

# **Az adipocita differenciáció komponenseinek vizsgálata**

*XXXII. OTDK Biológia Szekció*

Készítette

**Pataki Zoltán János**

Biotechnológia MSc II. évf

Témavezető

**dr. Bálint Bálint László**

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet



Debreceni Egyetem  
Természettudományi és Technológiai Kar  
Debrecen

# Tartalom

|                                                                                           |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Bevezetés és célkitűzések .....</b>                                                    | <b>2</b>                               |
| <b>1. Szakirodalmi áttekintés .....</b>                                                   | <b>3</b>                               |
| <b>2. Módszerek.....</b>                                                                  | <b>10</b>                              |
| 2.1. Az adipocita differenciáltatási protokoll beállítása 6-welles plate-en.....          | 10                                     |
| 2.1.1. Zsírsejt differenciáltatási munkaterve .....                                       | 10                                     |
| 2.1.2. A differenciációhoz használt médiumok összetétele .....                            | 11                                     |
| 2.1.3. Differenciáltatás menete .....                                                     | 12                                     |
| 2.1.4. Az Oil Red O-ról.....                                                              | 13                                     |
| 2.1.5. Oil Red O festés.....                                                              | 14                                     |
| 2.2. Adipocita differenciáció komponenseinek vizsgálata.....                              | 15                                     |
| 2.2.1. 24-well-es plate zsírsejt differenciáltatási munkaterve .....                      | 16                                     |
| 2.2.2. A differenciáltatás menete.....                                                    | 18                                     |
| <b>3. Eredmények.....</b>                                                                 | <b>19</b>                              |
| 3.1. Az adipocita differenciáltatási protokoll beállításának eredményei 6-welles plate-en | 19                                     |
| 3.1.1. Konklúzió .....                                                                    | 21                                     |
| 3.2. Adipocita differenciáció komponenseinek vizsgálata.....                              | 22                                     |
| 3.2.1. Az Oil Red O festés képei .....                                                    | 24                                     |
| 3.2.2. Az Oil Red O festésből levonható konklúziók.....                                   | 26                                     |
| 3.3. Az Oil Red O festés kvantifikálása.....                                              | 27                                     |
| 3.3.1. A kvantitálásból levonható konklúziók.....                                         | 29                                     |
| <b>4. További tervek.....</b>                                                             | <b>30</b>                              |
| 4.1. RNS izolálás.....                                                                    | 30                                     |
| 4.1.1. NanoDrop mérési eredmények.....                                                    | 31                                     |
| <b>5. Összegzés.....</b>                                                                  | <b>32</b>                              |
| <b>6. Forrásjegyzék .....</b>                                                             | <b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b> |
| <b>7. Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                       | <b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b> |

## Bevezetés és célkitűzések

A zsírsejtek vizsgálata napjaink egyik kiemelkedő fontosságú kérdése, hiszen ezen sejtek legfőbb energiaraktáraink. Rengeteg szabályzó faktor szekréciója köthető hozzájuk. Sajnálatos módon az egyre többeket érintő elhízásnak és kóros következményeinek is elejét vehetjük, ha sikerül kellő mélységekig feltárni, megérteni és leginkább szabályozni az adipociták érésének folyamatát. Az elmúlt 20 évben a zsírsejt differenciáció, sejt és molekuláris mechanizmusait igen alaposan tanulmányozták, melyhez preadipocita sejt kultúrákat hívtak segítségül.

Mára rengeteg cikk, szakirodalom jelent meg és mutatta be az in vitro differenciáltatás menetét, annak komponenseit. Dolgozatomban arra a kérdésre keresem a választ, hogy a már jól definiált komponensek milyen hatással bírnak az átalakulás folyamatára. Ennek során mindenekelőtt egy jól működő protokoll elsajátítására, annak beállítására törekszem. A későbbiekben az ebben lefektetett mennyiségek és arányok megváltoztatásával, egyes komponensek elhagyásával törekszem azok jelentőségének feltárására. A differenciációt követően annak kvantitálási módszerét igyekszem körbejárni, szélesebb körű információt nyújtani róla.

# 1. Szakirodalmi áttekintés

A fehér zsírszövet WAT a legfontosabb energia tartalék a magasabb rendű eukariótákban, amely tiacilglicerolt raktároz az energiatöbbletek periódusában, s mobilizálja energiahány esetén. Napjainkban rohamosan növekszik az elhízás gyakorisága a jelentős fehér zsírszövet többlet eredményeként. Az elhízás igen komoly egészségügyi kockázatot jelent az fejlett országokban is. Ez szoros kapcsolatban áll a krónikus betegségek számával, beleértve a nem inzulinfüggő diabéteszt, magas vérnyomást, rákot és az atherosclerózist.<sup>[1]</sup> Tekintettel a széleskörű egészségügyi következményekre, új és hatékony stratégiák szükségesek az elhízás mértékének kontrollálásához. Napjainkban egyre több kutatás zajlik az zsírsejt differenciáció megértésére. A genetikai háttér feltárásával génmódosított egereken végzett kísérletek is sokat segíthetnek a probléma mihamarabbi megoldásában.

Az érett adipociták - a legfőbb sejtes összetevői a fehér zsírszövetnek -, egyedülálló energiaraktározó képességgel, szoros hormonális kontrollal bírnak. Azonban a zsírsejtek által szekretált faktorok ismert szerepet játszanak az immunválaszokban, vaszkuláris rendellenességekben és az étvágy szabályozásában. A leptin az obese gén terméke, egy hormon, melyet elsődlegesen érett zsírsejtek termelnek, s választanak ki. A hormon receptora a hipotalamuszban található, s fontos szerepet játszhat a test zsírtömegének szabályzásában.<sup>[2]</sup>

Az adipocitáknak számos az immunrendszerrel kapcsolatos fehérje terméke ismert, mint az adiposzin, adiponectin, lipokain, aciláció stimuláló protein (ASP) tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és a makrofág migráció gátló faktor (MIF). Ezen faktorok bármelyike részt vehet az energia homeosztázisában, vagy az inzulin rezisztenciában.<sup>[3]</sup> A TNF- $\alpha$  nem csak gátolja az adipocita differenciációt, de érett zsírsejteket kezelve vele, gátolja az adipocita gének expresszióját is.<sup>[4]</sup> Ezen túl a TNF- $\alpha$  hozzájárulhat az inzulin rezisztenciához, melyet elhízás és nem inzulin függő diabétesz mellitus kísérhet.<sup>[5]</sup>

A vaszkuláris funkciókat befolyásoló fehérjék is szekrécióra kerülnek az adipocitákból úgy, mint az angiotenzinogén vagy a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusa (PAI-1).<sup>[6]</sup> Az angiotenzinogén szerepet játszhat a zsírszövet vérellátásában, s a zsírsav zsírból

való kiáramlásában.<sup>[7]</sup> Ezek tükrében kijelenthető, hogy az adipociták egyszerre viselkednek endokrin és paracrin/autokrin sejtként.

A legtöbb fajban a fehér zsírszövet kialakulása még a születés előtt megkezdődik.<sup>[8]</sup> A fehér zsírszövet megjelenésének kronológiája azonban igen faj-specifikus.<sup>[9]</sup> A fehér zsírszövet térnyerése gyorsan halad a születést követően a zsírsejtek méretének és számának gyarapodása folytán. Felnőtt korban az új zsírsejtek létrehozásának lehetősége továbbra is fennáll. Ezt demonstrálta a patkányokon végzett kísérlet, melynek során magas szénhidrát vagy zsír diétára fogták őket, melynek hatására a zsírsejtek száma növekedett.<sup>[10]</sup> A zsírsejtszám növekedés az emberi elhízásnál éppen így megfigyelhető. Mindezen túl zsírsejt prekursorokat izoláltak különböző fajok felnőtt kori WAT-éből, beleértve az embert is, és in vitro differenciáltatták őket érett adipocitává.<sup>[11]</sup> A lehetőség tehát, hogy új zsírsejtek képződjenek és a zsírsejt prekursorokból egy életen át fenn álljon. A zsírsejtek fejlődésének eredete, számos tanulmány szerint az embrionális őssejtekből kiindulva mezodermális őssejt fázison áthaladva, a miociták és oszteociták mellett képződnek a preadipociták, melyek utána tovább differenciálódnak érett adipocitákká.

Az elmúlt 20 évben az in vitro rendszerek kiemelkedően hasznosnak bizonyultak az adipocita differenciáció tanulmányozásában. Ez, sejten belüli molekuláris események alaposabb feltárásához vezetett, melyek a differenciálatlan fibroblaszt szerű preadipocitákból érett adipocitákká történő átalakulása közben zajlanak. Különböző preadipocita sejtvonalatokat és kötőszöveti primer kultúrákat használnak prekursor sejtekként. Az elő zsírsejt vonalak valamint az elsődleges preadipociták már kizárólagos módon elkötelezték magukat az adipocita fejlődésirányba, habár, ezen fejlődés különböző stádiumai reprezentálják. A legsűrűbben alkalmazott sejtvonalak a 3T3-F442A valamint a kísérleteimben általam is alkalmazott 3T3-L1. Ezek a vonalak eredete a Swiss 3T3 sejtekre vezethető vissza, melyeket 17-től 19 napos egér embriókból izoláltak.<sup>[12]</sup> A 3T3-C2 sejtek származása is hasonló, ám ezek természetes körülmények között nem működnek preadipocitaként. Mivel nem differenciálódnak adipocitákká, így kiváló viszonyítási pontot nyújtanak az átalakuló sejtekkel való összevetéshez. Ám, ezen modelleken kívül az embrionális őssejtek is gyakran mutatnak hajlandóságot érett adipocitává történő differenciációra in vitro,<sup>[13]</sup> mely igen fontos tény az adipogenezis kezdeti lépéseinek kutatása szempontjából. Elő zsírsejtek szubcutan injektálása csupasz egerekbe érett zsírpárnák kialakulásához vezetett, melyek szövettanilag teljesen megkülönböztethetetlenek voltak a fehér zsírszövettől. Ez a tény meggyőző bizonyítékot

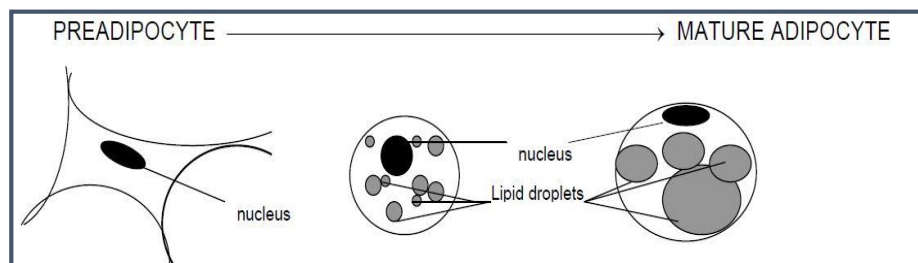
szolgáltat arra, hogy a zsírsejtek képződésének mechanizmusa preadipocitákból in vivo és in vitro igen hasonlóan zajlik le.<sup>[14]</sup>

