, GTT) και ανοχής στην ινσουλίνη (insulin tolerance test, ITT) αντίστοιχα. Τα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια αποδείχθηκε ότι χαρακτηρίζονται από αυξημένη αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη (Εικόνα 4.5 Α, Β). Η αυξημένη ανοχή των γενετικά τροποποιημένων μυών στην ινσουλίνη επιβεβαιώθηκε επίσης με τη χρήση του δείκτη Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR). Ο HOMA-IR αποτελεί μαθηματικό μοντέλο, η τιμή του οπού προκύπτει ως συνισταμένη των τιμών γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας. Οι τιμές των δύο αυτών παραμέτρων ήταν αυξημένες στα *Mpst*^{-/-} HFD και κατά συνέπεια μειωμένα ήταν και τα επίπεδα του HOMA-IR (Εικόνα 4.5 Γ-Ε).

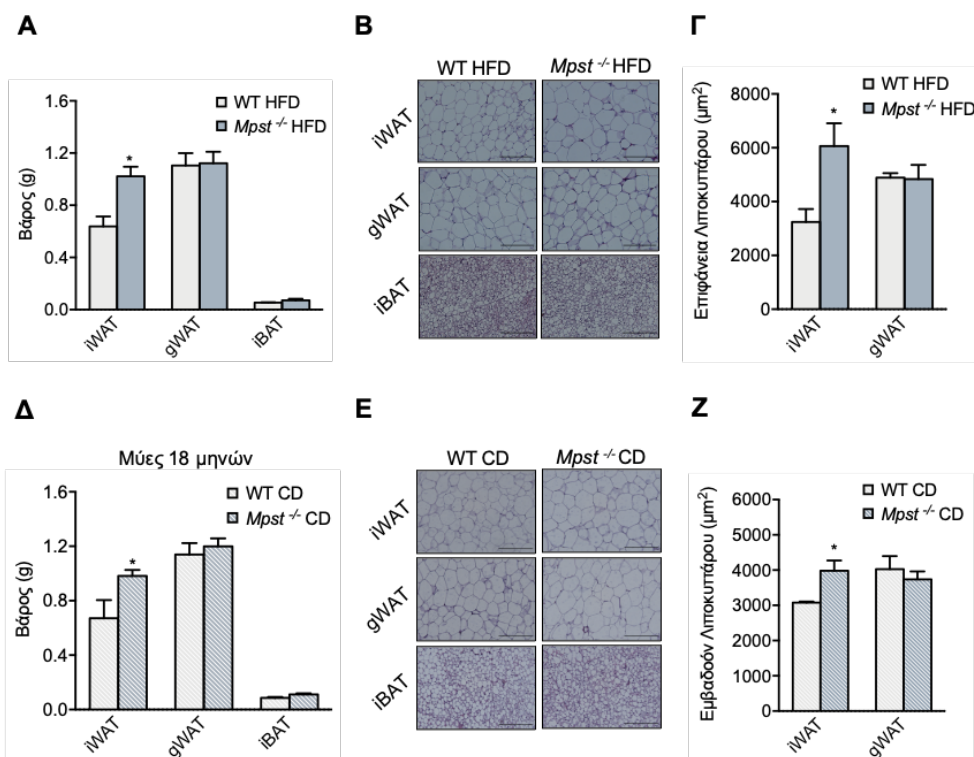


Εικόνα 4.5: Τα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια χαρακτηρίζονται από αυξημένη αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη. Δοκιμασία ανοχής στη **A.** γλυκόζη και στην **B.** ινσουλίνη, WT και *Mpst*^{-/-} μυών κατά τη χορήγηση HFD. **Γ.** Επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο αίμα, **Δ.** επίπεδα ινσουλίνης νηστείας στον ορό και **Ε.** επίπεδα HOMA-IR, WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), * $p < 0,05$, N=7ποντίκια/ομάδα. AUC: εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (area under the curve).

4.4 Η έλλειψη του *Mpst* συνδέεται με αυξημένη συσσώρευση λίπους

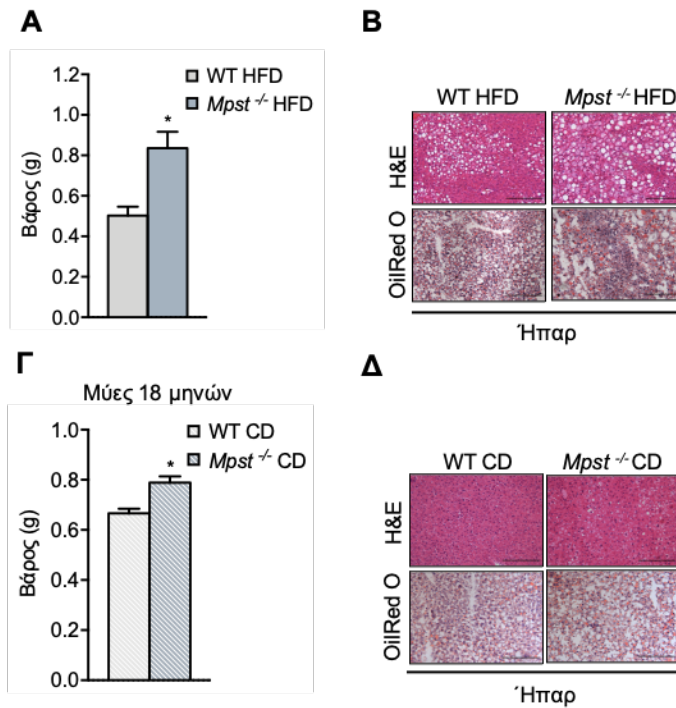
Στο τελευταίο μέρος της ανάλυσης του φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD μυών εξετάστηκε το βάρος και η μορφολογία των κύριων ιστών που εμπλέκονται στην αποθήκευση λίπους. Συγκεκριμένα οι δύο κύριες αποθήκες λευκού λίπους: iWAT, gWAT και ο ιστός καφέ λίπους iBAT απομονώθηκαν και το βάρος τους προσδιορίστηκε. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απέδειξαν ότι τα *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια χαρακτηρίζονται από αυξημένη μάζα iWAT, ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές στους ιστούς gWAT και iBAT. (Εικόνα 4.6 Α). Το αυξημένο βάρος του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού φαίνεται να οφείλεται στη μεγαλύτερη συσσώρευση λίπους, όπως διαπιστώθηκε από τη χρώση H&E (Εικόνα 4.6 Β). Η συγκεκριμένη παρατήρηση επιβεβαιώθηκε επιπροσθέτως και με τον υπολογισμό του εμβαδού της επιφάνειας των λιποκυττάρων, όπου βρέθηκε αυξημένο στον ιστό iWAT μετά την απαλοιφή του *Mpst*. Σε συμφωνία με το βάρος των ιστών, δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές στον ιστό gWAT (Εικόνα 4.6 Γ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επεκτάθηκαν σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο μοντέλο της γήρανσης. Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από τα πειράματα κατανάλωσης υπερθερμιδικής διαίτας, τα γηρασμένα ποντίκια με ανενεργό το MPST παρουσίασαν διαφορές μόνο στον iWAT μεταξύ των υπό μελέτη ιστών λίπους. Συγκεκριμένα στην ηλικία των 18 μηνών, οι γενετικά τροποποιημένοι μύες χαρακτηρίζονται από αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων στην αποθήκη λευκού λίπους που εντοπίζεται υποδόρια, παρατήρηση που προέκυψε από το αυξημένο βάρος του ιστού iWAT και το μεγαλύτερο εμβαδό της επιφάνειας των λιποκυττάρων του (Εικόνα 4.6 Δ-Ζ).



Εικόνα 4.6: Η γενετική απαλοιφή του *Mpst* συνδέεται με αλλαγές στο βάρος και τη μορφολογία του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού. **A.** Βάρος, **B.** αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών με χρώση H&E και **Γ.** εμβαδόν επιφάνειας λιποκυττάρων των ιστών iWAT και gWAT, WT και *Mpst*^{-/-} μυών μετά τη χορήγηση δίαιτας HFD για διάστημα 16 εβδομάδων. **Δ.** Βάρος, **E.** αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών με χρώση H&E και **Z.** εμβαδόν επιφάνειας λιποκυττάρων των ιστών iWAT και gWAT, WT και *Mpst*^{-/-} μυών ηλικίας 18 μηνών που έλαβαν φυσιολογική δίαιτα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), * $p < 0,05$, (A,Δ) N=6-7 (B,Γ,E,Z) και N=4 ποντίκια/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 200μM

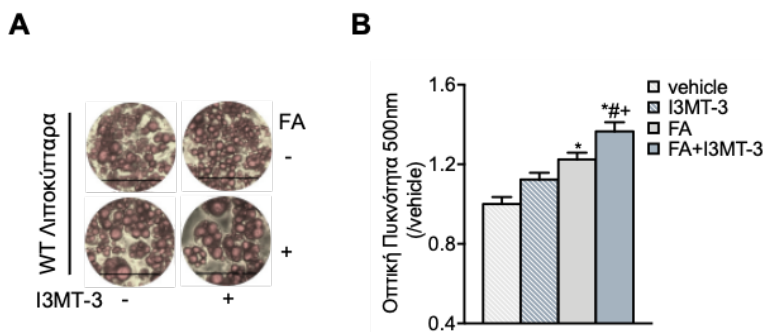
Δεδομένου του ότι σε μεγάλης διάρκειας περιόδους λήψης υπερθερμιδικής διαίτας η συσσώρευση λίπους επεκτείνεται εκτός του λιπώδους ιστού και στο ήπαρ (Azzu et al., 2020), το βάρος και η μορφολογία του στα WT και *Mpst*^{-/-} HFD εξετάστηκε. Απαλοιφή του ενζύμου *Mpst* σχετίζεται με αύξηση του βάρους του ήπατος και αυξημένη αποθήκευση λίπους στον ιστό. Η ανίχνευση λιπιδίων στο ήπαρ πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές ιστολογικές μελέτες: χρώση H&E και OilRed O (Εικόνα 4.7 Α, Β). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο μοντέλο της γήρανσης, με την απαλοιφή του *Mpst* να οδηγεί σε αυξημένο βάρος ήπατος και μεγαλύτερη αποθήκευση λιπιδίων στον ιστό σε μύες ηλικίας 18 μηνών (Εικόνα 4.7 Γ, Δ).



Εικόνα 4.7: Τα *Mpst*^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη εναπόθεση λίπους στο ήπαρ σε συνθήκες λήψης HFD ή κατά τη γήρανση. **A.** Βάρος ήπατος και **B.** αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών ήπατος με χρώση H&E και OilRed O, WT και *Mpst*^{-/-} μυών μετά τη χορήγηση δίαιτας HFD για διάστημα 16 εβδομάδων. **Γ.** Βάρος ήπατος και **Δ.** αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών ήπατος με χρώση H&E και OilRed O, WT και *Mpst*^{-/-} μυών ηλικίας 18 μηνών που έλαβαν φυσιολογική δίαιτα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (A, Γ) N=6-7 και (B, Δ), N=4 ποντίκια/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 200 μ M.

4.5 Η φαρμακολογική αναστολή του *Mpst* επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων

Έχοντας αποδείξει ότι σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια η απαλοιφή του *Mpst* κατά τη λήψη HFD συνδέεται με αύξηση της συσσώρευσης λίπους στον ιστό iWAT, εξετάστηκε ακολούθως αν η φαρμακολογική αναστολή του ενζύμου οδηγεί στον ίδιο φαινότυπο. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν πρόδρομα λιποκύτταρα από το λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό WT μυών και στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν σε λιποκύτταρα. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα εκτέθηκαν ακολούθως στο φαρμακολογικό αναστολέα του MPST, I3MT-3, παρουσία ή απουσία συμπληρώματος λιπαρών οξέων και η συσσώρευση λίπους εκτιμήθηκε με τη χρήση της χρώσης Oil Red O. Η προσθήκη FA οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των λιποσταγόνων των κυττάρων, η οποία ήταν μεγαλύτερη παρουσία του αναστολέα του MPST (Εικόνα 4.8 Α). Η επαγωγή της συσσώρευσης λίπους μετά την ταυτόχρονη δράση των I3MT-3 και FA, επιβεβαιώθηκε και ποσοτικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του εκλουσμένου από τα λιποσταγονίδια Oil Red O (Εικόνα 4.8 Β). Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν επιπλέον απόδειξη της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της αναστολής της λειτουργίας του MPST και της αυξημένης συσσώρευσης λιπιδίων.

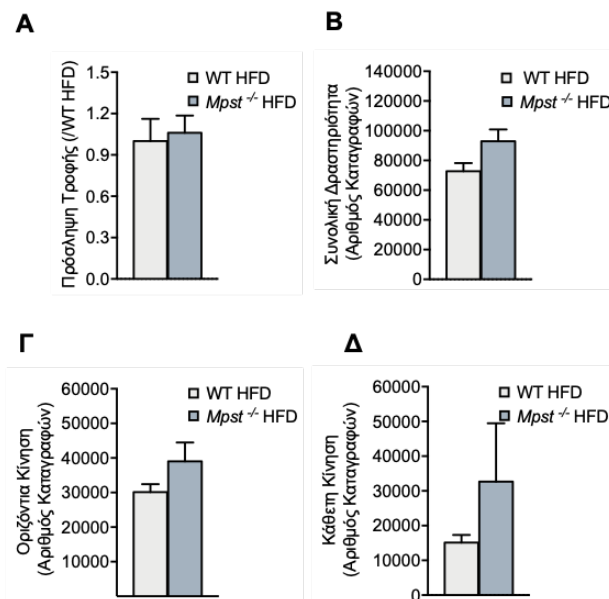


Εικόνα 4.8: Αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων σε WT διαφοροποιημένα λιποκύτταρα μετά από φαρμακολογική αναστολή του MPST. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Β.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με τη χρήση χρώσης Oil Red O σε WT λιποκύτταρα παρουσία ή απουσία I3MT-3 (50μM, 48ώρες) και FA (0,5X, 24ώρες). Η οπτική πυκνότητα παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα vehicle. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM). (B) Τα σύμβολα *,#,+ υποδηλώνουν σύγκρισή με τις ομάδες: vehicle, I3MT-3 και FA, αντίστοιχα. *,#,+ p <0,05, N=5-6 ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 100μM.

4.6 Ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός των *Mpst*^{-/-} μυών χαρακτηρίζεται από ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση του TIM/TOM

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων μελετών, έλλειψη του ενζύμου MPST κατά τη λήψη τροφής υψηλής περιεκτικότητας λιπιδίων, οδηγεί σε μεγαλύτερη συσσώρευση λίπους στο λευκό υποδόριο ιστό και αυξημένο σωματικό βάρος. Το επόμενο ερώτημα που εξετάστηκε ήταν ο μηχανισμός μέσω του οποίου δημιουργείται ο συγκεκριμένος φαινότυπος. Αρχικά ελέγχθηκε η κατανάλωση τροφής και η δραστηριότητα των υπό μελέτη μυών. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο γονοτύπων και

επομένως απορρίφθηκε η πιθανότητα τα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια να έχουν μεγαλύτερο βάρος, λόγω αυξημένης κατανάλωσης τροφής ή μειωμένης δραστηριότητας (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9: Πρόσληψη τροφής και συνολική δραστηριότητα WT, και *Mpst*^{-/-} μυών σε συνθήκες HFD. Μετρήσεις **A.** ημερήσιας κατανάλωσης τροφής, **B.** οριζόντιας κίνησης, **Γ.** κάθετης κίνησης και **Δ.** συνολικής δραστηριότητας WT και *Mpst*^{-/-} HFD ποντικίων. Οι συγκεκριμένες παράμετροι αξιολογήθηκαν για διάρκεια 72 ωρών με τη χρήση του συστήματος CLAMS. Οι τιμές της ημερήσιας πρόσληψης τροφής παρουσιάζονται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα WT HFD. Οι τιμές συνολικής δραστηριότητας παρουσιάζονται σε αριθμό καταγραφών (counts). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), * $p < 0,05$, N=7 ποντίκια/ομάδα.

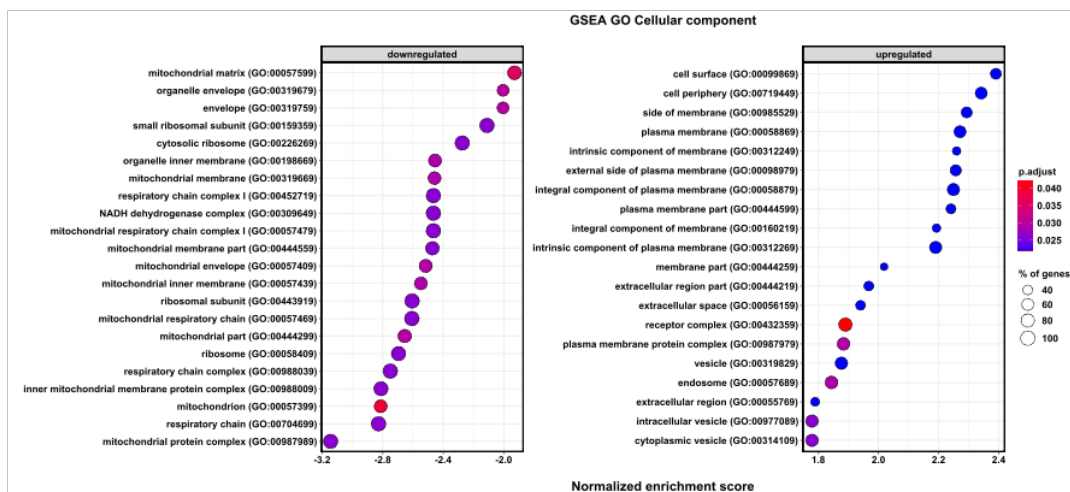
Ακολούθως προκειμένου να ανιχνεύσουμε τις βιολογικές διαδικασίες που επηρεάζονται από την απαλοιφή του *Mpst* αλλά και να κατανοήσουμε τη μοριακή βάση της αύξησης σωματικού βάρους στην οποία αυτή οδηγεί, πραγματοποιήσαμε ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με αλληλούχιση RNA (RNA-sequencing, RNA-seq). Δεδομένου ότι μεταξύ των ιστών λίπους που μελετήθηκαν συγκριτικά στους δύο γονοτύπους, εντοπίσαμε διαφορές στο βάρος και τη μορφολογία μόνο στον iWAT, ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός επιλέχθηκε για την αλληλούχιση RNA και για όλες τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω.

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων του RNA-seq αποκάλυψε πληθώρα γονιδίων των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την απαλοιφή του ενζύμου MPST στο υπό μελέτη μοντέλο. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO) στα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται στα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια υπέδειξε τα μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση, ως αυτά που κατεχοχίν επηρεάζονται (Εικόνα 4.10). Δεδομένου ότι η παχυσαρκία θεωρείται κατάσταση ήπιας φλεγμονής (Reilly and Saltiel, 2017), τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται να δικαιολογούνται από τον φαινότυπο αυξημένου σωματικού βάρους των μυών με απαλοιφή του *Mpst*. Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στο σύνολο των υποεκφραζόμενων, στα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια, γονιδίων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπέδειξαν ότι οι διαφορές γονιδιακής έκφρασης που εντοπίστηκαν επηρεάζουν κυρίως τα μιτοχόνδρια του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού των γενετικά τροποποιημένων μυών και ειδικότερα τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και τα σύμπλοκα που συγκροτούν την αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 4.10). Πράγματι η γονιδιακή έκφραση της πλειοψηφίας των γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ήταν μειωμένη στον ιστό iWAT των μυών με έλλειψη του *Mpst* (Εικόνα 4.11). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι μεταξύ των υποεκφραζόμενων γονιδίων που σχετίζονται με τις

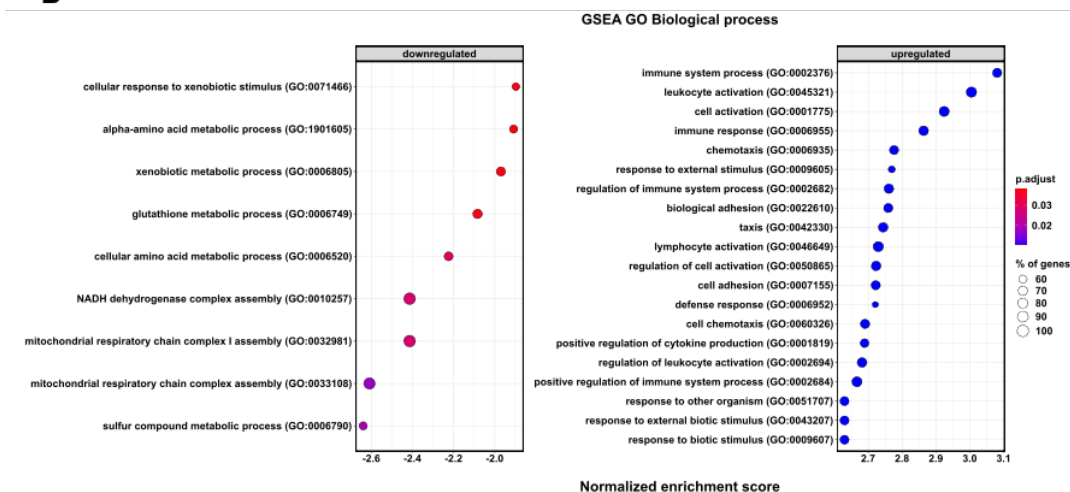
λειτουργίες των μιτοχονδρίων, εντοπίστηκαν γονίδια που συμμετέχουν στη δημιουργία του μιτοχονδριακού συμπλέγματος μεταφοράς πρωτεϊνών (Translocase of Inner Membrane)TIM/ (Translocase of Outer Membrane) TOM (Εικόνα 4.12 Α).

Τα μιτοχόνδρια εισάγουν περισσότερες από 1000 διαφορετικές πρωτεΐνες από το κυτοσόλιο, επομένως η ορθή λειτουργία του μεταφορέα TIM/TOM είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Η μειωμένη έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας που παρατηρείται στον λιπώδη ιστό των *Mpst^{-/-}* HFD μυών είναι πιθανόν να οδηγεί σε μειωμένη λειτουργία αυτής. Ωστόσο ενδεχόμενη υπολειτουργία του μιτοχονδριακού μεταφορέα των πρωτεϊνών στον λιπώδη ιστό των *Mpst^{-/-}* HFD μυών, θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά όχι μόνο τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά και άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες που φαίνεται να μην επηρεάζονται, στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, από την απαλοιφή του *Mpst*. Δεδομένου ότι οι μιτοχονδριακές λειτουργίες είναι απαραίτητες για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και πιθανή διαταραχή αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει σε ατελή ή ελλιπή αποικοδόμηση τους, και κατά συνέπεια σε αυξημένη αποθήκευση λίπους στον ιστό, το εύρημα που προέκυψε από την RNA-seq ανάλυση και υποδεικνύει την ύπαρξη μειωμένης έκφρασης διαφόρων υπομονάδων του TIM/TOM συμπλόκου στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια διερευνήθηκε με επιπλέον μελέτες.

A

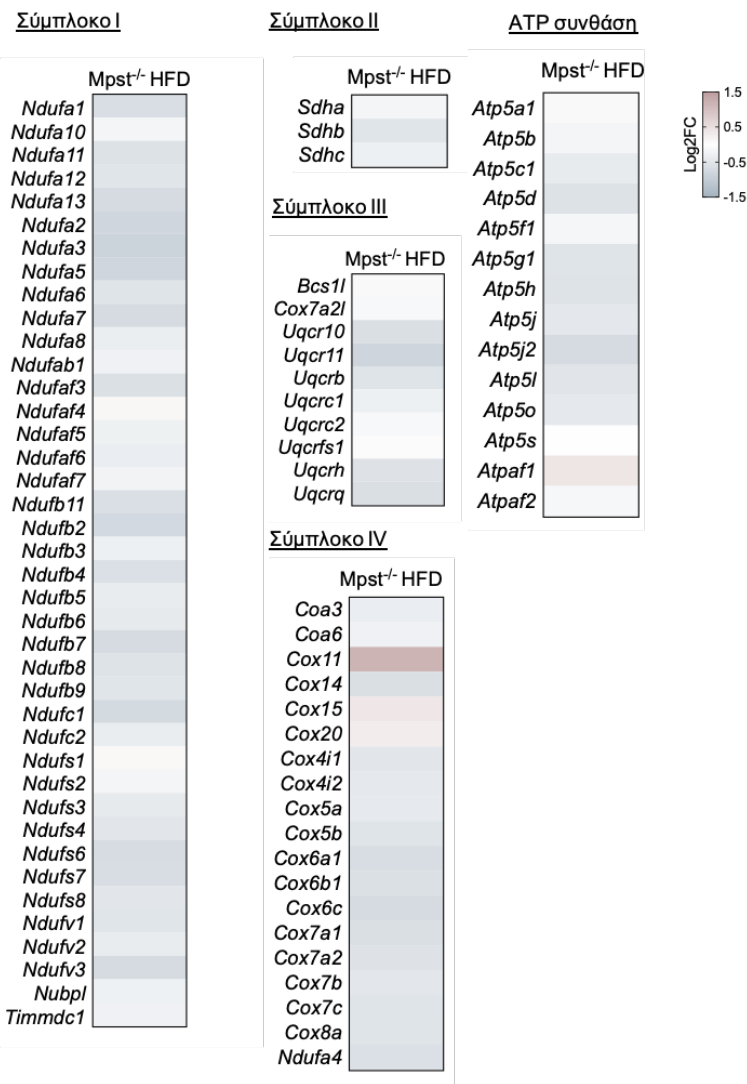


B

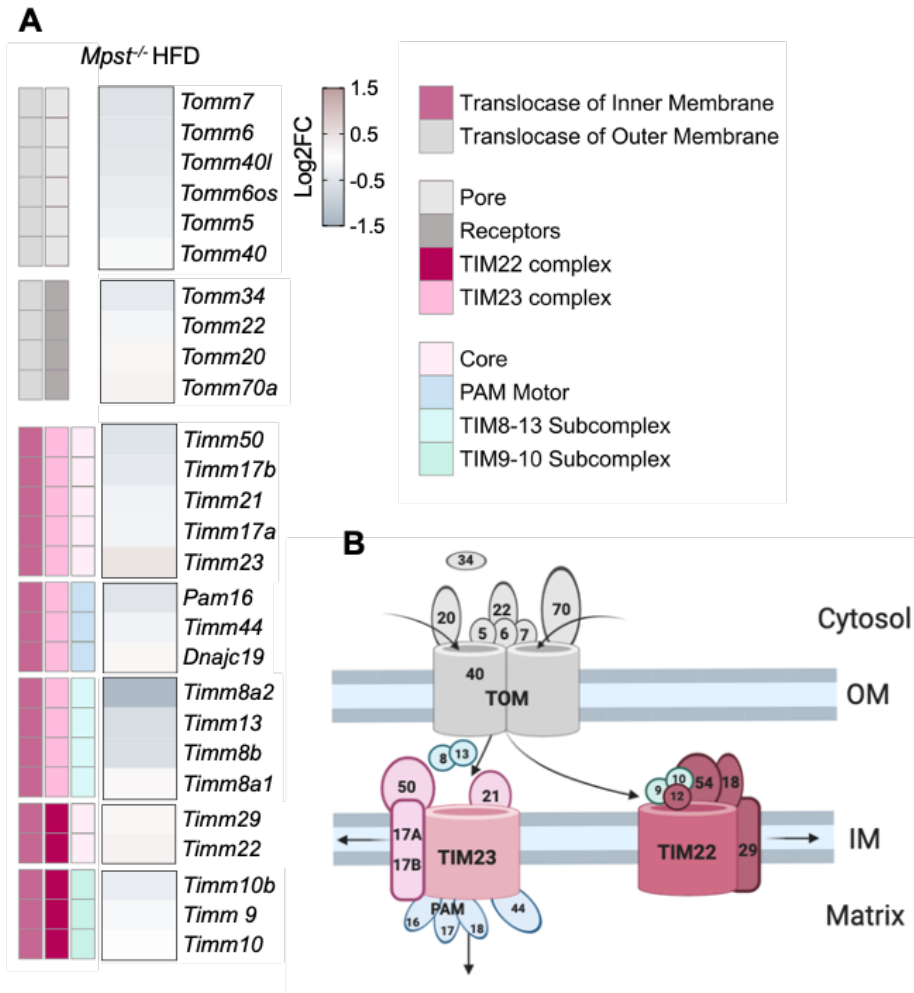


Εικόνα 4.10: GO ανάλυση στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT και *Mpst*^{-/-} μύων μετά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας. GO ανάλυση **A. κυτταρικά οργανίδια **B.** βιολογικές διαδικασίες, των γονιδίων των οποίων η έκφραση μειώνεται ή αυξάνεται στα *Mpst*^{-/-} HFD. Τα δεδομένα προέκυψαν μετά από ανάλυση αλληλούχισης RNA στον ιστό iWAT. N=3 ποντίκια/ομάδα.**

Αναπνευστική αλυσίδα



Εικόνα 4.11: Τα επίπεδα έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα είναι μειωμένα στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD ποντικών. Διάγραμμα heatmap που απεικονίζει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση της αναπνευστικής αλυσίδας, στα *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια σε αναλογία με τα WT HFD. Τα δεδομένα προέκυψαν μετά από ανάλυση αλληλούχισης RNA στον ιστό iWAT. N=3 ποντίκια/ομάδα.



