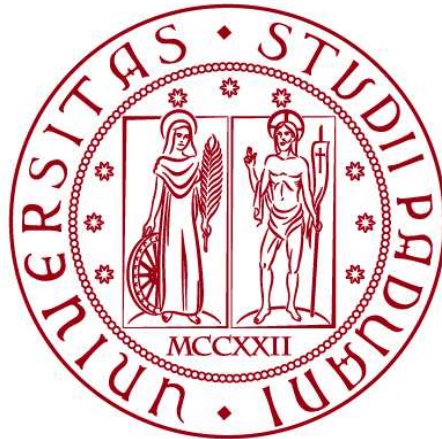


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



**ELABORATO DI LAUREA**

**L'inibizione della cascata di segnale evocata dalla serotonina attraverso il recettore HTR2B nel tessuto adiposo viscerale migliora la resistenza all'insulina correlata all'obesità**

Tutor: Prof.ssa Marina de Bernard  
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Francesca Bozzetto

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



## INDICE

ABSTRACT.....	3
<b>1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO.....</b>	<b>5</b>
1.1 Tessuto adiposo e obesità.....	5
1.2 La resistenza all'insulina.....	6
1.3 Le patologie correlate all'obesità.....	7
1.4 La serotonina e le sue funzioni.....	8
<b>2. APPROCCIO SPERIMENTALE: materiali e metodi.....</b>	<b>9</b>
2.1 Modelli murini.....	9
2.2 Campioni di tessuto adiposo umano.....	9
2.3 Isolamento degli adipociti dalla frazione vascolo stromale (SVF).....	9
2.4 Coltura primaria degli adipociti.....	9
2.5 Analisi istologiche.....	9
2.6 Immunofluorescenza.....	10
2.7 Test di tolleranza al glucosio (GTT) e all'insulina (ITT).....	10
2.8 Clamp iperinsulinemico-euglicemico.....	10
2.9 Real-time RT-PCR.....	11
2.10 Western-blot.....	11
2.11 Quantificazione di acidi grassi liberi, glicerolo e trigliceridi epatici....	12
2.12 Determinazione dei livelli plasmatici di AST e ALT.....	12
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>12</b>
3.1 Il <i>signaling</i> di HTR2B è up-regolato nel tessuto adiposo viscerale dei topi obesi.....	12
3.2 Inibire la cascata di segnale della serotonina attraverso HTR2B nel tessuto adiposo migliora la resistenza all'insulina indotta da HFD.....	13
3.3 La segnalazione della serotonina tramite HTR2B promuove la lipolisi nel tessuto adiposo viscerale.....	15
3.4 La serotonina porta alla fosforilazione di HSL tramite la cascata di segnale Ca <sup>2+</sup> -cGMP-PKG in eWAT.....	16
3.5 Inibire il <i>signaling</i> di HTR2B migliora la steatosi epatica indotta da HFD.....	16
3.6 L'inibizione farmacologica di HTR2B migliora le disfunzioni metaboliche indotte da HFD.....	17
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>19</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>20</b>
<b>6. APPENDICE.....</b>	<b>20</b>



## **ABSTRACT**

La resistenza all'insulina è una condizione che si riscontra frequentemente nei soggetti obesi e nelle patologie correlate all'obesità, come ad esempio la sindrome metabolica, il diabete di tipo 2 e la steatosi epatica non alcolica. Nell'articolo di Won Gun Choi *et al.* analizzato in questo elaborato, si è dimostrato che inibire il segnale della serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) attraverso il recettore della serotonina HTR2B nel tessuto adiposo viscerale migliora la resistenza all'insulina, riducendo il tasso di lipolisi negli adipociti.

Sia in topo che in uomo, HTR2B è risultato up-regolato nel tessuto adiposo viscerale dei soggetti obesi. Si è dunque provato a investigare il ruolo della serotonina e del suo recettore utilizzando topi *knockout* condizionali adipocita-specifici del gene *Htr2b*. Questi hanno mostrato non solo una maggiore sensibilità all'insulina ma anche una ridotta infiammazione del tessuto adiposo e un miglioramento della steatosi epatica, nonostante fossero sottoposti a una dieta ricca di grassi (*high-fat diet*, HFD). Effetti analoghi si sono ottenuti inibendo farmacologicamente HTR2B tramite un antagonista specifico. Quest'ultimo risultato suggerisce che l'inibizione di HTR2B possa essere in futuro impiegata come strategia per contrastare l'insulino-resistenza e la steatosi epatica nel paziente obeso.



# **1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO**

## **1.1 Tessuto adiposo e obesità**

L'obesità viene definita come una condizione patologica causata da un accumulo eccessivo di tessuto adiposo. La causa principale di sviluppo dell'obesità risiede in uno squilibrio tra l'apporto energetico assunto con l'alimentazione e il consumo energetico dell'organismo.

La diagnosi viene solitamente effettuata calcolando l'indice di massa corporea (*body mass index*, BMI), dato dal peso in chilogrammi diviso per il quadrato dell'altezza in metri. Questo indice, tuttavia, non sempre risulta efficace o sufficiente a definire lo stato di salute dell'obeso poiché questa patologia, e soprattutto le complicazioni ad essa correlate, possono essere estremamente variabili tra soggetti diversi, anche in base a fattori quali l'età, il sesso, eventuali squilibri ormonali o condizioni genetiche. Ciò che è emerso negli ultimi anni è come, nel valutare le condizioni di salute di un individuo obeso o in sovrappeso, sia molto più importante valutare la distribuzione del tessuto adiposo che non la quantità totale di tessuto stesso<sup>1</sup>. È possibile infatti distinguere diverse tipologie di tessuto adiposo. Vengono innanzitutto distinti il tessuto adiposo bianco (*white adipose tissue*, WAT) e quello bruno (*brown adipose tissue*, BAT). Il primo è formato da cellule, dette adipociti, che generalmente contengono una sola grande goccia lipidica che svolge la funzione di deposito di grassi neutri, mentre il secondo presenta adipociti contenenti numerose goccioline lipidiche e molti mitocondri, necessari alla produzione di calore mediante termogenesi. Il WAT si accumula in condizioni di obesità ed esso è a sua volta distinto in tessuto adiposo sottocutaneo (*subcutaneous adipose tissue*, SAT), che caratterizza un tipo di obesità definita sottocutanea o ginoide, e tessuto adiposo viscerale (*visceral adipose tissue*, VAT), che caratterizza l'obesità viscerale o androide. SAT e VAT presentano differenze a livello anatomico, cellulare, molecolare, metabolico e fisiologico<sup>2</sup>.

Il SAT si localizza principalmente al di sotto della cute, nella metà inferiore dell'addome e nella regione gluteo-femorale, è meno vascolarizzato e presenta adipociti mediamente più piccoli rispetto al VAT. Quest'ultimo, ricco di adipociti di grandi dimensioni, si localizza a livello profondo nel tronco, anche nella parte alta dell'addome, e avvolge gli organi addominali, è maggiormente vascolarizzato e il sangue, ricco di adipochine e acidi grassi liberi (*free fatty acids*, FFAs), è drenato direttamente al fegato attraverso la vena porta. Il tessuto adiposo, in generale, non è solo una sede di deposito dei grassi ma si comporta come un vero e proprio organo e regola il metabolismo energetico dell'organismo. Esso è in grado di rispondere a stimoli ormonali e di produrre esso stesso ormoni, citochine e chemochine che prendono il nome di adipochine<sup>2</sup>. Anche in questo caso vi sono però delle differenze tra SAT e VAT. Il SAT produce la maggior parte della leptina, è più sensibile all'insulina e ha minor attività lipolitica, mentre il VAT produce più citochine pro-infiammatorie e angiotensina, è meno sensibile all'insulina e ha elevata attività lipolitica, oltre ad essere maggiormente infiltrato dalle cellule del sistema immunitario<sup>2</sup>. Nel complesso, un'obesità di tipo androide, che può essere valutata misurando il girovita, predispone ad un rischio cardiometabolico e di

sviluppo di complicanze legate all'obesità molto maggiore di un'obesità di tipo ginoide.

## 1.2 La resistenza all'insulina

L'insulino-resistenza è una condizione tipicamente riscontrata nei soggetti obesi, soprattutto per quanto riguarda l'obesità viscerale, e nelle patologie correlate all'obesità.

In condizioni normali, l'insulina partecipa all'omeostasi del glucosio, mantenendo la glicemia entro i livelli fisiologici. I bersagli principali di questo ormone sono il fegato, il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo. L'insulina è riconosciuta da recettori tirosin-chinasici dimerici che si attivano e fosforilano alcuni residui di tirosina dei loro domini citoplasmatici. A queste tirosine possono legarsi vari substrati che attivano vie di segnalazione diverse, ma uno dei substrati più noti e meglio caratterizzati è IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), il quale avvia una cascata di segnale che porta all'attivazione tramite fosforilazione della chinasi AKT. Fosfo-AKT (p-AKT) a sua volta fosforila vari effettori e fattori di trascrizione, attivandoli o inibendoli, con l'effetto finale di favorire la traslocazione dei trasportatori del glucosio sulla membrana plasmatica, la glicogenosintesi e la lipogenesi e di inibire la lipolisi e la gluconeogenesi<sup>3</sup>.