Mivel a preadipociták származása, s differenciációs stádiuma nem mindig kellőképpen megállapítható, így a vizsgálatok validálásához az elsődleges kultúrák használata különösen fontos. Elsődleges preadipocita kultúrákat sikeresen hoztak létre számos fajból, beleértve az embert is.<sup>[15]</sup> Ezen elsődleges sejtek diploidak, s talán ezért is számos in vivo kontextusban jobbak, mint az aneuploid sejtvonalak. Számos kutatás támasztja alá, hogy az elsődleges kultúrák differenciációs kapacitása tisztán donor függő, s ami ennél is fontosabb, hogy a donorok korának előrehaladtával csökken.<sup>[16]</sup>

A növekedési fázis alatt a preadipocita vonal sejtjei valamint az elsődleges preadipociták morfológiájukban hasonlóak egy fibroblaszthoz. A sejtek konfluens állapotában a megfelelő kezeléssel indukált differenciáció hatására a sejtek alakja drasztikusan

megváltozik. A preadipociták gömb alakúvá válnak,

zsírcseppek

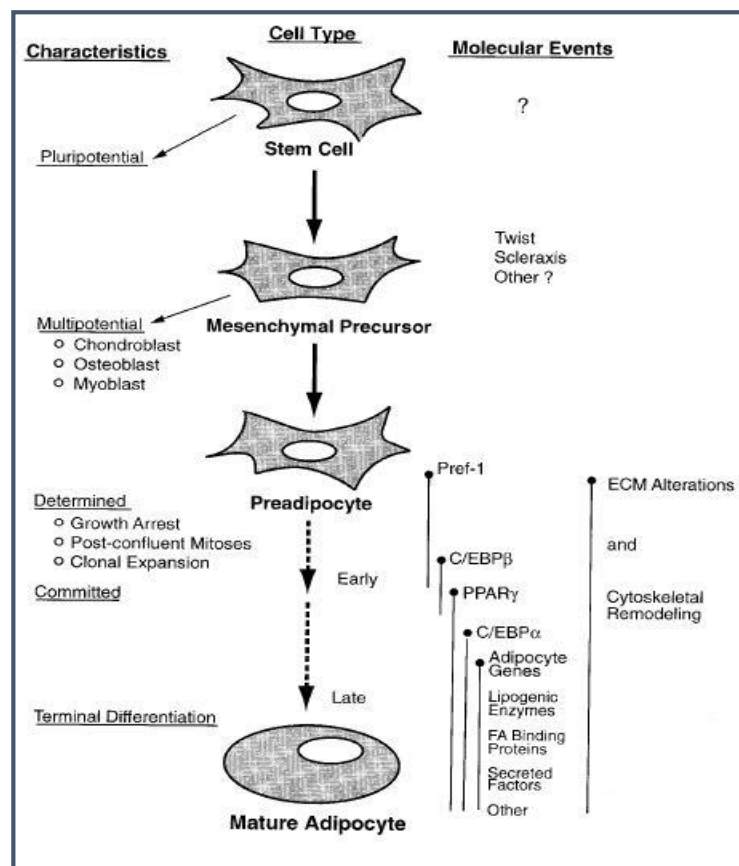


1. ábra Differenciáció menete

akkumulálódnak bennünk, s fokozatosan kialakulnak az érett zsírsejtekre jellemző morfológiai és biokémiai jellemvonások. A differenciáció természete főként az alkalmazott sejtvonaltól függ. Így hát számos protokoll közül válogathatunk a preadipocita sejtvonalak és az elsődleges preadipociták esetén. A 3T3-L1 preadipociták spontán differenciációján túl a sejt kultúra FCS-mal (fetal calf serum) való kezelés hatására néhány hét alatt zsírsejt kultúrát érhetünk el. Ez tovább fokozható indukáló ágensek alkalmazásával mit a Dexametazon a 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) mely egy foszfodiészteráz inhibitor. Ezen komponenseket magas koncentrációjú inzulinnal kombinálva használják. Az említett ágensek közös ismérve, hogy jelentős mértékben fokozzák a differenciációt.

Bár a preadipociták számos különböző forrásból származhatnak, és sok szempontból hasonlóak, az indukáló ágensekre való fogékonyságuk meglehetősen eltérő lehet. A legtöbb esetben az elsődleges preadipociták fiatal állatokból származnak, s vagy alacsony 1-10nM inzulin koncentráció jelenléte mellett FCS tartalmú, vagy magas 1-10 $\mu$ M inzulin taralomú szérumentes médiumot alkalmaznak a sejtek tápoldataként.<sup>[17]</sup> A preadipocita és az elsődleges preadipocita sejtvonalak szérumentes kultúráinak fejlődési kondíciói megerősítik az induktorok pozitív szerepét valamint az inzulin-szerű növekedési faktor I (IGF-I), glükokortikoid, és a cAMP szignálút részvételét. A preadipocita sejtvonalaknál az inzulin szint szuprafiziológiás koncentrációra emelése nem befolyásolja a differenciálódó sejtek számát, ám képes megnövelni a lipid akkumulációt. Ezzel szemben a legtöbb primer preadipocitánál, melyek spontán differenciációja igen alacsony fokú, az inzulin növelni tudta a differenciálódott sejtek számát.<sup>[18]</sup> A kultúrától függően az inzulin/IGF-I szignálút kritikus lehet a differenciációhoz, vagy csak szükséges a maximális triacilglicerol akkumuláció eléréséhez. Ennek tükrében kijelenthető, hogy a differenciáció egyik legjelentősebb komponense.

Az elkötelezett preadipociták növekedési kapacitásukat megtartják, ám a zsírsejté való konverzió előtt felhagynak a sejtciklussal. Az adipocita differenciáció alatt a sejtekben expresszáldó gének száma időrendi változásuk alapján



2. ábra A differenciáció során aktiválódó gének

jellemezhető. Ezt tükrözi a korai közép és kései mRNS/fehérje markerek megjelenése, s a triglicerid akkumulálódása. Ezen változások elsősorban transzkripcionális szinteken játszódnak, habár a poszttranszkripciós reguláció is végbemehet néhány adipocita gén esetén.<sup>[19]</sup> Ezen kívül azon gének aktivációja, mely gének gátolnák az adipogenezist, vagy

csak egyszerűen nem szükségesek a zsírsejtek funkciójához, represszálva van. A génexpresszió változásai az adipocita érés korai, s kései fázisait jól jellemzik, főként a gyakran alkalmazott preadipocita sejtvonalak esetén.

Mind a preadipocitákban, mind az elsődleges preadipocitákban az osztódásának gátlása és nem a sejtkonfluencia, vagy a sejt-sejt kontaktus a szükséges feltétele a differenciációnak. Holott kétségtelen tény, hogy a konfluencia ezen sejtvonalaknál az sejtosztódás gátlásához vezet, a sejt-sejt kapcsolat nem előfeltétele az adipocita konverciónak. Ezt példázza az elsődleges patkány preadipocitákon végzett kísérlet, mikor is alacsony sejtsűrűséggel plate-elték a sejteket szérummentes médiumban, ám így sejt-sejt kapcsolat nélkül is végbement a differenciáció.<sup>[20]</sup> Két transzkripciós faktor, a CCAAT/enhanszer kötő protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) és a Peroxiszóma proliferáció-aktiválta receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) mutat transzaktivációs hatást az adipocita specifikus génekre. Kísérletek támasztják alá, hogy mind a C/EBP- $\alpha$  mind a PPAR- $\gamma$  részt vesz a sejtosztódás gátlásában. McKnight és munkatársai a C/EBP- $\alpha$  antimitotikus hatását demonstrálták C/EBP- $\alpha$ -ösztrogén receptor fúziós fehérjével. Az ösztrogén kezeléssel általi aktiváció eredményeképp a sejtosztódás megszűnt, s vonták le a következtetést, a sejtszámot és a DNS szintézist szemlélve.<sup>[21]</sup> Noha a C/EBP- $\alpha$  és a PPAR- $\gamma$  expressziója drámaian növekszik az adipocita differenciáció alatt, a preadipocitákban ezen transzkripciós faktorok szintje alacsony, viszont ez is elég lehet a sejtosztódás gátlásához.

A sejtosztódás gátlását követően, a konfluens preadipocita sejteknek újabb mitogenetikus és adipogenetikus szignálok megfelelő kombinációját kell megkapniuk, hogy a differenciáció újabb stádiumába léphessenek. Preadipocita sejtvonalakról szóló tanulmányok azt mutatják, hogy a sejtosztódásában gátolt sejtek még legalább egy teljes DNS replikáción és sejtosztódáson mennek át. Így ez az elkötelezett sejtek klonális amplifikációjához fog vezetni.<sup>[22]</sup> A növekedéssel kapcsolatos fehérjék vizsgálata rávilágított a különbségekre a klonális expanzió és a preklonfluens sejtnövekedés között 3T3-L1 preadipocitákban. A retinoblasztoma proteinek pRB, p107, és p130 köti az E2F/DP komplexet és inaktíválják a növekedést-serkentő transzkripciós aktivitását. Az E2F és az RB család tagjainak szerepe jelenleg az adipogenezis során ismeretlen. A sejtosztódás gátló-specifikus (gas) gének egyes csoportja eltérő expressziós mintázatot mutat a klonális expanzió alatt. A Gas6 elsősorban a poszt konfluens preadipociták klonális expanziója során expresszálódik, míg a gas1 és gas3 a szérum-hiányos preadipocitákban.<sup>[23]</sup>

A sejtosztódás gátlását és a klonális expansziót komplex génexpressziós mintázat változások kísérik, melyek eltérőek lehetnek az egyes sejtkultúra modellekben és specifikus differenciáltatási protokollok alkalmazása esetén. A lipoprotein lipáz (LPL) expressziójának mRNS-eit gyakran az adipocita differenciáció korai markereként szokás tekinteni.<sup>[24]</sup> A lipoprotein lipáz az érett zsírsejtek választják ki, s kulcsfontosságú eleme a lipid akkumulációnak.<sup>[25]</sup> Azonban az LDL expresszió előfordulhat spontán is konfluens sejttömeg esetén, a differenciációhoz szükséges kiegészítő ágensektől függetlenül.<sup>[26]</sup> Ez viszont azt sugallja, hogy az LPL expresszió talán inkább tükrözi a sejtosztódás gátlásának stádiumát, mint egy korai differenciációs lépést. Tovább erősíti a feltevést, hogy más mezenchimális sejtek, mint a szívizom sejtek vagy a makrofágok szintén szintetizálják és szekretálják az enzimet.<sup>[27]</sup> Így, mivel az LPL expressziója nem adipocita specifikus és független a differenciációhoz szükséges kiegészítő ágensektől az LPL besorolása, mint az adipocita differenciáció korai markere, kérdéses marad.