Εικόνα 4.12: Απεικόνιση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των TIM/TOM υπομονάδων μετά την απαλοιφή του *Mpst* και κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας. **A. Διάγραμμα heatmap της έκφρασης των γονιδίων που αποτελούν υπομονάδες του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών TIM/TOM, στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Τα δεδομένα προέκυψαν από την ανάλυση RNA-seq και παρουσιάζονται σε αναλογία με τα WT HFD. **B.** Σχηματική απεικόνιση της δομής του συμπλόκου TIM/TOM. (A) N=3/ποντίκια ανά ομάδα.**

Ο μιτοχονδριακός μεταφορέας TIM/TOM αποτελείται από τα σύμπλοκα: μεταφορέας της εξωτερικής μεμβράνης (translocase of outer membrane, TOM), μεταφορέας της εσωτερικής μεμβράνης 23 (translocase of inner membrane, TIM23) και μεταφορέας της εσωτερικής μεμβράνης 22 (translocase of inner membrane, TIM22) TIM22 (Schmidt et al., 2010). Το σύμπλοκο TOM θεωρείται η κύρια πύλη εισόδου των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Ο πόρος εισαγωγής του TOM συγκροτείται από την πρωτεΐνη TOMM40 και την ισομορφή αυτής TOMM40L και περιβάλλεται από τις μικρές υπομονάδες TOMM5, TOMM6 και TOMM7 οι οποίες συμμετέχουν στη συνοχή και τη σταθερότητα του συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες TOMM20, TOMM22, TOMM70 και TOMM34 αναφέρονται ως υποδοχείς του TOM και η λειτουργία τους έγκειται στην αναγνώριση των αλληλουχιών-σημάτων, που εμπεριέχονται στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το DNA του πυρήνα, και σηματοδοτούν την εισαγωγή τους σε αυτό (Wang et al., 2020) (Εικόνα 4.12 B). Αφού μεταφερθούν μέσω του TOM, οι πρωτεΐνες ακολούθως κατευθύνονται στο μιτοχονδριακό υπό-διαμέρισμα που θα ασκήσουν την λειτουργία τους και καθορίζεται από την αλληλουχία-σήμα που εμπεριέχουν. Πρωτεΐνες με κατεύθυνση τη μήτρα του μιτοχονδρίου μεταφέρονται μέσω του συμπλόκου TIM23 με τη βοήθεια του κινητήρα υποβοήθησης εισόδου (Presequence translocase-Associated Motor, PAM). Οι υπομονάδες TIMM23, TIMM17A και TIMM17B σχηματίζουν το δίαυλο εισόδου του συμπλόκου ενώ οι TIMM50 και TIMM21 υποστηρίζεται ότι συμμετέχουν στη προώθηση των πρωτεϊνών από το TOM στο TIM23 (Schmidt et al., 2010) (Εικόνα 4.12 B). Ο κινητήρας PAM αποτελείται από τις υπομονάδες PAM16, PAM17, PAM18 και TIMM44 (Bolender et al., 2008). Το σύμπλοκο της διαμεμβρανικής περιοχής TIM8-13 φαίνεται να συμμετέχει στην πρωτεϊνική μεταφορά μέσω του TIM23, ωστόσο μόνο υπό ορισμένες συνθήκες (Paschen et al., 2000). Όπως γίνεται κατανοητό τα περισσότερα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό και αποτελούν πρωτεΐνες της

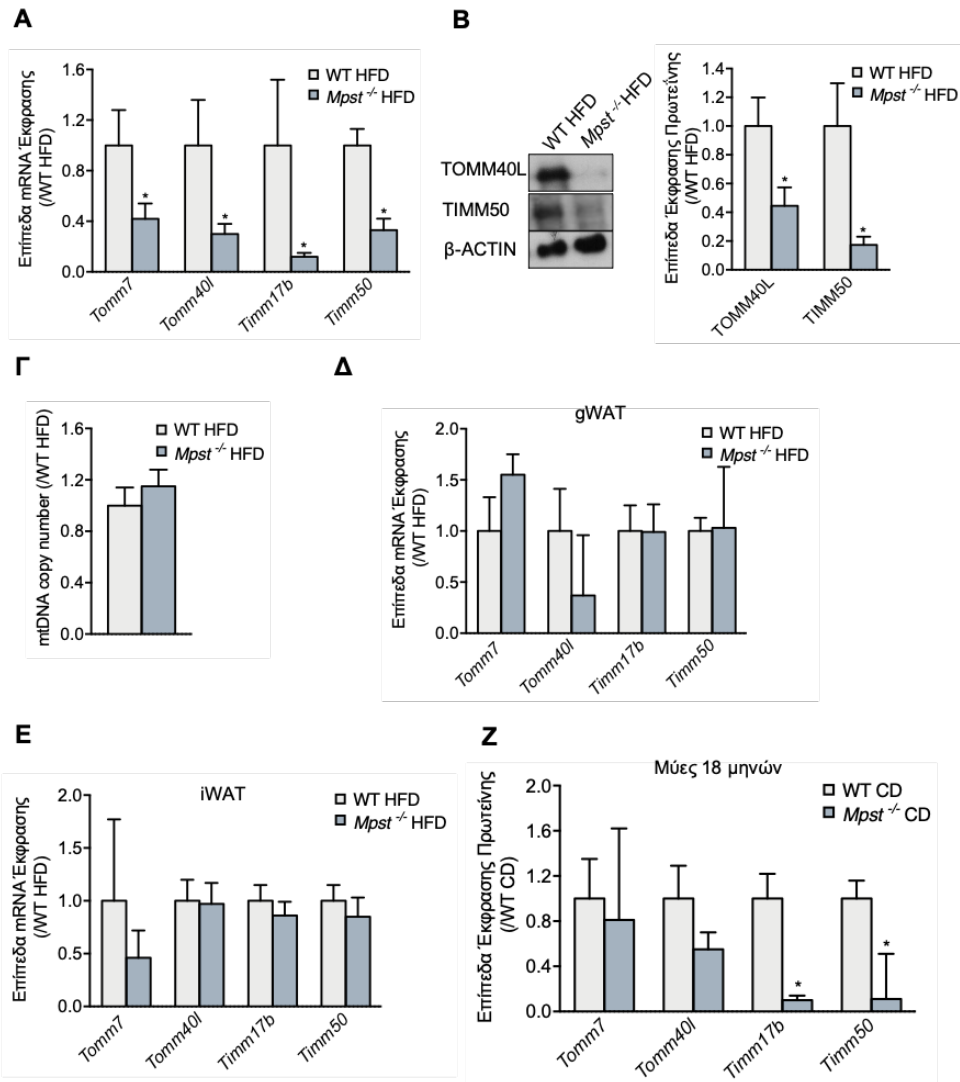
μήτρας εισάγονται στα μιτοχόνδρια ακολουθώντας την πορεία διαμέσου των TOM-TIM23-PAM (Schmidt et al., 2010). Πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του συμπλόκου TIM22 απελευθερώνονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι TIMM9, TIMM10 και TIMM10b θεωρούνται πρωτεΐνες συνοδοί, εντοπίζονται διαμεμβρανικά και υποστηρίζεται ότι λαμβάνουν μέρος στη μεταφορά πρωτεϊνών από το TOM στο TIMM22, σχηματίζοντας σύμπλοκα με την υπομονάδα TIM12 του δεύτερου (Wiedemann et al., 2006). Η υπομονάδα TIMM54 φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στη διαδικασία μεταφοράς μεταξύ των δύο συμπλόκων. Η πρωτεΐνη TIMM22 σχηματίζει το δίαυλο μεταφοράς, ενώ η TIMM18 συμμετέχει στη συνοχή του μεταφορέα της εσωτερικής μεμβράνης 22 (Bolender et al., 2008) (Εικόνα 4.12 B). Μεταφορά στην εσωτερική μεμβράνη μπορεί να πραγματοποιηθεί και διαμέσου του συμπλόκου TIM23. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ακριβής ρόλος όλων των υπομονάδων του συμπλόκου TIM/TOM δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως και η λειτουργία και θέση πολλών από αυτές στο μιτοχονδριακό μεταφορέα πρωτεϊνών εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο επιστημονικής μελέτης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αλληλούχιση RNA, η γονιδιακή έκφραση των *Tomm6*, *Tomm7*, *Tomm40l*, *Tomm34*, *Timm17b*, *Timm50*, *Timm8b*, *Timm13*, και *Pam16* βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένα, απουσία του *Mpst* σε μύες που έλαβαν HFD (Εικόνα 4.12 A). Τα αποτελέσματα της RNA αλληλούχισης επιβεβαιώθηκαν ακολούθως με qRT-PCR επιλέγοντας αντιπροσωπευτικά τέσσερα από τα παραπάνω γονίδια (Εικόνα 4.13 A). Εξετάστηκε επιπροσθέτως εάν η μειωμένη γονιδιακή έκφραση συνεπάγεται τη μειωμένη έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αντιπροσωπευτικά επιλέχθηκαν οι πρωτεΐνες: TOMM40L και TIMM50. Η ανάλυση western blot αποκάλυψε τα μειωμένα επίπεδα των συγκεκριμένων υπομονάδων του TIM/TOM στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών (Εικόνα 4.13 B).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η υπόθεση η παρατηρούμενη υποέκφραση των υπομονάδων του μιτοχονδριακού μεταφορέα να οφείλεται σε μειωμένο αριθμό μιτοχονδρίων στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των γενετικά τροποποιημένων μυών. Ως δείκτης του αριθμού μιτοχονδρίων στον ιστό χρησιμοποιήθηκε ο αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις μετρήσεις μεταξύ των δύο γονότυπων και επομένως η συγκεκριμένη υπόθεση απορρίφθηκε (Εικόνα 4.13 Γ).

Δεδομένου ότι κατά την ιστολογική μελέτη των iWAT, gWAT και iBAT παρατηρήθηκαν διαφορές στην αποθήκευση λίπους μόνο στο λευκό υποδόριο ιστό των γενετικά τροποποιημένων μυών, θεωρήσαμε ότι αν η παρατηρούμενη μειωμένη έκφραση των TIM/TOM υπομονάδων εμπλέκεται στη δημιουργία του φαινοτύπου αυξημένου σωματικού βάρους των μυών, η γονιδιακή έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων στους ιστούς gWAT και iBAT θα έπρεπε να μην επηρεάζεται από την έλλειψη του ενζύμου. Τα *Tomm7*, *Tomm40l*, *Timm50* και *Timm17b* επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικό δείγμα των γονιδίων-υπομονάδων του TIM/TOM που υποεκφράζονται στον iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών και τα επίπεδα των μεταγράφων τους προσδιορίστηκαν στον σπλαχνικό και τον καφέ λιπώδη ιστό με τη χρήση qRT-PCR ανάλυσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απέδειξαν τη μη ύπαρξη διαφορών μεταξύ των δύο γονοτύπων (Εικόνα 4.13 Δ, Ε).

Τέλος το εύρημα της ύπαρξης μειωμένης έκφρασης γονιδίων του μιτοχονδριακού μεταφορέα μετά την απαλοιφή του *Mpst* επιβεβαιώθηκε επιπροσθέτως στο μοντέλο των γηρασμένων μυών. Συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA των *Tomm7*, *Tomm40l*, *Timm50* και *Timm17b* προσδιορίστηκαν στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT και *Mpst^{-/-}* CD μυών ηλικίας 18 μηνών με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν τη μειωμένη γονιδιακή έκφραση των *Timm50* και *Timm17b*, απουσία του υπό μελέτη ενζύμου (Εικόνα 4.13 Ζ).



Εικόνα 4.13: Αποσιώπηση του *Mpst* κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας οδηγεί σε ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης πολλών υπομονάδων του TIM/TOM συμπλόκου. **A. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *Tomm7*, *Tomm40l*, *Timm50* και *Timm17b*, **B.** επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των TOMM40L και TIMM50 και **Γ.** επίπεδα αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA στον ιστό iWAT, WT και *Mpst*^{-/-} HFD μύων. Επίπεδα**

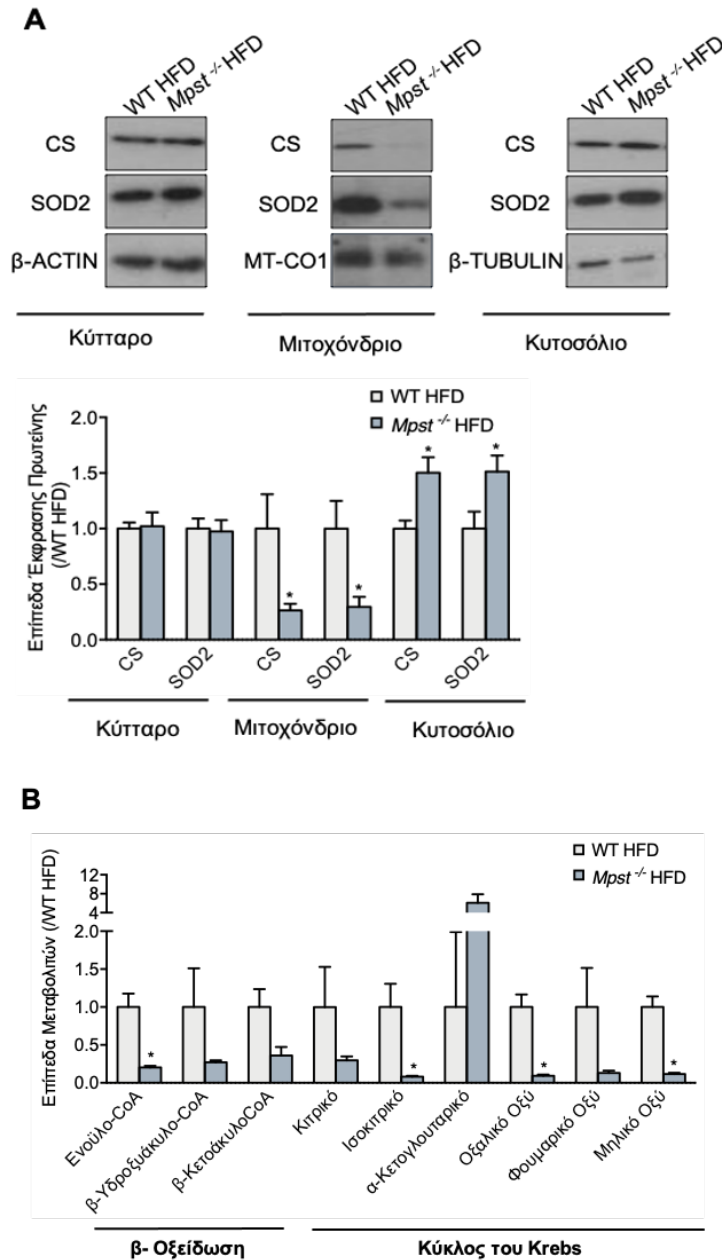
γονιδιακής έκφρασης των *Tom7*, *Tom40l*, *Timm50* και *Timm17b* στους ιστούς **Δ**. gWAT και **Ε**. iBAT WT και *Mpst*^{-/-} μυών μετά την κατανάλωση υπερθερμιδικής δίαιτας. **Ζ**. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *Tom7*, *Tom40l*, *Timm50* και *Timm17b* στον λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό WT και *Mpst*^{-/-} γηρασμένων μυών. Η έκφραση παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα (A-E) WT HFD ή (Z) WT CD. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της (A,B, Δ-Z) β-ακτίνης ή της 18s. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), *p<0,05, N=3-7 ποντίκια/ομάδα.

4.7 Η διαμεσολαβούμενη από το TIM/TOM μεταφορά πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων είναι μειωμένη στον iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών

Έχοντας αποδείξει τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών στο iWAT μυών με έλλειψη του ενζύμου MPST, εξετάστηκε ακολούθως αν η παρατηρούμενη μειωμένη έκφραση των TIM/TOM υπομονάδων είναι επαρκής ώστε να οδηγήσει σε μειωμένη λειτουργία του μιτοχονδριακού μεταφορέα. Για το σκοπό αυτό, οι συνολικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και οι πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων, ιστών λευκού υποδόριου λίπους, WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν ενδεικτικά τα επίπεδα δύο πρωτεϊνών που εισάγονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου από το σύμπλοκο TIM/TOM, των: συνθετάση του κιτρικού (citrate synthase, CS) και δισμουτάση του υπεροξειδίου 2 (superoxide dismutase 2, SOD2). Αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα των CS και SOD2 στο σύνολο των πρωτεϊνών του iWAT μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων, τα επίπεδα τους εντός των μιτοχονδρίων του ιστού ήταν μειωμένα στα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια (Εικόνα 4.14 A). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα τα επίπεδα των CS και SOD2 βρέθηκαν αυξημένα στο κυτοσόλιο του λιπώδους ιστού των τροποποιημένων μυών (Εικόνα 4.14 A). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν τη μειωμένη μεταφορά των CS και SOD2 στα μιτοχόνδρια του iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών υποδεικνύοντας τη δυσλειτουργία του συμπλόκου TIM/TOM απουσία του υπό μελέτη ενζύμου.

Δεδομένης της μειωμένης μεταφοράς πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων του iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD ποντικίων, εξετάστηκε ακολούθως η ορθότητα των λειτουργιών που αυτές συμμετέχουν. Για το σκοπό αυτό υποδορίοι λευκοί λιπώδης ιστοί, WT και *Mpst*^{-/-} μυών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα, απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Τα επίπεδα της πλειοψηφίας των μεταβολιτών που

προκύπτουν από τις διαδικασίες της β-οξειδωσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος προσδιορίστηκαν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπέδειξαν ότι η απαλοιφή του *Mps1* σχετίζεται με ελαττωμένα επίπεδα πολλών από αυτών (Εικόνα 4.14 Β). Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των μεταβολιτών που παράγονται κατά τη βήτα οξείδωση παρουσίασε ελάττωση επιπέδων στους γενετικά τροποποιημένους μύες σε ποσοστό 65-80%, ενώ η πλειοψηφία αυτών που προκύπτουν από τον κύκλο του Krebs σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85% (Εικόνα 4.14 Β). Τα ελαττωμένα επίπεδα των συγκεκριμένων μεταβολιτών, υποδεικνύουν τη δυσλειτουργία των δύο αυτών μιτοχονδριακών διαδικασιών.



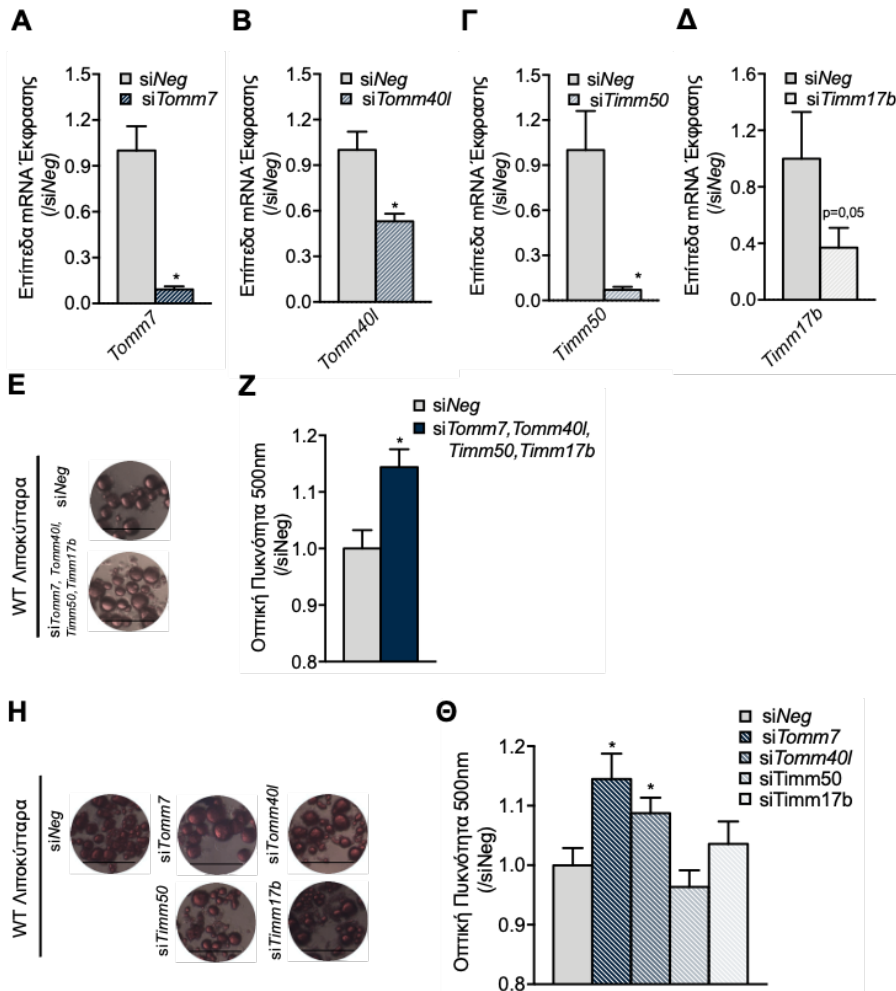
Εικόνα 4.14: Τα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών στη μήτρα των μιτοχονδρίων του iWAT και ελαττωμένα επίπεδα μεταβολιτών της β-οξειδωσης και του κύκλου του Krebs. A. Western blot ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των CS και SOD2 στο σύνολο

των ολικών, μιτοχονδριακών και των πρωτεϊνών κυτοσολίου που απομονώθηκαν από ιστούς iWAT WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης (ολικές πρωτεΐνες) ή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c1 (Mitochondrial-encoded cytochrome oxidase I, MT-CO1) (μιτοχονδριακές πρωτεΐνες) ή της β-τουμπουλίνης (πρωτεΐνες κυτοσολίου). **B.** Επίπεδα μεταβολιτών-προϊόντων της β-οξειδωσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος που προέκυψαν από στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Η έκφραση και τα επίπεδα μεταβολιτών παρουσιάζονται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα WT HFD. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (A) N=6-7 και (B) N=3 ποντίκια/ομάδα.

4.8 Μειωμένα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων του TIM/TOM ή αναστολή της λειτουργίας του σε λιποκύτταρα, επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων

Δεδομένου ότι οι μιτοχονδριακές λειτουργίες είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, τα οποία όταν δεν μεταβολιστούν αποθηκεύονται με τη μορφή των τριγλυκεριδίων, εξετάστηκε ακολούθως αν η αναστολή του TIM/TOM σε λιποκύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στο περιεχόμενο τους σε λίπος. Προκειμένου να προσομοιαστεί η ταυτόχρονη μείωση γονιδιακής έκφρασης αρκετών υπομονάδων του TIM/TOM που παρατηρήθηκε στους *Mpst^{-/-}* HFD μύες, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση διαφορετικών υπομονάδων του μεταφορέα σε λιποκύτταρα με τη χρήση siRNA, ειδικών για τα γονίδια στόχους, και της τεχνικής της παροδικής διαμόλυνσης. Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά τέσσερα από τα γονίδια που παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους γενετικά τροποποιημένους μύες, τα: *Tom7*, *Tom40l*, *Timm17b* και *Timm50*. Η παροδική διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε σε πρόδρομα λιποκύτταρα που απομονώθηκαν από λευκούς υποδόριους λιπώδεις ιστούς WT ποντικών και διαφοροποιήθηκαν για διάστημα 7 ημερών. Στην ομάδα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό siRNA (*siNeg*). Η επιτυχημένη σε υψηλό ποσοστό μείωση της έκφρασης των παραπάνω υπομονάδων μετά τη διαμόλυνση με τα αντίστοιχα siRNA, επιβεβαιώθηκε με qRT-PCR ανάλυση (Εικόνα 4.15 Α-Δ) και η ικανότητα συσσώρευσης λίπους των κυττάρων αξιολογήθηκε με τη χρήση της χρώσης Oil Red O (Εικόνα 4.15 Ε). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ιστολογικές μελέτες στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών, η ταυτόχρονη αποσιώπηση των *Tom7*, *Tom40l*, *Timm17b* και *Timm50* παρουσία λιπαρών οξέων οδήγησε σε αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα (Εικόνα 4.15 Ζ).

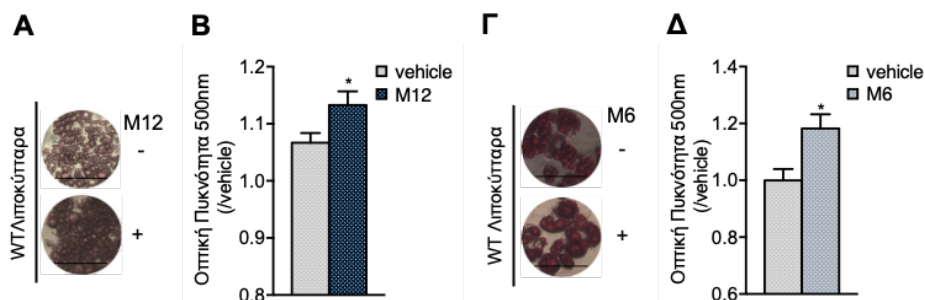
Ακολούθως, τα siRNA για τους προαναφερόμενους στόχους προστέθηκαν ξεχωριστά στις κυτταρικές καλλιέργειες προκειμένου να αξιολογηθεί η συμμετοχή του κάθε γονιδίου στην αυξημένη συσσώρευση λίπους. Παρουσία συμπληρώματος λιπαρών οξέων η αποθήκευση λίπους ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα με αποσιώπηση του *Tom7* ή του *Tom40l* (Εικόνα 4.15 Η, Θ). Οι υπομονάδες αυτές συμμετέχουν στη συγκρότηση του μιτοχονδριακού μεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης, που αποτελεί την πρώτη πύλη εισόδου των πρωτεϊνών εντός του μιτοχονδρίου και η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα τους για την ορθή λειτουργία του συμπλόκου.