Negli individui insulino-resistenti, le cellule normalmente responsive all'insulina diventano insensibili agli effetti di questo ormone. La resistenza all'insulina è stata positivamente correlata con la concentrazione di acidi grassi liberi nel plasma e con un aumento della lipolisi. A tal proposito, diversi studi suggeriscono che alcuni intermedi lipidici intracellulari del metabolismo degli acidi grassi, in particolare i diacilgliceroli e le ceramidi, possano interagire con il *pathway* dell'insulina. In particolare, i diacilgliceroli sembra portino all'attivazione di alcune "novel" proteinchinasi C (nPKC) diverse da quelle convenzionali, quali ad esempio PKC- $\theta$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$ , in grado di interagire con il *signaling* dell'insulina a livello di IRS-1, mentre le ceramidi possono agire inattivando AKT tramite la PKC atipica  $\zeta$  o attivando la fosfatasi 2A, che defosforila AKT<sup>4</sup>. La resistenza all'insulina e la lipolisi stessa dipendono però anche dallo stato infiammatorio basale cronico che caratterizza gli individui obesi. Nel paziente con obesità, i monociti vengono richiamati nel tessuto adiposo tramite la chemochina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), prodotta dagli adipociti, e lì vanno a costituire la maggior parte delle cellule della frazione vascolo stromale del WAT, differenziandosi in macrofagi e assumendo un profilo funzionale pro-infiammatorio. A loro volta i macrofagi producono citochine pro-infiammatorie quali TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, che richiamano anche altre cellule immunitarie, ad esempio i linfociti Th1 e le cellule *natural killer*, che producono IFN $\gamma$ . Tutte queste citochine non si limitano al tessuto adiposo ma entrano anche in circolo, contribuendo così ad uno stato di infiammazione cronica basale. TNF $\alpha$  inoltre compromette il *signaling* dell'insulina a livello dei recettori dell'insulina, di IRS-1 e di traslocazione di GLUT4<sup>5</sup>. Le citochine pro-infiammatorie aumentano inoltre la lipolisi nel WAT, diminuendo l'espressione di proteine stabilizzatrici delle gocce lipidiche come la perilipina e FSP27, contribuendo così al rilascio di FFAs<sup>4</sup>.



### 1.3 Le patologie correlate all'obesità

Le patologie correlate all'obesità sono diverse e le più frequenti sono ad esempio l'aterosclerosi, il diabete mellito di tipo 2 e la steatosi epatica non alcolica. A precedere o ad accompagnare lo sviluppo di queste malattie, vi è spesso il manifestarsi della sindrome metabolica.

La sindrome metabolica. Con questo termine si designa un insieme di condizioni cliniche alterate che determina un aumento del rischio cardiometabolico, associato ad uno stato pro-infiammatorio e pro-trombotico. Gli attuali criteri per la diagnosi includono la presenza di obesità addominale, data da una circonferenza in vita maggiore di 94 cm per gli uomini e di 80 cm per le donne, unita ad almeno due dei seguenti fattori (o alla presenza di trattamenti per i seguenti fattori):

- Glicemia elevata:  $\geq 100$  mg/dL (5.55 mmol/L) a digiuno
- Ipertensione arteriosa:  $\geq 130/85$  mm Hg
- Elevati valori di trigliceridi:  $\geq 150$  mg/dL (1.7 mmol/L)
- Ridotti valori di colesterolo HDL:  $< 40$  mg/dL (1.03 mmol/L) per gli uomini e  $< 50$  mg/dL (1.29 mmol/L) per le donne

Il principale fattore causativo alla base dello sviluppo della sindrome metabolica è proprio la resistenza all'insulina, unita ad alte concentrazioni di FFAs circolanti e ad uno stato infiammatorio diffuso<sup>6</sup>.

L'aterosclerosi. L'aumento di FFAs circolanti porta ad un aumento di VLDL e di LDL. Queste, in presenza di uno stress ossidativo oltre che infiammatorio, possono ossidarsi ed essere poi fagocitate dai macrofagi al di sotto dell'endotelio dei vasi, contribuendo a formare la placca aterosclerotica. Con l'aumento della massa grassa aumenta inoltre la produzione del mediatore pro-trombotico PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*) mentre diminuisce la produzione dell'adiponectina<sup>6</sup>, un'adipochina anti-aterogena che normalmente inibisce l'espressione di molecole di adesione e che sopprime la proliferazione di cellule muscolari lisce e la trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose<sup>2</sup>.

Il diabete mellito di tipo 2 (type-2 diabetes mellitus, T2DM). La resistenza all'insulina pone le basi per lo sviluppo di questa patologia. Definire con precisione in che modo l'insulino-resistenza conduca allo sviluppo del diabete non è semplice e i meccanismi sono solo in parte chiariti. Quello che noto è che, prima dello sviluppo del T2DM, le cellule  $\beta$  del pancreas cercano di compensare la resistenza all'insulina attraverso l'ipersecrezione di questo ormone, aumentando la loro massa e il loro numero, creando così uno stato di iperinsulinemia. Questa condizione a sua volta sembra condurre ad ulteriore insulino-resistenza e scompenso delle cellule  $\beta$  che infine perdono la loro funzionalità e vitalità, portando allo sviluppo della malattia. Diversi studi evidenziano infatti come l'insulina stessa, in quantità fisiologiche, possa stimolare in modo autocrino le cellule  $\beta$ , innanzitutto favorendo l'ulteriore rilascio dell'ormone e in seguito inibendone la secrezione quando la glicemia si è normalizzata, mentre ad alte e persistenti concentrazioni essa alteri il suo stesso *signaling* a livello periferico e conduca ad uno scompenso delle cellule  $\beta$  pancreatiche, riducendone la vitalità a causa dello stress ossidativo e/o inducendone l'apoptosi<sup>7</sup>.

La steatosi epatica non alcolica (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). La NAFLD è una patologia del fegato caratterizzata da un accumulo di lipidi a livello epatico, principalmente trigliceridi (TGs), non dovuta ad abuso di alcol. Se non gestita, può evolvere in steatoepatite non alcolica (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), una condizione in cui il fegato viene infiltrato da cellule immunitarie che innescano un processo infiammatorio. Se l'infiammazione persiste, si può arrivare allo sviluppo di cirrosi e, nei casi più gravi, di carcinoma epatocellulare. Nei soggetti obesi con insulino-resistenza la quantità di FFAs circolanti è maggiore che nei soggetti normopeso, a causa dell'alto tasso di lipolisi, e questi possono raggiungere il fegato, soprattutto dal VAT, ed essere convertiti in TGs. L'eccessivo accumulo di lipidi e dei metaboliti della loro ossidazione contribuisce a rendere disfunzionali gli epatociti, a innescare il processo infiammatorio e il successivo processo fibrotico<sup>8</sup>.

#### **1.4 La serotonina e le sue funzioni**

La serotonina, o 5-idrossitriptamina (5-HT), è un'ammina coinvolta in diverse funzioni, sia a livello del sistema nervoso centrale (SNC), sia a livello dei tessuti periferici. È sintetizzata a partire dal triptofano, che viene idrossilato dall'enzima TPH (Trp idrossilasi) a dare il 5-idrossitriptofano (5-HTP), poi convertito in 5-HT dalla decarbossilasi degli amminoacidi aromatici (AADC). TPH esiste in due isoforme: TPH1 è espresso nei tessuti periferici, mentre TPH2 nel tronco encefalico. La 5-HT non attraversa la barriera ematoencefalica, perciò il pool centrale e quello periferico restano spazialmente e funzionalmente separati. Le diverse funzioni della 5-HT si esplicano attraverso il legame ad uno dei suoi 14 recettori (HTR), tutti accoppiati a proteine G, eccetto HTR3 che è un canale ionico<sup>9</sup>.

A livello di SNC la 5-HT agisce da neuromodulatore, può sopprimere l'appetito e stimolare il dispendio energetico del BAT<sup>9</sup>, oltre a regolare i ritmi sonno-veglia, il livello di attenzione, l'ansia e l'aggressività.

La maggior parte della 5-HT, tuttavia, è prodotta a livello periferico dalle cellule enterocromaffini (EC) del tratto gastrointestinale, dove a sua volta regola l'attività peristaltica e l'assorbimento dei nutrienti. Parte della 5-HT viene poi trasportata al circolo sanguigno, raggiungendo così molti altri organi bersaglio. Essa favorisce l'accumulo di lipidi nel fegato<sup>9</sup>, ma anche la gluconeogenesi in condizioni di digiuno<sup>10</sup>, stimola l'assorbimento di glucosio nel muscolo<sup>9</sup>, modula il rimodellamento osseo<sup>10</sup> e agisce da fattore chemiotattico per potenziare la risposta immunitaria<sup>9</sup>. Piccole quantità di 5-HT sono prodotte anche dalle isole pancreatiche, per promuovere in modo paracrino la secrezione di insulina e inibire quella del glucagone<sup>9</sup>. La 5-HT periferica è anche in grado di inibire la termogenesi nel BAT, così come il "*browning*" degli adipociti bianchi in beige, mentre le funzioni nel WAT cambiano radicalmente a seconda del recettore che viene attivato: tramite HTR2A vengono favoriti l'assorbimento dei lipidi e la lipogenesi, ad esempio dopo un pasto<sup>9</sup>, mentre attivando HTR2B viene favorita la lipolisi, ad esempio in condizioni di digiuno<sup>10</sup>. Le cellule EC sono stimulate a produrre 5-HT in risposta a nutrienti come il glucosio e gli acidi grassi perciò è probabile che una dieta scorretta possa alterare il *signaling* della serotonina e portare ad esiti fisiologici diversi.

## **2. APPROCCIO SPERIMENTALE: materiali e metodi**

Nell'articolo di Won Gun Choi *et al.* analizzato in questo elaborato, i ricercatori hanno deciso di investigare il ruolo del *signaling* della serotonina attraverso il recettore HTR2B nel tessuto adiposo viscerale di topi sottoposti ad una dieta ad alto contenuto di grassi. Di seguito verranno elencati i principali metodi sperimentali utilizzati.

### **2.1 Modelli murini**

Per studiare i cambiamenti di espressione di Htr2a e Htr2b nel tessuto adiposo, sono stati utilizzati topi del ceppo C57BL/6J nutriti con una dieta standard (*standard chow diet*, SCD) oppure con una dieta ad alto contenuto di grassi (*high-fat diet*, HFD). Da questi individui sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo dell'epididimo (eWAT), a rappresentare il tessuto adiposo viscerale, e di tessuto adiposo inguinale (iWAT), a rappresentare il tessuto adiposo sottocutaneo, oltre a campioni di tessuto adiposo bruno (BAT). Campioni di eWAT sono stati prelevati anche da topi *ob/ob*, privi della leptina. Per investigare il *signaling* tramite Htr2b in WAT si sono invece usati topi *Adiponectin-Cre<sup>+/-</sup> Htr2b<sup>fl/fl</sup>* (*Htr2b*-FKO), ossia topi *knockout* condizionali adipocita-specifici del gene Htr2b, sottoposti ad HFD, assieme ai topi *Htr2b<sup>fl/fl</sup>* usati come controllo (Ctl).