Legalább, két transzkripciós faktor család - a C/EBP és a PPAR -, indukálódik a differenciáció korai szakaszában. A peroxiszóma proliferáció-aktiválta receptor- $\gamma$  nagymértékben adipocita specifikus, ám alacsony, de még detektálható szinten a preadipocitákban is expresszálódik. Expressziója gyorsan növekszik a differenciációs hormonkezelés nyomán. A 3T3-L1 adipocita sejtek differenciációjának második napján már jól detektálható, s az expressziós maximumát az érett adipocitákban éri el.<sup>[28]</sup> A PPAR- $\gamma$  expresszióját megelőzi a PPAR- $\delta$  expressziója, mely azonban szerteágazóbb, kevésbé specifikus. Különböző szövetekben s sejtkultúra vonalban detektálható, mint például a CH310T1/2 a 3T3-C2 vagy az NIH 3T3.<sup>[29]</sup> A C/EBP- $\beta$  és C/EBP- $\delta$  izoformák expressziójának átmeneti emelkedése megelőzi a PPAR- $\gamma$  expresszióját.<sup>[30]</sup> A C/EBP- $\beta$  és C/EBP- $\delta$  csökkenését a differenciáció korai s középső stádiumában a C/EBP- $\alpha$  mRNS-ek indukciója kíséri. A C/EBP- $\alpha$  expressziójának növekedése némileg megelőzi az adipocita-specifikus gének kifejeződését.<sup>[31]</sup> Más transzkripciós faktorok a zsírsejt differenciáció nagyon korai szakaszában indukálódnak, mint a szterol szabályzó elem kötő protein-1c (SREBP-1c), adipocita elköteleződési és differenciációs faktor 1 (ADD1), továbbá a bHLH-leucin zipzár fehérje, mely részt vesz a koleszterol metabolizációjában, s talán az adipocita génexpresszióban is érintett.<sup>[32]</sup>

Az adipocita differenciáció alatt a sejtek fibroblaszt szerű alakja gömbszerűvé alakul, s drámai változás történik a sejtek morfológiájában, citoskeletális komponenseiben, és az extracelluláris mátrix komponenseinek szintjében, valamint típusában. Valószínűleg mindezen változásokat befolyásolhatja a PPAR és/vagy CEBP

család tagjainak expressziója s hatása a zsírsejt differenciáció alatt. Az aktin és tubulin expressziójának csökkenése egy korai eseménye az adipocita differenciációnak, melynek nyilvánvaló következményei a morfológiai változások.<sup>[33]</sup> Ezen változások a sejt alakjában a differenciáció során lezajló különböző folyamatokat tükrözik, s nem a lipid lerakódás eredményei. 3T3 preadipocitákban biokémiai és morfológiai változások állnak be akkor is, ha meggátoljuk a triglicerid akkumulációt, akár biotin megvonással, vagy lipolitikus ágensek hozzáadásával.<sup>[34,35]</sup> Mindezeken túlmenően a kollagén gének expressziója is jelentősen megváltozik a differenciáció során. A preadipociták által expresszált I-es és III-as típusú prokollagén a 3T3-L1 differenciációja alatt felváltja a IV-es típusú, melynek hatására a sejtek médiuma a hormonkezelés követő második napra viszkózusabb állagot ölt.<sup>[36]</sup>

A differenciáció végső fázisa alatt az adipocitákban jelentősen nő a de novo lipogenezis valamint az inzulin érzékenység. Az aktivitási, protein és mRNS szinteken túl, a tiacilglicerol metabolizmusban résztvevő enzimek szerepét is meg kell említeni. Részt vesz ebben a folyamatban többek közt az ATP citrát liáz, acetyl-CoA karboxiláz, sztearoyl-CoA desaturáz (SCD1) glicerol-3-foszfát aciltranszferáz, glicerol-3-foszfát dehidrogenáz, zsírsav szintáz, és a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz.<sup>[37]</sup> A glükóz transzporterek és inzulin receptorok száma, s az inzulin érzékenység fokozódik.<sup>[38]</sup> A leptin mennyisége is növekszik az in vitro adipocita differenciáció terminális szakaszában, csak hogy ennek mértéke jóval elmarad a zsírszövetekben mérhetőtől.<sup>[39]</sup> A PPAR- $\gamma$  és a C/EBP- $\alpha$  a differenciáció ezen szakaszában is kulcsfontosságú szerepet játszik. Több gén koordinált aktiválásáért felelősek, mint a GLUT4, SCD1 foszfoenolpiruvát karboxikináz, vagy a leptin.

Mindezen lépések, transzkripciós faktorok, enzimek, s a többi felsorolt tényező sokasága és összetettsége kell tehát ahhoz, hogy végbemehessen a fibroblaszt szerű preadipociták átalakulása immár érett zsírsejttekké.

## 2. Módszerek

### 2.1. Az adipocita differenciálási protokoll beállítása 6-welles plate-en

A sejtek tápközegéül Dulbecco's Modified Eagle Medium szolgál, melyet 50ml Fetal Bovine Serum-mal, 5 ml Glutamin, illetve 5 ml Penicillin/ Streptomycin antibiotikumot tartalmaz. A kísérlet során használt 3T3-L1 sejtek az In Vitro Diagnosztikai Tömb alagsorának folyékony nitrogénes tartályából lettek felhozva. A sejtuszuspenzió vízfürdőben került hirtelen kiolvasztásra, majd steril boxban 10ml médiumba lett áthelyezve. Ezt centrifugálás követte, mely 250 rpm-en, 5 percig, 24 °C-on zajlott. Következő lépés a felülúszó eltávolítása, s a pelletet 20 ml médiumban történő felszuszpendálása, majd T75-ös flaskába helyezése. Végül inkubátorra helyezés másnapig. Ekkor médium csere, s a mikroszkópos vizsgálat során megállapítható volt, hogy a sejtek épek, kitapadtak, alakjuk fibroblaszt szerű.

#### 2.1.1. Zsírsejt differenciálási munkaterv

- **0. Nap** (10.15)
  - $6 \times 10^5$  sejt/well kihelyezése
- **1. Nap** (10.16)
  - A sejtek eléri a teljes konfluenciát, BM I. médium sejtekre tétele
- **3. Nap** (10.18)
  - DM I sejtekre tétele, az alsó 3 well-hez 2-2  $\mu\text{M}$  roziglitazon hozzáadása
- **5. Nap** (10.20)
  - DM II sejtekre tétele
- **7. Nap** (10.22)
  - BM II sejtekre tétele
- **8, 10, 12, 13. Nap** (10. 23,25,27,28)
  - BM II cseréje, a 13. napon Oil Red O stock elkészítése
- **14. Nap** (10.29)
  - Oil Red O festés

### 2.1.2. A differenciációhoz használt médiumok összetétele

#### ➤ **BM I**

- DMEM
- 10 % NCS (FBS-re lett cserélve)
- 1 x P/S
- Gln

#### ➤ **DM I**

- DMEM
- 10 % FBS
- 1 x P/S
- Gln
- 0,5 mM IBMX
- 0,25 µM dexametazon
- 1 µg/ml inzulin
- 2 µM roziglitazon (CSAK AZ ALSÓ 3 WELL-HEZ!)

#### ➤ **DM II**

- DMEM
- 10 % FBS
- 1 x P/S
- Gln
- 1 µg/ml (2,1µl) inzulin

#### ➤ **BM II**

- DMEM
- 10% FBS
- 1 x P/S
- Gln

### 2.1.3. Differenciáltatás menete

A **0. napon** a sejtek kihelyezése történik 6 well-es platere. Első lépésben az elhasznált médium leszívása, majd mosás 5 ml PBS-sel. Ezt követően a sejtek fellazítása 2 ml tripszin hozzáadásával; inkubálás (4 perc, 37°C); a flaska megütögetése; mikroszkóp alatt meggyőződni róla, hogy a sejtek felváltak. 8 ml médium hozzáadása szuszpendálás, majd a szuszpenzió 50 ml-es centrifugacsőbe történő áttétele. Ezután sejtszámolás következik Bürker-kamrával. Itt eredményül 386,6 sejt/ $\mu$ l-t kaptam. Minden well-be 600.000 sejt kerül, a Bürker-kamrás számlálásból következően ez 1551,9  $\mu$ l sejtsuszpenziót és 1448,1  $\mu$ l médiumot jelent wellenként. Utolsó lépésben a plate inkubátorba helyezése 24 órára.

Az **1. napon** a sejtek vizsgálat után a sejteken lévő médium leszívása és 3-3 ml BM I médium hozzáadása. A plate inkubálása 48 órán át.

A **3. napon** a DM I összeállítása során 1 well ráhagyással 21 ml médium készítése szükséges. Ehhez 21 ml médium kimérése egy 50 ml-es csőbe 21  $\mu$ l IBMX, 2,63  $\mu$ l dexametazon, 2,1  $\mu$ l inzulin médiumba mérése szükséges. A médium (DM I) felének új csőbe történő helyezése, majd ehhez 2,1  $\mu$ l roziglitazon hozzáadása. DM I sejtekre helyezése a BM I sejtekről való leszívásával kezdődik. A plate felső 3 welljéhez 3 ml DM I hozzáadása, majd az alsó sor welljeiben lévő sejtekhez 3 ml DM I + Roziglitazon hozzáadása. A plate 48 órára inkubátorba kerül.

Az **5. napon** a DM II összeállítása során 21 ml médium kimérése, s 50-es csőbe helyezése 2,1  $\mu$ l inzulin belemérése. Ezt követően a DM I leszívása történik, nagyon óvatosan, hogy a „sejtfilm” meg ne sérüljön, majd 3-3 ml DM II helyezése minden wellbe. A plate-et ismét inkubátorba helyezése 48 órára.

A **7. napon** a mikroszkópos vizsgálat után a DM II leszívása és wellenként 3-3 ml BM II médium sejtekre helyezése következett.

A **8. nap** a megfigyelés után a médium cseréje történt BM II médium használatával.

A **10. napra** az elhasznált médium helyére friss BM II került.

A **12. napon** a sejtek szemrevételezését a médium cseréje követte, BM II alkalmazásával.

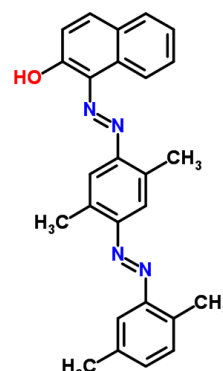
A **13. napra** ezen a napon is megtörtént a médium cseréje, melyhez most is BM II-vel. A sejtek festéséhez használt Oil Red O festék stock solution-jét is ezen a napon kellett elkészíteni az alábbi módon.

150 mg Oil Red O port bemérése 50ml-es centrifugacsőbe, majd 50ml 99%-os Izopropanolban történő beoldása. Záró lépésben a centrifugacső alufóliába burkolása, majd a hideg szobában történő elhelyezése felhasználásig.

A **14. napon** megtörtént a sejtek festése is, Oil Red O festékkel, melynek segítségével az adipocitává differenciálódott sejtek zsírcseppjei vörös színt öltenek, így könnyítve meg elkülönítésüket az át nem alakult sejtektől. A későbbiekben a festék kivonható a megfestett sejtekből, így kvantitálásra is alkalmazható.

#### 2.1.4. Az Oil Red O-ról

Az Oil Red O ( $C_{26}H_{24}N_4O$ ) egy lizokróm (zsírban oldódó) diazo festék, mely a neutrális triglicerideket és lipideket, továbbá néhány lipoproteint tud megfesteni. Megjelenése piros por halmazállapotú, melynek maximális abszorbanciája, 518 (359) nm-en van. A por 99%-os izopropanolban oldható.