Εικόνα 4.15: Αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων μετά την αποσιώπηση γονιδίων που συμμετέχουν στη συγκρότηση του μεταφορέα TIM/TOM. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των **A.** *Tomm7*, **B.** *Tomm40l*, **Γ.** *Timm50* και **Δ.** *Timm17b* σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα που διαμολύνθηκαν με siRNA ειδικά για τα συγκεκριμένα γονίδια. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με qRT-PCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης. **E, H.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Z, Θ.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με τη χρήση χρώσης Oil Red O σε WT λιποκύτταρα παρουσία FA (0,5X,

24ώρες) και των siRNA που υποδεικνύονται. Η έκφραση και η οπτική πυκνότητα παρουσιάζονται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα siNeg. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM). (B) Το σύμβολο * υποδηλώνει σύγκρισή με την ομάδα: siNeg. * $p < 0,05$, (A-Δ) N=5-7 και (E-Θ) N=14 ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 100 μ M

Η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ της λειτουργίας του μιτοχονδριακού μεταφορέα και της συσσώρευσης λίπους που αποδείχθηκε με το γενετικό μοντέλο της αποσιώπησης TIM/TOM υπομονάδων σε λιποκύτταρα, επικυρώθηκε επιπροσθέτως και με τη χρήση φαρμακολογικής προσέγγισης. Συγκεκριμένα, πρόδρομα λιποκύτταρα απομονώθηκαν από ιστούς iWAT WT μυών, διαφοροποιήθηκαν και εκτέθηκαν στους φαρμακολογικούς αναστολείς του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών: Mitoblock 12 (M12) και Mitoblock 6 (M6), παρουσία συμπληρώματος λιπαρών οξέων (Dabir et al., 2013; Miyata et al., 2014). Μετά από χρώση Oil Red O παρατηρήθηκε αύξηση της αποθήκευσης λιπιδίων στα κύτταρα παρουσία των αναστολέων του TIM/TOM (Εικόνα 4.16 A, Γ). Η δράση των M12 και M6 στη συσσώρευση λίπους επιβεβαιώθηκε και ποσοτικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της εκλουσμένης χρωστικής (Εικόνα 4.16 B, Δ).



Εικόνα 4.16: Αναστολή της λειτουργίας του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών έχει αρνητική δράση έναντι της συσσώρευσης λιπιδίων. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Β.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με τη χρήση χρώσης Oil Red O σε WT λιποκύτταρα παρουσία ή απουσία M12 (4μM, 24ώρες) και FA (0,5X, 23ώρες). **Γ.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Δ.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με τη χρήση χρώσης Oil Red O σε WT λιποκύτταρα παρουσία ή απουσία M6 (5μM, 24ώρες) και FA (0,5X, 23ώρες). Η οπτική πυκνότητα παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα vehicle. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM). * $p < 0,05$, N=6 ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 100μM.

4.9 Υποξία ή ενεργοποίηση του HIF1α σχετίζεται με ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης TIM/TOM υπομονάδων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αποσιώπηση υπομονάδων του TIM/TOM και τους φαρμακολογικούς αναστολείς αυτού στα λιποκύτταρα, αποκάλυψαν τη σημαντικότητα της ορθής λειτουργίας του μεταφορέα έναντι της συσσώρευσης λιπιδίων, ισχυροποιώντας έτσι την υπόθεση της πιθανής συμμετοχής της υπολειτουργίας του TIM/TOM στην εκδήλωση του μεταβολικού φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD μυών. Οι μελέτες που ακολούθησαν είχαν ως στόχο τη διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η απαλοιφή του *Mpst* μπορεί να οδηγήσει σε υποέκφραση διαφόρων γονιδίων-υπομονάδων του μιτοχονδριακού αυτού συμπλόκου.

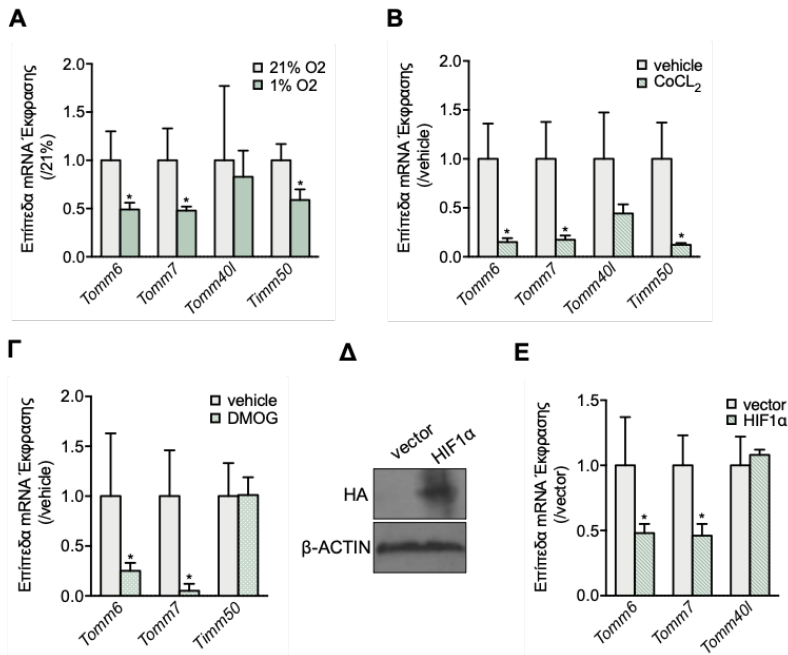
Η αύξηση της μάζας του λευκού υποδόριου λίπους και κατά συνέπεια το αυξημένο σωματικό βάρος των *Mpst^{-/-}* σε σύγκριση με τα WT ποντίκια, παρατηρείται μόνο υπό συνθήκες που συμβάλουν στην ανάπτυξη φαινοτύπου παχυσαρκίας, όπως η κατανάλωση υπερθερμιδικής δίαιτας ή η γήρανση. Δεδομένου αυτού, διάφορες παράμετροι που συνδέονται άμεσα με την παχυσαρκία και θα μπορούσαν να επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από την έλλειψη του υπό μελέτη ενζύμου, εξετάστηκαν ως προς το ρόλο τους στη δημιουργία του φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD μυών. Κατά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας η αυξημένη αποθήκευση λίπους οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων. Τα υπερτροφικά λιποκύτταρα χαρακτηρίζονται από μειωμένα επίπεδα οξυγόνου αφού η απόσταση τους από το αγγειακό σύστημα ξεπερνά συχνά την απόσταση διάχυσης του O₂ εντός του ιστού (Trayhurn, 2013). Η πιθανή ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της υποξίας που εντοπίζεται στα λιποκύτταρα παχύσαρκων οργανισμών και της αλλαγής στα επίπεδα έκφρασης των TIM/TOM υπομονάδων, διερευνήθηκε.

Πρόδρομα λιποκύτταρα απομονώθηκαν από τους ιστούς iWAT WT μυών και αφού διαφοροποιήθηκαν για διάστημα 7 ημέρων εκτέθηκαν σε

χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (1%). Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των *Tom6*, *Tom7*, *Tom40l* και *Timm50* που συμπεριλαμβάνονται στις TIM/TOM υπομονάδες με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών, προσδιορίστηκαν. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qRT-PCR ανάλυση απέδειξαν ότι η υποξία οδηγεί σε υποέκφραση των *Tom6*, *Tom7* και *Timm50* στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα (Εικόνα 4.17 Α). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε επιπροσθέτως σε συνθήκες χημικά επαγόμενης υποξίας με τη χρήση του χλωριούχου κοβάλτιου (Muñoz-Sánchez and Chánez-Cárdenas, 2019). Ειδικότερα τα επίπεδα mRNA έκφρασης των *Tom6*, *Tom7* και *Timm50* ελαττώθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% μετά την έκθεση των λιποκυττάρων στο $CoCl_2$ (Εικόνα 4.16 Β).

Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι επάγονται σε απάντηση στην υποξία (Cummins and Taylor, 2005) και ενδεχομένως θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη μειωμένη γονιδιακή έκφραση των *Tom6*, *Tom7* και *Timm50* που παρατηρείται στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα κατά την έκθεση τους σε συνθήκες χαμηλών επιπέδων οξυγόνου. Τα μέλη της οικογένειας HIF αποτελούν κύριους εκπροσώπους της κατηγορίας των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων, ενώ ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος του HIF1α στο λιπώδη ιστό υποστηρίζεται από πολλές επιστημονικές μελέτες (Gonzalez et al., 2018; Lee et al., 2014). Η επίδραση του HIF1α στη γονιδιακή έκφραση των TIM/TOM υπομονάδων διερευνήθηκε με τη χρήση του φαρμακολογικού αγωνιστή αυτού, DMOG. Επαγωγή του HIF1α σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα οδήγησε σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης των *Tom6*, *Tom7* ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του *Timm50* (Εικόνα 4.17 Γ). Τα παραπάνω αποτελέσματα επικυρώθηκαν ακολούθως με την αύξηση των επιπέδων HIF1α σε διαφοροποιημένα 3T3-L1 λιποκύτταρα με τη χρήση του πλασμιδιακού φορέα HA-HIF1α P402A/P564A-pcDNA3 κατά τη διάρκεια παροδικής διαμόλυνσης.

Πρόκειται για μεταλλαγμένη μορφή του HIF1α όπου τα αμινοξέα προλίνης στις θέσεις 402, και 565 έχουν αντικατασταθεί από αμινοξέα αλανίνης ώστε ο μεταγραφικός παράγοντας να μην υφίσταται αποικοδόμηση σε συνθήκες φυσιολογικών επιπέδων οξυγόνου (Yan et al., 2007a). Η επιτυχημένη υπερέκφραση του HIF1α επιβεβαιώθηκε με western blot ανάλυση (Εικόνα 4.17 Δ) και οι διαφορές στα επίπεδα των υπομονάδων του μιτοχονδριακού μεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης αξιολογήθηκαν με qRT-PCR ανάλυση. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έκθεση των λιποκυττάρων σε DMOG, η γονιδιακή έκφραση των *Tom6* και *Tom7* μειώθηκε σημαντικά παρουσία του πλασμιδιακού φορέα που φέρει τον HIF1α (Εικόνα 4.17 Ε).



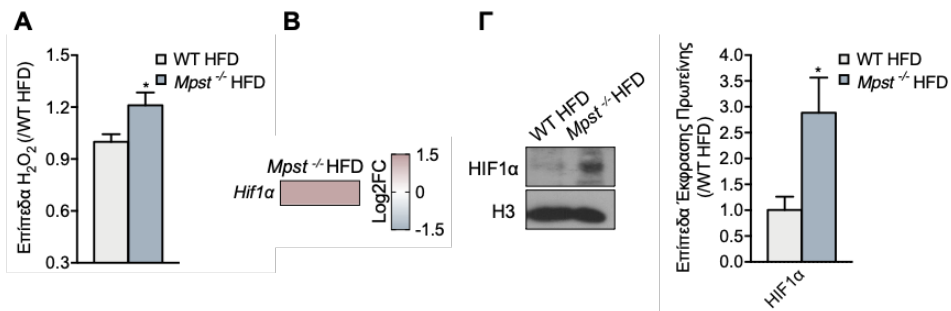
Εικόνα 4.17: Επίδραση της ενεργοποίησης του HIF1α στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-υπομονάδων του TIM/TOM. Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *Tomm6*, *Tomm7*, *Tomm40l*, και *Timm50* σε συνθήκες **A.** υποξίας (1% O₂, 48h), **B.** CoCl₂ -επαγόμενης υποξίας (300μM, 24h) και **Γ.** έκθεσης σε DMOG (1mM, 48h). Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα που προήλθαν από ιστούς iWAT WT μυών. Επίπεδα **Δ.** έκφρασης πρωτεΐνης HIF1α και **Ε.** γονιδιακής έκφρασης των *Tomm6*, *Tomm7* και *Tomm40l* σε 3T3-L1 διαφοροποιημένα λιποκύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα HA-HIF1α P402A/P564A-pcDNA3 (48ώρες). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με qRT-PCR και παρουσιάζεται ως αναλογία με την ομάδα (A) 21% O₂ ή (B, Γ) vehicle ή (E) vector. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της 18s. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), *p<0,05, N=5-8 ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα.

4.10 Ο HIF1α εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα στους πυρήνες των κυττάρων του λευκού υποδόριου λιπώδους ιστού των *Mpst*^{-/-} HFD μυών

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έκθεση των λιποκυττάρων σε συνθήκες υποξίας και κατά την ενεργοποίηση του HIF1α, αποτελούν απόδειξη της εμπλοκής του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1α στη μεταγραφή των γονιδίων *Tomm6* και *Tomm7*. Τα μειωμένα επίπεδα των συγκεκριμένων υπομονάδων του μεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης μετά την ενεργοποίηση του HIF1α υποδεικνύουν μάλιστα την ανασταλτική δράση του παράγοντα στη μεταγραφή τους.

Σύμφωνα με την RNA-seq ανάλυση στους ιστούς iWAT WT και *Mpst*^{-/-} HFD μυών, απαλοιφή του *Mpst* φαίνεται να σχετίζεται με υπερέκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών για τη φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση (Εικόνα 4.10). Η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών και της ενεργοποίησης του HIF1α έχει περιγραφεί από πολλές επιστημονικές μελέτες (Palazon et al., 2014). Τα αποτελέσματα πολλών ερευνών υποστηρίζουν επιπροσθέτως την αντιοξειδωτική δράση του ενζύμου MPST (Kimura et al., 2017; Nagahara, 2018; Nagahara et al., 2013). Μετρήσεις των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H₂O₂) στο λευκό λιπώδη ιστό WT και *Mpst*^{-/-} μυών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα, υπέδειξαν αύξηση του H₂O₂ μετά την απαλοιφή του ενζύμου, παρέχοντας επιπλέον απόδειξη για το ρόλο του στη δημιουργία του οξειδωτικού στρες (Εικόνα 4.18 A). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) υποστηρίζεται ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενεργοποίησης του HIF1α (Bonello et al., 2007; Chandel et al., 2000; Mansfield et al., 2005). Τέλος, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1α βρέθηκαν αυξημένα στο iWAT των παχύσαρκων μυών με έλλειψη του *Mpst* (Εικόνα 4.18 B).

Η πιθανότητα ύπαρξης αυξημένης πυρηνικής εντόπισης του HIF1α στον λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό των *Mpst*^{-/-} μυών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα, εξετάστηκε ακολούθως. Πυρήνες από ιστούς iWAT, WT και *Mpst*^{-/-} HFD ποντικών, απομονώθηκαν και οι μεμβράνες τους λύθηκαν προκειμένου να απελευθερωθούν οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για ανάλυση western blot. Αυξημένα επίπεδα του HIF1α ανιχνεύθηκαν στο σύνολο των πυρηνικών πρωτεϊνών των *Mpst*^{-/-} HFD μυών σε σύγκριση με των WT (Εικόνα 4.18 Γ).



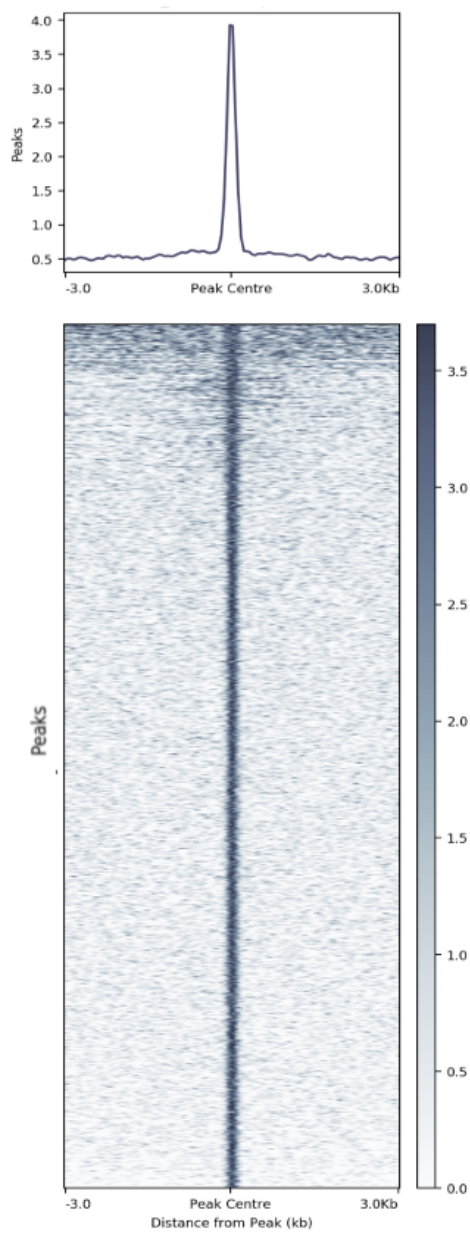
Εικόνα 4.18: Ο HIF1α εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στους πυρήνες του λευκού υποδόριου λίπους των *Mpst*^{-/-} HFD μυών. Α. Επίπεδα H₂O₂, **Β.** διάγραμμα heatmap της γονιδιακής έκφρασης του *Hif1a* και **Γ.** επίπεδα του HIF1α στο σύνολο των πυρηνικών πρωτεϊνών, στον iWAT, WT και *Mpst*^{-/-} μυών μετά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας. Τα επίπεδα H₂O₂ προέκυψαν με τη χρήση του αντιδραστηρίου AmpliFlue red και μέτρηση φθορισμού. Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του *Hif1a* προσδιορίστηκαν με RNA-seq ανάλυση και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανάλυση western blot. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αναλογία με την ομάδα WT HFD. (Γ) Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της ιστόνης 3 (histone 3, H3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), *p<0,05, N=3-5 ποντίκια/ομάδα.

4.11 Ο HIF1α προσδένεται στους υποκινητές TOM υπομονάδων στον ιστό iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών

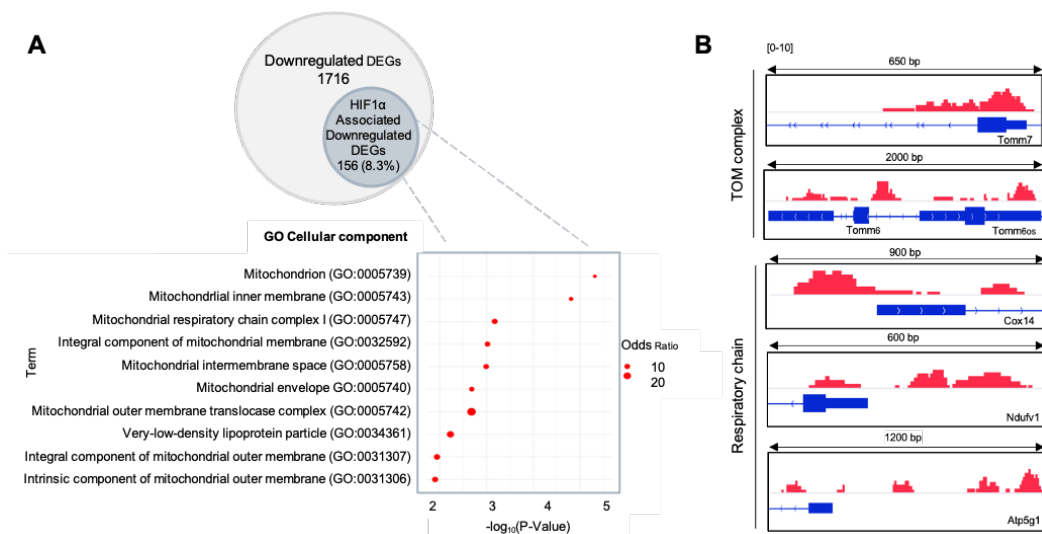
Η μειωμένη γονιδιακή έκφραση των *Tom70* και *Tom71* που εντοπίζεται στο λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό των *Mpst^{-/-}* HFD μυών σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα του HIF1α στους πυρήνες των κυττάρων του, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα που υποδεικνύουν την κατασταλτική δράση του HIF1α στην έκφραση τους. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την εμπλοκή του HIF1α στην έκφραση των συγκεκριμένων TOM υπομονάδων στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών μελετήσαμε τις περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με τη χρήση της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP), ακολουθούμενης από αλληλούχιση (ChIP-Seq).

Ο θερμικός χάρτης που προέκυψε από την πειραματική προσέγγιση του ChIP παρουσιάζει χαρακτηριστικό πρότυπο επιτυχημένης ανοσοκατακρήμνισης (Εικόνα 4.19). Ακολούθως ελέγχθηκε η πρόσδεση του HIF1α σε περιοχές του γονιδιώματος. Η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε την εμπλοκή του HIF1α στη μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων στον λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό των γενετικά τροποποιημένων μυών. Μεταξύ αυτών εντοπίστηκαν 156 γονίδια που σύμφωνα με τα αποτελέσματα του RNA-seq υποεκφράζονται στο iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD ποντικών. GO ανάλυση των γονιδίων αυτών υπέδειξε το μιτοχόνδριο ως το κυτταρικό οργανίδιο που κατεξοχήν επηρεάζεται. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα γονίδια που προέκυψαν σχετίζονται τόσο με το μεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου όσο και με την αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 4.20 A), υποδεικνύοντας έτσι την εμπλοκή του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα στις αλλαγές στο προφίλ μεταγραφής γονιδίων με σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD μυών. Πρόσδεση του HIF1α ανιχνεύθηκε στους υποκινητές των

Tom7 και *Tom20*, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση του με τη ρύθμιση της έκφρασης των υπομονάδων του TOM και παρέχοντας επιπλέον ένδειξη για την κατασταλτική του δράση (Εικόνα 4.20 Β) στη μεταγραφή τους. HIF1α πρόσδεση εντοπίστηκε επίσης στις εγγύς ρυθμιστικές περιοχές των *Cox14*, *Ndufv1*, και *Atp5g1*, τα οποία συμμετέχουν στη συγκρότηση της αναπνευστικής αλυσίδας και παρουσιάζουν ελαττωμένη έκφραση στο iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών (Εικόνα 4.20 Β).



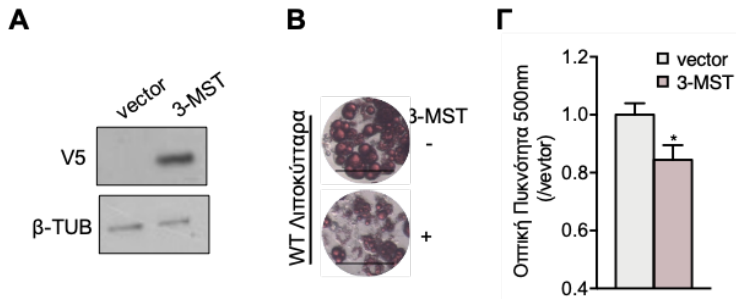
Εικόνα 4.19: Θερμικός χάρτης που προέκυψε από HIF1α-ChIP σε ιστούς iWAT *Mpst*^{-/-} HFD μυ. Ο θερμικός χάρτης παρουσιάζει την ισχύ πρόσδεσης κατά μήκος περιοχών του γονιδιώματος στις οποίες ανιχνεύτηκε στατιστικά σημαντική πρόσδεση του HIF1α +/- 3 kb από το κέντρο κάθε περιοχής.



Εικόνα 4.20: Ο HIF1α εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που υποεκφράζονται στον ιστό iWAT *Mpst*^{-/-} HFD και συμμετέχουν στη συγκρότηση του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών και της αναπνευστικής αλυσίδας. **A.** Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ των υποεκφραζόμενων γονιδίων που εντοπίζονται στο σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (Differentially expressed genes, DEGs) στο iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD μυών και προήλθαν από RNA-Seq και των γονιδίων που προέκυψαν από την ChIP-Seq ανάλυση για τον HIF1α. GO ανάλυση των γονιδίων που προέκυψαν από την συσχέτιση για την κατηγορία κυτταρικά οργάνια. **B.** Πρόσδεση του HIF1α στα *Tomm6*, *Tomm7*, *Cox14*, *Ndufv1* και *Atp5g1* στο iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD. N=1-3/ποντίκια/ ομάδα.

4.12 Αύξηση των επιπέδων του MPST λειτουργεί θετικά έναντι της συσσώρευσης λιπιδίων

Όλες οι παραπάνω μελέτες ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο του ενζύμου MPST στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού και την παθογένεια της παχυσαρκίας. Οι μελέτες που ακολούθησαν επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση της χρησιμότητας των παραπάνω ευρημάτων για τη θεραπεία της μεταβολικής αυτής νόσου. Δεδομένου ότι η απαλοιφή του *Mpst* συνδέεται με επαγωγή της συσσώρευσης λιπιδίων και κατά συνέπεια της αύξησης σωματικού βάρους, η πιθανότητα τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου να έχουν θετική δράση έναντι της συσσώρευσης του λίπους, εξετάστηκε. Πρόδρομα λιποκύτταρα απομονώθηκαν από τον ιστό iWAT WT μυών και αφού διαφοροποιήθηκαν, επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-V5-MPST. Η επιτυχημένη επιμόλυνση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση αυξημένων επιπέδων του MPST με ανάλυση western blot (Εικόνα 4.21 Α) και οι διαφορές στη συσσώρευση λίπους αξιολογήθηκαν με τη χρήση της χρώσης Oil Red O. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η υπερέκφραση του MPST οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των λιποσταγονιδίων (Εικόνα 4.21 Β) και κατά συνέπεια σε ελάττωση της συνολικής αποθήκευσης λίπους εντός των λιποκυττάρων (Εικόνα 4.21 Γ). Η παρατήρηση αυτή αποτελεί επιπλέον απόδειξη της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του MPST και της συσσώρευσης λιπιδίων και αποδεικνύει τη θετική δράση του ενζύμου έναντι αυτής.



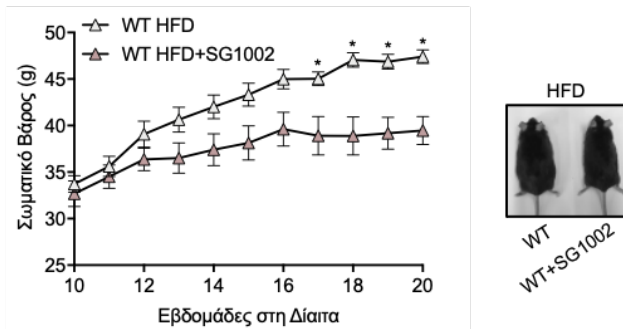
Εικόνα 4.21: Υπερέκφραση του MPST σε λιποκύτταρα συνδέεται με ελαττωμένη συσσώρευση λιπιδίων. Α. Επίπεδα έκφρασης του MPST, **Β.** αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Γ.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με (Α) ανάλυση western blot και (Β, Γ) χρώση Oil Red O σε WT λιποκύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα rcDNA3.1-V5-3-MPST (48ώρες). Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-τουμπουλίνης. Η οπτική πυκνότητα παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα vector. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). * $p < 0,05$, $N=4-6$ ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 100μM.