### **2.2 Campioni di tessuto adiposo umano**

Per verificare la rilevanza fisiologica dell'espressione di HTR2A e HTR2B nell'uomo, sono stati prelevati campioni di grasso viscerale da soggetti magri sottoposti a nefrectomia e da soggetti obesi (con o senza T2DM) sottoposti a bypass per la riduzione del peso.

### **2.3 Isolamento degli adipociti dalla frazione vascolo stromale (SVF)**

Separare gli adipociti dal resto delle cellule della SVF è essenziale se si vuole analizzare l'espressione genica esclusivamente in una delle due frazioni, dato che le tipologie cellulari sono molto diverse, e anche se si vogliono poi mettere in coltura gli adipociti primari. Il tessuto prelevato è stato dunque sminuzzato e incubato in agitazione per 30 minuti a 37°C nel *buffer* di isolamento (3% di BSA in HBSS) a cui è aggiunto 1 mg/mL di collagenasi di tipo II. Adipociti e SVF sono stati separati dal tessuto non digerito per filtrazione e poi separati tra di loro per centrifugazione a 800g per 10 minuti a 4°C.

### **2.4 Coltura primaria degli adipociti**

Gli adipociti isolati da eWAT sono stati messi in coltura in *medium* DMEM con aggiunta di 100 µg/mL di penicillina/streptomicina per prevenire la contaminazione batterica. Per alcuni esperimenti, gli adipociti sono stati inoltre trattati con diverse sostanze chimiche e messi a incubare in agitazione.

### **2.5 Analisi istologiche**

Campioni di tessuto adiposo e di fegato sono stati confrontati a livello istologico per evidenziare eventuali differenze tra topi *Htr2b*-FKO e topi di controllo. I tessuti

raccolti sono stati dapprima fissati in paraformaldeide, che preserva la struttura cellulare creando dei *crosslink* tra le proteine, poi inclusi in paraffina che, una volta solidificata, consente di tagliare il tessuto in sezioni sottili, in questo caso 5  $\mu\text{m}$ . Le sezioni sono state poi deparaffinizzate, reidratate e colorate con la classica colorazione H&E, che utilizza due coloranti: l'ematossilina (basica), che colora di viola scuro il nucleo, e l'eosina (acida) che colora di rosa il citoplasma.

## 2.6 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica che permette di identificare in modo selettivo una o più componenti cellulari o tissutali, tramite il riconoscimento di queste da parte di un anticorpo. Il tessuto adiposo dei topi *Htr2b*-FKO è stato confrontato con quello dei topi Ctl, soprattutto per confrontare il grado di infiltrazione da parte dei macrofagi. I tessuti sono stati fissati in paraformaldeide in PBS, dopodiché i siti aspecifici sono stati bloccati con aggiunta del 5% di siero di capra o asino in PBST (0,3% di Triton X-100 in PBS) per 1 ora. Il Triton X-100 è un detergente non ionico che solubilizza le membrane cellulari, aiutando l'ingresso degli anticorpi nelle cellule. A seguire i tessuti sono stati incubati a 4°C *overnight* con gli anticorpi primari diretti contro le strutture/proteine che si desiderava rilevare. Nel caso in esame si è utilizzato un anticorpo prodotto in cavia anti-perilipina 1 (PLIN1), una proteina che riveste le gocce lipidiche degli adipociti, e un anticorpo prodotto in ratto anti-F4/80, una proteina di membrana usata come *marker* dei macrofagi. Dopo una serie di lavaggi in PBST, i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 2 ore con anticorpi secondari prodotti in capra: uno anti-cavia coniugato al fluoroforo TRITC, che emette nel rosso-arancio, e uno anti-ratto coniugato a FITC, che emette nel verde. L'utilizzo di anticorpi secondari permette di amplificare il segnale di fluorescenza, perché ad un anticorpo primario possono legarsi più secondari. Infine, i nuclei sono stati colorati con il colorante blu DAPI.

## 2.7 Test di tolleranza al glucosio (GTT) e all'insulina (ITT)

Questi due test sono stati utilizzati in topi *Htr2b*-FKO e Ctl per valutare i livelli di glucosio nel sangue, e dunque indirettamente la sensibilità all'insulina, in seguito ad iniezione di glucosio (GTT) o di insulina (ITT). Per il GTT vengono iniettati 2 g di glucosio per kg di peso dopo un digiuno di 16 ore, mentre per l'ITT viene iniettata 1 unità enzimatica per kg di peso di insulina dopo un digiuno di 6 ore. In entrambi i casi, la concentrazione di glucosio è misurata con il glucometro immediatamente prima dell'iniezione e poi a 15, 30, 60, 90 e 120 minuti da essa.

## 2.8 Clamp iperinsulinemico-euglicemico

Questa tecnica è stata utilizzata in topi *Htr2b*-FKO e Ctl per valutare *in vivo* la sensibilità all'insulina. Essa consiste nella somministrazione continua nell'animale di insulina (15 pmol/min) e nella contemporanea somministrazione di glucosio, in modo da mantenere la glicemia costante, con una concentrazione di 5-6 mM. La quantità di glucosio somministrata per kg al minuto necessaria a mantenere l'euglicemia è detta *glucose infusion rate* ed è una misura della sensibilità all'insulina: più il *rate* è elevato, maggiore è la sensibilità all'insulina, la quale

stimola infatti l'*uptake* del glucosio da parte dei tessuti. Oltre al glucosio, è anche possibile utilizzare alcuni suoi analoghi radio-marcati per determinare altri parametri. Nel caso in esame, il [3-<sup>3</sup>H]-glucosio (marcato con trizio) è utilizzato per calcolare la quantità totale di glucosio assunto dall'intero organismo grazie all'effetto dell'insulina (*glucose turnover rate*), dividendo il *rate* di somministrazione del [3-<sup>3</sup>H]-glucosio (in termini di radioattività) per l'attività specifica del glucosio plasmatico, ossia la misura della radioattività presente nel campione plasmatico.

## 2.9 Real-time RT-PCR

La real-time PCR (*polymerase chain reaction*), o *quantitative* PCR (qPCR), è un'evoluzione della tecnica della PCR che consente di determinare quantità relative di DNA (o cDNA) presenti in diversi campioni. Nella maggioranza dei casi, viene utilizzata per valutare l'espressione genica, partendo dall'mRNA che viene retrotrascritto in cDNA a singolo filamento che farà poi da stampo per la PCR (*quantitative reverse transcriptase* PCR, qRT-PCR). Il concetto di base è quello di monitorare la quantità di amplicone ad ogni ciclo di PCR, analizzando la quantità di fluorescenza prodotta da una molecola intercalante: maggiore è la quantità di templato di partenza, prima si raggiungerà il cosiddetto ciclo soglia ( $C_t$ ), ossia il ciclo di amplificazione in cui la fluorescenza del campione diventa rilevabile. Normalizzando i valori di  $C_t$  ottenuti con quelli di un gene *housekeeping*, la cui espressione è attesa non cambiare, è possibile determinare l'espressione relativa di due o più geni. Nell'articolo in analisi, la qRT-PCR viene usata per monitorare l'espressione di molti geni, partendo da 1 µg di RNA totale estratto con il reagente Trizol e retrotrascritto. La proteina ribosomale 36B4 è usata come gene *housekeeping* di riferimento. L'espressione relativa è calcolata con il metodo del  $\Delta\Delta C_t$ .

## 2.10 Western-blot

Il western-blot permette di individuare la presenza di una certa proteina in un campione, sfruttando il riconoscimento antigene-anticorpo, e di confrontarla in maniera semi-quantitativa tra campioni diversi. I lisati proteici sono caricati in un gel per SDS-PAGE, in modo da separare le proteine per dimensione. Queste sono poi trasferite ad una membrana di nitrocellulosa o di PVDF, mantenendo la stessa separazione che avevano nel gel. Dopo aver bloccato i siti aspecifici con una soluzione di BSA o latte in polvere, la membrana viene incubata con l'anticorpo primario diretto contro la proteina di interesse e, solitamente, anche con un anticorpo secondario. Quest'ultimo è coniugato con un enzima che, in presenza del suo substrato, genera un prodotto chemiluminescente o colorato. Per assicurarsi della buona riuscita dell'esperimento e di aver caricato la stessa quantità di proteine per ogni pozzetto del gel, viene rilevata anche la presenza di una proteina ubiquitaria, la cui quantità dovrebbe restare circa la stessa in tutti i campioni. Nello studio analizzato, il western-blot viene utilizzato per rilevare HSL (*Hormone-sensitive lipase*), fosfo-HSL, AKT e fosfo-AKT, mentre come controllo si è scelta la  $\beta$ -actina. I lisati cellulari sono stati ottenuti incubando le cellule nel *buffer* di lisi RIPA, centrifugandole e prelevando i surnatanti. La concentrazione

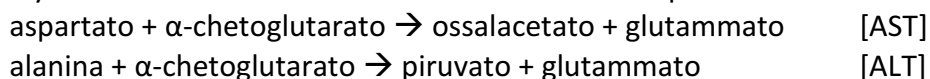
proteica è stata determinata con il metodo del BCA (acido bicinconinico). Dopo l' SDS-PAGE e il trasferimento in membrana, quest'ultima è saturata con BSA al 5% e poi incubata con gli anticorpi primari diluiti 1:1000. La membrana è stata poi lavata in TBST (TBS+0,1% di Tween-20, un detergente non ionico) e incubata con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (HRP). È stato poi fornito il substrato ECL, contenente luminolo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: la HRP ossida il luminolo fornendo un substrato chemiluminescente.