3. ábra Az Oil Red O szerkezeti képlete

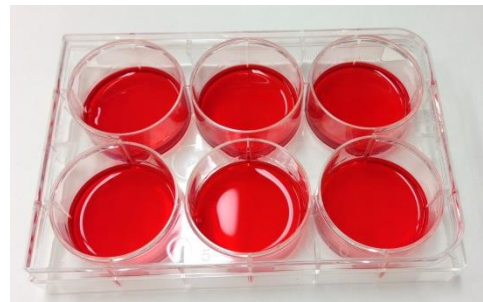
## 2.1.5. Oil Red O festés

### *Sejtek fixálása*

- Médium leszívása
- Mosás 2 ml PBS-sel
- 2 ml frissen hígított (stock 37%-os) 4%-os formaldehid hozzáadása
- Inkubálás szobahőmérsékleten 45 percig

### *Oil Red O working solution elkészítése*

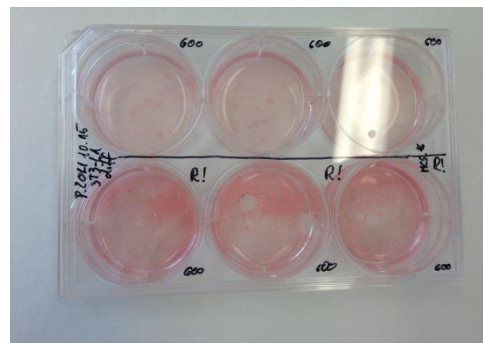
- 9 ml Oil Red O stock + 6 ml MQ víz  
összerázása
- Pihentetés 10 percig szobahőmérsékleten,  
ezután már nem szabad felkavarni a  
leülepedett festékszemcséket
- Az oldat átszűrése 0,2 µm-es fecskendő  
szűrőn



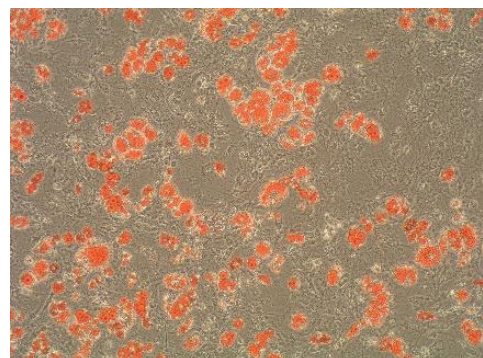
4. ábra Oil Red O a sejteken

### *Festés*

- A formaldehid eltávolítása a sejtekről
- Mosás 2 ml MQ vízzel
- 2 ml 60%-os izopropanol hozzáadása, s  
pihentetés 4 percig szobahőmérsékleten
- Izopropanol eltávolítása
- 2-2 ml Oil Red O working solution  
sejtekre tétele, majd inkubálás  
szobahőmérsékleten 5 percig
- Az Oil Red O eltávolítása
- Mosás 2 ml MQ vízzel (kb. 3X) míg a  
leszívott víz tiszta nem lesz
- Végül 2-2 ml MQ víz hozzáadása minden  
wellhez, majd a plate lezárása parafilmmel
- Mikroszkópos vizsgálat, s fotózás után a plate becsomagolása alufóliával, a hideg  
szobában 1 hónapig tárolható.



5. ábra Festett sejtek a mosás után



6. ábra Festett sejtek mikroszkópos képe

## 2.2. Adipocita differenciáció komponenseinek vizsgálata

Vizsgálódásaimmal a továbbiakban arra a kérdésre kerestem választ, hogy a differenciáltatáshoz használt egyes komponensek milyen mértékben befolyásolják az átalakulást. A kísérlet ezen szakaszánál új 3T3-L1 sejtvonallal dolgoztam, hiszen az előző kultúra passzázs száma ekkorra meghaladta a 30-at, így már nem reagált megfelelően a differenciációs médiumra, s jelentősen lecsökkent az adipocitává alakuló sejtek száma, ami torz eredményekhez vezetett volna. Az új sejtvonal 6. passzázsánál került lefagyaszttásra, a felvételét követően még kétszer passzáltam, így a kísérlet kezdetén a sejtek 9. passzázsuknál tartottak. Továbbá immáron a differenciáltatás során 24-welles plate-tel dolgoztam, a költséghatékonyságot s a hatékonyabb munkavégzést szem előtt tartva. A kérdés megválaszolásának módja, hogy a plate-et négy szekcióra osztom, így vizsgálva az egyes összetevőket. Az I. IBMX, a II. Dexametazon, a III. Inszulin, végül a IV. Kontrollként szolgált. Minden rész hat well-t foglal magába, ahol is az első oszlop nem tartalmazza valamely komponenst (pl.: A1 és B1 well-ekbe nem kerül IBMX), a középső oszlop well-jeibe fél adag kerül az adott komponensből, míg az utolsó oszlopba a teljes mennyiség belekerül. Természetesen az adott szekcióban csak az ahhoz tartozó komponens mennyiségével játszunk, a többi alkotó teljes mennyiségben kerül a sejtek médiumaihoz. Mindezen túl minden szekció alsó sorában található well-ek teljes adag Roziglitazont is kapnak.

A differenciáltatás menete, teljes mértékben megegyezik a korábban leírttal, mindössze a felhasznált differenciációs médium I összetételében, valamint az inszulin hatását vizsgáló well-eknél a differenciációs médium II-nél is, tér el attól. Illetve, mivel 24 well-es plate-et alkalmaztam, melynek felszíne  $1,9\text{ cm}^2$ , a 6-welles plate  $9,5\text{ cm}^2$ -hez képest így a kihelyezett sejtek száma is kevesebb 120.000 sejt/well, továbbá a lyukanként használt médium mennyisége is  $0,5\text{ ml/well}$ -re csökkent az eddig használt  $3\text{ ml}$ -ről.

### 2.2.1. 24-well-es plate zsírsejt differenciálási munkaterve

- **0. Nap**
  - 120.000 sejt/well kihelyezése
- **1. Nap**
  - A sejtek elérik a teljes konfluenciát, BM I. médium sejtekre tétele
- **3. Nap**
  - DM I sejtekre tétele, az alsó well-ekhez 2-2  $\mu$ M roziglitazon hozzáadása
- **5. Nap**
  - DM II sejtekre tétele
- **7. Nap**
  - BM II sejtekre tétele
- **8, 10, 12, 13. Nap**
  - BM II cseréje, a 13. napon Oil Red O stock elkészítése
- **14. Nap (10.29)**
  - Oil Red O festés

A differenciáltatás során használt plate térképe, valamint a differenciációs médium I well-enkénti összetétele az alábbi táblázatokban láthatóak.

|          | 1                          | 2                                      | 3                         | 4                             | 5                                          | 6                             |
|----------|----------------------------|----------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>A</b> | Ø IBMX                     | $\frac{1}{2}$ IBMX                     | 1 IBMX                    | ØDexametazon                  | $\frac{1}{2}$ Dexametazon                  | 1Dexametazon                  |
| <b>B</b> | Ø IBMX<br>+Roziglitazon    | $\frac{1}{2}$ IBMX<br>+Roziglitazon    | 1 IBMX<br>+Roziglitazon   | ØDexametazon<br>+Roziglitazon | $\frac{1}{2}$ Dexametazon<br>+Roziglitazon | 1Dexametazon<br>+Roziglitazon |
| <b>C</b> | Ø Inzulin                  | $\frac{1}{2}$ Inzulin                  | 1Inzulin                  | Kontroll                      | Kontroll                                   | Kontroll                      |
| <b>D</b> | Ø Inzulin<br>+Roziglitazon | $\frac{1}{2}$ Inzulin<br>+Roziglitazon | 1Inzulin<br>+Roziglitazon | Kontroll<br>+Roziglitazon     | Kontroll<br>+Roziglitazon                  | Kontroll<br>+Roziglitazon     |

1. táblázat A differenciáltatás plate-térképe

|          | 1                                                                                         | 2                                                                                            | 3                                                                                           | 4                                                                                       | 5                                                                                          | 6                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b> | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0,25μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0,5μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0μl</u><br>Inzulin-0,05μl                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0,03μl</u><br>Inzulin-0,05μl                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0,063μl</u><br>Inzulin-0,05μl                         |
| <b>B</b> | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0,25μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX- <u>0,5μl</u><br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0μl</u><br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0,03μl</u><br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam- <u>0,063μl</u><br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u> |
| <b>C</b> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0μl</u>                          | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0,025μl</u>                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0,05μl</u>                         | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                             | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                                | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl                                 |
| <b>D</b> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0μl</u><br>Rozigl- <u>0,1μl</u>  | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0,025μl</u><br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin- <u>0,05μl</u><br>Rozigl- <u>0,1μl</u> | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u>     | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u>        | DMEM-0,5ml<br>IBMX-0,5μl<br>Dexam-0,063μl<br>Inzulin-0,05μl<br>Rozigl- <u>0,1μl</u>         |

2. táblázat A DMI médiumok összetétele well-enként

A táblázatban leírt médiumok, külön-külön eppendorf csőben kerül összeállításra. Mint az látszik, néhol pontosan ki nem mérhetően apró mennyiségek szerepelnek, ennek áthidalására a szükséges komponensekből hígítással kezelhető koncentrációjú oldatot készítettem, melyből már bizonyosan pontosan ki pipettázható a kívánt mennyiség. A hígításhoz alap médiumot használtam, hisz ez semmilyen módon nem befolyásolja a kísérlet folyamatát.

### **IBMX**

Normál well-ek: 11μl IBMX+11μl DMEM => 1μl/well

Feles well-ek: 1μl IBMX+3μl DMEM => 1μl/well

### **Dexametazon**

Normál well-ek: 2μl Dexametazon+29,74μl DMEM => 1μl/well

Feles well-ek: 1μl Dexametazon+32,33μl DMEM => 1μl/well

### **Inzulin**

Normál well-ek: 2μl Inzulin+38μl DMEM => 1μl/well

Feles well-ek: 1μl Inzulin+39μl DMEM => 1μl/well

### **Roziglitazon**

B és D sor well-jeihez: 2μl Roziglitazon+18μl DMEM => 1μl/well

## 2.2.2. A differenciáltatás menete

A **0. napon** megtörtént a sejtek kihelyezése, melyhez a 9. passzázsuknál járó sejteket használtam. Összesen 6 plate került indításra, melyből 3 festésre 3 pedig genetikai vizsgálatra készült. Első lépésben a T75-ös tenyésztő edényekből leszívtam a médiumot, majd 5 ml PBS-sel mostam. Ezt követően 2ml Tripszint adtam hozzá, mellyel 4 percen át 37 °C-on inkubáltam, majd óvatos kocogtatással segítettem a sejtek felválását, amiről mikroszkóp alatt is meggyőződtem. A sejteket ezután flaskánként 8 ml DMEM-ben szuszpendáltam fel, majd 50 ml-es centrifugacsőbe helyeztem át. A Tripán-kék festés után sejtszámlálás Bürker-kamrával, melynek eredménye 1152 sejt/ $\mu$ l. Mivel minden well-be 120.000 sejt kerül, ennek következtében well-enként 104,167  $\mu$ l sejtszuspenzió és 395,83 $\mu$ l médiumot pipettáztam ki. Végezetül a plate-eket 24 órára 37°C-os inkubátorba helyeztem.

Az **1. napra** a mikroszkópos vizsgálat után médiumcsere, s 24 órás inkubálás.

A **3. napon** a differenciációs médium I-et a fentebbi táblázat alapján külön-külön eppendorf csövekben való összeállítása, majd az elhasznált médium leszívása után az adott well-hez tartozó eppendorf csőből át pipettázás a sejtekre. A plate-eket inkubátorba helyezése 48 órára.

Az **5. napon** minden well megkapta a differenciációs médium II-t, ügyelve az Insulin mentes és fél adag Insulint tartalmazó well-ekre, melyek médiumába ennek megfelelően nem vagy csak fél adag Insulin került. A plate 48 órára inkubátorba került.