4.13 Η χορήγηση SG1002 σε παχύσαρκους μύες μειώνει τη συσσώρευση λίπους στον iWAT και βελτιώνει τον φαινότυπο αύξησης βάρους

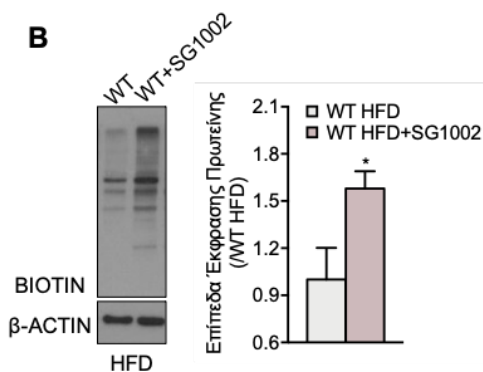
Το MPST αποτελεί σημαντική πηγή ενδογενούς παραγωγής υδροθείου. Η θετική δράση του έναντι της συσσώρευσης λίπους αποτελεί απόδειξη της σημαντικότητας του ρόλου των επιπέδων του H₂S για τη μεταβολική υγεία του οργανισμού. Η αξία των παραπάνω αποτελεσμάτων στη θεραπεία της παχυσαρκίας, εξετάστηκε ακολούθως in vivo με τη χρήση του δότη πολυσουλφιδίων SG1002. Συγκεκριμένα, WT ποντίκια έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα και το σωματικό τους βάρος ελέγχθηκε εβδομαδιαία. Μετά το πέρας 10 εβδομάδων, οι παχύσαρκοι μύες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες: μύες που συνέχισαν να λαμβάνουν HFD (WT HFD) και μύες που συνέχισαν να λαμβάνουν HFD παρουσία του δότη υδροθείου SG1002 στη τροφή (WT HFD+SG1002). Κατά το διάστημα χορήγησης του SG1002 πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σωματικού βάρους τα αποτελέσματα των οποίων απέδειξαν την αντίσταση στην προκαλούμενη από HFD αύξηση σωματικού βάρους, των μύων που έλαβαν το δότη. Ειδικότερα, τα πειραματόζωα παρουσία του SG1002, αύξησαν το σωματικό τους βάρος κατά μέσο όρο 8 γραμμάρια λιγότερο από ότι απουσία αυτού (Εικόνα 4.22 A). Η επιτυχημένη προσθήκη του δότη στην τροφή και η απορρόφηση του επιβεβαιώθηκαν με τη μέτρηση των επιπέδων σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών στον λευκό υποδόριο ιστό των υπό μελέτη ομάδων. Το SG1002 οδήγησε σε αύξηση κατά μέσο όρο 60% των επιπέδων των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της σουλφυδριλίωσης (Εικόνα 4.22 B). Η αντίστοιχη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε παράλληλα σε πειραματόζωα με λήψη φυσιολογικής δίαιτας. Καμία διαφορά σωματικού βάρους δεν παρατηρήθηκε στα ποντίκια που έλαβαν CD (WT CD) σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν τη δίαιτα παρουσία του δότη (WT CD+SG1002) και επομένως απορρίφθηκε η πιθανότητα ο φαινότυπος

μειωμένου βάρους των WT HFD SG1002 μυών να οφείλεται σε τοξική δράση του δότη (Εικόνα 4.22 Γ).

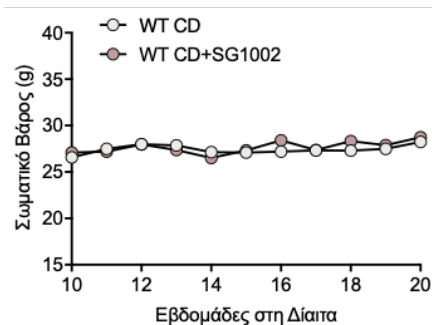
A



B



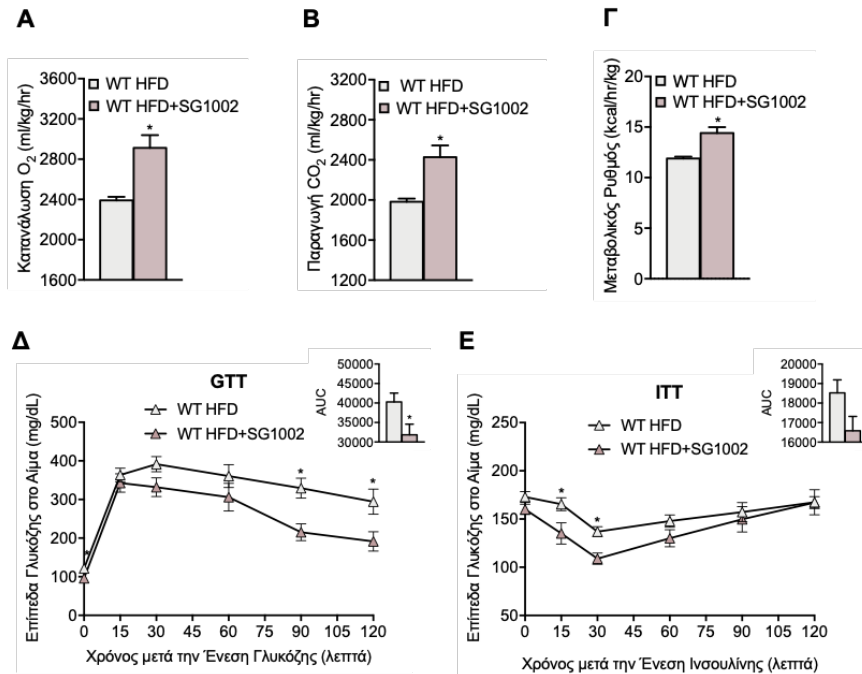
Γ



Εικόνα 4.22: Το SG1002 οδηγεί σε ελαττωμένη αύξηση βάρους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας. Α. Καμπύλη σωματικού βάρους, αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες και **Β.** προσδιορισμός επιπέδων σουλφυδριλιωμένων πρωτεϊνών υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού, WT μυών κατά τη χορήγηση HFD παρουσία ή απουσία SG1002. **Γ.** Καμπύλη σωματικού βάρους των ομάδων WT CD και WT CD+SG1002. Τα επίπεδα πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με την μέθοδο dimedone switch ακολουθούμενη από ανάλυση western blot. (B) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως

αναλογία με την ομάδα WT HFD και η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με τη χρήση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (A, Γ) N=7 και (B) N=4 ποντίκια/ομάδα.

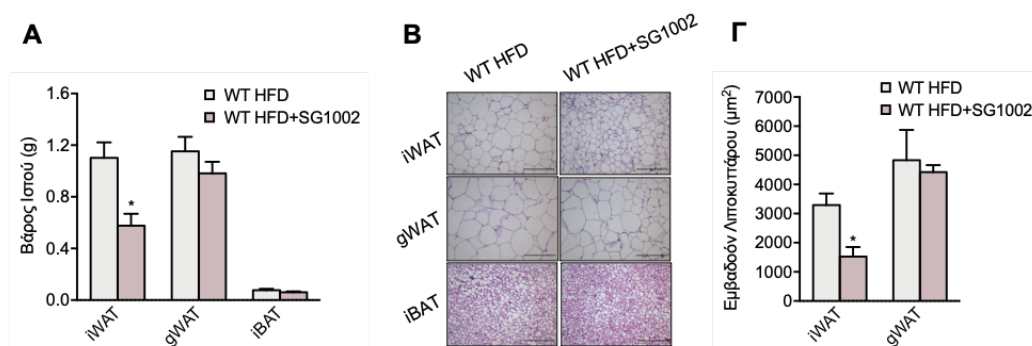
Κατά τη διάρκεια λήψης HFD, τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στα CLAMS προκειμένου να εξεταστούν διάφορες σημαντικές παράμετροι του μεταβολισμού. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν αντίθετες από αυτές που ανιχνεύθηκαν στις αντίστοιχες παραμέτρους στα *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια. Η κατανάλωση O₂, η παραγωγή CO₂ και ο μεταβολικός ρυθμός ήταν αυξημένα μετά τη χορήγηση του δότη, υποδεικνύοντας τη θετική δράση του SG1002 στο μεταβολισμό (Εικόνα 4.23 Α-Γ). Η λήψη του φαρμακολογικού δότη υδροθείου οδήγησε επιπλέον σε μειωμένη αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη, βελτιώνοντας τον φαινότυπο διαβήτη που παρατηρείται μετά από μεγάλα διαστήματα κατανάλωσης υπερθερμιδικής δίαιτας (Εικόνα 4.23 Δ, Ε).



Εικόνα 4.23: Η χορήγηση SG1002 αυξάνει το μεταβολικό ρυθμό και βελτιώνει την αντίσταση στη γλυκόζη και την ινσουλίνη των παχύσαρκων μυών. Μέτρηση **A.** κατανάλωσης O₂, **B.** παραγωγής CO₂, **Γ.** μεταβολικού ρυθμού, και δοκιμασία ανοχής στην **Δ.** γλυκόζη και **Ε.** ινσουλίνη WT μυών κατά τη χορήγηση HFD, παρουσία ή απουσία του SG1002. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM), * $p < 0,05$, (A-Γ) N=4 και (Δ, Ε) N=7 ποντίκια/ομάδα.

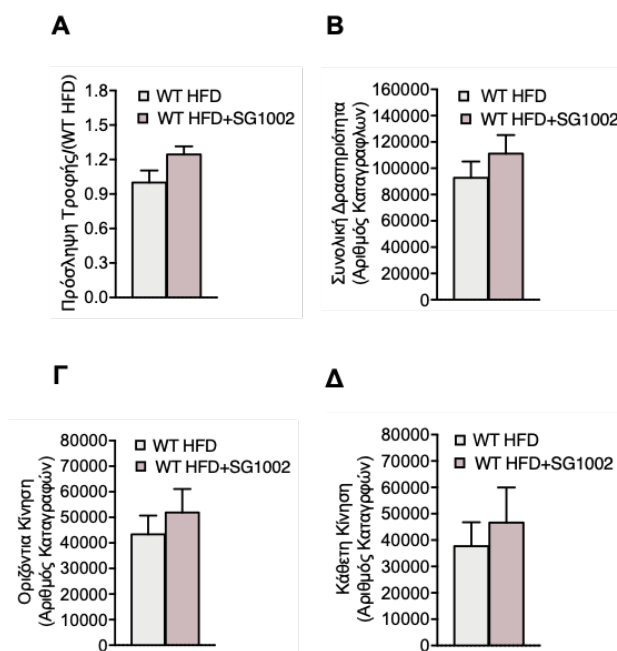
Όσον αφορά το βάρος και τη μορφολογία των ιστών iWAT, gWAT και iBAT, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του φαινοτύπου των μυών με απαλοιφή του *Mprst*, διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στον λευκό υποδόριο λιπώδη ιστό (Εικόνα 4.24 A). Το βάρος του ήταν μειωμένο στην ομάδα μυών που έλαβε το δόση ενώ η χρώση H&E σε τομές

που προέκυψαν από τους ιστούς λίπους αποκάλυψε τη μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στο iWAT των WT HFD+SG1002 μυών (Εικόνα 4.24 Β). Το εμβαδόν της επιφάνειας των λιποκυττάρων στους ιστούς iWAT και sWAT προσδιορίστηκε ακολούθως. Το μέγεθος των λιποκυττάρων ήταν μειωμένο στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των ποντικών που έλαβαν το δόση ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό, επιβεβαιώνοντας την παρατήρηση της θετικής επίδρασης του SG1002 στην αποθήκευση λίπους (Εικόνα 4.24 Γ).



Εικόνα 4.24: Η αποθήκευση λίπους είναι μειωμένη στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό WT μυών που έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα παρουσία SG1002. Α. Βάρος, **Β.** αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών με χρώση H&E και **Γ.** εμβαδόν επιφάνειας λιποκυττάρων των ιστών iWAT και sWAT, WT HFD και HFD+SG1002 μυών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, (A) $N=7$ (B, Γ) και $N=4$ ποντίκια/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 200 μ M.

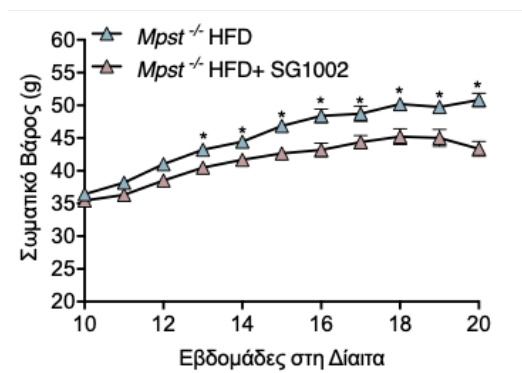
Επιπροσθέτως αξίζει να σημειωθεί ότι η χορήγηση του δότη παράλληλα με την υπερθερμιδική διαίτα δεν επηρέασε την ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης τροφής και δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα των μυών (Εικόνα 4.25 Α-Δ). Τα παραπάνω αποτελέσματα απέκλεισαν το ενδεχόμενο ο φαινότυπος μειωμένου σωματικού βάρους των ποντικών της ομάδας WT HFD+SG1002 να οφείλεται σε μειωμένη κατανάλωση τροφής ή αυξημένη δραστηριότητα.



Εικόνα 4.25: Πρόσληψη τροφής και συνολική δραστηριότητα WT HFD μυών παρουσία ή απουσία του SG1002. Μετρήσεις **A.** ημερήσιας κατανάλωσης τροφής, **B.** οριζόντιας κίνησης, **Γ.** κάθετης κίνησης και **Δ.** συνολικής δραστηριότητας, WT μυών που έλαβαν υπερθερμιδική διαίτα παρουσία ή απουσία δότη υδροθείου. Οι συγκεκριμένες παράμετροι

αξιολογήθηκαν για διάρκεια 72 ωρών με τη χρήση του συστήματος CLAMS. Οι τιμές της ημερήσιας πρόσληψης τροφής παρουσιάζονται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα WT HFD. Οι τιμές συνολικής δραστηριότητας παρουσιάζονται σε αριθμό καταγραφών (counts). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, N=4 ποντίκια/ομάδα.

Η ικανότητα του δότη SG1002 ως προς την αντιστροφή του φαινότυπου παχυσαρκίας αποδείχθηκε επιπροσθέτως και στα *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια. Σε αντιστοιχία με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα WT ποντίκια, μύες με απαλοιφή του *Mpst^{-/-}* έλαβαν υπερθερμιδική δίαιτα για διάστημα 10 εβδομάδων και ακολούθως χωρίστηκαν τυχαία στις ομάδες *Mpst^{-/-}* HFD και *Mpst^{-/-}* HFD+SG1002. Οι μετρήσεις σωματικού βάρους απέδειξαν ότι η χορήγηση του δότη στα *Mpst^{-/-}* HFD δρα θετικά στον φαινότυπο των πειραματόζωων, παρέχοντας επιπλέον απόδειξη για τη σημαντικότητα του ρόλου των επιπέδων H₂S στην παχυσαρκία (Εικόνα 4.26).

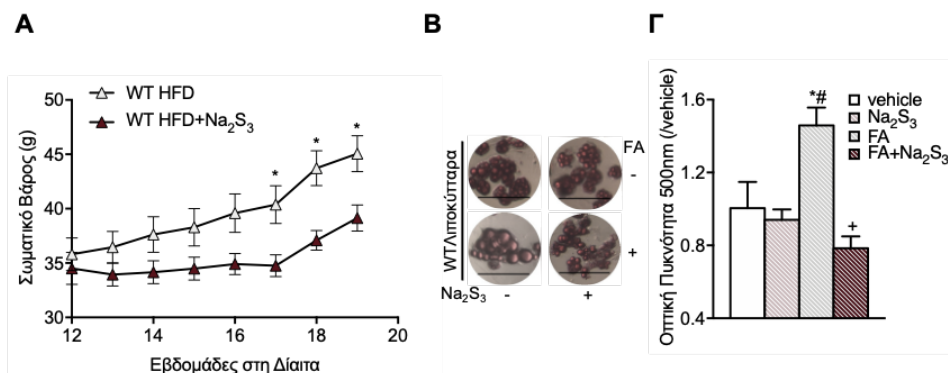


Εικόνα 4.26: Η χορήγηση SG1002 αντιστρέφει τον φαινότυπο πρόωρης παχυσαρκίας που εμφανίζουν τα *Mpst*^{-/-} ποντίκια κατά τη λήψη HFD. Καμπύλη σωματικού βάρους *Mpst*^{-/-} HFD μυών παρουσία ή απουσία SG1002. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM), * $p < 0,05$, N=7ποντίκια/ομάδα.

4.14 Το Na_2S_3 δρα θετικά έναντι της αύξησης σωματικού βάρους και της συσσώρευσης λίπους

Έχοντας αποδείξει τη θετική δράση του SG1002 έναντι της παχυσαρκίας, διερευνήθηκε ακολούθως αν η δράση αυτή συνδέεται μόνο με το συγκεκριμένο δότη υδροθείου ή χαρακτηρίζει όλη την ομάδα φαρμακολογικών δοτών αυτού. Για το σκοπό αυτό, η πειραματική μελέτη χορήγησης υδροθείου σε παχύσαρκους μύες, επαναλήφθηκε με τη χορήγηση Na_2S_3 . Τα WT ποντίκια αφού έγιναν παχύσαρκα με την κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας για διάστημα 3 μηνών, συνέχισαν να λαμβάνουν HFD για χρονικό διάστημα 8 ακόμα εβδομάδων με παρουσία ή απουσία του Na_2S_3 . Οι μύες έλαβαν το δότη με ημερήσια ενδοπεριτοναϊκή ένεση (WT HFD+ Na_2S_3) ενώ στην ομάδα αναφοράς πραγματοποιήθηκαν ενέσεις με PBS (WT HFD). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χορήγηση SG1002, το Na_2S_3 βελτίωσε τον φαινότυπο παχυσαρκίας των μυών οδηγώντας σε μικρότερη αύξηση βάρους κατά τη λήψη της υπερθερμιδικής διαίτας (Εικόνα 4.27 A).

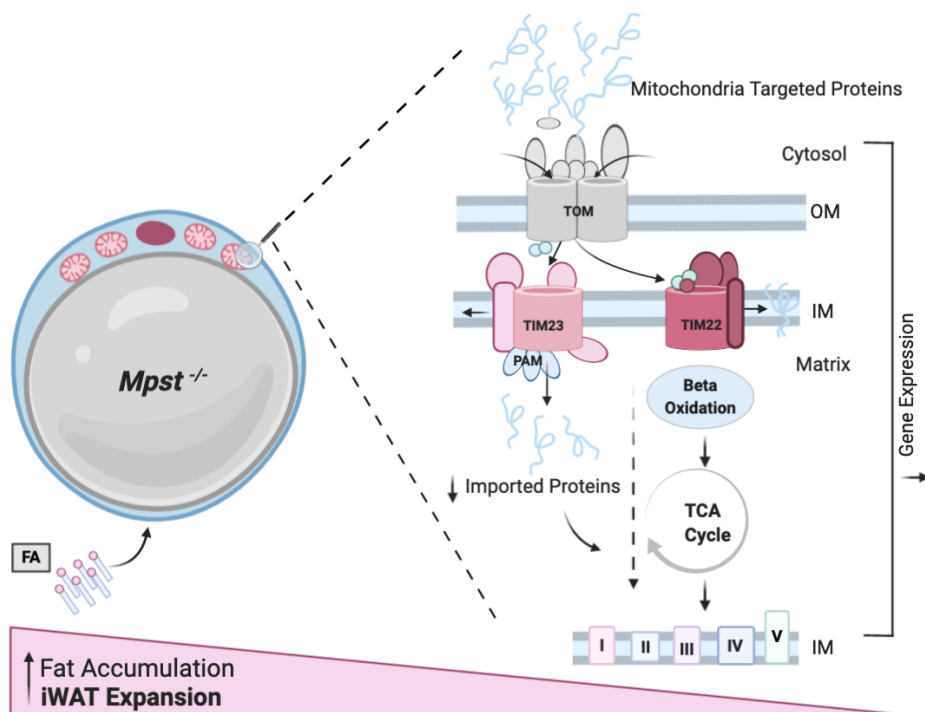
Η θετική δράση του εξωγενώς χορηγούμενου υδροθείου στη μείωση συσσώρευσης λίπους που παρατηρήθηκε στους παχύσαρκους μύες, επιβεβαιώθηκε επιπροσθέτως και στο *in vitro* μοντέλο των διαφοροποιημένων κυττάρων που περιγράφηκε παραπάνω. Τα λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε Na_2S_3 παρουσία ή απουσία συμπληρώματος λιπαρών οξέων και η αποθήκευση λίπους παρατηρήθηκε με τη χρήση χρώσης Oil Red O. Η εξωγενής χορήγηση δότη υδροθείου οδήγησε σε μείωση της προκαλούμενη από τα FA συσσώρευσης λιπιδίων (Εικόνα 4.27 B). Η παρατήρηση αυτή επικυρώθηκε και ποσοτικά με τη μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής (Εικόνα 4.27Γ).



Εικόνα 4.27: Η δράση του Na₂S₃ στη συσσώρευση λίπους και το σωματικό βάρος. Α. Καμπύλη σωματικού βάρους WT HFD μυών κατά τη χορήγηση Na₂S₃. **Β.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **Γ.** οπτική πυκνότητα εκλουσμένης χρωστικής, που προέκυψαν με χρώση Oil Red O σε WT λιποκύτταρα παρουσία ή απουσία Na₂S₃ (100μM, 24ώρες) και FA (0,5X, 24ώρες). Η οπτική πυκνότητα παρουσιάζεται ως αναλογία σε σχέση με την ομάδα vehicle. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (mean ± SEM). (Γ) Τα σύμβολα *,#,+ υποδηλώνουν σύγκρισή με τις ομάδες: vehicle, Na₂S₃ και FA, αντίστοιχα. *,#,+p<0,05, N=5-6 ανεξάρτητες καλλιέργειες κυττάρων/ομάδα. Μπάρα κλίμακας: 100μM.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του ενζύμου MPST, που συμμετέχει στην ενδογενή παραγωγή υδροθείου, στην παθογένεια της παχυσαρκίας και ακολούθως εξετάστηκε η δράση του H₂S στην θεραπεία αυτής (Εικόνα 5.1). Τα κύρια ευρήματα που προέκυψαν ήταν τα εξής: 1) Τα επίπεδα έκφρασης του MPST είναι μειωμένα στους ιστούς λίπους (iWAT, gWAT, iBAT) των παχύσαρκων μύων, 2) τα *Mpst*^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη συσσώρευση λιπιδίων στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό και πρόωρο φαινότυπο παχυσαρκίας κατά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας, 3) παρόμοιος φαινότυπος αυξημένου σωματικού βάρους εκδηλώνεται επίσης στα *Mpst*^{-/-} CD ποντίκια κατά τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης, 4) η γονιδιακή έκφραση πολλών υπομονάδων του συμπλόκου TIM/TOM και κατά συνέπεια η μεταφορά πρωτεϊνών στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και οι μιτοχονδριακές λειτουργίες, είναι μειωμένα στον iWAT των *Mpst*^{-/-} HFD ποντικίων, 5) αναστολή της λειτουργίας του TIM/TOM προκαλεί αυξημένη συσσώρευση λίπους 6) συνθήκες υποξίας και ενεργοποίησης του HIF1α συνδέονται με ελαττωμένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης TIM/TOM υπομονάδων, 7) ο HIF1α εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα στους πυρήνες του λευκού υποδόριου λιπώδους ιστού των *Mpst*^{-/-} HFD μύων και προσδένεται στους υποκινητές ή στις εγγύς περιοχές μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων-υπομονάδων του TOM και της αναπνευστικής αλυσίδας και 8) χορήγηση του δότη πολυσουλφιδίων SG1002 αντιστρέφει τον φαινότυπο αύξησης βάρους των παχύσαρκων μύων.



Εικόνα 5.1: Ο ρόλος του *Mpst* στην ενεργειακή ομοίωση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας. Απαλοιφή του *Mpst* σε μύες που λαμβάνουν HFD οδηγεί σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση διαφόρων υπομονάδων του TIM/TOM και της αναπνευστικής αλυσίδας του iWAT. Ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων του μεταφορέα συνεπάγεται την υπολειτουργία του συμπλόκου και έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων. Λειτουργίες, όπως η β-οξειδωση και ο κύκλος του κιτρικού οξέος, στις οποίες συμμετέχουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, μειώνονται, υποδεικνύοντας την ελαττωμένη ικανότητα του κυττάρου ως προς το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Η περίσσεια λιπαρών οξέων που προσλαμβάνεται από την υπερθερμιδική διαίτα και είναι αδύνατον να μεταβολιστεί, αποθηκεύεται στο

λιποκύτταρο με τη μορφή τριγλυκεριδίων με συνέπεια την αύξηση του μεγέθους του και την επέκταση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των CBS, CSE και MPST στον λιπώδη ιστό φυσιολογικού βάρους και παχύσαρκων μυών. Ελάχιστες μελέτες έχουν δημοσιευθεί όσον αφορά την έκφραση των ενζύμων ενδογενούς παραγωγής υδροθείου σε λιποκύτταρα και ιστούς λίπους. Επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των CSE και CBS έχουν ανιχνευθεί τόσο στον σπλαχνικό λευκό όσο και στον φαιό λιπώδη ιστό των μυών, ωστόσο η παρουσία του MPST σε επίπεδο πρωτεΐνης είχε επικυρωθεί μόνο στον gWAT (Feng et al., 2009; Liu et al., 2018; Yang et al., 2018). Τα ευρήματα που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύουν την ύπαρξη έκφρασης των CBS, CSE και MPST στους ιστούς λευκού (υποδόριου και σπλαχνικού) και φαιού λίπους. Σημειώνεται ότι έκφραση των τριών ενζύμων βιοσύνθεσης υδροθείου έχει ανιχνευθεί επίσης σε 3T3-L1 διαφοροποιημένα λιποκύτταρα (Tsai et al., 2015).

Τα επίπεδα του CSE στους λιπώδεις ιστούς παχύσαρκων πειραματόζων έχουν διερευνηθεί, ωστόσο τόσο αύξηση όσο και μείωση αυτών έχει αναφερθεί (Geng et al., 2013; Liu et al., 2018; Velmurugan et al., 2015). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι χορήγηση υπερθερμιδικής δίαιτας σε ποντίκια οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του MPST στο iWAT, gWAT και iBAT, ενώ η έκφραση των CBS και CSE δεν επηρεάζεται σε κανέναν από τους ιστούς αυτούς. Οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων θα μπορούσαν να οφείλονται στις διαφορές στη σύσταση της δίαιτας και τη διάρκεια χορήγησης της μεταξύ των μελετών. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι μειωμένη έκφραση του MPST έχει επίσης ανιχνευθεί στο ήπαρ παχύσαρκων μύων, ενώ καμία διαφορά δεν εντοπίζεται

στα επίπεδα του ενζύμου στους πνεύμονες και τους νεφρούς των HFD ζώων (Peh et al., 2014).

Σε συμφωνία με τα ελαττωμένα επίπεδα του MPST στο λιπώδη ιστό μετά τη λήψη υπερθερμιδικής δίαιτας, μειωμένη βρέθηκε και η συγκέντρωση του υδροθείου στους ιστούς iWAT και gWAT των HFD πειραματόζων. Μελέτες αναφέρουν ότι ο φαινότυπος παχυσαρκίας συνδέεται επιπροσθέτως με χαμηλότερα επίπεδα του αέριου διαβιβαστή στο αίμα. Η παρατήρηση αυτή δεν αντικατοπτρίζει μόνο την ελαττωμένη παραγωγή H₂S στον λιπώδη ιστό, αλλά και στο καρδιαγγειακό σύστημα, το ήπαρ, τους πνεύμονες και τους νεφρούς (Barr et al., 2015; Geng et al., 2013; Jenkins et al., 2016). Επιπροσθέτως, δεδομένου ότι η αύξηση σωματικού βάρους συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα ROS αλλά και του ότι το υδρόθειο μεταβολίζεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα μειωμένα επίπεδα του κατά την παχυσαρκία πιθανώς να είναι συνέπεια της συνύπαρξης ελαττωμένης παραγωγής και αυξημένου καταβολισμού (Fernández-Sánchez et al., 2011; Ruskovska and Bernlohr, 2013; Stein and Bailey, 2013; Suzuki et al., 2011).