### 2.11 Quantificazione di acidi grassi liberi, glicerolo e trigliceridi epatici

I FFAs plasmatici sono stati quantificati utilizzando il kit "NEFA HR.II" (Wako), secondo il protocollo del produttore, mentre il glicerolo rilasciato nel surnatante dalle cellule in coltura è stato quantificato tramite il "free glycerol reagent" (MilliporeSigma), sempre seguendo il protocollo del produttore. I TGs epatici sono stati analizzati indirettamente, omogenizzando il tessuto con il detergente NP-40 al 5% e solubilizzando i TGs con due cicli di riscaldamento a 95°C per 5 min seguiti da raffreddamento a 23°C e da trattamento con il "Triglyceride Reagent" (Sigma-Aldrich) per favorire la loro idrolisi, così da liberare il glicerolo per la sua quantificazione tramite il "free glycerol reagent" (MilliporeSigma).

### 2.12 Determinazione dei livelli plasmatici di AST e ALT

Le concentrazioni di queste transaminasi sono state determinate con il metodo dell'assorbimento nell'UV messo a punto dall'International Federation of Clinical Chemistry. Le reazioni catalizzate da AST e da ALT sono rispettivamente:

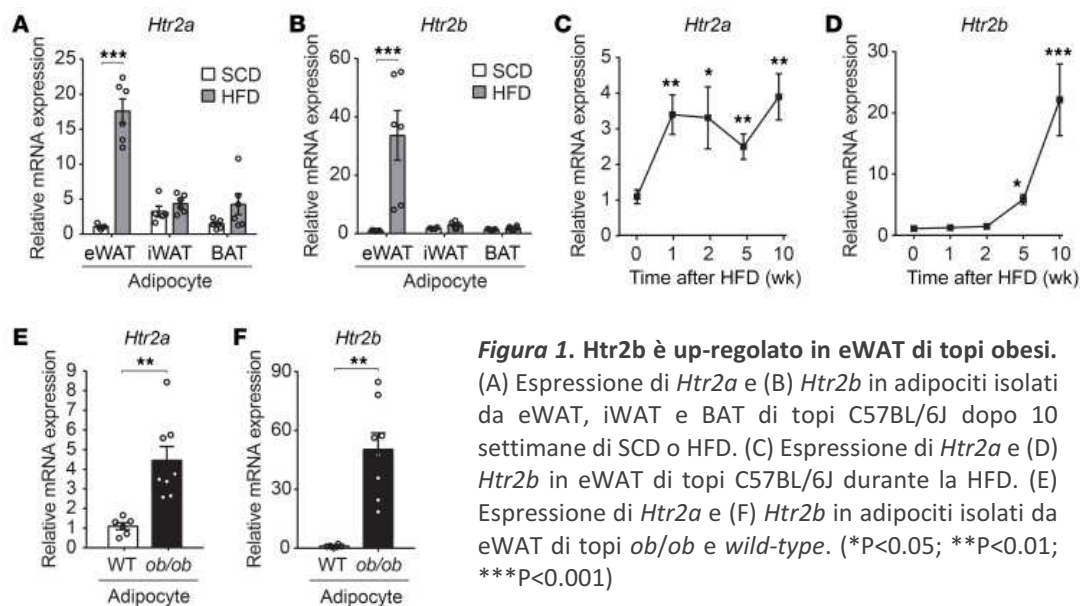


Ossalacetato e piruvato reagiscono poi con il NADH, che viene ossidato a NAD<sup>+</sup>. In breve, si aggiungono ai campioni di plasma i substrati e gli enzimi necessari a far avvenire le reazioni appena descritte: la quantità di NADH ossidato, rilevabile dalla variazione di assorbanza, è proporzionale alle concentrazioni di AST e ALT.

## 3. RISULTATI

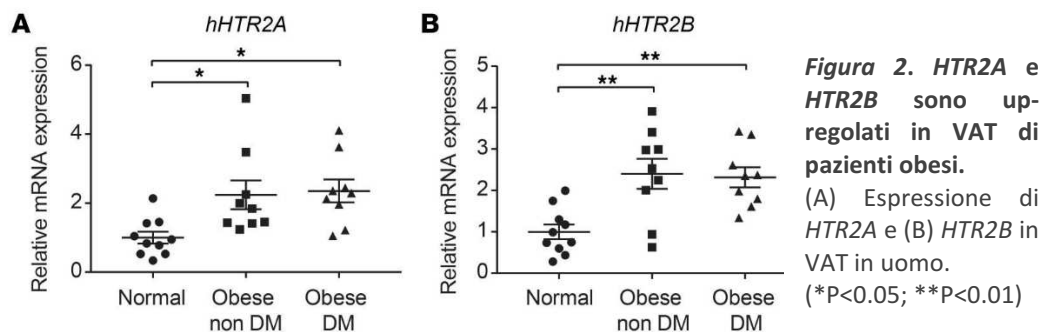
### 3.1 Il *signaling* di HTR2B è up-regolato nel tessuto adiposo viscerale dei topi obesi

Prima di tutto, si è valutata l'espressione di Htr2a e di Htr2b negli adipociti isolati da eWAT, iWAT e BAT di topi C57BL/6J nutriti con dieta standard (SCD) oppure ipercalorica (HFD). L'analisi è stata fatta mediante qRT-PCR. La stessa analisi è stata condotta sugli adipociti isolati da eWAT di topi *ob/ob* e *wild-type*. Dopo dieci settimane di HFD l'espressione sia di Htr2a che di Htr2b è aumentata significativamente, ma solamente nel tessuto adiposo viscerale (eWAT), mentre non sono state rilevate differenze significative in iWAT o in BAT (Fig.1 A, B). L'espressione di Htr2b, a differenza di quella di Htr2a, non aumenta immediatamente con l'inizio della HFD ma, dalla seconda settimana in poi, l'aumento risulta molto maggiore rispetto ad Htr2a (Fig.1 C, D). Infine, entrambi i recettori sono risultati maggiormente espressi nei topi *ob/ob* rispetto ai *wild-type* (Fig.1 E, F).



**Figura 1. Htr2b è up-regolato in eWAT di topi obesi.** (A) Espressione di *Htr2a* e (B) *Htr2b* in adipociti isolati da eWAT, iWAT e BAT di topi C57BL/6J dopo 10 settimane di SCD o HFD. (C) Espressione di *Htr2a* e (D) *Htr2b* in eWAT di topi C57BL/6J durante la HFD. (E) Espressione di *Htr2a* e (F) *Htr2b* in adipociti isolati da eWAT di topi *ob/ob* e *wild-type*. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

Questi risultati hanno spinto i ricercatori ad investigare l'espressione di *HTR2A* e di *HTR2B* anche in uomo. Anche in questo caso l'espressione è aumentata in VAT di pazienti obesi, senza però differenze tra diabetici e non diabetici (Fig.2 A, B). Si è deciso perciò di investigare il ruolo della cascata di segnale della serotonina attraverso HTR2B nel tessuto adiposo viscerale.

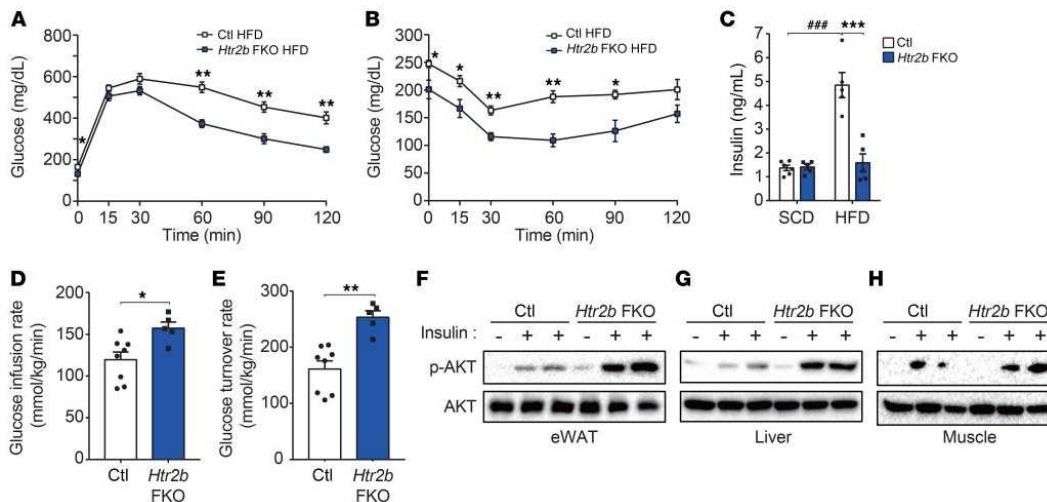


**Figura 2. HTR2A e HTR2B sono up-regolati in VAT di pazienti obesi.** (A) Espressione di *HTR2A* e (B) *HTR2B* in VAT in uomo. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

### 3.2 Inibire la cascata di segnale della serotonina attraverso HTR2B nel tessuto adiposo migliora la resistenza all'insulina indotta da HFD

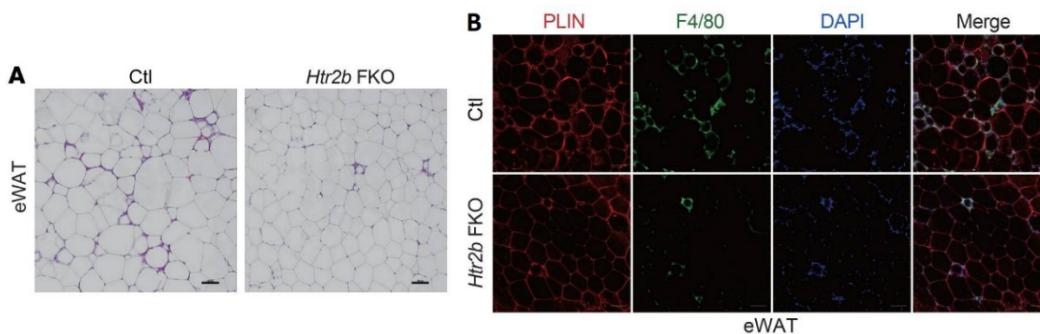
Il segnale della serotonina attraverso HTR2B è stato testato *in vivo* su topi *knockout* adipocita-specifici del recettore e nutriti per 10 settimane con HFD. Sottoposti a ITT e a GTT, essi hanno mostrato livelli di glucosio nel sangue minori rispetto ai controlli (Fig.3 A, B) e una ridotta insulinemia (Fig.3 C). Questi risultati indicano un miglioramento nella tolleranza al glucosio e dunque della resistenza all'insulina, risultati confermati anche dal clamp iperinsulinemico-euglicemico (Fig.3 D, E): i topi *Htr2b*-FKO, per mantenere l'euglicemia, necessitavano di un tasso di somministrazione del glucosio maggiore e hanno mostrato un maggior *turnover* del glucosio stesso.