A **7. napon** az ellenőrzést médium csere követi, a sejtek 0,5-0,5 ml/well BM II-t kapnak, s 24 órára inkubátorba kerültek.

A **8. napon** megtörtént még a médiumcsere, majd 48 órára inkubátorba helyeztem a plate-eket.

A **10. napon** médiumcsere során a well-ek 0,5-0,5 ml BM II-t kaptak. Végül 48 órára inkubátorba kerültek.

A **12. napon** a BM II ismét megtörtént, melyet 24 órás inkubálás követett.

A **13. napon** a vizsgálatot médium csere követte, melyhez BM II használatával.

A **14. napra** a szemrevételezést a sejtek festése követte, mely az előzőekben leírt protokoll szerint zajlott, azzal a különbséggel, hogy 0,5ml-es mennyiségeket használtam. A festéshez 3 plate-et használtam, míg a másik 3 plate sejtjeit well-enként 0,5 ml Trizolban vettem fel, s külön feliratozott eppendorf csövekbe helyeztem át, majd -20 °C-on tároltam az RNS izolálásáig.

### 3. Eredmények

#### 3.1. Az adipocita differenciálási protokoll beállításának eredményei 6-welles plate-en

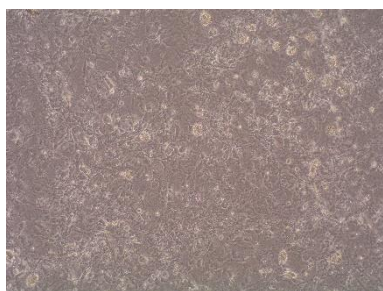
Az **1. napon** a sejtek minden wellben több mint 80%-os konfluenciát mutatnak, elenyésző halott sejt mellett.

A **3. napon** minden well szuperkonfluens, néhány halott sejt figyelhető csak meg.

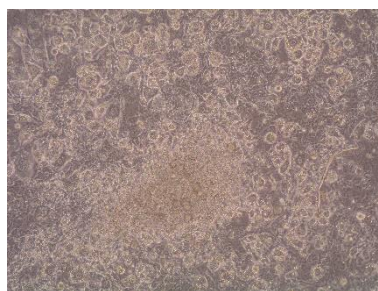
Az **5. napon** a sejtek alakjában apró változás vehető észre, kisebb csoportosulások kezdenek kialakulni. A médium jelentősen viszkózusabb lett, több halott sejt figyelhető meg.

A **7. napon** a differenciálódó sejtek kezdenek gömbölydedebbé válni, bennük apró lipid cseppek jelentek meg. A roziglitazonos wellekben mindez nagyobb intenzitással látható.

A **8. nap** vizsgálata alapján megállapítható, hogy egyre több sejt indult differenciálódásnak, s azon sejtekben a zsírcseppek mérete és száma egyaránt gyarapodásnak indult. A leírtak a roziglitazonos wellekben hatványozottan érvényesülnek.

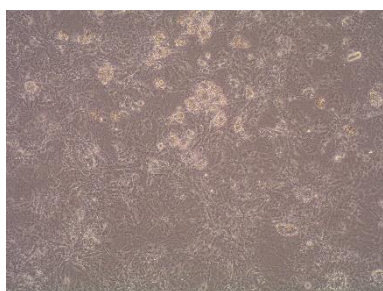


*Normál*

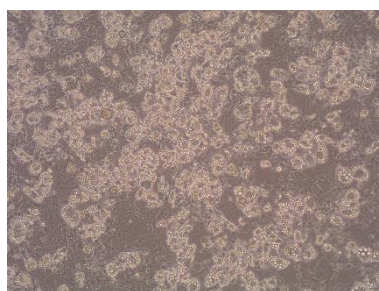


*Roziglitazonos*

A **10. napra** a differenciálódó sejtek már jól kivehetőek, a bennük lévő zsírcseppek mérete, s száma tovább nőtt, így maguk a sejtek is egyre terebélyesebbek. Az észlelték a roziglitazonos wellekről továbbra is nagyobb léptékben mondhatóak el.

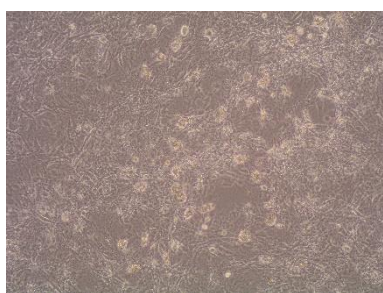


***Normál***

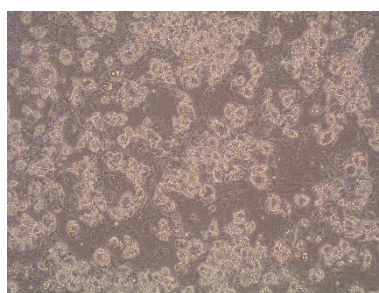


***Roziglitazonos***

A kísérlet vége felé a **12. napon** a lipid cseppek mérete és száma a differenciálódásnak indult sejtekben töretlenül nő, s mint eddig most is intenzívebben érvényesül ez a roziglitazonos wellekben, így több s nagyobb zsírcsejt figyelhető meg, melyekben a zsírcseppek is jelentősebbek.

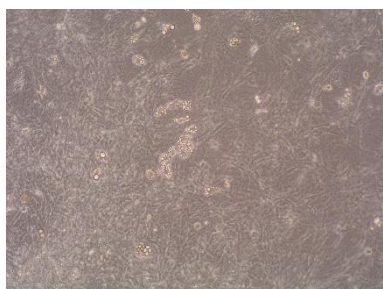


***Normál***

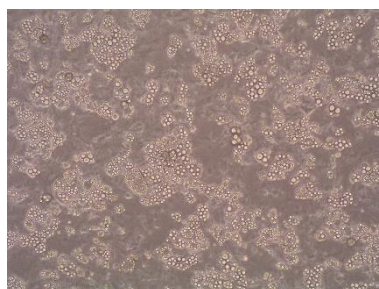


***Roziglitazonos***

A **13. napra** a folyamat tovább zajlott így az átalakuló sejtek gömbölyded alakjukkal jól kitűnnek a többi sejt közül, s bennük ugyanilyen jól kivehetőek a lipid cseppek. A roziglitazonnak kezelt wellekben a folyamat erőteljesebben figyelhető meg.



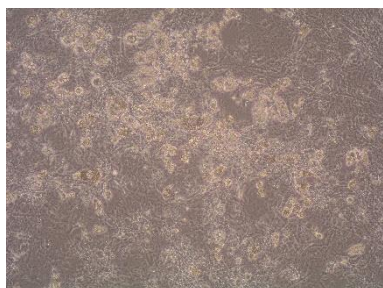
***Normál***



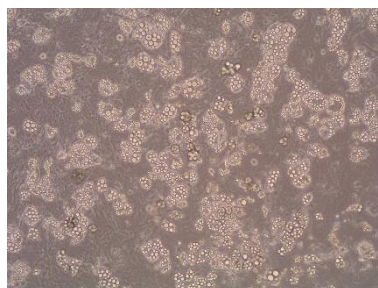
***Roziglitazonos***

A differenciáltatás záró, **14. napján** a deifferenciálódott sejtek immár sok és nagy, szabályos gömb alakú zsírcseppel bírnak. A roziglitazonos welllekben mindez intenzívebben vehető szemügyre.

**Festés előtt**

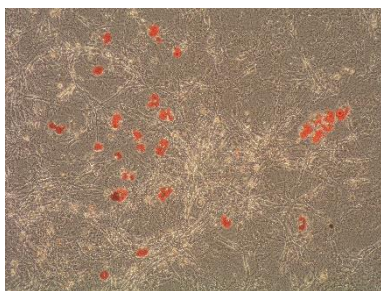


***Normál***

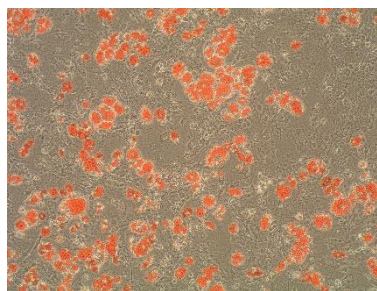


***Roziglitazonos***

**Festés után**



***Normál***



***Roziglitazonos***

### **3.1.1. Konklúzió**

A kísérlet végén kijelenthető, hogy a differenciáltatás sikeresen lezajlott. Érett zsírsejtek jelentek meg mind a kontroll mind a roziglitazonos welllekben, ám ez utóbbiban jól látható az említett komponens differenciációra gyakorolt jótékony hatása. A kontroll welllekben az átalakult sejtek kb 5-10%-ot tesznek ki míg a roziglitazonos minták esetén ez a szám 30% körülire tehető.

### 3.2. Adipocita differenciáció komponenseinek vizsgálata

Az **1. napra** az összes plate well-jeiben megtapadtak a sejtek, morfológiailag épek, szép fibroblaszt szerűek. Konfluenciájuk 80-90% körüli.

A **3. napon** a sejtek minden well-ben szuperkonfluenciát mutatnak, így ideálisak a kísérlet megkezdéséhez.

Az **5. napon** a plate-eket szemlélve látható, hogy a Dexametazon nélküli well-ek médiuma citromsárga színűvé, az Inzulint nélkülözők pedig lazacszínűvé váltak. A mikroszkópos vizsgálat alapján pedig elmondható, hogy a sejtek kisebb csoportosulásokat kezdenek létrehozni, s apró foltok már láthatóak némely sejteken, de jól kivehető zsírcseppek még nem.

A **7. napon** a dexametazont nem tartalmazó well-ek médiuma most is citromsárga. Mikroszkóp alatt vizsgálva a normál well-ekben a csoportosulás erősödött, az inzulint nem kapó sejteknél a pusztulás mértéke jelentősebb, mint a többi well esetén. A Roziglitazonnal kezelt well-ek többségében már kivehetőek a differenciálódásnak indult sejtek, s bennük az aprócska lipid cseppek. Ez alól kivételt képeznek a Dexametazon nélkülöző sejtek, itt ugyan is nem látható változás, még a Roziglitazonnal kezelt well-ekben sem.

A **8. nap** több differenciálódott sejt figyelhető meg. A Roziglitazonhoz jutott sejtek esetében, s bennük mint számban, mint méretben gyarapodó lipid cseppek. Az Inzulin nélküli well-ek továbbra is lemaradásban vannak, míg a Dexametazon nélküli normál well-ekben most sem láthatóak differenciálódó sejtek, míg a Roziglitazonosokban már felfedezhető egy-egy átalakulásnak indult sejt. Ugyanez elmondható az IBMX nélküli well-ekről is.

A **10. napon** a Roziglitazonnal kezelt sejtekben növekvő számú és méretű zsírcseppek láthatóak. A normál well-ekben jól kivehető differenciálódott sejt továbbra sem látható, de intenzifikálódott a csoportosulás. A Dexametazon nélküli normál well-ekben nem vehető észre zsírcsepp, míg a Roziglitazonosban már látható, az Inzulin nélküli well-ek továbbra is lemaradásban van az IBMX-et nélkülözőkkel egyetemben.