Την παρατήρηση των ελαττωμένων επιπέδων έκφρασης του MPST στον λιπώδη ιστό παχύσαρκων μυών, ακολούθησε σειρά πειραμάτων με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου αυτού στην αύξηση σωματικού βάρους. Τα *Mpst*^{-/-} ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν ως in vivo μοντέλο μελέτης του ενζύμου. Συγγενή ανεπάρκεια ή έλλειψη του MPST στον άνθρωπο έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση της ασθένειας mercaptolactate-cysteine disulfiduria. Πρόκειται για κληρονομική μεταβολική διαταραχή που σχετίζεται με μη φυσιολογική συμπεριφορά, νοητική καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και ψυχικές διαταραχές (Crawhall et al., 1968). Τα *Mpst*^{-/-} ποντίκια αναφέρεται ότι εμφανίζουν αυξημένο άγχος που εκδηλώνεται μέσω της συμπεριφοράς τους (Nagahara et al., 2013). Ο φαινότυπος των συγκεκριμένων μυών έχει επίσης μελετηθεί στο καρδιαγγειακό σύστημα με έλλειψη του ενζύμου υπό φυσιολογικές συνθήκες να μην φαίνεται να επηρεάζει τις κύριες λειτουργίες

αυτού (Peleli et al., 2020). Κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση του σωματικού βάρους, των *Mpst^{-/-}* μυών σε σύγκριση με τα WT που εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη σουλφοτρανσφεράση του θειοθειικού (thiosulfate sulfurtransferase, TST), η οποία παρουσιάζει υψηλού ποσοστού ομολογία με την MPST υποστηρίζεται επίσης ότι ασκεί θετική δράση έναντι της παχυσαρκίας (Morton et al., 2016). Επιπροσθέτως, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα *Mpst^{-/-}* ποντίκια, υπερέκφραση του CBS σε αρουραίους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας, συνεπάγεται μείωση του σωματικού τους βάρους (Zheng et al., 2018). Τα ευρήματα ωστόσο μελετών που χρησιμοποιούν γενετική απαλοιφή ή φαρμακολογική αναστολή του CSE με ταυτόχρονη χορήγηση HFD οδηγούν σε μικρότερη ή καμία διαφορά στην αύξηση σωματικού βάρους, υποδεικνύοντας την ύπαρξη διαφορετικού ρόλου μεταξύ των CSE και MPST στο μεταβολισμό (Geng et al., 2013; Guo et al., 2019; Mani et al., 2015; Yang et al., 2018). Το αυξημένο σωματικό βάρος των *Mpst^{-/-}* CD μυών που παρατηρήθηκε κατά τη γήρανση παρέχει επιπλέον απόδειξη για την ύπαρξη ισχυρής συσχέτισης μεταξύ του ρόλου του MPST και της παθογένειας της παχυσαρκίας.

Η εκδήλωση διαβήτη θεωρείται ως μία από τις πιο συνηθισμένες συνέπειες αυτής (Chobot et al., 2018). Ο ρόλος του MPST στην ομοίωση της γλυκόζης δεν είχε διερευνηθεί έως σήμερα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω υποστηρίζουν την ύπαρξη υψηλότερων επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης και αυξημένης αντίστασης σε αυτές στα *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια. Υπερέκφραση του CBS σε αρουραίους που έλαβαν υπερθερμιδική διαίτα οδήγησε σε βελτιωμένη ευαισθησία στη γλυκόζη και την ινσουλίνη (Zheng et al., 2018). Τα ευρήματα μελετών που εξετάζουν τον ρόλο του ενδογενώς παραγομένου από το CSE υδροθείου στην ανάπτυξη φαινοτύπου διαβήτη κατά την παχυσαρκία δεν είναι ξεκάθαρα. Απαλοιφή του *Cse* σε μύες που κατανάλωσαν HFD αναφέρεται ότι προκαλεί μειωμένη

αντίσταση στη γλυκόζη (Okamoto et al., 2013). Τα αποτελέσματα άλλης ομάδας ερευνητών υποστηρίζουν το αντίθετο (Guo et al., 2019). Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με έλλειψη του CSE που χρησιμοποιούνται στα δύο δημοσιευμένα άρθρα που αφορούν τις αντίστοιχες μελέτες είναι διαφορετικά. Φαρμακολογική αναστολή του CSE με τη χρήση PAG σε HFD αναφέρεται ότι οδηγεί σε βελτίωση της ευαισθησίας στη γλυκόζη και την ινσουλίνη (Geng et al., 2013).

Η επαγωγική δράση της έλλειψης δραστηριότητας του MPST στη συσσώρευση λιπιδίων των λευκών λιποκυττάρων που εντοπίζονται υποδόρια υπό συνθήκες υπολειπουργίας του μεταβολισμού, αποδεικνύεται στη συγκεκριμένη μελέτη με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις: *Mpst^{-/-}* HFD ποντίκια, γηρασμένα *Mpst^{-/-}* CD ποντίκια και *in vitro* με τη χρήση του φαρμακολογικού αναστολέα του ενζύμου και συμπληρώματος λιπαρών οξέων. Ο ρόλος του MPST στη φυσιολογία του λιπώδους ιστούς δεν είχε αποτελέσει αντικείμενο έρευνας έως σήμερα, επομένως όσα δεδομένα υπάρχουν για την επίδραση του ενδογενώς παραγόμενου υδροθείου σε αυτή προέχονται από μελέτες του ρόλου των CBS και CSE. Υπερέκφραση του CBS σε αρουραίους κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας έχει συσχετιστεί με μειωμένη μάζα του λευκού λιπώδους ιστού (Zheng et al., 2018). Σε ποντίκια απαλοιφή του CSE σε HFD έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε μείωση της μάζας και του μεγέθους λιποκυττάρων του gWAT, ωστόσο άλλη μελέτη υποστηρίζει την αύξηση της εναπόθεσης λίπους στον ίδιο ιστό (Guo et al., 2019; Yang et al., 2018). Χορήγηση PAG προκαλεί ελάττωση στο βάρος των iWAT και gWAT παχύσαρκων μυών (Geng et al., 2013). *In vitro*, ο ρόλος του ενδογενώς παραγόμενου υδροθείου έχει εξεταστεί μόνο στα 3T3-L1 κύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους σε λιποκύτταρα. Τα κυριότερα ευρήματα των μελετών αυτών υποστηρίζουν, αυξημένη συσσώρευση λίπους μετά από αποσιώπηση του *Cbs* ή υπερέκφραση του *Cse* και μειωμένη μετά από αποσιώπηση του *Cse* ή έκθεση σε PAG (Cai et al., 2016; Comas et al., 2020; Yang et al., 2018).

Αν και τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα με αυτά της παρούσας μελέτης αφού προέρχονται από άλλο κυτταρικό τύπο και οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιούνται κυρίως κατά την διαφοροποίηση, υποδεικνύουν παρόμοια δράση των CBS και MPST στην επέκταση των λιποσταγονιδίων.

Αύξηση στο βάρος και στην εναπόθεση λιπιδίων παρατηρήθηκε επίσης στο ήπαρ των *Mpst^{-/-}* HFD και γηρασμένων *Mpst^{-/-}* CD μυών. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με την επαγωγή της συσσώρευσης λίπους στο λευκό λιπώδη ιστό, το αυξημένο βάρος και τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη αυτών, αφού η εκδήλωση στεάτωσης συνδέεται συχνά με τον φαινότυπο της παχυσαρκίας (Samuel et al., 2004). Πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι μείωση των επιπέδων του MPST με τη χρήση είτε αδενοϊού είτε ετερόζυγων *Mpst^{+/-}* μυών βελτιώνει τον φαινότυπο στεάτωσης που προκαλείται από τη λήψη HFD. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται από την έλλειψη του ενζύμου σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων παρουσία λιπαρών οξέων. Στην ίδια μελέτη, αναφέρεται ότι μείωση του MPST οδηγεί σε αυξημένα και όχι μειωμένα επίπεδα υδροθείου. Η συγκεκριμένη ομάδα υποστηρίζει ότι ο φαινότυπος βελτιωμένης εναπόθεσης λίπους στο ήπαρ καθώς επίσης και η αύξηση της συγκέντρωσης του H₂S στα ζώα με έλλειψη MPST, οφείλεται στην παρουσία υψηλότερων επιπέδων έκφρασης του CSE, παρέχοντας αποδείξεις για την αλληλεπίδραση των δύο ενζύμων στα ηπατοκύτταρα (Li et al., 2017). Σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικό γενετικό μοντέλο *Mpst^{-/-}* μυών και διαφορετική διάρκεια χορήγησης διαίτας από ότι στα πειράματα που παρουσιάζουμε παραπάνω. Όσον αφορά το ρόλο του CSE στη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, παρά τα αντίθετα αποτελέσματα που υποστηρίζονται σχετικά με την αύξηση βάρους και την ευαισθησία στη γλυκόζη των *Cse^{-/-}* HFD μυών, οι ερευνητικές ομάδες φαίνεται να συμφωνούν στο ότι τα συγκεκριμένα ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένη εναπόθεση λίπους στο ήπαρ (Guo et al., 2019; Mani et al., 2015).

Πολλές δημοσιευμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι αυξημένη κατανάλωση τροφής οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης οξειδωτικού στρες και φλεγμονής (Fernández-Sánchez et al., 2011; Gao et al., 2010; Sutherland et al., 2008; Valerio et al., 2006). Η αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη φλεγμονής, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων της αναπνευστικής αλυσίδας, η μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων και οι μειωμένες μιτοχονδριακές λειτουργίες, που παρατηρούνται στα *Mpst*^{-/-} HFD ποντίκια βρίσκονται σε συμφωνία με τις μελέτες αυτές. Η μειωμένη έκφραση των υπομονάδων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που παρατηρείται στους υπό μελέτη μύες υποστηρίζεται από τα ευρήματα δημοσιευμένων μελετών που συνδέουν τον φαινότυπο της παχυσαρκίας με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα (Fischer et al., 2015; Heinonen et al., 2015). Μειωμένα επίπεδα υπομονάδων του TOM έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια των λιποκυττάρων ασθενών με διαβήτη τύπου 2 ενώ η ύπαρξη μεταβολών των TIM/TOM υπομονάδων κατά την αύξηση σωματικού βάρους δεν έχει διερευνηθεί (Gómez-Serrano et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη αποδεικνύουμε την ύπαρξη ελαττωμένης έκφρασης των *Tomm6*, *Tomm7*, *Tomm40l*, *Tomm34*, *Timm17b*, *Timm50*, *Timm8b*, *Timm13*, και *Pam16* στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των *Mpst*^{-/-} HFD. Η σημαντικότητα της παρατήρησης αυτής για την λειτουργία του TIM/TOM complex υποστηρίζεται από την μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών εντός των μιτοχονδρίων του iWAT των υπό μελέτη μυών.

Ο ρόλος του TIM/TOM στην φυσιολογία του λιπώδους ιστούς και στην συσσώρευση λίπους δεν έχει διερευνηθεί. Σε συμφωνία με τα ευρήματα που παρουσιάζουμε, πρόσφατη έρευνα αναφέρει την ύπαρξη μειωμένης εισαγωγής πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια παχύσαρκων μυών, ωστόσο η ελαττωμένη εισαγωγή σχετίζεται με φραγή του πόρου και δεν εξετάζεται η

συμμετοχή της παρατήρησης αυτής στην επέκταση του λιπώδους ιστού (An et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη αποδεικνύουμε ότι η ταυτόχρονα μειωμένη γονιδιακή έκφραση συνδυασμού TIM/TOM υπομονάδων που παρατηρείται στα *Mpst^{-/-}* HFD είναι ικανή να προκαλέσει αυξημένη συσσώρευση λίπους στα λιποκύτταρα του iWAT, παρουσία FA. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν επιπροσθέτως την σημαντικότητα των TOMM7 και TOMM40L τόσο για τη λειτουργικότητα του συμπλέγματος όσο και για την εναπόθεση λίπους, αφού μείωση της γονιδιακής έκφρασης έστω και μίας υπομονάδας εξ' αυτών, είναι ικανή να επάγει περεταίρω την προκαλούμενη από FA συσσώρευση λιπιδίων. Η σημαντικότητα των υπομονάδων που συγκρατούν το συμπλόκο TOM στη μεταφορά των πρωτεϊνών ενισχύεται από το γεγονός ότι αν και τουλάχιστον πέντε διαφορετικές κατηγορίες πρόδομων πρωτεϊνών που ακολουθούν διαφορετική πορεία μεταφοράς κατά την εισαγωγή τους εντός των μιτοχονδρίων έχουν αναφερθεί, κοινή πρώτη πύλη εισόδου για την πλειοψηφία αυτών αποτελεί ο μεταφορέας της εξωτερικής μεμβράνης (Schmidt et al., 2010). Το TOMM40L αποτελεί ισομορφή του TOMM40 (Kinoshita et al., 2007). Υποέκφραση του *Tomm40* οδηγεί σε μειωμένη εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (Billing et al., 2011; Gottschalk et al., 2014). Το TOMM7 συμμετέχει στη συνοχή και σταθερότητα του TOM και υποστηρίζεται ότι δρα συμπληρωματικά με την υπομονάδα TOMM6 (Hönlinger et al., 1996). Ο ακριβής ρόλος του στη μεταφορά πρωτεϊνών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και τόσο αύξηση όσο και μείωση αυτής παρουσίας μειωμένων επιπέδων της συγκεκριμένης υπομονάδας έχει αναφερθεί (Hönlinger et al., 1996; Shi et al., 2018; Yamano et al., 2010). Η σύνδεση μεταξύ μειωμένης λειτουργίας του TIM/TOM και αυξημένης συσσώρευσης λίπους υποστηρίζεται στην παρούσα μελέτη και με τη χρήση των φαρμακολογικών αναστολέων αυτού M12 και M6 (Dabir et al., 2013; Miyata et al., 2014).

Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που με *in vitro* προσεγγίσεις μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης διαφόρων υπομονάδων του TIM/TOM αποδεικνύουν τη σημαντικότητα αυτής για τη λειτουργία του μεταφορά, ο τρόπος ενδογενούς ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που τον συγκροτούν δεν έχει μελετηθεί. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε υποδεικνύουν την κατασταλτική δράση του HIF1α στην έκφραση των *Tom6*, *Tom7* στα λιποκύτταρα. Αποδεικνύουν επιπροσθέτως ότι τα *Mpst^{-/-}* HFD χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντά 1α στους πυρήνες των κυττάρων του iWAT και επιβεβαιώνουν την πρόσδεση του HIF1α στους υποκινητές των *Tom6*, *Tom7* στον συγκεκριμένο ιστό.

Πρόσδεση του HIF1α ανιχνεύθηκε επίσης στις εγγύς περιοχές μεταγραφής των *Cox14*, *Ndufv1*, και *Atp5g1* στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των *Mpst^{-/-}* HFD ποντικών. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στο iWAT των υπό μελέτη μυών βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα ερευνών που υποστηρίζουν την ύπαρξη κατασταλτικής δράσης του HIF1α στις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (Okamoto et al., 2017; Soro-Arnaiz et al., 2016).

Η εμπλοκή του HIF1α στην εκδήλωση του μεταβολικού φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD υποστηρίζεται επίσης από επιστημονικές εργασίες που αναφέρουν ότι επαγωγή αυτού οδηγεί σε επιδείνωση της προκαλούμενης από την παχυσαρκία φλεγμονής και αντίστασης στην ινσουλίνη, ενώ η έλλειψη του μειώνει την εναπόθεση λίπους και την αύξηση σωματικού βάρους και βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη κατά την πρόσληψη υπερθερμιδικής διαίτας (Jiang et al., 2011; Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014, 2019; Zhang et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επαγωγή του HIF1α έχει συσχετισθεί επίσης με την αυξημένη εναπόθεση λίπους που εμφανίζεται κατά τη γήρανση (Soro-Arnaiz et al., 2016). Ο ρόλος του MPST στη ρύθμιση του HIF1α δεν έχει διερευνηθεί, ωστόσο τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης αποδεικνύουν ότι

το ενδογενώς παραγόμενο από το CBS υδρόθειο σουλφυδριλιώνει το ένζυμο υδροξυλάση της προλίνης 2 (prolyl 2 hydroxylase, PHD2) που πυροδοτεί την αποικοδόμηση του HIF1α, αυξάνοντας έτσι την ενεργότητά του. Κατά συνέπεια έλλειψη του CBS οδηγεί σε μείωση της λειτουργίας της PHD2 και σταθεροποίηση του HIF1α (Dey et al., 2020). Στην ίδια κατεύθυνση φαίνεται να είναι και τα αποτελέσματα που προέρχονται από πειραματικές προσεγγίσεις με τη χρήση δοτών υδροθείου και υποστηρίζουν ότι αύξηση των επιπέδων αυτού δρα ανασταλτικά έναντι της ενεργοποίησης του HIF1α (Kai et al., 2012; Wu et al., 2012a).

Η δημιουργία οξειδωτικού στρες στο λευκό λιπώδη ιστό επάγεται κατά την ανάπτυξη του φαινοτύπου της παχυσαρκίας (Masschelin et al., 2020; McMurray et al., 2016). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύουν την ύπαρξη υψηλότερων επιπέδων ROS στον ιστό iWAT των *Mpst^{-/-}* HFD μυών. Η αντιοξειδωτική δράση του MPST έχει υποστηριχθεί και από άλλες επιστημονικές ομάδες (Kimura et al., 2017; Nagahara, 2018; Nagahara et al., 2013) ενώ αυξημένα επίπεδα H₂O₂ έχουν επίσης ανιχνευθεί στην καρδιά των *Mpst^{-/-}* μυών και σε zebrafish με έλλειψη του ενζύμου (Katsouda et al., 2020; Peleli et al., 2020). Δεδομένων των αποτελεσμάτων των μελετών που υποστηρίζουν ότι αύξηση των ROS συνδέεται με αυξημένη ενεργοποίηση του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1α, η επαγωγή της δημιουργίας οξειδωτικού στρες στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό των *Mpst^{-/-}* HFD μυών θα μπορούσε πιθανόν να εμπλέκεται στον αυξημένο πυρηνικό εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα που παρατηρείται (Bonello et al., 2007; Chandel et al., 2000; Mansfield et al., 2005).

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η χρησιμότητα των ευρημάτων που προέκυψαν από τη μελέτη του μεταβολικού φαινοτύπου των *Mpst^{-/-}* HFD στη θεραπεία της παχυσαρκίας. Χορήγηση SG1002 αναστρέφει τον φαινότυπο παχύσαρκων ποντικών, μειώνει την

συσσώρευση λίπους στον iWAT και βελτιώνει τις δυσμενείς συνέπειες που εμφανίζονται κατά την παχυσαρκία. Η θετική δράση της αύξησης των επιπέδων του υδροθείου έναντι της αύξησης σωματικού βάρους που παρατηρείται κατά τη λήψη υπερθερμιδικής διαίτας επιβεβαιώθηκε επιπροσθέτως με τη χρήση του δότη Na_2S_3 . Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση του δότη NaHS. Χορήγηση αυτού σε παχύσαρκους μύες οδηγεί σε μείωση της επαγόμενης από HFD αύξησης του σωματικού βάρους ωστόσο παρόμοια μελέτη σε αρουραίους αναφέρει τη μη ύπαρξη μεταβολής (Gomez et al., 2019; Sun et al., 2015; Wu et al., 2015, 2016). Οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στο ρόλο του δότη στην εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, στην δημιουργία ίνωσης στους νεφρούς και σε διάφορες παραμέτρους της ορθής λειτουργίας της καρδιάς, ωστόσο σε καμία από αυτές δεν εξετάζεται η επίδραση του NaHS στην παρατηρούμενη επέκταση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού κατά την παχυσαρκία (Gomez et al., 2019; Sun et al., 2015; Wu et al., 2015, 2016). Χορήγηση GYY4137 κατά τη λήψη HFD δεν οδηγεί σε αλλαγές στο σωματικό βάρος σύμφωνα με δημοσιευμένη μελέτη (Geng et al., 2013). Ωστόσο η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα εξετάζει τη δράση του δότη στο μοντέλο πρόληψης και όχι σε μοντέλο θεραπείας της παχυσαρκίας αφού η χορήγηση του ξεκινά από την πρώτη ημέρα λήψης της υπερθερμιδικής διαίτας. Ταυτόχρονη λήψη SG1002 και HFD έχει αναφερθεί από μία μόνο ερευνητική ομάδα έως σήμερα, ωστόσο στη συγκεκριμένη μελέτη χορηγείται HFD με 60% περιεκτικότητα σε λίπος και για διάστημα 24 εβδομάδων. Η λήψη 60% HFD απέχει από τη συνήθη ανθρώπινη υπερθερμιδική διαίτα. Η μελέτη αυτή επιπροσθέτως εστιάζει σε παραμέτρους της ορθής λειτουργίας της καρδιάς ενώ δεν διερευνάται η δράση του δότη στη φυσιολογία του λιπώδους ιστού (Barr et al., 2015). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι χρήση του SG1002 έχει πραγματοποιηθεί σε κλινικές μελέτες φάσης I για την καρδιακή ανεπάρκεια (Polhemus et al., 2015).

Συγκεντρωτικά, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάζεται για πρώτη φορά ο ρόλος του ενζύμου MPST στην φυσιολογία του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού και στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Αποδεικνύεται η καταλυτική σημασία της ορθής λειτουργίας του μιτοχονδριακού μεταφορέα πρωτεϊνών για την αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων και κατά συνέπεια την αποφυγή εμφάνισης αυξημένης συσσώρευσης λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Παρουσιάζεται ένας νέος τρόπος ρύθμισης της λειτουργίας του TIM/TOM που σχετίζεται με την έκφραση των υπομονάδων του και αποδεικνύεται η θετική δράση του SG1002 έναντι της παχυσαρκίας και των δυσμενών συνεπειών που σχετίζονται με αυτή. Όλα τα παραπάνω ευρήματα, υποδεικνύουν το MPST/H₂S και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα μιτοχόνδρια που ρυθμίζονται από αυτό ως νέους υποψήφιους στόχους για τη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης στον λιπώδη ιστό και την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας.

6. Βιβλιογραφία

Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013). Ppar γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* *19*, 557–566.

Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Müller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J., and Offermanns, S. (2010). An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metab.* *11*, 311–319.

An, Y.A., Crewe, C., Asterholm, I.W., Sun, K., Chen, S., Zhang, F., Shao, M., Funcke, J.B., Zhang, Z., Straub, L., et al. (2019). Dysregulation of amyloid precursor protein impairs adipose tissue mitochondrial function and promotes obesity. *Nat. Metab.* *1*, 1243–1257.

Arch, J.R.S. (2002). β 3-adrenoceptor agonists: Potential, pitfalls and progress. *Eur. J. Pharmacol.* *440*, 99.

Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C.T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., Giannis, A., Szabo, C., Spyroulias, G.A., and Papapetropoulos, A. (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *Br. J. Pharmacol.* *169*, 922–932.

Azzu, V., and Valencak, T.G. (2017). Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review. *Gerontology* *63*, 327–336.

Azzu, V., Vacca, M., Virtue, S., Allison, M., and Vidal-Puig, A. (2020). Adipose Tissue-Liver Cross Talk in the Control of Whole-Body Metabolism: Implications in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *158*, 1899–1912.

Banerjee, R., and Zou, C.G. (2005). Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine- β - synthase: A PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* *433*, 144–156.

- Barr, L.A., Shimizu, Y., Lambert, J.P., Nicholson, C.K., and Calvert, J.W. (2015). Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* *46*, 145–156.
- Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 24–36.
- Becker, M., Siems, W.E., Kluge, R., Gembardt, F., Schultheiss, H.P., Schirner, M., and Walther, T. (2010). New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late-onset obesity. *PLoS One* *5*, 1–8.
- Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J.M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Dev.* *140*, 3939–3949.
- Bhattacharyya, S., Saha, S., Giri, K., Lanza, I.R., Nair, K.S., Jennings, N.B., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Basal, E., Weaver, A.L., et al. (2013). Cystathionine Beta-Synthase (CBS) Contributes to Advanced Ovarian Cancer Progression and Drug Resistance. *PLoS One* *8*, e79167.
- Billing, O., Kao, G., and Naredi, P. (2011). Mitochondrial function is required for secretion of DAF-28/insulin in *C. elegans*. *PLoS One* *6*, e14507.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S., and Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.* *36*, 1211–1226.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* *9*, 42–49.
- Bonello, S., Zähringer, C., BelAiba, R.S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., and Görlach, A. (2007). Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 755–761.

Brancaleone, V., Roviezzo, F., Vellecco, V., De Gruttola, L., Bucci, M., and Cirino, G. (2008). Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br. J. Pharmacol.* *155*, 673–680.

Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., Roviezzo, F., Brancaleone, V., and Cirino, G. (2010). Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1998–2004.

Bucci, M., Vellecco, V., Cantalupo, A., Brancaleone, V., Zhou, Z., Evangelista, S., Calderone, V., Papapetropoulos, A., and Cirino, G. (2014). Hydrogen sulfide accounts for the peripheral vascular effects of zofenopril independently of ACE inhibition. *Cardiovasc. Res.* *102*, 138–147.

Cai, J., Shi, X., Wang, H., Fan, J., Feng, Y., Lin, X., Yang, J., Cui, Q., Tang, C., Xu, G., et al. (2016). Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1861*, 419–429.

Campos-Sandoval, J.A., Redondo, C., Kinsella, G.K., Pal, A., Jones, G., Eyre, G.S., Hirst, S.C., and Findlay, J.B.C. (2011). Fenretinide derivatives act as disrupters of interactions of serum retinol binding protein (sRBP) with transthyretin and the sRBP receptor. *J. Med. Chem.* *54*, 4378–4387.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.

La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 371–379.

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* *275*, 25130–

25138.

Chao, C., Bohannon, F.J., Mrazek, A., Coletta, C., Szabo, C., and Hellmich, M.R. (2014). P19 Cysthionine-β-synthetase inhibition in combination with standard-chemotherapy decreases colorectal cancer metastasis to the liver. *Nitric Oxide* 39, Pages S21-S22.

Chattopadhyay, M., Kodela, R., Nath, N., Dastagirzada, Y.M., Velázquez-Martínez, C.A., Boring, D., and Kashfi, K. (2012). Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of human cancer cells: A general property and evidence of a tissue type-independent effect. *Biochem. Pharmacol.* 83, 715–722.

Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738–749.

Chen, B.H., Song, Y., Ding, E.L., Roberts, C.K., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., Gaziano, J.M., and Liu, S. (2009). Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: Results from two prospective cohorts. *Diabetes Care* 32, 329–334.

Chen, Y.H., Yao, W.Z., Geng, B., Ding, Y.L., Lu, M., Zhao, M.W., and Tang, C.S. (2005). Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest* 128, 3205–3211.

Chobot, A., Górowska-Kowolik, K., Sokołowska, M., and Jarosz-Chobot, P. (2018). Obesity and diabetes—Not only a simple link between two epidemics. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 34, e3042.