La sensibilità all'insulina, inoltre, è aumentata non solo in eWAT ma a livello sistemico, come si può vedere dall'aumento di fosforilazione di AKT nei Western-blot di eWAT, fegato e muscolo (Fig.3 F, G, H).



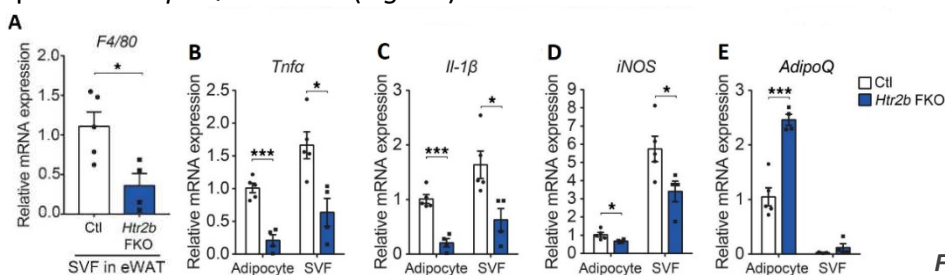
**Figura 3. I topi *Htr2b*-FKO sono protetti dalla resistenza all'insulina indotta da HFD.** (A) GTT e (B) ITT dopo HFD. (C) Livelli plasmatici di insulina dopo SCD o HFD. (D) *Glucose infusion rate* e (E) *glucose turnover rate* in clamp iperinsulinemico-euglicemico. (F) Western-blot di p-AKT e AKT in eWAT, (G) fegato e (H) muscolo in topi Ctl e *Htr2b*-FKO. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; ###, \*\*\* $P < 0.001$ )

Poiché l'insulino-resistenza è spesso accompagnata da ipertrofia degli adipociti e infiammazione del WAT, sono state eseguite analisi istologiche e di immunofluorescenza per confrontare eWAT tra topi obesi di controllo e *knockout* (Fig.4).



**Figura 4. L'ipertrofia degli adipociti e l'infiltrazione dei macrofagi in eWAT migliorano nei topi *Htr2b*-FKO.** (A) Istologia rappresentativa di eWAT in topi Ctl e *Htr2b*-FKO. (B) Colorazione in immunofluorescenza (eWAT) di perilipina 1 (PLIN, rosso), F4/80 (verde) e dei nuclei (DAPI, blu).

La dimensione media degli adipociti non cambia tra topi Ctl e *Htr2b*-FKO ma in questi ultimi si osserva una proporzione minore di adipociti ipertrofici, ossia quelli che risultano maggiormente disfunzionali (Fig.4 A). In immunofluorescenza, inoltre, si nota una diminuzione del segnale di F4/80 negli *Htr2b*-FKO, indice di una minore infiltrazione da parte dei macrofagi e dunque di una ridotta infiammazione, come si è potuto confermare anche tramite qRT-PCR; l'espressione di *F4/80*, *Tnfa*, *Il-1 $\beta$*  e *iNOS* diminuisce (Fig.5 A, B, C, D), mentre quella di *AdipoQ* aumenta (Fig.5 E).



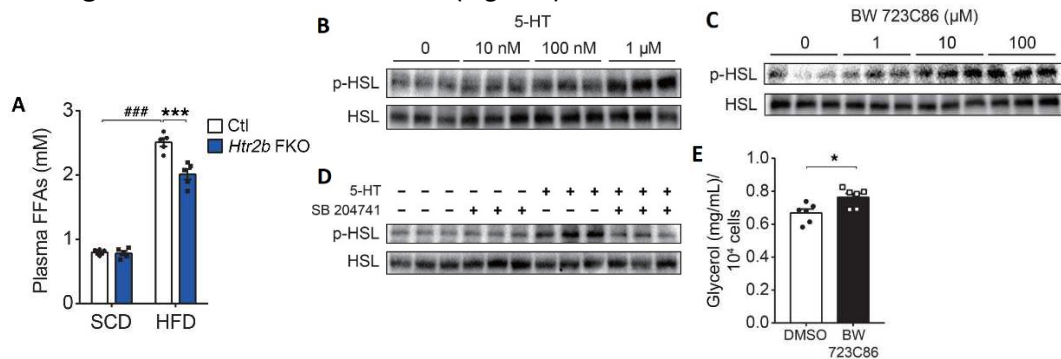
**Figura 5**



**Figura 5 (pag.14, in basso).** L'infiammazione del tessuto adiposo diminuisce in topi *Htr2b*-FKO. (A) Espressione di F4/80 nella frazione vascolo stromale (SVF) di eWAT. (B-D) Espressione dei geni legati ad infiammazione in eWAT. (E) Espressione dell'adiponectina in eWAT. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

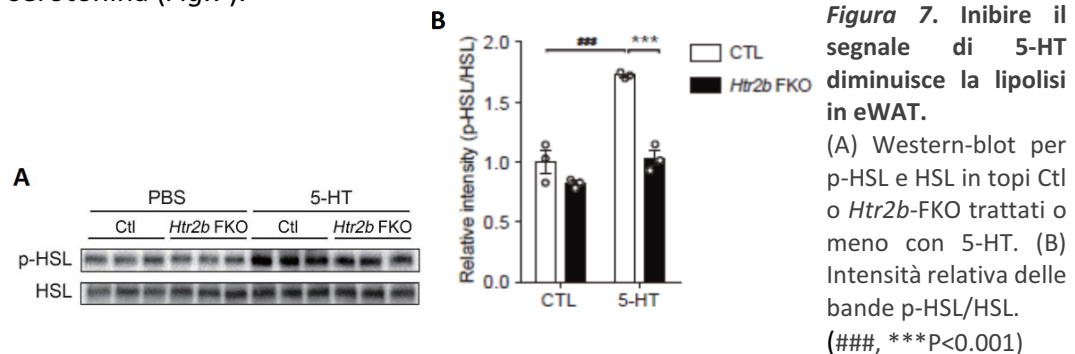
### 3.3 La segnalazione della serotonina tramite HTR2B promuove la lipolisi nel tessuto adiposo viscerale

L'insulino-resistenza è associata ad un aumento di acidi grassi liberi nel plasma, la cui quantità è regolata dal tasso di lipolisi in WAT. Poiché le concentrazioni plasmatiche di FFAs sono risultate diminuite nei topi *Htr2b*-FKO sottoposti ad HFD rispetto ai controlli (*Fig.6 A*), si è deciso di investigare come la 5-HT fosse correlata con la lipolisi in eWAT. Gli adipociti primari isolati da eWAT di topi sottoposti a HFD sono stati incubati con diverse concentrazioni di 5-HT o di BW 723C86, un agonista di HTR2B e si è visto, tramite Western-blot, che entrambi attivavano la lipasi ormone-sensibile (*Hormone-sensitive lipase*, HSL), fosforilandola (*Fig.6 B, C*). BW 723C86, inoltre, aumentava il rilascio di glicerolo da parte degli adipociti (*Fig.6 E*). La fosforilazione di HSL, invece, diminuiva pretrattando gli adipociti con l'antagonista di HTR2B SB 204741 (*Fig.6 D*).



**Figura 6.** 5-HT promuove la lipolisi tramite HTR2B negli adipociti viscerali di topi obesi. (A) Livelli plasmatici di FFAs in topi SCD o HFD. (B) Western-blot di p-HSL e HSL in adipociti trattati con 5-HT, (C) BW 723C86 o (D) 5-HT+SB 204741. (E) Rilascio di glicerolo dopo trattamento con BW 723C86. (\* $P < 0.05$ ; ###, \*\*\* $P < 0.001$ )

Questi risultati mostrano come il *signaling* della 5-HT attraverso HTR2B in eWAT sia in grado di promuovere la lipolisi. Coerentemente, l'iniezione di 5-HT in topi *Htr2b*-FKO non portava ad un aumento di p-HSL in eWAT come nei topi Ctl, perciò i topi *knockout* sono risultati protetti dall'aumento della lipolisi indotta dalla serotonina (*Fig.7*).

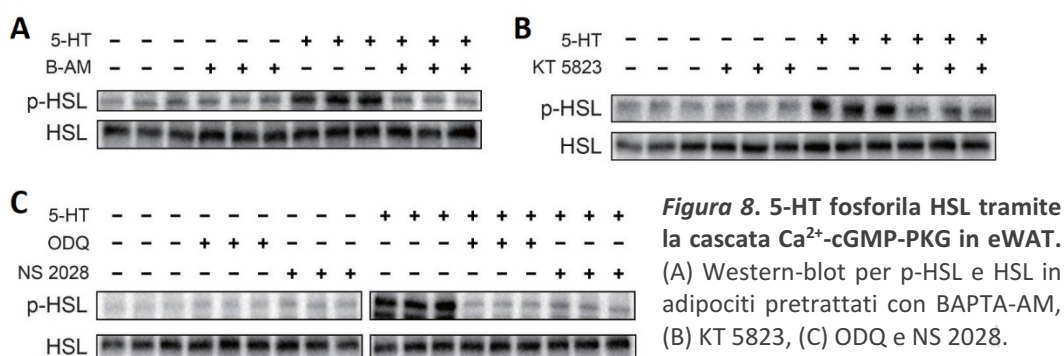


**Figura 7.** Inibire il segnale di 5-HT diminuisce la lipolisi in eWAT.

(A) Western-blot per p-HSL e HSL in topi Ctl o *Htr2b*-FKO trattati o meno con 5-HT. (B) Intensità relativa delle bande p-HSL/HSL. (###, \*\*\* $P < 0.001$ )

### 3.4 La serotonina porta alla fosforilazione di HSL tramite la cascata di segnale $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG in eWAT.