A **12. napra** az átalakuló sejtek száma, s bennük a lipid cseppek mérete tovább gyarapodott. Mint eddig is a Roziglitazont tartalmazó well-ekben látható ez. Immár jól kivehetőek az eltérések - a nélkülöző, fél és teljes komponenst kapó sejtek átalakulása között -, a Roziglitazont is tartalmazó well-eket szemlélve. A Dexametazon IBMX-et és

az Inzulint nélkülöző well-ekre továbbra is igazak a korábban leírtak, így kevesebb bennük a differenciálódó sejt.

A **13. napon** jól látható gömbölyded sejtekként tűnnek ki a differenciálódó sejtek, bennük szépen látszódó zsírcseppekkel a Roziglitazonos well-ekben. Mindez kevésbé intenzíven figyelhető meg a normál well-ek esetén. A Dexametazon nélküli Roziglitazonos well-ekben kevés differenciálódó sejt figyelhető meg. Az inzulint nem kapó sejtek átalakulása továbbra is lassabb. A normál IBMX mentes well-ben a sejtek csoportosulása erősödött.

A **14. napra** a differenciálódott sejtek gömbölyűek, bennük jól kivehető s nagyméretű zsírcseppekkel. A Roziglitazonnal kezelt well-ekben több sejt differenciálódott, itt nagyobb, s több lipid csepp figyelhető meg a sejtekben. Az Inzulin és a Dexametazon hiányos well-ekben jelentősen kisebb léptékű átalakulást sikerült elérni.

### 3.2.1. Az Oil Red O festés képei

#### IBMX mennyiség változtatása



**A/1**



**A/2**



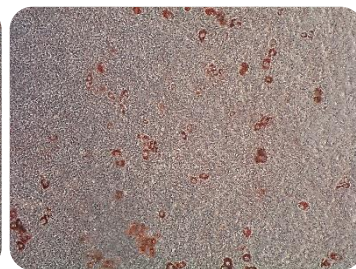
**A/3**



**B/1R**



**B/2R**



**B/3R**

#### Dexametazon mennyiség változtatása



**A/4**



**A/5**



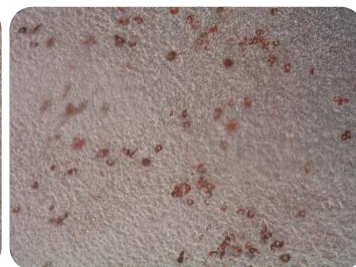
**A/6**



**B/4R**



**B/5R**



**B/6R**

### Inzulin mennyiség változtatása



**C/1**



**C/2**



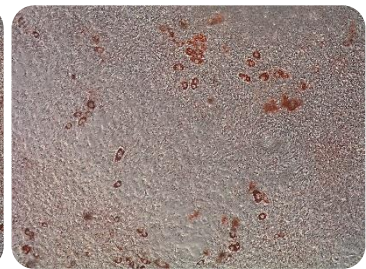
**C/3**



**D/1R**



**D/2R**



**D/3R**

### Kontroll



**C/4**



**C/5**



**C/6**



**D/4R**



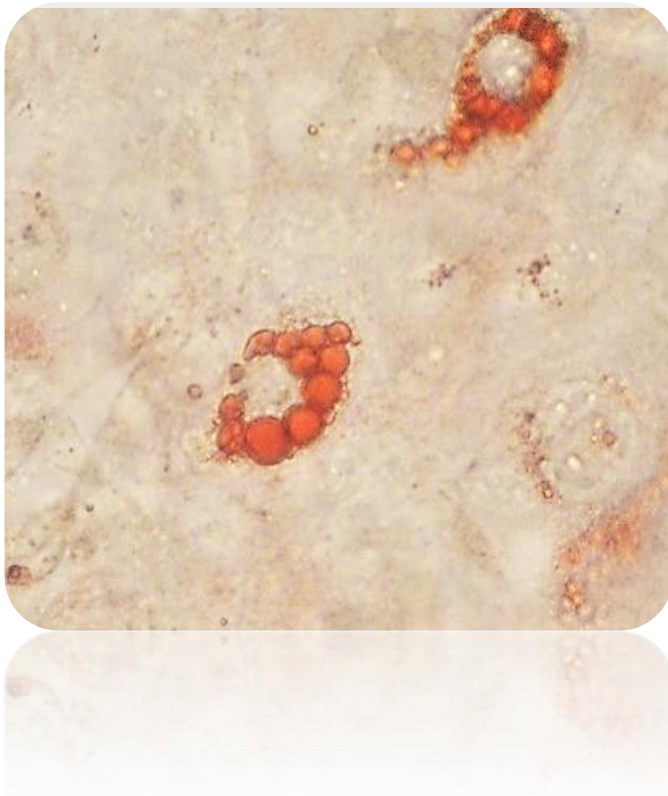
**D/5R**



**D/6R**

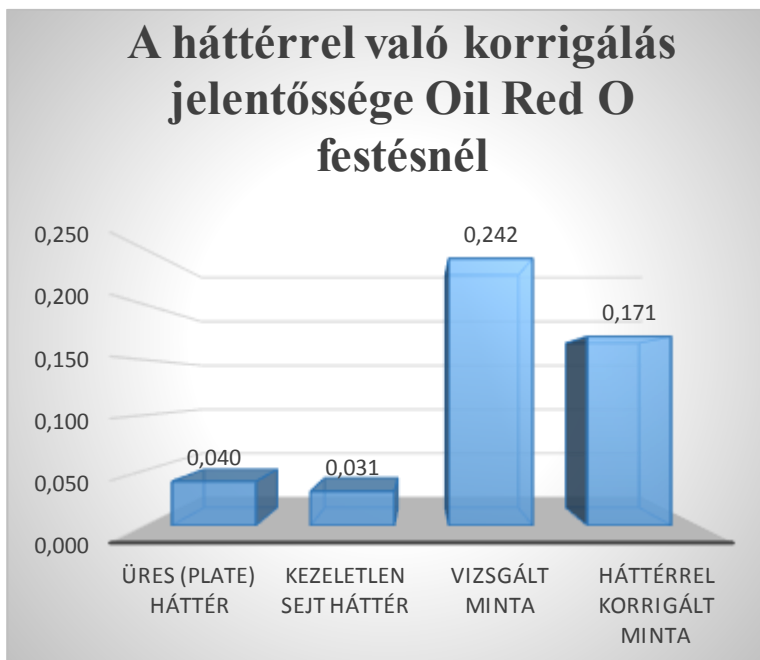
### 3.2.2. Az Oil Red O festésből levonható konklúziók

Mindezek tükrében kijelenthető, hogy a kísérlet sikeres volt, hisz a differenciáció lezajlott, eltérő mértékben az egyes well-ekben. A három plate-et szemlélve azt a konklúziót vonhatjuk le, hogy az adipocitózisra a legnagyobb hatást a Dexametazon megvonása gyakorolja, mivel ebben az esetben szinte alig-alig észlelhető differenciálódott sejt a well-ekben. Ám még ilyenkor is jól észrevehető a Roziglitazon intenzifikáló hatása, hisz úgymond „helyettesíteni” képes a Dexametazont, így kiváltva a zsírosodást. A kiváltott hatás mértékének alapján a második helyet az Inszulin foglalja el. Itt is jelentős a lemaradás a kontroll well-ekhez képest, s a Roziglitazon hatása az előbb említetthez hasonlóan itt is jótékonyan érvényesül. A legkisebb eltérést a kontrolltól az IBMX hiányos well-ek mutatják.



### 3.3. Az Oil Red O festés kvantifikálása

A differenciáltatott sejteken elvégzett Oil Red O festés nagyon látványos, s szépen kiemeli az adipocita sejteket a „háttér” sejtek közül. Ám mindezen túl nagyszerű alapot szolgáltat számunkra a sejtek átalakulásának számszerűsítéséhez. Ezt az a remek

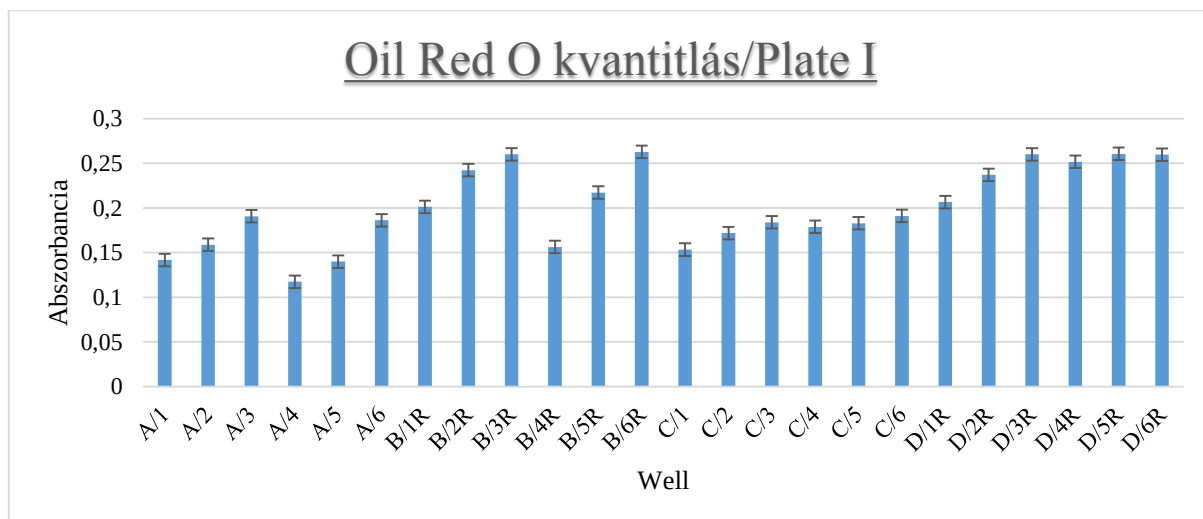


7. ábra Az Oil Red O mérés adatainak korrigálása

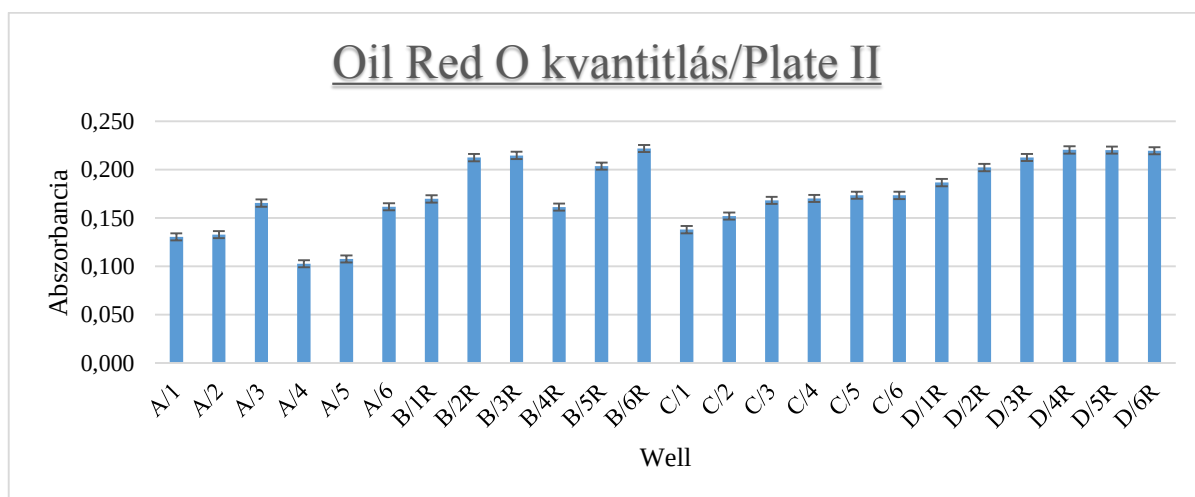
tulajdonsága teszi lehetővé, hogy a festést követően kivonható a sejtekből, majd az így az egyes well-ekből nyert folyadék abszorbanciája fotometriásan mérhető. A mérésnél fontos, hogy a kapott eredményeket teljesen üresen megfestett well-ekből és a kezeletlen sejteket tartalmazó szintén

megfestett well-ekből kapott eredményekkel korrigáljuk. Hisz ezek is jelentős festékmennyiséget képesek elnyelni, melyek torzítják a kapott eredményeket.