Choi, S.M., Tucker, D.F., Gross, D.N., Easton, R.M., DiPilato, L.M., Dean, A.S., Monks, B.R., and Birnbaum, M.J. (2010). Insulin Regulates Adipocyte Lipolysis via an Akt-Independent Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5009–5020.

Chouchani, E.T., Kazak, L., and Spiegelman, B.M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 29, 27–37.

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., et al. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9161–9166.

Coletta, C., Módis, K., Szczesny, B., Brunyánszki, A., Oláh, G., Rios, E.C.S., Yanagi, K., Ahmad, A., Papapetropoulos, A., and Szabo, C. (2015). Regulation of vascular tone, angiogenesis and cellular bioenergetics by the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/H₂S pathway: Functional impairment by hyperglycemia and restoration by dl- α -lipoic acid. *Mol. Med.* *21*, 1–14.

Comas, F., Latorre, J., Ortega, F., Oliveras-Cañellas, N., Lluch, A., Ricart, W., Fernández-Real, J.M., and Moreno-Navarrete, J.M. (2020). Permanent cystathionine- β -Synthase gene knockdown promotes inflammation and oxidative stress in immortalized human adipose-derived mesenchymal stem cells, enhancing their adipogenic capacity. *Redox Biol.* *42*, 101668.

Connolly, E., Nanberg, E., and Nedergaard, J. (1986). Norepinephrine-induced Na⁺ influx in brown adipocytes is cyclic AMP-mediated. *J. Biol. Chem.* *261*, 14377–14385.

Considine, R. V. (2001). Regulation of Leptin Production. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *2*, 357–363.

Crawhall, J.C., Parker, R., Sneddon, W., Young, E.P., Ampola, M.G., Efron, M.L., and Bixby, E.M. (1968). Beta mercaptolactate-cysteine disulfide: Analog of cystine in the urine of a mentally retarded patient. *Science (80-)*. *160*, 419–420.

Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B., and Möller, M.N. (2012). Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes. *PLoS One* *7*, e34562.

Cummins, E.P., and Taylor, C.T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *450*, 363–371.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.

Dabir, D. V., Hasson, S.A., Setoguchi, K., Johnson, M.E., Wongkongkathep, P., Douglas, C.J., Zimmerman, J., Damoiseaux, R., Teitell, M.A., and Koehler, C.M. (2013). A small molecule inhibitor of redox-regulated protein translocation into mitochondria. *Dev. Cell* 25, 81–92.

Dey, A., Prabhudesai, S., Zhang, Y., Rao, G., Thirugnanam, K., Hossen, M.N., Dwivedi, S.K.D., Ramchandran, R., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2020). Cystathione β -synthase regulates HIF-1 α stability through persulfidation of PHD2. *Sci. Adv.* 6, 1–15.

Dongó, E., Hornyák, I., Benko, Z., and Kiss, L. (2011). The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury (Review). *Acta Physiol. Hung.* 98, 369–381.

E., D., A.M., R., S.F., B., A.L., S., D.J., P., R.K., T., D.J., L., and T.T., G. (2016). The novel H₂S pro-drug, SG-1002, preserves coronary artery vascular reactivity in the setting of critical limb ischemia in swine. *Circulation* 134, A19028–A19028.

Ereno-Orbea, J., Majtan, T., Oyenarte, I., Kraus, J.P., and Martinez-Cruz, L.A. (2014). Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine β -synthase by S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 16, E3845-52.

Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T., and Kimura, H. (2002). Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1485–1488.

Faller, S., Ryter, S.W., Choi, A.M.K., Loop, T., Schmidt, R., and Hoetzel, A. (2010). Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung

injury. *Anesthesiology* 113, 104–115.

Fedorenko, A., Lishko, P. V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400–413.

Feng, X., Chen, Y., Zhao, J., Tang, C., Jiang, Z., and Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 153–159.

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., and Morales-González, J.A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3117–3132.

Fischer, B., Schöttl, T., Schempp, C., Fromme, T., Hauner, H., Klingenspor, M., and Skurk, T. (2015). Inverse relationship between body mass index and mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in human subcutaneous adipocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 309, E380-7.

Forest, C., Tordjman, J., Glorian, M., Duplus, E., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G., and Antoine, B. (2003). Fatty acid recycling in adipocytes: A role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. In *Biochemical Society Transactions*, pp. 1125–1129.

Fu, M., Zhang, W., Wu, L., Yang, G., Li, H., and Wang, R. (2012). Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2943–2948.

Furuhashi, M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489–503.

Gadalla, M.M., and Snyder, S.H. (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.* 149, 101–109.

Gao, C.L., Zhu, C., Zhao, Y.P., Chen, X.H., Ji, C.B., Zhang, C.M., Zhu, J.G.,

Xia, Z.K., Tong, M.L., and Guo, X.R. (2010). Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 25–33.

Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Gong, Y., Yang, J., Cui, Q. hua, Tang, C., et al. (2013). Increase or Decrease Hydrogen Sulfide Exert Opposite Lipolysis, but Reduce Global Insulin Resistance in High Fatty Diet Induced Obese Mice. *PLoS One* 8, 1–11.

Gómez-Serrano, M., Camafeita, E., López, J.A., Rubio, M.A., Bretón, I., García-Consuegra, I., García-Santos, E., Lago, J., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., et al. (2017). Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol.* 11, 415–428.

Gomez, C.B., de la Cruz, S.H., Medina-Terol, G.J., Beltran-Ornelas, J.H., Sánchez-López, A., Silva-Velasco, D.L., and Centurión, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 863, 172707.

Gonzalez, F.J., Xie, C., and Jiang, C. (2018). The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 21–32.

Gottschalk, W.K., Lutz, M.W., He, Y.T., Saunders, A.M., Burns, D.K., Roses, A.D., and Chiba-Falek, O. (2014). The Broad Impact of TOM40 on Neurodegenerative Diseases in Aging. *J. Park. Dis. Alzheimer's Dis.* 1, 12.

Graham, T.E., and Kahn, B.B. (2007). Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. In *Hormone and Metabolic Research*, pp. 717–721.

Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783–809.

Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Stepan, C.M., and Lazar, M.A. (2002). A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic

agents. *Nat. Med.* 8, 1122–1128.

Guo, W., Li, D., You, V., Li, W., Hu, B., Zhang, S., Miao, L., Xian, M., Zhu, Y., and Shen, X. (2019). Cystathionine γ -lyase deficiency aggravates obesity-related insulin resistance via FoxO1-dependent hepatic gluconeogenesis. *FASEB J.* 33, 4212–4224.

Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z. V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., et al. (2009). Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4467–4483.

Hanaoka, K., Sasakura, K., Suwanai, Y., Toma-Fukai, S., Shimamoto, K., Takano, Y., Shibuya, N., Terai, T., Komatsu, T., Ueno, T., et al. (2017). Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H₂S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci. Rep.* 7, 40227.

Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *Lancet* 366, 1197–1209.

Heinonen, S., Buzkova, J., Muniandy, M., Kaksonen, R., Ollikainen, M., Ismail, K., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Lundbom, N., Vuolteenaho, K., et al. (2015). Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes* 64, 3135–3145.

Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schön, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333–338.

Hernandez, T.L., Kittelson, J.M., Law, C.K., Ketch, L.L., Stob, N.R., Lindstrom, R.C., Scherzinger, A., Stamm, E.R., and Eckel, R.H. (2011). Fat redistribution following suction lipectomy: Defense of body fat and patterns of restoration. *Obesity* 19, 1388–1395.

Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Dixon, R.M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J.A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., et al. (1999). Recombinant

leptin for weight loss in obese and lean adults: A randomized, controlled, dose-escalation trial. *J. Am. Med. Assoc.* *282*, 1568–1575.

Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckstuhl, C., Lee, B.C., Brace, L., Longchamp, A., Treviño-Villarreal, J.H., Mejia, P., Ozaki, C.K., et al. (2015). Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* *160*, 132–144.

Hönlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., and Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* *15*, 2125–2137.

Hosoki, R., Matsuki, N., and Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *237*, 527–531.

Iciek, M., Kowalczyk-Pachel, D., Bilska-Wilkosz, A., Kwiecién, I., Górný, M., and Wøodek, L. (2016). S-sulfhydration as a cellular redox regulation. *Biosci. Rep.* *36*, e00304.

Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., and Kimura, H. (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants Redox Signal.* *11*, 205–214.

Jain, S.K., Bull, R., Rains, J.L., Bass, P.F., Levine, S.N., Reddy, S., McVie, R., and Bocchini, J.A. (2010). Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxidants Redox Signal.* *12*, 1333–1337.

Jenkins, T.A., Nguyen, J.C.D., and Hart, J.L. (2016). Decreased vascular H₂S production is associated with vascular oxidative stress in rats fed a high-fat western diet. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* *389*, 783–790.

Jiang, C., Qu, A., Matsubara, T., Chanturiya, T., Jou, W., Gavriloova, O., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2011). Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in

adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 60, 2484–2495.

Kabil, O., and Banerjee, R. (2014). Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 770–782.

Kabil, O., Zhou, Y., and Banerjee, R. (2006). Human cystathionine β-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry* 45, 13528–13536.

Kabil, O., Vitvitsky, V., Xie, P., and Banerjee, R. (2011). The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 363–372.

Kahn, B.B., and Cushman, S.W. (1985). Subcellular translocation of glucose transporters: Role in insulin action and its perturbation in altered metabolic states. *Diabetes. Metab. Rev.* 1, 203–227.

Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, pages 840–846.

Kai, S., Tanaka, T., Daijo, H., Harada, H., Kishimoto, S., Suzuki, K., Takabuchi, S., Takenaga, K., Fukuda, K., and Hirota, K. (2012). Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von Hippel-Lindau-and mitochondria-dependent manner. *Antioxidants Redox Signal.* 16, 203–216.

Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab.* 22, P546-559.

Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., and Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* 272, 27218–27223.

Katsouda, A., Peleli, M., Asimakopoulou, A., Papapetropoulos, A., and Beis, D. (2020). Generation and characterization of a CRISPR/Cas9-induced 3-mst

deficient zebrafish. *Biomolecules* 10, 317.

Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.

Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591.

Kim, J.Y., Van De Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., et al. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 117, 2621–2637.

Kim, Y.W., Kim, J.Y., Park, Y.H., Park, S.Y., Won, K.C., Choi, K.H., Huh, J.Y., and Moon, K.H. (2006). Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. *Diabetes* 55, 716–724.

Kimura, H. (2014a). Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules* 19, 16146–16157.

Kimura, H. (2014b). Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 783–793.

Kimura, H. (2015). Signaling molecules: Hydrogen sulfide and polysulfide. *Antioxidants Redox Signal.* 22, 362–376.

Kimura, Y., Koike, S., Shibuya, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., and Kimura, H. (2017). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. *Sci. Rep.* 7, 10459.

Kinoshita, J.Y., Mihara, K., and Oka, T. (2007). Identification and characterization of a new Tom40 isoform, a central component of mitochondrial outer membrane translocase. *J. Biochem.* 141, 897–906.

Klein, S., Fontana, L., Young, V.L., Coggan, A.R., Kilo, C., Patterson, B.W., and Mohammed, B.S. (2004). Absence of an Effect of Liposuction on Insulin Action and Risk Factors for Coronary Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2549–2557.

Kondo, K., Bhushan, S., King, A.L., Prabhu, S.D., Hamid, T., Koenig, S., Murohara, T., Predmore, B.L., Gojon, G., Wang, R., et al. (2013). H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* *127*, 1116–1127.

Konige, M., Wang, H., and Sztalryd, C. (2014). Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1842*, 393–401.

Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K.M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T., et al. (2012). Dietary obesity-associated hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev.* *26*, 259–270.

Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* *72*, 1150–1162.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* *30*, 294–309.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* *3*, 309–319.

Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011). Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat

stores. *Prog. Lipid Res.* 50, 14–27.

Lebovitz, H.E. (2019). Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. *Curr. Diab. Rep.* 19, 1–13.

Lee, M.J., Wu, Y., and Fried, S.K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 34, 1–11.

Lee, Y.S., Kim, J.W., Osborne, O., Oh, D.Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., et al. (2014). Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 157, 1339–1352.

Lee, Y.S., Riopel, M., Cabrales, P., and Bandyopadhyay, G.K. (2019). Hepatocyte-specific HIF-1 ablation improves obesity-induced glucose intolerance by reducing first-pass GLP-1 degradation. *Sci. Adv.* 5, eaaw4176.

Leininger, G.M., Jo, Y.H., Leshan, R.L., Louis, G.W., Yang, H., Barrera, J.G., Wilson, H., Opland, D.M., Faouzi, M.A., Gong, Y., et al. (2009). Leptin Acts via Leptin Receptor-Expressing Lateral Hypothalamic Neurons to Modulate the Mesolimbic Dopamine System and Suppress Feeding. *Cell Metab.* 10, 89–98.

Li, M.-F. (2011). Rise and fall of anti-obesity drugs. *World J. Diabetes* 2, 19–23.

Li, L., Whiteman, M., Guan, Y.Y., Neo, K.L., Cheng, Y., Lee, S.W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C.H., and Moore, P.K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 117, 2351–2360.

Li, M., Xu, C., Shi, J., Ding, J., Wan, X., Chen, D., Gao, J., Li, C., Zhang, J., Lin, Y., et al. (2017). Fatty acids promote fatty liver disease via the dysregulation of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway. *Gut* 1–12.

Liang, D., Wu, H., Wong, M.W., and Huang, D. (2015). Diallyl Trisulfide Is a Fast H₂S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org. Lett.* *17*, 4196–4199.

Liu, M., Deng, M., Su, J., Lin, Y., Jia, Z., Peng, K., Wang, F., and Yang, T. (2018). Specific downregulation of cystathionine β -synthase expression in the kidney during obesity. *Physiol. Rep.* *6*, 1–9.

Mani, S., Li, H., Yang, G., Wu, L., and Wang, R. (2015). Deficiency of cystathionine gamma-lyase and hepatic cholesterol accumulation during mouse fatty liver development. *Sci. Bull.* *60*, 336–347.

Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., and Simon, M.C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab.* *1*, 393–399.

Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Collen, D., and Roger Lijnen, H. (2002). Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* *51*, 1093–1101.

van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500–1508.

Masschelin, P.M., Cox, A.R., Chernis, N., and Hartig, S.M. (2020). The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Front. Physiol.* *10*, 1638.

Mathis, D. (2013). Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab.* *17*, 851–859.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985b). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in

man. *Diabetologia* 28, 412–419.

Mauer, M.M., Harris, R.B.S., and Bartness, T.J. (2001). The regulation of total body fat: Lessons learned from lipectomy studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 15–28.

McMurray, F., Patten, D.A., and Harper, M.E. (2016). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity* 24, 2301–2310.

Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J.P., and Burkhard, P. (2001). Structure of human cystathionine β -synthase: A unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J.* 20, 3910–3916.

Meng, G., Zhao, S., Xie, L., Han, Y., and Ji, Y. (2018). Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1146–1156.

Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Ogasawara, Y., and Kimura, H. (2011). Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.* 439, 479–485.

Mitidieri, E., Tramontano, T., Gurgone, D., Citi, V., Calderone, V., Brancaleone, V., Katsouda, A., Nagahara, N., Papapetropoulos, A., Cirino, G., et al. (2018). Mercaptopyruvate acts as endogenous vasodilator independently of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 75, 53-59.

Mittendorfer, B., Horowitz, J.F., DePaoli, A.M., McCamish, M.A., Patterson, B.W., and Klein, S. (2011). Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 60, 1474–1477.

Miyata, N., Steffen, J., Johnson, M.E., Fargue, S., Danpure, C.J., and Koehler, C.M. (2014). Pharmacologic rescue of an enzyme-trafficking defect in primary

hyperoxaluria 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14406–14411.

Módis, K., Panopoulos, P., Coletta, C., Papapetropoulos, A., and Szabo, C. (2013). Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 1311–1319.

Módis, K., Ju, Y.J., Ahmad, A., Untereiner, A.A., Altaany, Z., Wu, L., Szabo, C., and Wang, R. (2016). S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol. Res.* *113*, 116–124.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* *387*, 903–908.

Moon, H.S., Dalamaga, M., Kim, S.Y., Polyzos, S.A., Hamnvik, O.P., Magkos, F., Paruthi, J., and Mantzoros, C.S. (2013). Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr. Rev.* *34*, 377–412.

Morton, N.M., Beltram, J., Carter, R.N., Michailidou, Z., Gorjanc, G., McFadden, C., Barrios-Llerena, M.E., Rodriguez-Cuenca, S., Gibbins, M.T.G., Aird, R.E., et al. (2016). Genetic identification of thiosulfate sulfurtransferase as an adipocyte-expressed antidiabetic target in mice selected for leanness. *Nat. Med.* *22*, 771–779.

Muñoz-Sánchez, J., and Chánez-Cárdenas, M.E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* *39*, 556–570.

Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., and Snyder, S.H. (2009). HS signals through protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* *2*, ra72.

Myers, M.G., Heymsfield, S.B., Haft, C., Kahn, B.B., Laughlin, M., Leibel, R.L., Tschöp, M.H., and Yanovski, J.A. (2012). Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance.

Nagahara, N. (2013). Regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase activity via intrasubunit and intersubunit redox-sensing switches. *Antioxidants Redox Signal.* *19*, 1792–1802.

Nagahara, N. (2018). Multiple role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: antioxidative function, H₂S and polysulfide production and possible SO_x production. *Br. J. Pharmacol.* *175*, 577–589.

Nagahara, N., Sreeja, V.G., Li, Q., Shimizu, T., Tsuchiya, T., and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). A point mutation in a silencer module reduces the promoter activity for the human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* *1680*, 176–184.

Nagahara, N., Yoshii, T., Abe, Y., and Matsumura, T. (2007). Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase: An intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation. *J. Biol. Chem.* *282*, 1561-9.

Nagahara, N., Nagano, M., Ito, T., Shimamura, K., Akimoto, T., and Suzuki, H. (2013). Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: A model for human mercaptolactate- cysteine disulfiduria. *Sci. Rep.* *3*, 1986.

Nagy, P. (2015). Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling. In *Methods in Enzymology*, pp. 554:3-29.

Nicholls, P., and Kim, J.K. (1982). Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Can. J. Biochem.* *60*, 613–623.

Nicholls, P., Marshall, D.C., Cooper, C.E., and Wilson, M.T. (2013). Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 1312–1316.

Oh, D.Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E.J., and Olefsky, J.M. (2012). Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* 61, 346–354.

Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., Honma, T., Hamagami, K.I., Matsuda, K., Yamaguchi, M., Tanabe, H., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., et al. (2013). A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493–499.

Okamoto, A., Sumi, C., Tanaka, H., Kusunoki, M., Iwai, T., Nishi, K., Matsuo, Y., Harada, H., Takenaga, K., Bono, H., et al. (2017). HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. *Sci. Rep.* 7, 1–14.

Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., Tohya, K., Ishizaki, T., Niki, I., and Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 227–233.

Osuga, J.I., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., et al. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 787–792.

Palazon, A., Goldrath, A.W., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2014). HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity* 41, 518–528.

Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R., et al. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21972–21977.

Papapetropoulos, A., Whiteman, M., and Cirino, G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: A brief, introductory guide for beginners.

Br. J. Pharmacol. 172, 1633–1637.

Paschen, S.A., Rothbauer, U., Káldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W., and Brunner, M. (2000). The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J.* 19, 6392–6400.

Paul, B.D., Sbodio, J.I., Xu, R., Vandiver, M.S., Cha, J.Y., Snowman, A.M., and Snyder, S.H. (2014). Cystathionine γ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature* 509, 96–100.

Peh, M.T., Anwar, A.B., Ng, D.S.W., Shirhan Bin Mohamed Atan, M., Kumar, S.D., and Moore, P.K. (2014). Effect of feeding a high fat diet on hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in the mouse. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 41, 138–145.

Peleli, M., Bibli, S.I., Li, Z., Chatzianastasiou, A., Varela, A., Katsouda, A., Zukunft, S., Bucci, M., Vellecco, V., Davos, C.H., et al. (2020). Cardiovascular phenotype of mice lacking 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Biochem. Pharmacol.* 176, 113833.

Polhemus, D.J., Li, Z., Pattillo, C.B., Gojon, G., Gojon, G., Giordano, T., and Krum, H. (2015). A Novel Hydrogen Sulfide Prodrug, SG1002, Promotes Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Bioavailability in Heart Failure Patients. *Cardiovasc. Ther.* 33, 216–226.

Preitner, F., Mody, N., Graham, T.E., Peroni, O.D., and Kahn, B.B. (2009). Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E1420-9.

Purdom, T., Kravitz, L., Dokladny, K., and Mermier, C. (2018). Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 15, 3.

Reaven, G.M. (2011). Insulin Resistance: The Link Between Obesity and Cardiovascular Disease. *Med. Clin. North Am.* 95, 875–892.

Reiffenstein, R.J., Hulbert, W.C., and Roth, S.H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *32*, 109–134.

Reilly, S.M., and Saltiel, A.R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 633–643.

Riahi, S., and Rowley, C.N. (2014). Why can hydrogen sulfide permeate cell membranes? *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 15111–15113.

Riordan, N.H., Ichim, T.E., Min, W.P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J.P., Harman, R.J., Patel, A.N., et al. (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* *7*, 1–9.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* *156*, 20–44.

Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* *15*, 659–667.

Roth, J.D., Roland, B.L., Cole, R.L., Trevaskis, J.L., Weyer, C., Koda, J.E., Anderson, C.M., Parkes, D.G., and Baron, A.D. (2008). Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: Evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7257–7262.

Ruskovska, T., and Bernlohr, D.A. (2013). Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *J. Proteomics* *92*, 323–334.

Rutkowski, J.M., Stern, J.H., and Scherer, P.E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* *208*, 501–512.

Saha, S., Chakraborty, P.K., Xiong, X., Dwivedi, S.K.D., Mustafi, S.B., Leigh, N.R., Ramchandran, R., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2016). Cystathionine β -synthase regulates endothelial function via protein S-

sulfhydration. *FASEB J.* 30, 441–456.

Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 279, 32345–53.

Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D.A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* 5, 4099.

Savage, D.B., Sewter, C.P., Klenk, E.S., Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R. V., and O’Rahilly, S. (2001). Resistin / Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome Proliferator - Activated Receptor- γ Action in Humans. *Diabetes* 50, 2199–2202.

Schipper, H.S., Prakken, B., Kalkhoven, E., and Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells: Key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 407–415.

Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 655–667.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.

Shan, X., and Kruger, W.D. (1998). Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat. Genet.* 19, 91–93.

Shen, X., Peter, E.A., Bir, S., Wang, R., and Kevil, C.G. (2012). Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2276–2283.

Shetty, S., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2009). Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies.

Trends Pharmacol. Sci. 30, 234–239.

Shi, D., Qi, M., Zhou, L., Li, X., Ni, L., Li, C., Yuan, T., Wang, Y., Chen, Y., Hu, C., et al. (2018). Endothelial mitochondrial preprotein translocase tomm7-rac1 signaling axis dominates cerebrovascular network homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2665–2677.

Shi, H., Strader, A.D., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2007). The effect of fat removal on glucose tolerance is depot specific in male and female mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, E1012-20.

Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., and Kimura, H. (2009). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 703–714.

Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., and Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* 4, 1366.

Singh, S., and Banerjee, R. (2011). PLP-dependent H₂S biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1814, 1518–1527.

Singh, S., Padovani, D., Leslie, R.A., Chiku, T., and Banerjee, R. (2009). Relative contributions of cystathionine β-synthase and γ-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* 284, 22457–22466.

Soro-Arnaiz, I., Li, Q.O.Y., Torres-Capelli, M., Meléndez-Rodríguez, F., Veiga, S., Veys, K., Sebastian, D., Elorza, A., Tello, D., Hernansanz-Agustín, P., et al. (2016). Role of Mitochondrial Complex IV in Age-Dependent Obesity. *Cell Rep.* 16, 2991–3002.

Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531–543.

Stein, A., and Bailey, S.M. (2013). Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biol.* *1*, 32–39.

Steppan, C.M., and Lazar, M.A. (2004). The current biology of resistin. *J. Intern. Med.* *15*, 150–156.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* *56*, 2910–2918.

Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* *18*, 470–477.

Sun, L., Zhang, S., Yu, C., Pan, Z., Liu, Y., Zhao, J., Wang, X., Yun, F., Zhao, H., Yan, S., et al. (2015). Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *309*, E925–E935.

Sun, Q., Collins, R., Huang, S., Holmberg-Schiavone, L., Anand, G.S., Tan, C.H., Van-den-Berg, S., Deng, L.W., Moore, P.K., Karlberg, T., et al. (2009). Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ -lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *J. Biol. Chem.* *284*, 3076–3085.

Sutherland, L.N., Capozzi, L.C., Turchinsky, N.J., Bell, R.C., and Wright, D.C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: Potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *295*, E1076-83.

Suzuki, K., Olah, G., Modis, K., Coletta, C., Kulp, G., Gerö, D., Szoleczky, P., Chang, T., Zhou, Z., Wu, L., et al. (2011). Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13829–13834.

Szabo, C. (2017). Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide

signaling: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **312**, C3–C15.

Szabo, C. (2018). A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* **149**, 5–19.

Szabo, C., and Papapetropoulos, A. (2017). International union of basic and clinical pharmacology. CII: Pharmacological modulation of H₂S levels: H₂S donors and H₂S biosynthesis inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **69**, 497–564.

Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Módis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., and Hellmich, M.R. (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-β-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12474–12479.

Szabo, C., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., Olah, G., Yanagi, K., and Bouillaud, F. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2099–2122.

Szabó, C., and Papapetropoulos, A. (2011). Hydrogen sulphide and angiogenesis: Mechanisms and applications. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 853–865.

Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 917–935.

Szczesny, B., Módis, K., Yanagi, K., Coletta, C., Le Trionnaire, S., Perry, A., Wood, M.E., Whiteman, M., and Szabo, C. (2014). AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **41**, 120–130.

Szczesny, B., Marcatti, M., Zatarain, J.R., Druzhyina, N., Wiktorowicz, J.E., Nagy, P., Hellmich, M.R., and Szabo, C. (2016). Inhibition of hydrogen sulfide

biosynthesis sensitizes lung adenocarcinoma to chemotherapeutic drugs by inhibiting mitochondrial DNA repair and suppressing cellular bioenergetics. *Sci. Rep.* 6, 36125.

Tang, X.Q., Yang, C.T., Chen, J., Yin, W.L., Tian, S.W., Hu, B., Feng, J.Q., and Li, Y.J. (2008). Effect of hydrogen sulphide on β -amyloid-induced damage in PC12 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 180–186.

Tchernof, A., and Després, J.P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404.

Tchernof, A., Bélanger, C., Morisset, A.S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P., and Dupont, P. (2006). Regional differences in adipose tissue metabolism in women: Minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 55, 1353–1360.

Tchkonia, T., Lenburg, M., Thomou, T., Giorgadze, N., Frampton, G., Pirtskhalava, T., Cartwright, A., Cartwright, M., Flanagan, J., Karagiannides, I., et al. (2007). Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 292, 298–307.

Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17, 644–656.

Tchoukalova, Y.D., Votruba, S.B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Kirkland, J.L., and Jensen, M.D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18226–18231.

Teng, H., Wu, B., Zhao, K., Yang, G., Wu, L., and Wang, R. (2013). Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12679–12684.

Tomita, M., Nagahara, N., and Ito, T. (2016). Expression of 3-

mercaptopyruvate sulfurtransferase in the mouse. *Molecules* 21, 1707.

Tran, T.T., and Kahn, C.R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 195–213.