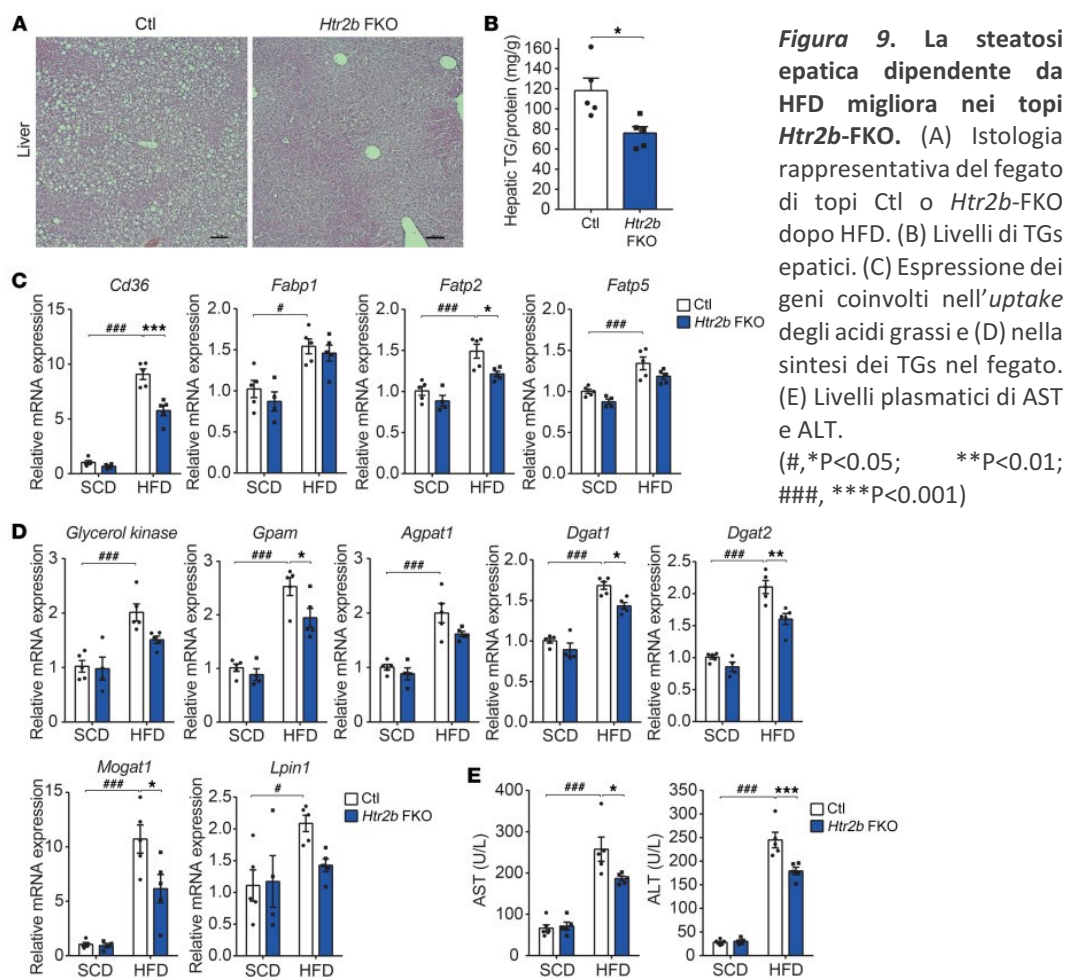
È noto che HTR2B sia un recettore accoppiato a proteine  $G_q$  che, una volta attivato, porta all'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare. Questo a sua volta può portare o alla produzione di cAMP e all'attivazione della PKA o alla produzione di cGMP e all'attivazione della PKG. Per indagare più a fondo quale cascata di segnale venisse attivata dalla 5-HT attraverso HTR2B, si sono inizialmente trattati gli adipociti isolati da eWAT di topi sottoposti ad HFD con BAPTA-AM, un chelante del  $Ca^{2+}$  intracellulare e questo ha ridotto la fosforilazione di HSL, confermando come la risposta alla 5-HT dipenda dalle concentrazioni di calcio (Fig.8 A). Anche trattando gli adipociti con l'inibitore selettivo della PKG KT 5823 (Fig.8 B) oppure con gli inibitori selettivi della guanilil ciclastasi (GC) ODQ e NS 2028 (Fig.8 C) si è ottenuta una riduzione di p-HSL, a differenza dei trattamenti con inibitori della PKA o della adenilil ciclastasi che non hanno portato ad una inibizione della fosforilazione.



Si può quindi concludere che la serotonina, nel tessuto adiposo viscerale, induca la fosforilazione di HSL tramite la cascata di segnale  $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG, attivata tramite HTR2B. L'effetto è un aumento della lipolisi e dell'insulino-resistenza.

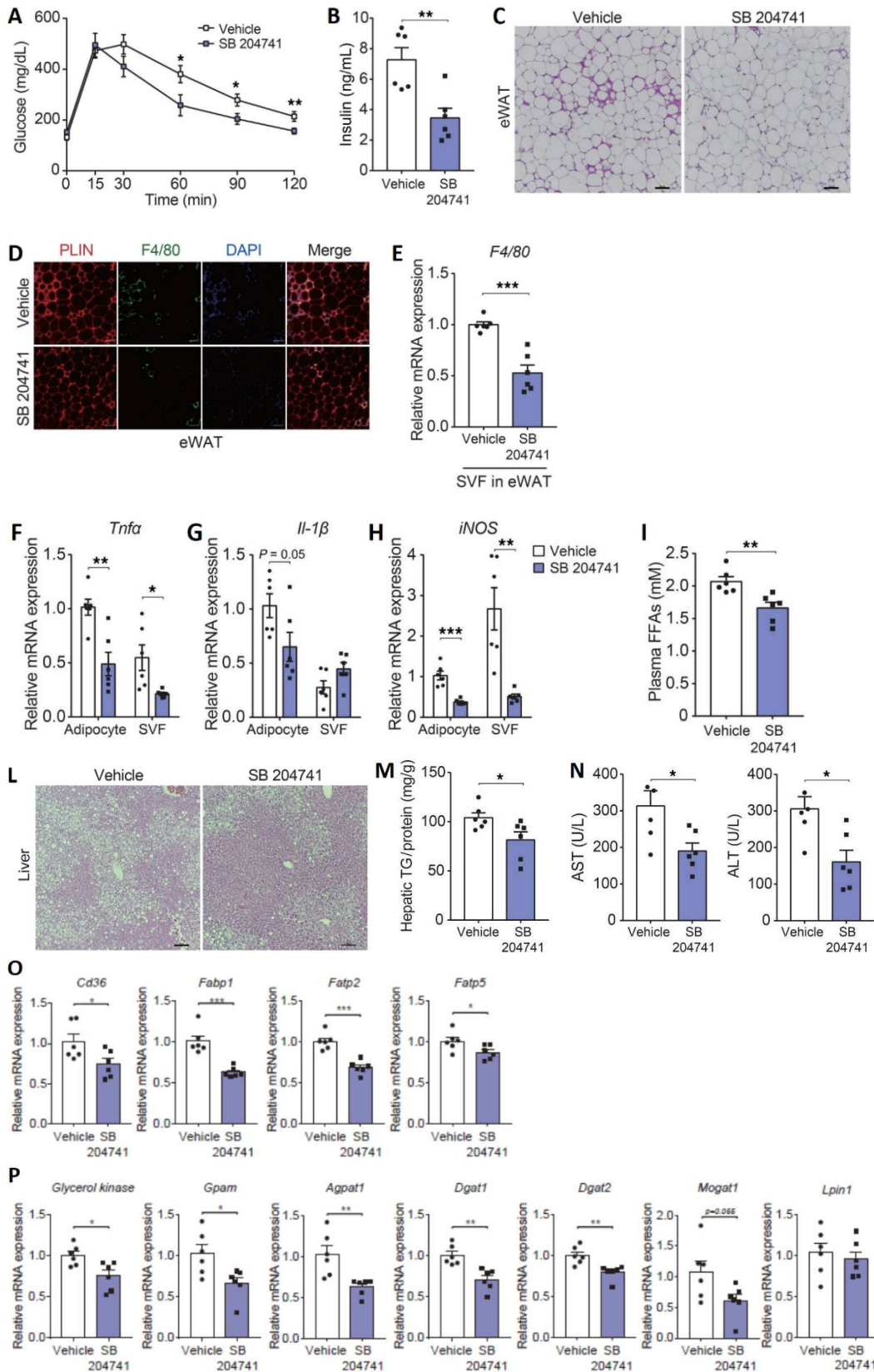
### 3.5 Inibire il *signaling* di HTR2B migliora la steatosi epatica indotta da HFD

L'accumulo di lipidi nel fegato è molto frequente in soggetti obesi e insulino-resistenti a causa dell'elevato tasso di lipolisi e dunque del flusso di FFAs dal tessuto adiposo al fegato. Poiché si è visto che la 5-HT, tramite HTR2B, promuove la lipolisi, si è deciso di investigare se vi fossero cambiamenti a livello istologico e metabolico nel fegato dei topi *Htr2b*-FKO rispetto ai controlli. L'istologia dei tessuti epatici ha mostrato una quantità ridotta di lipidi nel fegato (Fig.9 A) e la quantificazione dei TGs ha confermato quanto osservato (Fig.9 B). L'espressione di una serie di geni coinvolti nell'*uptake* degli acidi grassi (Fig.9 C) e nella sintesi dei TGs (Fig.9 D) è stata valutata tramite qRT-PCR: molti di questi geni mostrano un'espressione ridotta nei *knockout* rispetto ai controlli, quando sottoposti ad HFD. I geni coinvolti nella lipogenesi *de novo* non hanno invece mostrato variazioni significative, ad eccezione di *Srebp1c*. Infine, anche i livelli plasmatici di Aspartato e Alanina transaminasi (AST e ALT) diminuiscono nei topi *Htr2b*-FKO (Fig.9 E). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che l'inibizione del segnale della 5-HT attraverso HTR2B possa avere un effetto protettivo anche sulla steatosi epatica.