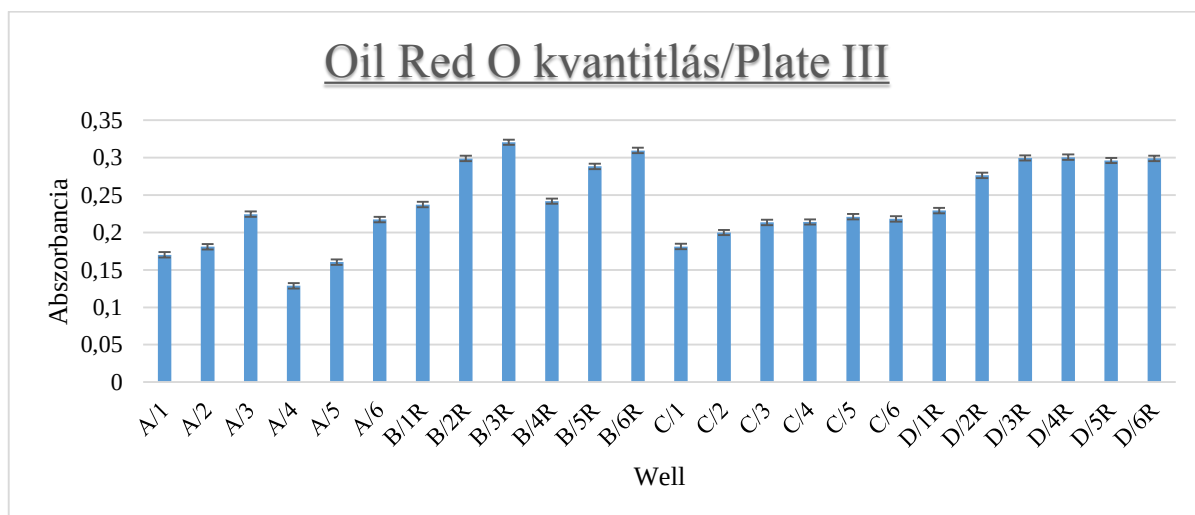
Első lépésben a sejteken lévő vizet kell leszívni, ügyelve, hogy a lehető legkevesebb maradjon rajta. Ezt követően hagyjuk a plate-et teljesen kiszáradni, nagyjából 20-30 perc, amit akkor érünk el, ha a sejtfilm a plate alján már nem csillog, hanem mattá válik. Mindez azért fontos, hogy utána az összes well festéke azonos térfogatban legyen felvéve, így küszöbölve ki az eltérő térfogatokból eredő fotometrálnálási hibákat. Ezután 70µl 100%-os Izopropanollal 10 perc alatt eluáljuk a festéket a sejtekből. Ezt követően párszor felszuszpendáljuk, így bizonyosodva meg róla, hogy a festék az oldatba került, majd 50µl-t áthelyezzük a 96 lyukú mérő plate-be. Az áthelyezést a lehető leggyorsabban kell csinálni, hogy minimalizáljuk az izopropanol párolgásából fakadó veszteséget. A kész plate-et a VIKTOR 2-vel 490 nm-en 0,5 másodpercig fotometrálnuk. Az eredményeket végül egy Excel file formájában kapjuk meg. Innentől kezdve nincs más teendőnk, mint a teljesen üres plate-ekből nyert adatokat átlagoljuk. Majd ezzel egyesével javítjuk, a kezelés nélküli sejtek méréséből kapott adatoknak vesszük az átlagát, végül ezzel az értékekkel korrigáljuk a releváns well-ek adatait.



8. ábra Oil Red O kvantitálás -Plate 1



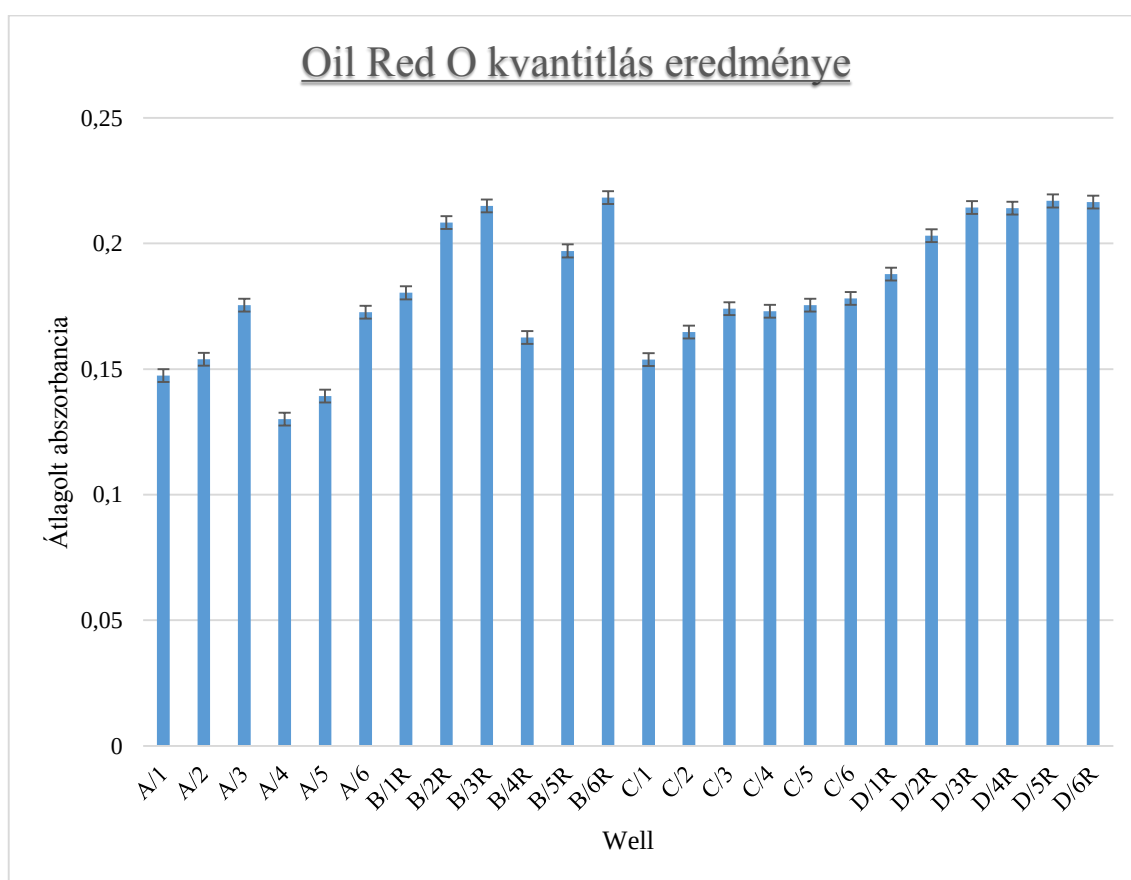
9. ábra Oil Red O kvantitálás -Plate 2



10. ábra Oil Red O kvantitálás-Plate 3

### 3.3.1. A kvantitálásból levonható konklúziók

A mérés eredményeit szemlélve megállapíthatjuk, hogy azok teljes mértékben igazolják a mikroszkópos vizsgálat során látottakat. A Roziglitazonos well-ek szignifikánsan magasabb értékeket mutatnak, mint az ezt nélkülözőek. Jól kitűnik a Dexametazon hiányos well-ek igen alacsony abszorbanciája, mely jól alátámasztja a tapasztaltakat. A mérés alapján viszont a második helyre az IBMX kerül, alacsonyabb abszorbanciát érve el az Inzulinnál, mind a normál, mind a Roziglitazonos well-eknél, megcáfolva ezzel a mikroszkópos szemrevételezésből levonható következtetést.



11. ábra Oil Red O kvantálás eredményeinek átlagolása

## 4. További tervek

Az Oil Red O festés nagyszerű mutatója a differenciáció végtermékének, ám ha az egyes komponensek génszinten kiváltott hatására vagyunk kíváncsiak, mélyebbre kell ásni. Épp ezért a kísérlet folytatása egy qPCR vizsgálat lehet, melynek során a differenciációra legnagyobb hatást gyakorló géntermékek mennyiségét vehetjük górcső alá. Az ehhez vezető rögzös út első állomásaként, mint fentebb írtam a sejteket trizolban felvettem, s belőlük az RNS izolálás is megtörtént az alábbiak szerint.

### 4.1. RNS izolálás

1. 0,5ml trizolos mintához 100µl szobahős kloroform hozzáadása
2. Le-fel forgatás eppendorf tartóban
3. 5 perc inkubálás szobahős rázaton
4. 15 perc centrifugálás 16.000g-vel 4 °C-on
5. A felső vizes fázis átpipettázása új, feliratozott eppendorf csőbe
6. 375 µl Izopropanol hozzáadása, felrázás 4-5x
7. 10 perc inkubálás szobahőmérsékleten, közben néha átforgatva
8. 10 perc centrifugálás 16.000g-vel 4 °C-on
9. A felülúszó leszívása. ügyelve a pelletre
10. A pellet mosás 1 ml 75%-os fagyos etanollal
11. A minták összeforgatása után 10 perc centrifugálás 12.000g-vel 4 °C-on
12. Minták beszárítása Speed Vac-ben, V-AL programmal, szobahőmérsékleten
13. Az RNS felvétele 40 µl NFW-ben
14. 10 perc inkubálás 65 °C-on
15. Vortexelés és lehúzás
16. Koncentrációmérés NanoDroppal