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol. Rev.* 93, 1–21.

Trayhurn, P. (2014). Hypoxia and adipocyte physiology: Implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 207–236.

Tsai, C.Y., Peh, M.T., Feng, W., Dymock, B.W., and Moore, P.K. (2015). Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. *PLoS One* 10, e0119511.

Turer, A.T., and Scherer, P.E. (2012). Adiponectin: Mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55, 2319–2326.

Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., et al. (2006). TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J. Clin. Invest.* 116, 2791–2798.

Vegiopoulos, A., Müller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Diaz, M.B., Rozman, J., De Angelis, M.H., Nüsing, R.M., et al. (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* (80-.). 328, 1158–1161.

Velmurugan, G. V., Huang, H., Sun, H., Candela, J., Jaiswal, M.K., Beaman, K.D., Yamashita, M., Prakriya, M., and White, C. (2015). Depletion of H₂S during obesity enhances store-operated Ca²⁺ entry in adipose tissue macrophages to increase cytokine production. *Sci. Signal.* 8, ra128.

Villarroya, J., Cereijo, R., and Villarroya, F. (2013). An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 305, E567-72.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T.,

Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.

Vitvitsky, V., Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H.E., and Banerjee, R. (2006). A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J. Biol. Chem.* *281*, 35785–35793.

Wallace, J.L., Caliendo, G., Santagada, V., and Cirino, G. (2010). Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br. J. Pharmacol.* *159*, 1236–1246.

Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* *92*, 791–896.

Wang, P., Zhang, G., Wondimu, T., Ross, B., and Wang, R. (2011). Hydrogen sulfide and asthma. *Exp. Physiol.* *96*, 847–852.

Wang, W., Chen, X., Zhang, L., Yi, J., Ma, Q., Yin, J., Zhuo, W., Gu, J., and Yang, M. (2020). Atomic structure of human TOM core complex. *Cell Discov.* *6*, 67.

Wang, Y., Zhao, X., Jin, H., Wei, H., Li, W., Bu, D., Tang, X., Ren, Y., Tang, C., and Du, J. (2009). Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 173–179.

Weber, W.A. (2004). Brown adipose tissue and nuclear medicine imaging. *J. Nucl. Med.* *45*, 1101–1103.

Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szijártó, I.A., Miljkovic, J.L., Mitrovic, A., Lange, M., Savitsky, S., Yadav, P.K., Torregrossa, R., et al. (2016). Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chem. Sci.* *7*, 3414–3426.

Whiteman, M., Gooding, K.M., Whatmore, J.L., Ball, C.I., Mawson, D.,

Skinner, K., Tooke, J.E., and Shore, A.C. (2010). Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia* 53, 1722–1726.

Whiteman, M., Le Trionnaire, S.L., Chopra, M., Fox, B., and Whatmore, J. (2011). Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: Critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin. Sci.* 121, 459–488.

Wiedemann, N., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2006). Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Cell* 21, 145–148.

Williams, G. (2010). Withdrawal of sibutramine in Europe. *BMJ* 340, c824.

Williams, E.P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P.M., and Wyatt, S.B. (2015). Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr. Obes. Rep.* 331, 166–174.

Woo, Y.C., Xu, A., Wang, Y., and Lam, K.S.L. (2013). Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 78, 489–496.

Wu, B., Teng, H., Yang, G., Wu, L., and Wang, R. (2012a). Hydrogen sulfide inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *Br. J. Pharmacol.* 167, 1492–1505.

Wu, D., Zheng, N., Qi, K., Cheng, H., Sun, Z., Gao, B., Zhang, Y., Pang, W., Huangfu, C., Ji, S., et al. (2015). Exogenous hydrogen sulfide mitigates the fatty liver in obese mice through improving lipid metabolism and antioxidant potential. *Med. Gas Res.* 5, 1–8.

Wu, D., Gao, B., Li, M., Yao, L., Wang, S., Chen, M., Li, H., Ma, C., Ji, A., and Li, Y. (2016). Hydrogen sulfide mitigates kidney injury in high fat diet-induced obese mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2715718.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012b). Beige adipocytes

are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.

Wu, R., Yao, W. zhen, Chen, Y. hong, Geng, B., and Tang, C. shu (2008). Plasma level of endogenous hydrogen sulfide in patients with acute asthma. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 40, 505–508.

Xie, L., Gu, Y., Wen, M., Zhao, S., Wang, W., Ma, Y., Meng, G., Han, Y., Wang, Y., Liu, G., et al. (2016). Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation. *Diabetes* 3171–3184.

Yamano, K., Tanaka-Yamano, S., and Endo, T. (2010). Tom7 regulates Mdm10-mediated assembly of the mitochondrial import channel protein TOM40. *J. Biol. Chem.* 285, 41222–41231.

Yan, Q., Bartz, S., Mao, M., Li, L., and Kaelin, W.G. (2007a). The Hypoxia-Inducible Factor 2 α N-Terminal and C-Terminal Transactivation Domains Cooperate To Promote Renal Tumorigenesis In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2092–2102.

Yan, Q.W., Yang, Q., Mody, N., Graham, T.E., Hsu, C.H., Xu, Z., Houstis, N.E., Kahn, B.B., and Rosen, E.D. (2007b). The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* 56, 2533–2540.

Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., et al. (2008). H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* (80-.). 322, 587–590.

Yang, G., Ju, Y., Fu, M., Zhang, Y., Pei, Y., Racine, M., Baath, S., Merritt, T.J.S., Wang, R., and Wu, L. (2018). Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1863, 165–176.

Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B.B. (2005a). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356–362.

Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., and Wang, R. (2005b). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J. Physiol.* 569, 519–531.

Zanardo, R.C.O., Brancaleone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., Wallace, J.L., Zanardo, R.C.O., Brancaleone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., et al. (2006). Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J.* 20, 2118–2120.

Zhang, X., Lam, K.S.L., Ye, H., Chung, S.K., Zhou, M., Wang, Y., and Xu, A. (2010). Adipose tissue-specific inhibition of hypoxia-inducible factor 1 α induces obesity and glucose intolerance by impeding energy expenditure in mice. *J. Biol. Chem.* 285, 32869–32877.

Zheng, F., Han, J., Lu, H., Cui, C., Yang, J., Cui, Q., Cai, J., Zhou, Y., Tang, C., Xu, G., et al. (2018). Cystathionine beta synthase-hydrogen sulfide system in paraventricular nucleus reduced high fatty diet induced obesity and insulin resistance by brain-adipose axis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1864, 3281–3291.

Zhou, Z., Von Wantoch Rekowski, M., Coletta, C., Szabo, C., Bucci, M., Cirino, G., Topouzis, S., Papapetropoulos, A., and Giannis, A. (2012). Thioglycine and l-thiovaline: Biologically active H₂S-donors. *Bioorganic Med. Chem.* 20, 2675–2678.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* (80-.). 306, 1383–1386.

Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J.B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J.L., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., et al. (2020). Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulfhydration. *Cell Metab.* 30, 1152–1170.



Reduced adipose tissue H₂S in obesity



Antonia Katsouda^{a,b}, Csaba Szabo^c, Andreas Papapetropoulos^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

^b Center of Clinical, Experimental Surgery & Translational Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Greece

^c Department of Anesthesiology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

article info

Article history:

Received 16 September 2017

Accepted 29 September 2017

Available online 2 October 2017

Keywords:

Hydrogen sulfide

Obesity

Cystathionine μ -lyase

Cystathionine β -synthase

3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase

abstract

Hydrogen sulfide (H₂S) is an endogenously produced signaling molecule synthesized by cystathionine μ -lyase (CSE), cystathionine β -synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST). Given that H₂S exerts significant effects on bioenergetics and metabolism, the goal of the current study was to determine the expression of H₂S-producing enzymes in adipose tissues in models of obesity and metabolic disruption. Mice fed a western diet expressed lower mRNA levels of all three enzymes in epididymal fat (EWAT), while only CSE and 3-MST were reduced in brown adipose tissue (BAT). At the protein level 3-MST was reduced in all fat depots studied. Using db/db mice, a genetic model of obesity, we found that CSE, CBS and 3-MST mRNA were reduced in white fat, while only CSE was reduced in BAT. CBS and CSE protein levels were suppressed in all three fat depots. In a model of age-related weight gain, no reduction in the mRNA of any of the enzymes was noted. Smaller amounts of 3-MST protein were found in EWAT, while both CSE and 3-MST were reduced in BAT. Tissue levels of H₂S were lower in WAT in HFD mice; both WAT and BAT contained lower H₂S amounts in db/db animals. Taken together, our data suggest that obesity is associated with a decreased expression of H₂S-synthesizing enzymes and reduced H₂S levels in adipose tissues of mice. We propose that the reduction in H₂S may contribute to the metabolic response associated with obesity. Further work is needed to determine whether restoring H₂S levels may have a beneficial effect on obesity-associated metabolic alterations.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is a multifactorial, chronic disease that is rapidly developing into a 21 century epidemic; more than 2 billion people worldwide are overweight or obese [1]. Apart from its direct impact on quality of life, obesity is linked to a variety of diseases including type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, sleep apnea syndrome and hormone-dependent types of cancer [2,3]. Obesity is defined as excessive body weight for a given height (i.e. increased body mass index, BMI) and is typically accompanied by mild systemic inflammation. BMI reflects total body fat; however, adipose tissue is not homogeneous. Health risks correlate not only with the total amount of fat, but also with the site of fat deposition and the morphology of the adipose tissue. Adipose tissue exists in two main types, white and brown, which differ histologically and functionally. White adipose tissue (WAT) consists of monovacuolar cells that contain a small number of mitochondria [4]. Their main func-

tion is to store energy surplus in the form of triglycerides in their cytoplasmic lipid droplets and release it upon metabolic demand [5]. WAT is found subcutaneously and viscera. Accumulation of WAT has detrimental health sequelae, with visceral WAT expansion being considered more harmful [6]. Brown adipose tissue (BAT) on the other hand, is a highly vascularized, mitochondria-rich tissue that constitutes only a small percentage of body fat [7]. Its main function is non-shivering thermogenesis. Activation of BAT appears to have beneficial effects on obesity, insulin resistance and hyperlipidemia [7]. An additional type of adipocyte, called beige or brite, exists in WAT and can be converted to brown following cold exposure, adrenergic or hormonal stimulation [8]. Beige cells in a permissive environment up regulate uncoupling protein-1, leading to increased heat production from the electron transport chain. Browning of WAT has been proposed to restrict weight gain and reverse metabolic abnormalities [9].

Hydrogen sulfide (H₂S) has recently gained significant attention as a biological mediator [10]; together with nitric oxide and carbon monoxide they comprise the gas transmitter family. H₂S is enzymatically generated by cystathionine μ -lyase (CSE), cystathionine β -synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) [11]. The three H₂S-producing enzymes differ in substrate

*Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, Panepistimiopolis, Zografou, Athens 15771, Greece.

E-mail address: apapapet@pharm.uoa.gr (A. Papapetropoulos).

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.09.023>

1043-6618/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

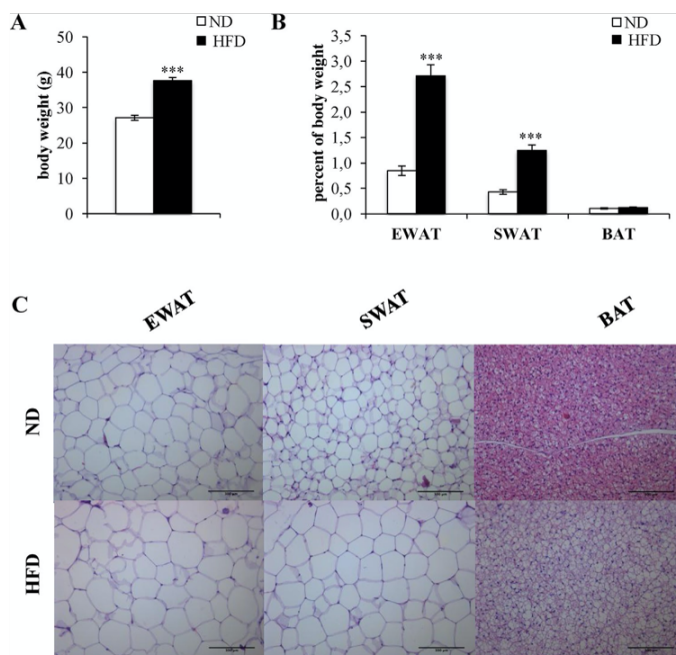


Fig. 1. Body weight, adipose tissue mass and structure after high fat diet. Mice were fed control chow diet (ND; 10% fat) or high fat diet (HFD; 45% fat) over 14–16 weeks. (A) Body weight, and (B) EWAT, SWAT and BAT mass were measured. (C) Representative photomicrographs of EWAT, SWAT and BAT sections stained with haematoxylin and eosin. Data are presented as means \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ vs ND. (A,B) $n = 8$ mice per group, (C) $n = 4$ mice per group. Scale bar: 300 μ m.

utilization, mode of regulation, tissue expression and sub-cellular localization [10,12,13]. H₂S exerts profound effects on metabolism as it inhibits insulin secretion by β -cells [14], affects insulin resistance [15–18] and glucose metabolism [19,20] and serves an endogenous regulator of mitochondrial respiration [21]. Previous studies have demonstrated that H₂S is produced by adipose tissue [15,16]. However, its contribution to adipocyte function remains largely unexplored, with some contradictory reports in the literature [16,22,23]. To gain further insights into the role of H₂S in adipose tissue biology, we studied three different models of obesity and determined alterations in the expression of CSE, CBS and 3-MST in white and brown adipose tissues.

2. Materials and methods

2.1. Animal studies

Six-week-old male C57Bl/6J mice were provided by the animal facilities of the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA). *db/db* mice were also bred in BRFAA. Mice were housed in a pathogen-free, temperature controlled (22 °C), 12-h light/dark cycle in accredited animal facilities and allowed free access to diets and water. Three different models were used: a high fat diet (HFD) model, *db/db* mice and mice that were aged to 24 weeks. For the HFD, animals were fed chow that contained 45% of calories from fat (the remaining were 35% from carbohydrates and 20% from protein). Control mice were fed a normal diet (ND; 10% calories from fat, 70% from carbohydrates and 20% from

protein). Both HFD (D12451) and ND (D12450 K) were purchased from Research Diets (New Brunswick, NJ). The *db/db* mice exhibited blood glucose levels above 600 mg/dl. The *db/db* mice and the mice used for the aging study were fed a normal laboratory diet. The adipose tissue depots used were: epididymal white adipose tissue (EWAT), subcutaneous white adipose tissue (SWAT) from the inguinal region and brown adipose tissue (BAT) from the interscapular region. All experimental procedures reported here were approved by the veterinary authority of the Prefecture of Athens, in accordance to the National Registration (Presidential Decree 56/2013) in harmonization to the European Directive 63/2010.

2.2. Histological analysis

Tissues were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde solution overnight, before paraffin-embedding. Tissues were sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (H&E) following standard procedures. Images were obtained using a bright field 507 LEICA DMLS2 microscope.

2.3. Gene expression analysis using qRT-PCR

Total RNA was extracted from tissues using nucleoZOL (Macherey-Nagel; Lab Supplies, Athens, Greece) and treated with DNase using the DNA-free kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific; Antisel SA, Thessaloniki, Greece). RNA (500 ng) was reverse-transcribed with the PrimeScript RT Reagent Kit (Takara; Lab Supplies, Athens, Greece). Quantitative real-time

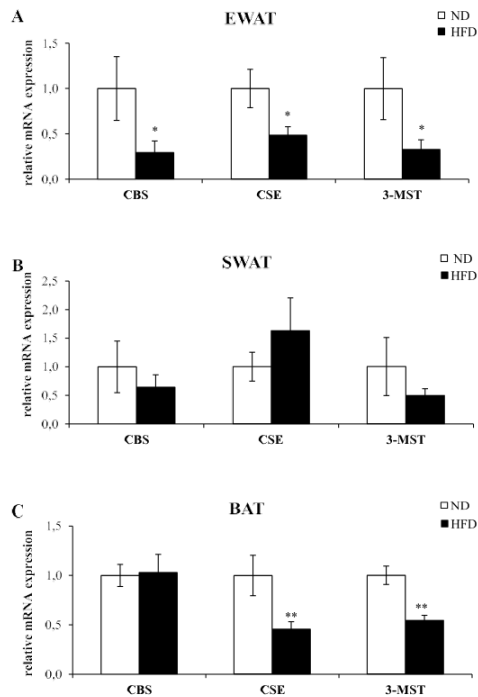


Fig. 2. Gene expression analysis of H_2S -generating enzymes in adipose tissues of mice fed a HFD. Mice were fed normal chow diet (ND; 10% fat) or high fat diet (HFD; 45% fat) over 14–16 weeks. mRNA was extracted and CBS, CSE and 3-MST levels were determined by real-time PCR in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT. Data were normalized to β -actin and presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs ND, $n = 8$ –10 mice per group.

PCR analysis was performed using KAPA SYBR Fast Master Mix (Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab, Attica, Greece) in a LightCycler 96 (Roche Hellas, Athens, Greece). Primer sequences were: CBS forward 5'-TCATCTGCTGACTCTGTG-3', CBS reverse 5'-GAAACCTTTCTGCAGCATCC-3', CSE forward 5'-TGCTAAGGCCTTCTCAAAA-3', CSE reverse 5'-GTCCTTCTCAGGCACAGAGG-3', 3-MST forward 5'-CTTTCCGAGCTGGTGTG-3', 3-MST reverse 5'-TAGGCAGCATGTGGTCTAG-3', ACTIN forward 5'-CCCAGGCATTGCTGACAGG-3', ACTIN reverse 5'-GGAAGGTGGACAGTGAGG-3'. Gene expression levels were calculated according to the 2- $\Delta\Delta Ct$ method.

2.4. Western blot analysis

EWAT, SWAT and BAT were homogenized in lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) supplemented with 1% protease and phosphatase inhibitor cocktail (Calbiochem-Novagen; Lab Supplies, Athens, Greece). Protein amount was quantified using the Bradford assay and concentration was normalized before western blot analysis. Samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Macherey-Nagel; Lab Supplies, Athens, Greece). The membranes were blocked and probed with the following antibodies at the dilution as indicated: anti-CBS (1:1000,

ProteinTech Europe, Manchester, UK), anti-CSE (1:1000, Protein-Tech or Abcam; Lab Supplies, Athens, Greece), anti-3-MST (1:500, Atlas Antibodies; Lab Supplies, Athens, Greece), anti β -tubulin (1:3000, Abcam; Lab Supplies, Athens, Greece). Immunoblots were next processed with secondary antibody (1:4000 Millipore, Lab Supplies, Athens Greece) and visualized using the Western HRP substrate (Millipore, Lab Supplies, Athens, Greece). Quantification of western blots was performed using ImageJ software (NIH Image, National Institutes of Health, USA) and ratios of CBS/ β -tubulin, CSE/ β -tubulin and 3-MST/ β -tubulin were used for statistical analysis.

2.5. Measurement of H_2S production (methylene blue assay)

Adipose tissues were weighed and homogenized in ice-cold 100 mM potassium phosphate buffer, pH = 7.4. All reagents for the methylene blue assay were from Sigma-Aldrich, Life-Science Chemilab, Attica, Greece. Samples were prepared in parafilm-sealed eppendorf tubes containing tissue homogenates, 8 μ M pyridoxal-5'-phosphate, 0.4 mM l-cysteine, 0.08 mM homocysteine and 8 μ M 3-mercaptopyruvate. After 30 min of incubation at 37 $^{\circ}$ C in a shaking water bath the reaction was terminated by adding 1% zinc acetate to trap H_2S , followed by 10% trichloroacetic acid to precipitate proteins. Subsequently, *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine-sulfate in 7.2 M HCl was added followed by $FeCl_3$ in 1.2 M HCl. Absorbance was measured at

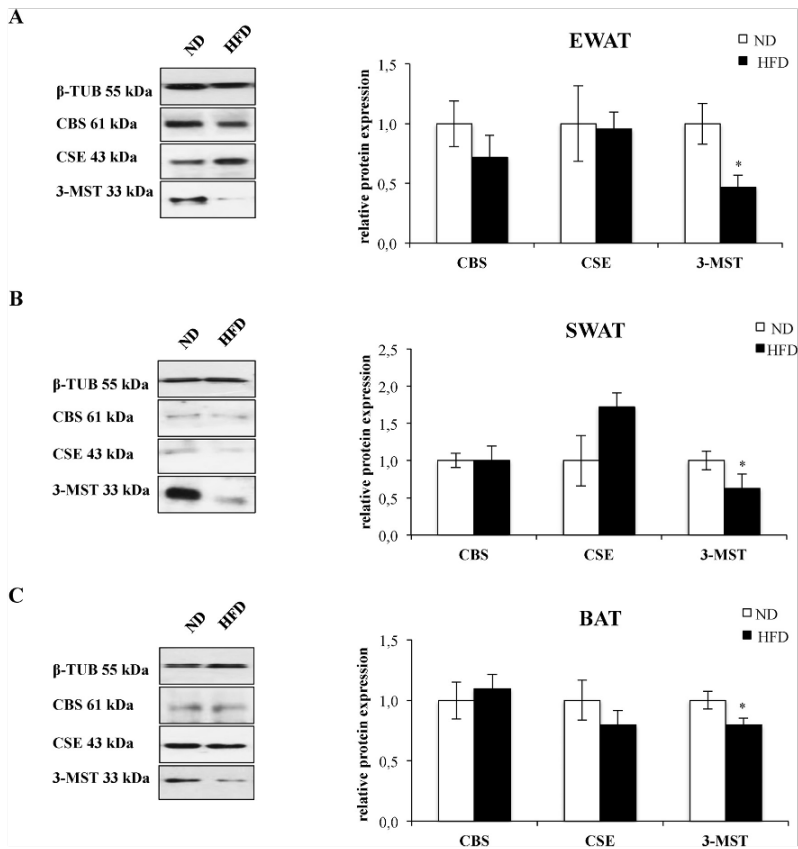


Fig. 3. 3-MST is reduced in adipose tissues of mice fed a HFD. Mice were fed normal chow diet (ND; 10% fat) or high fat diet (HFD; 45% fat) over 14–16 weeks. Proteins were extracted from WAT and BAT and subjected to SDS-PAGE and western blotting. Representative western blots and quantitation of CBS, CSE and 3-MST protein expression in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT. Expression was normalized to β -tubulin. Data are presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs ND, $n = 6–10$ mice per group.

655 nm and H_2S content was calculated against a calibration curve of Na_2S (0–250 μM). Results were expressed as concentration of H_2S formed per milligram of tissue. All samples were assayed in duplicate.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. Differences were analyzed using two-tailed Student's *t*-test. Sample sizes are reported in all figure captions. *p* was considered significant when less than 0.05.

3. Results

3.1. Changes in H_2S -producing enzymes in diet-induced obesity

Mice fed a western-type high fat diet (45% of the calories from fat) over a 14–16 week period gained significantly more weight compared to mice fed normal laboratory chow (Fig. 1A). Changes characteristic of obesity were observed in the WAT of HFD-fed

mice: fat accumulated in both white adipose tissue depots (EWAT and SWAT; Fig. 1B), while adipocyte size increased in EWAT and SWAT (Fig. 1C). Accumulation of fat was also evident in BAT (Fig. 1C). In HFD mice, mRNA levels of CBS, CSE and 3-MST were reduced in EWAT, but not in SWAT (Fig. 2A&B). Moreover, CSE and 3-MST were expressed at lower levels in BAT (Fig. 2C). Changes in H_2S -producing enzymes were also evident at the protein level, albeit only affected 3-MST (Fig. 3). 3-MST protein levels were significantly lower in all fat depots studied. Moreover, tissue H_2S levels were reduced in WAT (Table I). Taken together, our findings suggest that CSE and CBS expression remains unaffected in HFD, while 3-MST is reduced lowering adipose tissue H_2S .

3.2. Changes in H_2S -producing enzymes in a genetic model of obesity

The db/db mouse is a model of obesity, diabetes, and dyslipidemia carrying a point mutation in the leptin receptor that results in its inactivation [24]. Expression of all three H_2S -generating

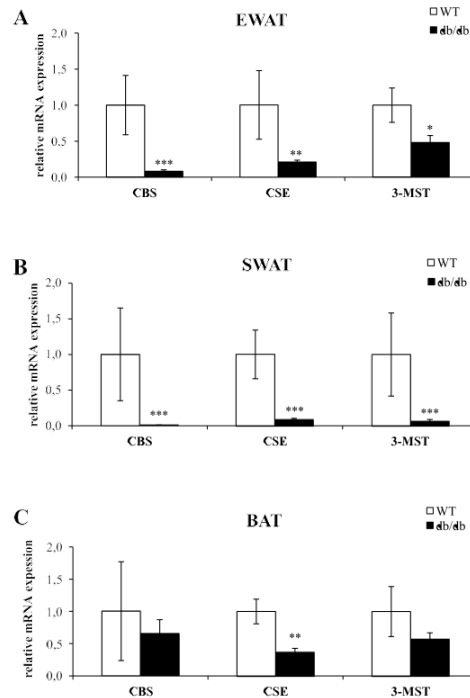


Fig. 4. Decreased mRNA CSE, CBS and 3-MST levels in tissues of db/db mice. Wild-type and db/db mice were fed a normal diet and were sacrificed at 12 weeks of age. mRNA was extracted and CBS, CSE and 3-MST levels were determined by real-time PCR in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT. Data were normalized to β-actin and presented as means ± S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs WT, $n = 6-8$ mice per group.

Table 1
Hydrogen sulfide levels in a adipose tissue depots in the different models used.

Modes	Groups	Hydrogen Sulfide (μM)/mg tissue			n
		EWAT	SWAT	BAT	
HFD	ND	5,14 ± 0,80	12,14 ± 1,45	92,50 ± 11,03	6-7
	HFD	3,72 ± 1,23*	7,37 ± 0,79 *	73,46 ± 5,27	
Genetic	WT	5,96 ± 0,82	19,00 ± 1,92	108,98 ± 13,50	5
	db/db	3,05 ± 0,41 *	6,09 ± 0,34 ***	32,29 ± 3,92 ***	
Aging	8 weeks	8,10 ± 0,62	12,85 ± 1,09	70,83 ± 5,65	5-6
	24 weeks	6,59 ± 0,70	9,46 ± 1,29	85,78 ± 8,34	

enzymes was markedly reduced in white adipose tissues (Fig. 4A and B). Although, trends were evident for all three enzymes in BAT, only the reduction for CSE reached statistical significance (Fig. 4C). Changes in protein expression for CSE and CBS were apparent in WAT and BAT, while 3-MST was spared (Fig. 5). The reduced expression in CSE and CBS affected tissue H_2S levels, leading to significantly lower H_2S in all fat depots (Table 1).

3.3. Changes in H_2S -producing enzymes in age-related weight gain

To study the changes in CSE, CBS and 3-MST in the setting of a more physiological setting associated with reduced metabolic

rate, expression of the H_2S -producing enzymes was determined at 8 and 24 weeks of age on mice fed normal laboratory chow. Although mice gained weight that increased significantly with age (Fig. 6A), this was lower than what was observed in the obesity models. Fat accumulated preferentially in the EWAT, without affecting SWAT tissue weight (Fig. 6B). Consistently with what is known from the literature [25], morphological changes in BAT were evident (Fig. 6C). mRNA levels of H_2S -synthesizing enzymes remained largely unaltered (Fig. 7A-C), with CBS even exhibiting an increase in EWAT. Interestingly 3-MST protein was reduced in EWAT and BAT; CSE was reduced in BAT (Fig. 8A-C). In spite of the observed changes in protein expression, H_2S tissue levels remained unaffected (Table 1).