#### 4.1.1. NanoDrop mérési eredmények

| Sample ID          | ng/ul  | 260/280 | 260/230 |
|--------------------|--------|---------|---------|
| NFW_pzoli_10.13    | 0,05   | 1,34    | 0,05    |
| II/A1_pzoli_10.13  | 354,51 | 1,96    | 0,95    |
| II/A2_pzoli_10.13  | 318,98 | 1,91    | 0,79    |
| II/A3_pzoli_10.13  | 247,23 | 1,96    | 0,52    |
| II/A4_pzoli_10.13  | 325,73 | 1,98    | 0,93    |
| II/A5_pzoli_10.13  | 413,69 | 1,8     | 1,02    |
| II/A6_pzoli_10.13  | 274,3  | 1,9     | 0,64    |
| II/B1R_pzoli_10.13 | 299,44 | 1,93    | 0,77    |
| II/B2R_pzoli_10.13 | 282,31 | 1,95    | 0,75    |
| II/B3R_pzoli_10.13 | 228,75 | 1,95    | 0,91    |
| II/B4R_pzoli_10.13 | 301,42 | 1,94    | 0,84    |
| II/B5R_pzoli_10.13 | 246,96 | 1,92    | 0,63    |
| II/B6R_pzoli_10.13 | 338,02 | 1,86    | 0,82    |
| II/C1_pzoli_10.13  | 350,38 | 1,87    | 0,93    |
| II/C2_pzoli_10.13  | 177,02 | 2,01    | 0,69    |
| II/C3_pzoli_10.13  | 317,57 | 1,78    | 0,8     |
| II/C4_pzoli_10.09  | 242,3  | 2,04    | 1,48    |
| II/C5_pzoli_10.09  | 326,65 | 1,94    | 0,68    |
| II/C6_pzoli_10.09  | 326,22 | 1,95    | 1,44    |
| II/D1R_pzoli_10.13 | 363,76 | 1,87    | 0,82    |
| II/D2R_pzoli_10.13 | 260,63 | 1,9     | 0,58    |
| II/D3R_pzoli_10.13 | 251,45 | 1,98    | 0,75    |
| II/D4R_pzoli_10.09 | 291,93 | 1,99    | 1,26    |
| II/D5R_pzoli_10.09 | 449,96 | 1,9     | 1,09    |
| II/D6R_pzoli_10.09 | 358,39 | 1,91    | 0,79    |

12. ábra RNS mennyiségmérés

| Sample ID           | ng/ul  | 260/280 | 260/230 |
|---------------------|--------|---------|---------|
| NFW_pzoli_10.15     | 0,13   | 0,43    | 0,2     |
| III/A1_pzoli_10.15  | 269,58 | 1,94    | 0,6     |
| III/A2_pzoli_10.15  | 249,83 | 1,94    | 1,72    |
| III/A3_pzoli_10.15  | 296,86 | 1,95    | 1,32    |
| III/A4_pzoli_10.15  | 313,08 | 1,95    | 0,96    |
| III/A5_pzoli_10.15  | 331,36 | 1,91    | 1,3     |
| III/A6_pzoli_10.15  | 368,4  | 1,93    | 1,18    |
| III/B1R_pzoli_10.15 | 252,59 | 1,95    | 1,18    |
| III/B2R_pzoli_10.15 | 225,34 | 1,9     | 0,96    |
| III/B3R_pzoli_10.15 | 170,73 | 1,93    | 1,57    |
| III/B4R_pzoli_10.15 | 156,92 | 1,96    | 1,27    |
| III/B5R_pzoli_10.15 | 121,03 | 1,73    | 0,16    |
| III/B6R_pzoli_10.15 | 250,7  | 1,92    | 1,09    |
| III/C1_pzoli_10.15  | 277,94 | 2       | 1,5     |
| III/C2_pzoli_10.15  | 286,14 | 1,95    | 1,11    |
| III/C3_pzoli_10.15  | 242,18 | 1,97    | 0,53    |
| III/C4_pzoli_10.15  | 274,88 | 1,87    | 0,84    |
| III/C5_pzoli_10.15  | 276,67 | 1,96    | 1,38    |
| III/C6_pzoli_10.15  | 194,65 | 2,01    | 1,35    |
| III/D1R_pzoli_10.15 | 342,15 | 1,83    | 0,9     |
| III/D2R_pzoli_10.15 | 286,31 | 1,91    | 0,97    |
| III/D3R_pzoli_10.15 | 193,53 | 2,01    | 1,05    |
| III/D4R_pzoli_10.15 | 178,37 | 1,93    | 1,1     |
| III/D5R_pzoli_10.15 | 282,86 | 1,94    | 1,16    |
| III/D6R_pzoli_10.15 | 431,03 | 1,74    | 1,06    |

13. ábra RNS mennyiségmérés

## 5. Összegzés

Az elmúlt 20 évben az in vitro rendszerek kiemelkedően hasznosnak bizonyultak az adipocita differenciáció tanulmányozásában. Ez a sejten belüli molekuláris események alaposabb feltárásához vezetett melyek a differenciálatlan fibroblaszt szerű preadipocitákból érett adipocitáká történő átalakulása közben zajlanak. Különböző preadipocita sejtvonalakat és kötőszöveti primer kultúrákat használnak prekursor sejtekként. Az elő zsírsejt vonalak, valamint az elsődleges preadipociták már kizárólagos módon elkötelezték magukat az adipocita fejlődés irányába, habár ezen fejlődést különböző stádiumai reprezentálják. A legelterjedtebb ilyen sejtvonal a kísérleteim során is alkalmazott 3T3-L1. Ezen vonal eredete a Swiss 3T3 sejtekre vezethető vissza, melyeket 17-től 19 napos egér embriókból izoláltak.

A differenciáció növekedési fázisa alatt a preadipocita vonal sejtjei morfológiájukban hasonlóak egy fibroblaszthoz. A sejtek konfluens állapotában a megfelelő kezeléssel indukált differenciáció hatására a sejtek alakja drasztikusan megváltozik. A preadipociták gömb alakúvá válnak, zsírcseppek akkumulálódnak bennük, s fokozatosan kialakulnak az érett zsírsejtekre jellemző morfológiai és biokémiai jellemvonások. A differenciáció természete főként az alkalmazott sejtvonaltól függ. Így hát számos protokoll közül válogathatunk a preadipocita esetén. A 3T3-L1 preadipociták spontán differenciációján túl a sejtkultúra FCS-mal (fetal calf serum) való kezelés hatására néhány hét alatt zsírsejt kultúrát érhetünk el. Ez tovább fokozható indukáló ágensek alkalmazásával mit a Dexametazon a 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) mely egy foszfodiészteráz inhibitor. Ezen komponenseket magas koncentrációjú inzulinnal kombinálva használják. Az említett ágensek közös ismérve, hogy jelentős mértékben fokozzák a differenciációt.

Munkám első fázisában a differenciáció reprodukálása volt a cél. Ehhez a már említett 3T3-L1 sejtvonalat használtam. A 14 napon át zajló differenciáltatás során a sejtek komoly változásokon mentek át. Morfológiájuk fibroblaszt szerűről gömbölydeddé vált, s bennük az idő előrehaladtával mint számban, mint méretben egyre gyarapodó lipid cseppek jelentek meg. Az átalakulás mértékére jelentős katalitikus hatással bírt a Roziglitazon. A normál wellekkel összevetve, jóval több átalakult sejt s bennük több

továbbá nagyobb zsírcseppek voltak megfigyelhetek a mikroszkóp lencsén keresztül. A differenciációs protokoll végeztével, a jobb megfigyelhetőségért a sejtek megfestésére került sor. Ehhez egy zsírban oldódó lizokróm festéket az Oil Red O-t használtam, mely a neutrális triglicerideket és lipideket, továbbá néhány lipoproteint tud megfesteni. Így immár az érett zsírsejtek szépen elkülönültek az át nem alakult sejtektől. Ezek fényében kijelenthető, hogy a differenciáltatás sikeresen lezajlott. Érett zsírsejtek jelentek meg mind a kontroll mind a roziglitazonos wellekben, ám ez utóbbiban jól látható az említett komponens differenciációra gyakorolt jótékony hatása. A kontroll wellekben az átalakult sejtek kb 5-10%-ot tettek ki, míg a roziglitazonos minták esetén ez a szám 30% körülire volt tehető.

Ezek után immár arra a kérdésre kerestem választ, hogy a differenciáltatáshoz használt egyes komponensek milyen mértékben befolyásolják az átalakulást. Ekkor a differenciáltatások már 24-welles plate-en zajlottak, a költséghatékonyságot s a hatékonyabb munkavégzést szem előtt tartva. A kérdés megválaszolásának módja, hogy a plate-et négy szekcióra osztom, így vizsgálva az egyes összetevőket. Az I. IBMX, a II. Dexametazon, a III. Inzulin, végül a IV. Kontrollként szolgált. Minden rész hat well-t foglal magába, ahol is az első oszlop nem tartalmazza valamely komponens, a középső oszlop well-jeibe fél adag kerül az adott komponensből, míg az utolsó oszlopba a teljes mennyiség belekerül. Természetesen az adott szekcióban csak az ahhoz tartozó komponens mennyiségével játszunk, a többi alkotó teljes mennyiségben kerül a sejtek médiumaihoz. Mindezen túl, minden szekció alsó sorában található well-ek teljes adag Roziglitazont is kapnak.

A differenciáltatás menete, teljes mértékben megegyezik a korábban leírttal, mindössze a felhasznált differenciációs médium I összetételében, valamint az inzulin hatását vizsgáló well-eknél a differenciációs médium II-nél is, tér el attól.

A differenciáltatás ebben az esetben is lezajlott, s a festést követően az alábbi következtetések voltak levonhatóak. Az adipocitózisra a legnagyobb hatást a Dexametazon megvonása gyakorolja, mivel ebben az esetben szinte alig-alig észlelhető differenciálódott sejt a well-ekben. Ám még ilyenkor is jól észrevehető a Roziglitazon intenzifikáló hatása, hisz úgymond „helyettesíteni” képes a Dexametazont, így kiváltva a zsírosodást. A kiváltott hatás mértékének alapján a második helyet az Inzulin foglalja el. Itt is jelentős a lemaradás a kontroll well-ekhez képest, s a Roziglitazon hatása az előbb említettet hasonlóan itt is jótékonyan érvényesül. A legkisebb eltérést a kontrolltól az IBMX hiányos well-ek mutatják.

A pontosabb eredmények kiderítése érdekében azonban szükséges volt az eredmények kvantitálása is, melyre az Oil Red O festés szolgáltatott alapot. Ez a festék, sejtekből való kivonásával történt, s az egyes well-ekből így kinyert festék abszorbanciája mérhető volt egy fotométer segítségével. Ezt követően már számszerű adatok álltak rendelkezésre, melyek a hátterekkel való korrigálás után már jól összevethetőek voltak.

Ezeket szemlélve megállapíthatjuk, hogy mikroszkópos vizsgálat során látottakhoz hasonló eredményeket kaptunk. A Roziglitazonos well-ek szignifikánsan magasabb értékeket mutatnak, mint az ezt nélkülözők. Jól kitűnik a Dexametazon hiányos well-ek igen alacsony abszorbanciája, mely alátámasztja a tapasztaltakat. A mérés alapján viszont a második helyre az IBMX kerül, alacsonyabb abszorbanciát érve el az Inzulinnál, mind a normál, mind a Roziglitazonos well-eknél, megcáfolva ezzel a mikroszkópos szemrevételezésből levonható következtetést.

Ezen tények birtokában kijelenthető, hogy az adipocita differenciációhoz használt komponensek legfontosabb tagja a már oly sokat emlegetett Roziglitazont kivéve a Dexametazon. Ugyan is ennek hiányában a differenciáció mértéke jóval alulmúlja az ezt a komponenst is tartalmazó sejtek differenciációs készségét.

Ám a kérdés ezzel korán sincs megválaszolva. A továbbiakban érdemes a vizsgálódást géntermék szinten folytatni így egy qPCR vizsgálat alapjait a már elvégzett RNS izolálási lépéssel letettem.

Végezetül még egyszer szeretném nyomatékosítani az adipocita differenciáció tanulmányozásának jelentőségét, hisz napjainkban rohamosan növekszik a krónikus elhízásos esetek gyakorisága. Ez igen komoly egészségügyi kockázatot jelent főként a fejlett országokban, s igen szoros kapcsolatban áll a kóros betegségek egyre gyarapodó számával.