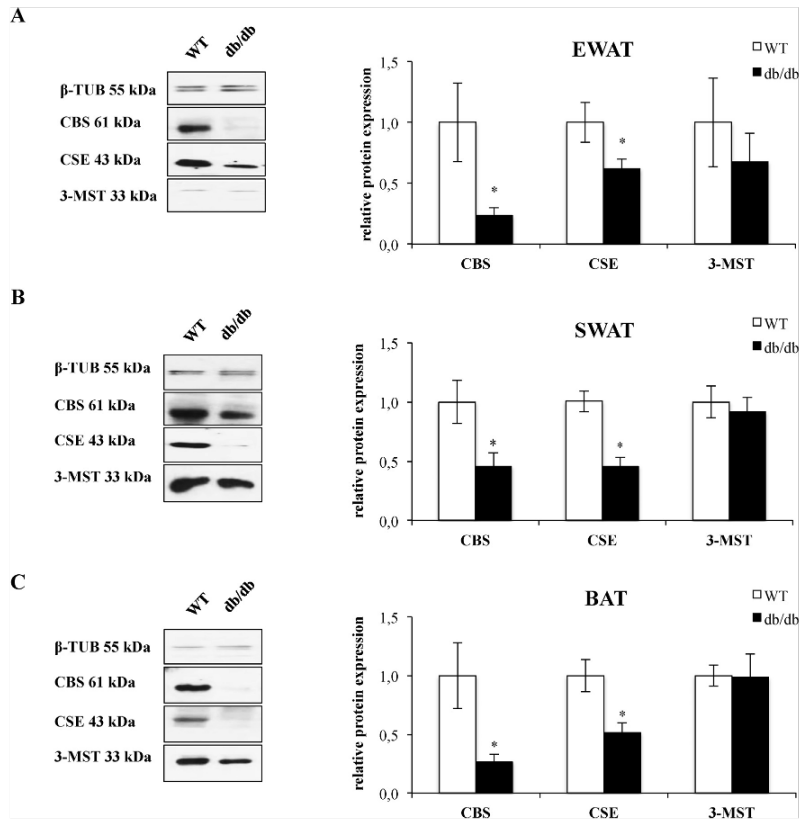


Fig. 5. CBS and CSE expression are decreased in adipose tissues of db/db mice. Wild-type and db/db mice were fed a normal diet and were sacrificed at 12 weeks of age. Proteins were extracted from WAT and BAT and subjected to SDS-PAGE and western blotting. CBS, CSE and 3-MST expression was determined in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT. Data were normalized to β -tubulin and are presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs WT, $n = 6-9$ mice per group.

4. Discussion

The present study explored the changes in the expression of H₂S synthesizing enzymes in different adipose tissue depots using three animal models, namely diet-induced obesity, genetically-driven obesity and age-related weight gain. The main findings of our study are that 1) defects in H₂S-producing enzyme expression were evident in all three models, 2) heterogeneity in the adipose depots affected was observed among the different models, 3) CSE and CBS were reduced in db/db mice, while 3-MST was reduced in HFD and age-induced weight gain, 4) changes in CBS, CSE and/or 3-MST protein levels, in many instances, did not parallel those of the respective mRNA expression, suggesting both transcriptional and post-transcriptional regulation of these enzymes in obesity and 5) tissue H₂S levels were reduced in all adipose depots in db/db mice, while only WAT H₂S levels were reduced in HFD.

Expression of CSE, CBS and 3-MST in adipose tissue depots has only superficially been studied so far. In a prior report, CSE was

found to be expressed in both white and brown adipose tissue, while CBS mRNA was barely detectable in brown adipose tissue of rats [15]. Herein, we provide evidence for the expression of all three enzymes (CSE, CBS and 3-MST), both in WAT and BAT. It should be noted that using an *in vitro* system of 3T3L1-derived adipocytes Tsai and colleagues [26] observed CSE, CBS and 3-MST expression in 3T3L1-derived adipocytes; levels of the enzymes increased with differentiation and inhibition of H₂S reduced the expression of adipogenesis-related genes.

CSE was previously proposed to be the major determinant of adipose tissue function [15]. Geng et al., have previously reported that CSE protein expression and H₂S bioavailability were decreased in adipose tissues of mice fed a HFD [16]. In addition, Velmurugan and colleagues demonstrated that H₂S bioavailability was reduced in obese mice, in spite of enhanced CSE expression in adipose tissue macrophages [27]. In the present study, we observed that in mice fed a HFD, WAT H₂S levels were reduced but this correlated with decreased 3-MST expression, rather than CSE. In contrast to

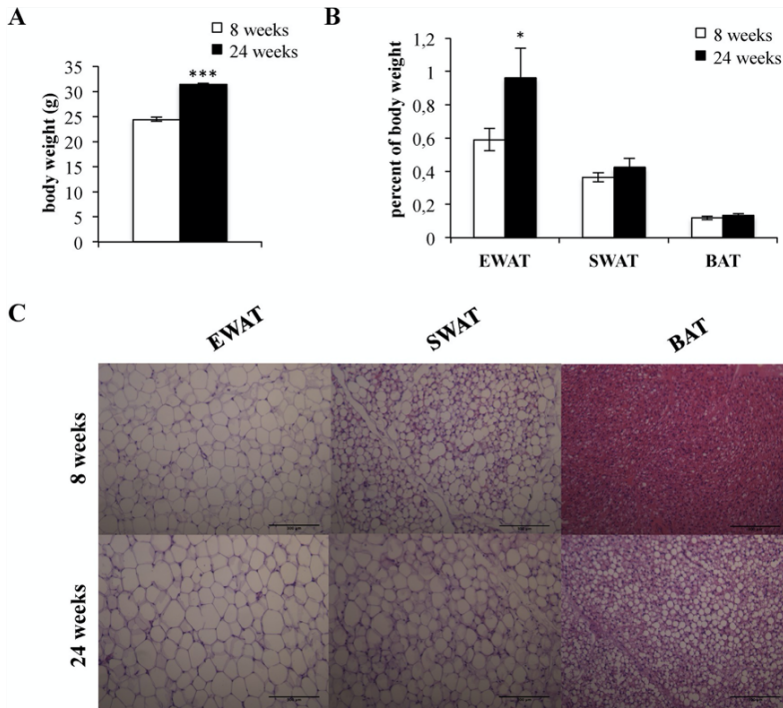


Fig. 6. Body weight, adipose tissue mass and structure in young and aged mice. C57/Bl6 mice were fed a normal diet and analyzed at 8 or 24 weeks of age. (A) Body weight and (B) EWAT, SWAT and BAT mass were measured. (C) Representative photomicrographs of EWAT, SWAT and BAT sections stained with haematoxylin and eosin. Data are presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs 8 weeks. (A, B) $n = 7-8$ mice per group; (C) $n = 4$ mice per group. Scale bar: 300 μ m.

HFD, dietary restriction increases H_2S production and promotes longevity in yeast, worm, fruit fly, and rodent models [28], underscoring the importance of dynamic regulation of H_2S pathways in response to diet.

Earlier studies investigating the expression of H_2S -generating enzymes in obese animals have measured CSE, CBS or 3-MST levels in the liver (an organ of major importance for lipid metabolism), or have focused on changes in H_2S production in the cardiovascular system [29–32]. In line with our observation for reduced expression of 3-MST in adipose tissues in HFD fed mice, downregulation of this enzyme has also been observed in the heart under similar conditions [29]. In addition, Peh and colleagues reported a deficiency in CSE and 3-MST, but an increase in CBS in the liver in mice fed a HFD for 8–16 weeks [30]. However, a different study using mice fed a HFD demonstrated increases in both CBS and CSE in the liver after 5 weeks [31]. The discrepancy between the findings of the two groups might relate to differences in fat composition/content in the diet and the different duration of the HFD protocol. It would be interesting to note that genetic ablation of CSE results in accumulation of greater amounts of lipids in the liver of CSE KO compared to wild-type mice, resulting in fatty liver damage after 12 weeks of HFD [33]. In line with this finding, H_2S stimulates lipid metabolism and ameliorates fatty liver development in mice fed a HFD by downregulating fatty acid synthase and up regulating carnitine palmytoyltransferase-1 [34].

It remains to be tested whether the changes in H_2S -producing enzyme levels in obesity reported in the current study are causally related and contribute to adipose tissue expansion, whether they constitute a homeostatic response or are an epiphenomenon. Some studies have reported that exogenous H_2S limits lipolysis and enhances lipid storage in adipocytes [16,26,35]. In agreement with these observations, pharmacological inhibition of CSE in adipocytes increased lipolysis by a protein kinase A (PKA)-perilipin/hormone-sensitive lipase pathway and blunted fat mass increase in obese mice [16]. Genetic evidence from experiments using mice deficient in CSE supported the pharmacological observations. CSE KO mice were resistant to weight gain when fed a HFD [33], further suggesting the CSE-derived H_2S promotes weight gain; however, it is unclear whether this effect is related to adipose tissue CSE.

Of note, the ability of CSE inhibition to activate PKA and promote lipolysis contradicts the known inhibitory effects of H_2S on phosphodiesterases and the reports demonstrating increased cyclic nucleotide levels in response to H_2S [36–39]. Studies investigating the functional role of CBS and 3-MST in the above-discussed functional responses in WAT and BAT have not yet been conducted.

To determine whether the reduction in the expression of H_2S biosynthetic enzymes observed with obesity reduces H_2S bioavailability, we measured H_2S levels in adipose tissues. In these experiments, we observed that H_2S was lower in both brown and white adipose tissue in db/db mice, with only WAT showing

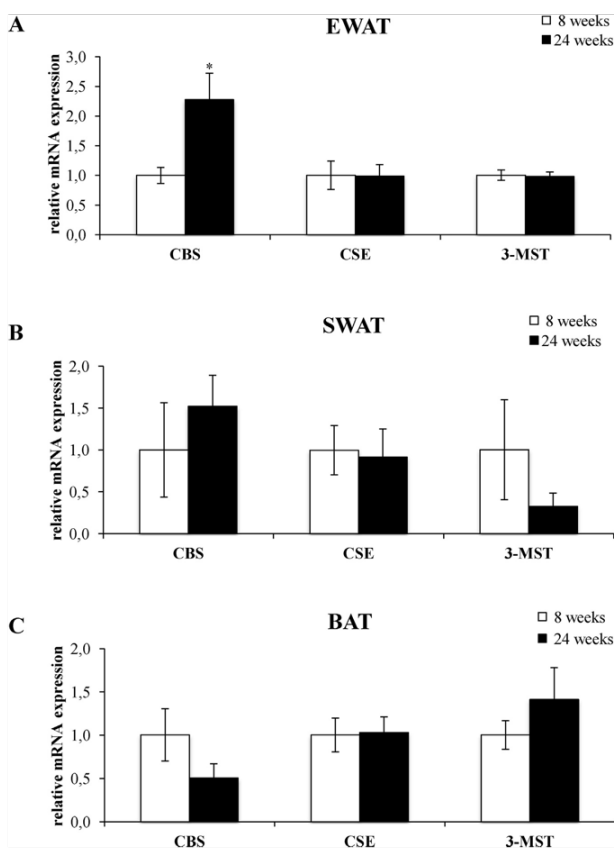


Fig. 7. CBS, CSE and 3-MST gene expression levels in adipose tissues of young and aged mice: C57/B16 mice were fed a normal diet and sacrificed at 8 or 24 weeks of age. mRNA was extracted and CBS, CSE and 3-MST levels were determined by real-time PCR in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT. Data are presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs 8 weeks, $n = 5-6$ mice per group.

reduced H_2S levels after HFD. H_2S levels and enzyme expression were more drastically affected in the db/db genetic model, compared to the HFD alone. The reasons for this more pronounced downregulation in db/db mice are not known, but they might relate to the fact that db/db mice are diabetic in addition to obese and diabetes has been linked with reduced H_2S [10]. In line with our observations, Barr and coworkers demonstrated that mice on HFD had lower levels of circulating free H_2S and sulfane sulfur. The reduction in plasma H_2S does not only reflect the lower production from adipose tissue, but also from the heart, vessels, liver, kidney and lung as reported to occur by others [16,29,32]. In addition, since obesity is associated with increased levels of reactive oxygen species [40,41] and H_2S is degraded in the presence of oxidative stress [42,43], the reduction in plasma H_2S in obesity might be due to a combination of lower production and enhanced degradation. It should be noted that in spite of downregulation of H_2S -producing enzymes in adipose tissues with aging, no reduction in H_2S levels

was observed. It is possible that enzymes like sulfide-quinone oxidoreductase [11], that participate in H_2S degradation, are similarly reduced with aging.

Decreased levels of H_2S have been associated with a variety of diseases including hypertension, diabetes, atherosclerosis, heart failure and preeclampsia [44,45]. Restoring H_2S levels in many of these instances has been shown to mitigate disease severity and progression. Based on the present findings, as well as previous reports, obesity can now be added to the list of maladies characterized by defects in H_2S production. The reduction in H_2S -producing enzymes observed in our study is in line with the findings in a human cohort where plasma H_2S levels were reported to be significantly lower in overweight patients compared with lean individuals [46]. Although a causative relationship between obesity and reduction in the expression of H_2S -producing enzymes in adipose tissues of obese mice of varying etiologies was not established in the present series of experiments, we propose that H_2S supple-

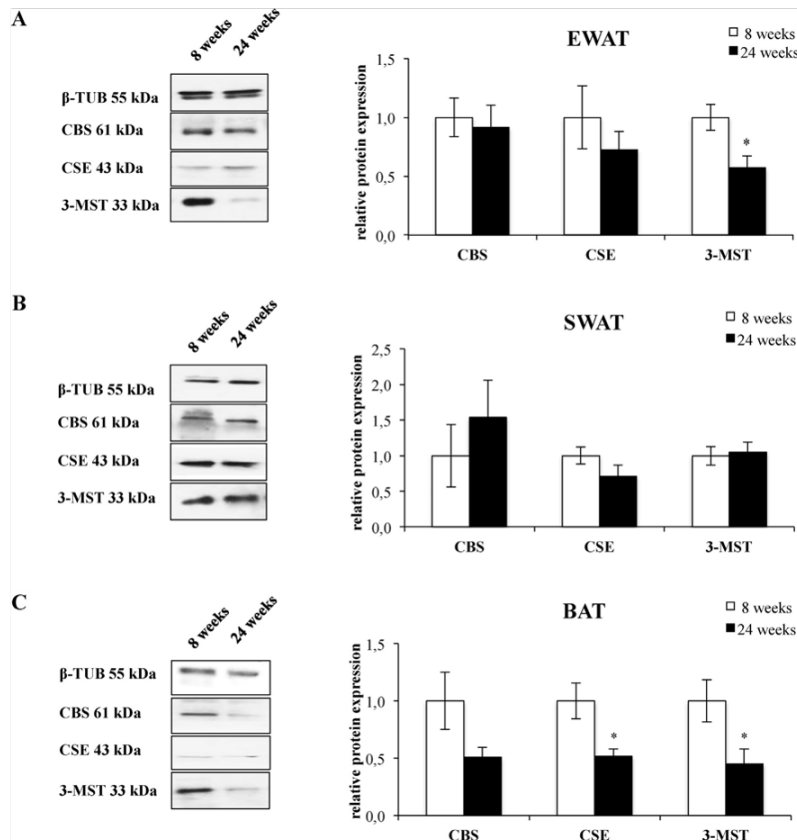


Fig. 8. Aging leads to decreased 3-MST protein levels in both brown and white adipose tissues. C57/B16 mice were fed a normal diet and sacrificed at 8 or 24 weeks of age. Proteins were extracted from WAT and BAT and subjected to SDS-PAGE and western blotting. CBS, CSE and 3-MST protein levels were determined in (A) EWAT, (B) SWAT, (C) BAT, of 8- or 24-week old WT mice. Protein levels were normalized to β -tubulin. Data are presented as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs 8 weeks, $n = 5-7$ mice per group.

mentation might be effective in restricting weight gain. Indeed, in a preliminary study of short duration (5 weeks), H₂S administration decreased body weight of mice fed a HFD without affecting the body weight of mice on normal diet [47]. However, other studies have challenged the ability to H₂S to reduce body weight; mice on HFD receiving the CSE inhibitor PAG had reduced body weight [16,35] and CSE KO mice were resistant to HFD [31]. Considerable amount of additional work would be required to dissect the roles of each H₂S-producing enzyme in the biology of WAT and BAT. Donors that release H₂S in a controlled manner (for example, ROS-activated), or in a specific cellular compartment (mitochondrial-targeted) [48], are valuable tools that could help unravel the contribution and therapeutic potential of H₂S in combating fat accumulation.

Taken together, our data suggest that obesity is associated with a decreased expression of H₂S-synthesizing enzymes in fat tissues of mice. 3-MST is downregulated in both brown and white fat in HFD. In contrast, CBS and CSE are affected in db/db mice. Our working hypothesis is that loss of H₂S in fat tissue, may contribute to the

altered metabolic responses associated with obesity. The pharmacological [49] and genetic approaches [50] that are available need to be used to validate or refute this hypothesis.

Funding

This work has been funded by the Hellenic State Scholarship Foundation IKY-Siemens Research Projects of Excellence (11/3056 to AP and AK) and by a scholarship to AK by the Hellenic Foundation for Research and Innovation.

Conflict of interest

The authors of the manuscript entitled "Reduced adipose tissue H₂S in obesity" (Katsouda, Szabo, Papapetropoulos) have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Aristidis Charonis for donating the db/db mice.

References

- NREFC (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1.698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 387 (2017) 1377–1396.
- P. González-Muniesa, M. Martínez-González, F. Hu, J. Després, Y. Matsuzawa, R. Loos, I. Moreno, G. Bray, J. Martínez, *Obes. Nat. Rev. Dis. Primers* 3 (17034) (2017) 1–18.
- B.P. Williams, M. Mesidor, K. Winters, P.M. Dubbert, S.B. Wyatt, *Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. Curr. Obes. Rep.* 4 (2015) 363–370.
- J.M. Rutkowski, J.H. Stern, P.F. Scherer, *The cell biology of fat expansion. J. Cell Biol.* 208 (2015) 501–512.
- R. Zechner, R. Zimmermann, Thomas O. Eichmann, Sepp D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass, F. Madeo, *Fat signals – lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell Metab.* 15 (2016) 279–291.
- B.J. Assouline, B.P. Beaumont, J.P. Després, E. Larose, *Mapping body fat distribution: a key step towards the identification of the vulnerable patient? Ann. Med.* 44 (2012) 758–772.
- M. Harms, P. Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat. Med.* 19 (2013) 1252–1263.
- S. Kajimura, Bruce M. Spiegelman, P. Seale, *Brown and beige fat physiology roles beyond heat generation. Cell Metab.* 22 (2015) 546–559.
- A. Bartelt, J. Heeren, *Adipose tissue browning and metabolic health. Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 24–36.
- R. Wang, *Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol. Rev.* 92 (2012) 791–836.
- O. Kabil, R. Banerjee, *Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 770–782.
- H. Kimura, *The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. Nitric Oxide* 41C (2014) 4–10.
- O. Kabil, N. Moril, R. Banerjee, *H₂S and its role in redox signaling. Biochim. Biophys. Acta* 1844 (2014) 1355–1366.
- L. Wu, W. Yang, X. Jia, G. Yang, D. Duridanova, K. Cao, R. Wang, *Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. Lab. Invest.* 89 (2008) 52–67.
- X. Fang, Y. Chen, J. Zhao, C. Tang, Z. Jiang, B. Gong, *Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (2009) 153–159.
- B. Gong, B. Cai, F. Liao, Y. Zheng, O. Zeng, X. Fan, Y. Gong, J. Yang, Q. H. Cui, C. Tang, G. H. Xu, *Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. PLoS One* 8 (2013) e73892.
- P. Mania, S.K. Jain, *Hydrogen sulfide and L-cysteine increase phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) and glucose utilization by inhibiting phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein and activating phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/serine/threonine protein kinase (AKT)/protein kinase C5/h (PKC5/h) in 3T3L1 adipocytes. J. Biol. Chem.* 286 (2011) 39848–39859.
- P. Mania, S.K. Jain, *Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- β -lyase (CSE) activation and H₂S formation in 3T3L1 adipocytes. J. Biol. Chem.* 287 (2012) 42324–42332.
- A.A. Unterseiner, R. Wang, Y. Ju, L. Wu, *Decreased gluconeogenesis in the absence of cystathionine gamma-lyase and the underlying mechanisms. Antioxid. Redox Signal.* 24 (2016) 129–140.
- S. Mani, W. Cao, J. Wu, R. Wang, *Hydrogen sulfide and the liver. Nitric Oxide* 41 (2014) 62–71.
- K. Modis, E.M. Bos, E. Calzina, H. van Goor, C. Coletta, A. Panapanopoulos, M.R. Hellmich, P. Rademacher, F. Bouillaud, C. Szabo, *Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2123–2146.
- R.N. Carter, N.M. Morton, *Cysteine and hydrogen sulfide in the regulation of metabolism: insights from genetics and pharmacology. J. Pathol.* 238 (2016) 321–332.
- J. Beltowski, A. Jamroz-Wisniewska, *Hydrogen sulfide in the adipose tissue—physiology pathology and a target for pharmacotherapy. Molecules* 22 (2017) 63.
- G.H. Lee, R. Proenca, J.M. Montez, K.M. Carroll, J.G. Darvishzadeh, J.I. Lee, J.N. Friedman, *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature* 379 (1996) 632–635.
- V. LeCoutre, E. Ravussin, *Brown adipose tissue and aging. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14 (2011) 1–6.
- C.Y. Tsai, M.T. Peh, W. Feng, B.W. Dymock, P.K. Moore, *Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. PLoS One* 10 (2015) e0119511.
- G.V. Velimirovic, H. Huang, H. Sun, J. Candela, M.K. Jainwal, K.D. Reaman, M. Yamashita, M. Prakriya, C. White, *Depletion of H₂S during obesity enhances store-operated Ca²⁺ entry in adipose tissue macrophages to increase cytokine production. Sci. Signal.* 8 (2015) ra128–ra128.
- C. Hine, F. Harunulwail, Y. Zhang, C. Ruckentuhl, B.C. Lee, L. Bracc, A. Lonschamp, J.H. Trevino-Villareal, P. Melia, C.K. Ozaki, R. Wang, V.N. Gladyshev, F. Madeo, W.B. Mair, J.R. Mitchell, *Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. Cell* 160 (2015) 132–144.
- L.A. Barr, Y. Shimizu, J.P. Lambert, C.K. Nicholson, J.W. Calvert, *Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. Nitric Oxide* 46 (2015) 145–156.
- M.T. Peh, A.B. Anwar, D.S.W. Ng, M.S.B. Aman, S.D. Kumar, P.K. Moore, *Effect of feeding a high fat diet on hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in the mouse. Nitric Oxide* 41 (2014) 138–145.
- S.Y. Hwang, I.K. Sarna, Y.I. Siow, *High-fat diet stimulates hepatic cystathionine β -synthase and cystathionine β -lyase expression. Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91 (2013) 913–919.
- T.A. Jenkins, J.C.D. Nguyen, J.L. Hart, *Decreased vascular H₂S production is associated with vascular oxidative stress in rats fed a high-fat western diet. N.S. Arch. Pharmacol.* 389 (2016) 783–790.
- S. Mani, H. Li, G. Yang, L. Wu, R. Wang, *Deficiency of cystathionine gamma-lyase and hepatic cholesterol accumulation during mouse fatty liver development. Sci. Bull.* 60 (2015) 336–347.
- D. Wu, N. Zheng, K. Qi, H. Cheng, Z. Sun, B. Gao, Y. Zhang, W. Pang, C. Huanafu, S. H. M. Xue, A. H. Y. Li, *Exogenous hydrogen sulfide mitigates the fatty liver in obese mice through improving lipid metabolism and antioxidant potential. Med. Gas Res.* 5 (2015) 1.
- J. Cai, X. Shi, H. Wang, J. Fan, Y. Feng, X. Lin, J. Yang, Q. Cui, C. Tang, G. Xu, B. Gong, *Cystathionine β -lyase–hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor α activity by sulphydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. Biochim. Biophys. Acta* 1861 (2016) 419–429.
- M. Bucci, A. Panapanopoulos, V. Vellicco, Z. Zhou, A. Pyriochou, C. Roussos, F. Roviozic, V. Brancalione, G. Cirino, *Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 1998–2004.
- C. Coletta, A. Panapanopoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gero, I. Sharina, E. Martin, C. Szabo, *Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 9161–9166.
- S.J. Bibl, G. Yang, Z. Zhou, R. Wang, S. Tonouzis, A. Panapanopoulos, *Role of eGMP in hydrogen sulfide signaling. Nitric Oxide* 46 (2015) 7–13.
- K. Modis, P. Panopoulos, C. Coletta, A. Panapanopoulos, C. Szabo, *Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 1311–1319.
- A. Fernández-Sánchez, E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, A. Morales-González, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sánchez-Rivera, C. Valadez-Vega, J.A. Morales-González, *Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 3117–3132.
- T. Ruskovska, D. Bernlohr, *Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue – implications for insulin resistance and diabetes mellitus. J. Proteom.* 92 (2013) 323–334.
- K. Suzuki, G. Olah, K. Modis, C. Coletta, G. Kulp, D. Gerö, P. Szoleczky, T. Chang, Z. Zhou, L. Wu, R. Wang, A. Panapanopoulos, C. Szabo, *Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 13829–13834.
- A. Stein, S.M. Bailey, *Redox biology of hydrogen sulfide: implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. Redox Biol.* 1 (2013) 32–39.
- R. Wang, C. Szabo, F. Ichinose, A. Ahmed, M. Whiteman, A. Panapanopoulos, *The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction. Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 568–578.
- D.J. Pellemus, J.W. Calvert, J. Butler, D.J. Lefer, *The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in a acute myocardial infarction and heart failure. Scientifica* 2014 (2014) 8.
- M. Whiteman, K.M. Gending, J.I. Whittlemore, C.I. Hall, D. Mawson, K. Skinner, J.E. Tooke, A.C. Shore, *Adipositis is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. Diabetologia* 53 (2010) 1722–1726.
- D. Wu, B. Gao, M. Li, L. Yao, S. Wang, M. Chen, H. Li, C. Ma, A. Ji, Y. Li, *Hydrogen sulfide mitigates kidney injury in high fat diet-induced obese mice. Oxid. Med. Cell Longev.* 2016 (2016) 2715718.
- A. Panapanopoulos, M. Whiteman, C. Giusseppe, *Pharmacological tools for hydrogen sulfide research: a brief, introductory guide for beginners. Br. J. Pharmacol.* (2015).
- K. Hanaoka, K. Sasakura, Y. Suwanai, S. Toma-Fukai, K. Shimamoto, Y. Takano, N. Shibuya, T. Terai, T. Komatsu, T. Ueno, Y. Ogasawara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, H. Kimura, C. Wang, M. Uchivama, H. Koima, T. Okabe, Y. Urano, T. Shimizu, T. Nagano, *Discovery and mechanistic characterization of selective inhibitors of H₂S-producing enzyme: 3-mercaptopropylate sulfinyltransferase (3-MST) targeting active-site cysteine encephalide. Sci. Rep.* 7 (2017) 40227.
- N. Nagahara, M. Nagano, T. Ito, K. Shimamura, T. Akimoto, H. Suzuki, *Antioxidant enzyme, 3-mercaptopropylate sulfinyltransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfidemia. Sci. Rep.* 3 (2013) 1986.