### 3.6 L'inibizione farmacologica di HTR2B migliora le disfunzioni metaboliche indotte da HFD

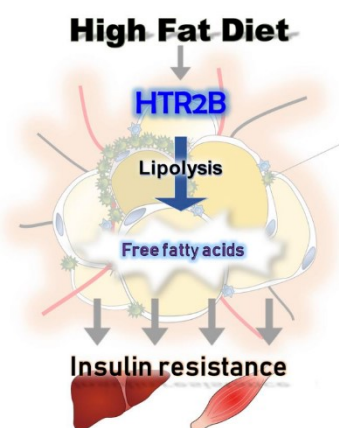
Visti i risultati ottenuti nei topi *Htr2b*-FKO in termini di protezione contro diverse disfunzioni metaboliche correlate all'obesità, gli autori dello studio in questione hanno deciso di testare gli effetti farmacologici dell'antagonista specifico di HTR2B SB 204741 in topi obesi. Gli animali sono stati quindi nutriti per 10 settimane con HFD e in seguito sottoposti giornalmente ad una iniezione di SB 204741 per 3 settimane, continuando la HFD. I risultati ottenuti sono stati molto simili a quelli ottenuti in precedenza con i topi *knockout*: ridotti livelli di glucosio durante il GTT e ridotta insulinemia (*Fig.10 A, B*), una minor proporzione di adipociti ipertrofici in eWAT (*Fig.10 C*) e minore infiltrazione del tessuto da parte dei macrofagi (*Fig.10 D, E*), una ridotta espressione in eWAT dei geni coinvolti nell'infiammazione (*Fig.10 F, G, H*), livelli plasmatici di FFAs ridotti (*Fig.10 I*) e dunque un miglioramento della steatosi epatica (*Fig.10 L*), con diminuzione della quantità di TGs epatici (*Fig.10 M*) e dei livelli plasmatici di AST e ALT (*Fig.10 N*), oltre a una ridotta espressione dei geni per l'*uptake* degli acidi grassi e per la sintesi dei TGs.



**Figura 10.** L'inibizione farmacologica di HTR2B migliora le disfunzioni metaboliche indotte da HFD. (A) GTT in topi trattati con SB 204741 e (B) livelli plasmatici di insulina. (C) Istologia di eWAT e (D) immunofluorescenza (eWAT) per perilipina 1 (PLIN, rosso), F4/80 (verde) e nuclei (DAPI, blu). (E) Espressione di F4/80 in SVF e (F-H) dei geni coinvolti nell'infiammazione in eWAT. (I) Livelli plasmatici di FFAs. (L) Istologia del fegato e (M) valori dei TGs epatici. (N) Livelli plasmatici di AST e ALT. (O) Espressione dei geni per l'uptake degli acidi grassi e (P) per la sintesi dei TGs nel fegato. (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001)

## 4. DISCUSSIONE

A livello periferico, la serotonina svolge moltissimi ruoli diversi, anche grazie ai molti tipi di recettori che può attivare. Diversi suoi effetti sul metabolismo, come ad esempio l'inibizione della termogenesi in BAT e la regolazione dell'accumulo dei lipidi nel fegato, erano già noti, mentre il ruolo specifico della serotonina nel tessuto adiposo viscerale nell'obeso non era mai stato investigato a fondo. Gli autori dell'articolo che è stato analizzato hanno dunque deciso di concentrarsi sul *signaling* della serotonina attraverso HTR2B in VAT, dato che l'espressione di questo recettore aumentava sia in modelli murini obesi sia in pazienti obesi.



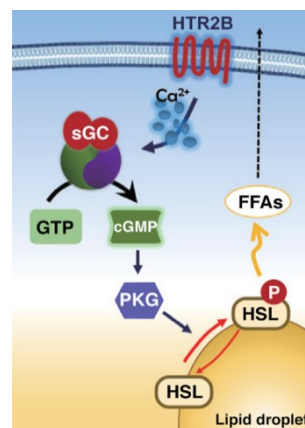
**Figura 11.** La HFD porta ad un aumento del *signaling* della serotonina attraverso HTR2B e questo stimola la lipolisi e il rilascio di FFAs, portando allo sviluppo di insulino-resistenza.

Quello che è stato dimostrato è che l'inibizione della cascata di segnale evocata tramite HTR2B può portare a significativi miglioramenti delle disfunzioni metaboliche normalmente associate all'obesità, in particolare aumentando la sensibilità all'insulina, riducendo l'infiammazione del tessuto adiposo viscerale e riducendo la steatosi epatica, grazie ad una diminuzione dei livelli plasmatici di acidi grassi liberi. Sono questi ultimi, infatti, alla base dello sviluppo dell'insulino-resistenza e della steatosi epatica.

I ricercatori, con questi esperimenti, hanno verificato che l'attivazione del recettore HTR2B nel tessuto adiposo viscerale attiva una cascata di segnale del tipo  $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG che porta all'attivazione della lipasi ormone-sensibile HSL, che è poi responsabile della lipolisi e dunque del rilascio degli acidi grassi liberi.

Degno di nota è inoltre il fatto che gli stessi miglioramenti metabolici osservati nei topi *Htr2b*-FKO siano stati poi ottenuti anche tramite l'inibizione farmacologica selettiva di HTR2B. Questo suggerisce un possibile approccio terapeutico per la resistenza all'insulina e soprattutto per la steatosi epatica, patologia per la quale, ad oggi, non sono noti trattamenti efficaci.

Come prospettive future, sarebbe sicuramente utile potenziare gli studi sull'antagonismo farmacologico di HTR2B e sulle sue possibili applicazioni in campo terapeutico, valutando anche i possibili effetti collaterali della sua inibizione su altri tessuti che esprimono questo recettore.



**Figura 12.** La serotonina porta alla fosforilazione di HSL tramite la cascata di segnale  $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG nel tessuto adiposo viscerale.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Tchernof A, Després JP. **Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update.** *Physiol Rev.* 2013;93(1):359-404. doi:10.1152/physrev.00033.2011
2. Ibrahim MM. **Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.** *Obes Rev.* 2010;11(1):11-18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x
3. Saltiel AR. **Insulin signaling in health and disease.** *J Clin Invest.* 2021;131(1):e142241. doi:10.1172/JCI142241
4. Samuel VT, Shulman GI. **Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links.** *Cell.* 2012;148(5):852-871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017
5. Lauterbach MAR, Wunderlich FT. **Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance.** *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2017;469(3-4):385-396. doi:10.1007/s00424-017-1955-5
6. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. **Pathophysiology of the metabolic syndrome.** *Clin Dermatol.* 2018;36(1):14-20. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004
7. Rachdaoui N. **Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus.** *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1770. doi:10.3390/ijms21051770
8. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics.** *Metabolism.* 2019;92:82-97. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.014
9. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. **Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule.** *Endocr Rev.* 2019;40(4):1092-1107. doi:10.1210/er.2018-00283
10. Martin AM, Young RL, Leong L, et al. **The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin.** *Endocrinology.* 2017;158(5):1049-1063. doi:10.1210/en.2016-1839

**Fonti delle immagini:** tutte le figure sono state tratte dall'articolo in analisi.

## 6. APPENDICE

Articolo in analisi:

Choi WG, Choi W, Oh TJ, Cha HN, Hwang I, Lee YK, Lee SY, Shin H, Lim A, Ryu D, Suh JM, Park SY, Choi SH, Kim H. **Inhibiting serotonin signaling through HTR2B in visceral adipose tissue improves obesity-related insulin resistance.** *J Clin Invest.* 2021 Dec 1;131(23):e145331. doi: 10.1172/JCI145331.

# Inhibiting serotonin signaling through HTR2B in visceral adipose tissue improves obesity-related insulin resistance

Won Gun Choi,<sup>1</sup> Wonsuk Choi,<sup>1,2</sup> Tae Jung Oh,<sup>3</sup> Hye-Na Cha,<sup>4</sup> Inseon Hwang,<sup>1</sup> Yun Kyung Lee,<sup>5</sup> Seung Yeon Lee,<sup>1</sup> Hyemi Shin,<sup>1</sup> Ajin Lim,<sup>1</sup> Dongryeol Ryu,<sup>6</sup> Jae Myoung Suh,<sup>1</sup> So-Young Park,<sup>4</sup> Sung Hee Choi,<sup>3,5</sup> and Hail Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Medical Science and Engineering, Biomedical Research Center, KAIST, Daejeon, South Korea. <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, Chonnam National University Medical School, Hwasun, South Korea. <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seongnam, South Korea. <sup>4</sup>Department of Physiology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, South Korea. <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea. <sup>6</sup>Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, South Korea.

Insulin resistance is a cornerstone of obesity-related complications such as type 2 diabetes, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. A high rate of lipolysis is known to be associated with insulin resistance, and inhibiting adipose tissue lipolysis improves obesity-related insulin resistance. Here, we demonstrate that inhibition of serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) signaling through serotonin receptor 2B (HTR2B) in adipose tissues ameliorates insulin resistance by reducing lipolysis in visceral adipocytes. Chronic high-fat diet (HFD) feeding increased *Htr2b* expression in epididymal white adipose tissue, resulting in increased HTR2B signaling in visceral white adipose tissue. Moreover, *HTR2B* expression in white adipose tissue was increased in obese humans and positively correlated with metabolic parameters. We further found that adipocyte-specific *Htr2b*-knockout mice are resistant to HFD-induced insulin resistance, visceral adipose tissue inflammation, and hepatic steatosis. Enhanced 5-HT signaling through HTR2B directly activated lipolysis through phosphorylation of hormone-sensitive lipase in visceral adipocytes. Moreover, treatment with a selective HTR2B antagonist attenuated HFD-induced insulin resistance, visceral adipose tissue inflammation, and hepatic steatosis. Thus, adipose HTR2B signaling could be a potential therapeutic target for treatment of obesity-related insulin resistance.

## Introduction

Obesity is a serious global health problem, affecting more than half a billion people worldwide (1). Importantly, obesity is a key underlying factor in several diseases related to insulin resistance, including type 2 diabetes, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Adipose tissue acts as an energy reservoir and endocrine organ to regulate systemic energy homeostasis. Obesity causes adipose tissue remodeling, characterized by adipocyte hyperplasia/hypertrophy, inflammation, and changes in adipose hormones, which leads to insulin resistance (2). Notably, expansion of visceral white adipose tissue (WAT) is closely associated with the development of insulin resistance, whereas expansion of subcutaneous WAT has no adverse effects on metabolic health (3, 4).

Serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) is a monoamine neurotransmitter that modulates many functions. 5-HT is synthesized from tryptophan by the sequential actions of tryptophan hydroxylase (TPH) and aromatic amino acid decarboxylase (AADC). Two isoforms of TPH are expressed in a mutually exclu-

sive manner: TPH1 in peripheral nonneuronal tissues and TPH2 in neurons of central and enteric nervous systems (5, 6). Since 5-HT cannot cross the blood–brain barrier, central and peripheral 5-HT systems are functionally separated (7). 5-HT exerts its biological function through 5-HT receptors (HTRs). At least 14 HTRs have been identified in mammals, all of which are G protein-coupled receptors (GPCRs) with the exception of HTR3, which is a ligand-gated ion channel (8).

5-HT regulates multiple energy metabolism pathways in metabolic organs such as pancreatic  $\beta$  cells, liver, skeletal muscle, and adipose tissues (9–16). In the obese state, 5-HT inhibits adaptive thermogenesis in brown and beige adipocytes (12, 13). Thus, genetic and chemical inhibition of peripheral 5-HT synthesis increases thermogenesis and protects against obesity-related metabolic dysfunction. In our previous study, we demonstrated a functional role for 5-HT in adipose tissues using adipocyte-specific *Tph1* knockout (*Tph1*-FKO) mice (13, 17). The phenotypes of *Tph1*-FKO mice are largely attributable to the increased energy expenditure in brown adipose tissue (BAT) and inguinal white adipose tissue (iWAT). However, the function of 5-HT in epididymal white adipose tissue (eWAT) has not been directly tested in *Tph1*-FKO mice because of the profound effects of increased energy expenditure on eWAT. To overcome these limitations and explore the mechanism and function of 5-HT signaling in visceral adipocytes in detail, we examined receptor-specific roles of 5-HT in eWAT.

**Authorship note:** WGC, WC, and TJO contributed equally to this work.

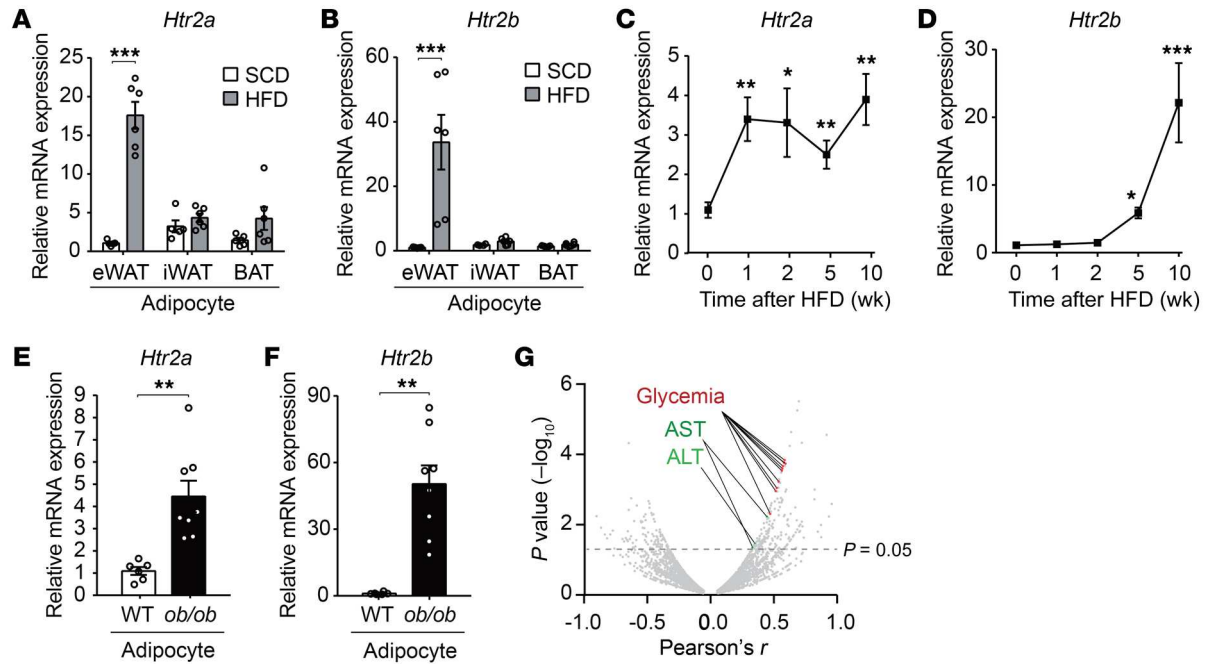
**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2021, American Society for Clinical Investigation.

**Submitted:** October 23, 2020; **Accepted:** October 5, 2021; **Published:** December 1, 2021.

**Reference information:** *J Clin Invest.* 2021;131(23):e145331.

<https://doi.org/10.1172/JCI145331>.



**Figure 1. HTR2B signaling is upregulated in visceral adipose tissue of obese mice.** (A and B) Twelve-week-old C57BL/6J mice were fed a SCD or HFD for 10 weeks. (A) *Htr2a* and (B) *Htr2b* mRNA expression in adipocytes isolated from eWAT, iWAT, and BAT, as assessed by qRT-PCR (SCD,  $n = 5$ /group; HFD,  $n = 6$ /group). (C and D) (C) *Htr2a* and (D) *Htr2b* mRNA expression in eWAT from C57BL/6J mice after the indicated durations of HFD feeding, as assessed by qRT-PCR ( $n = 7$ /group). (E and F) Evaluation of 12-week-old *ob/ob* mice. (E) *Htr2a* and (F) *Htr2b* mRNA expression in adipocytes isolated from eWAT, as assessed by qRT-PCR (WT,  $n = 6$ /group; *ob/ob*,  $n = 8$ /group). (G) Correlation of phenotypes in the BXD mouse cohort with *Htr2b* expression in white adipose tissue. Glycemia (indicated by glucose tolerance tests) and blood levels of AST and ALT were significantly elevated in HFD-fed mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t* test used in A–F).

Here, we demonstrate that 5-HT signaling through the HTR2B induces insulin resistance by increasing lipolysis in visceral adipocytes in an obese mouse model. Chronic high-fat diet (HFD) feeding increased *Htr2b* expression in eWAT. Thus, enhanced 5-HT signaling through HTR2B induced lipolysis by activating hormone-sensitive lipase (HSL). Inhibition of HTR2B signaling by adipocyte-specific *Htr2b*-KO or administration of a selective HTR2B antagonist improved systemic insulin sensitivity by reducing the release of free fatty acids (FFAs) from white adipocytes.

## Results

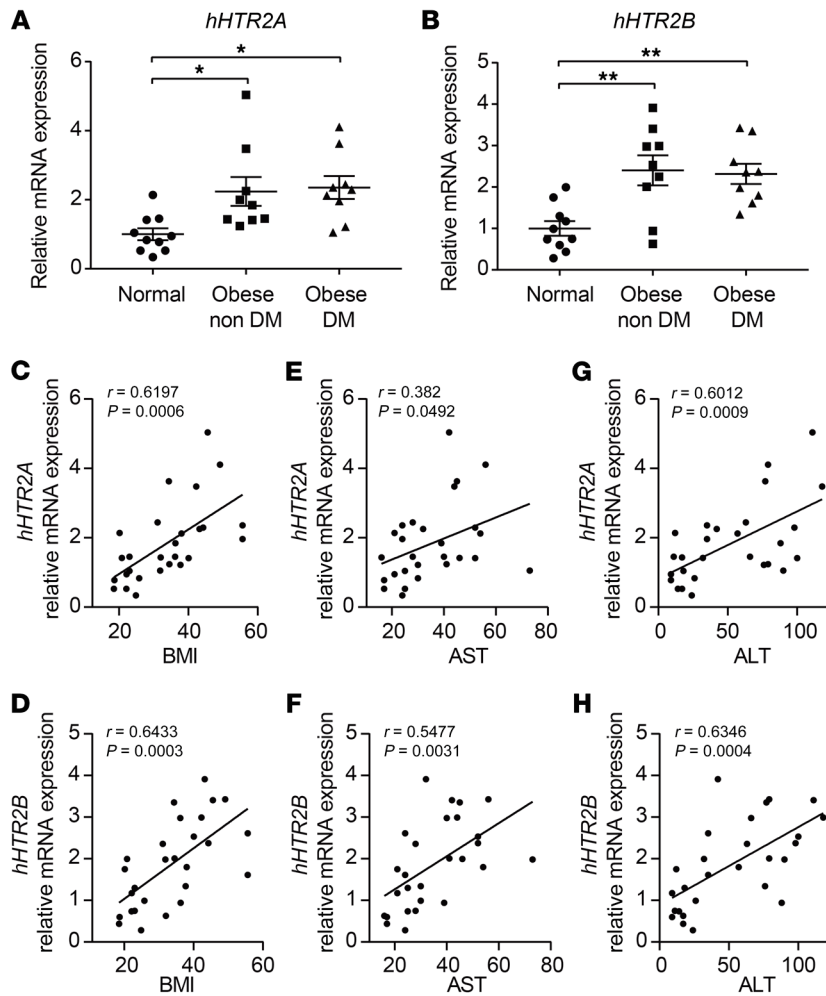
**HTR2B signaling is upregulated in visceral adipose tissue of obese mice.** We first confirmed the expression of HTRs in visceral adipocytes (i.e., those isolated from eWAT) using publicly available RNA-seq data (18). Among HTR genes, *Htr2a* and *Htr2b* were abundantly expressed in visceral adipocytes and *Htr2b* expression was increased upon HFD feeding for 9 weeks (Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/JCI145331DS1>). Further quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses using RNA isolated from different adipocytes revealed that HFD feeding for 10 weeks increased *Htr2a* and *Htr2b* expression in visceral adipocytes but not in subcutaneous or brown adipocytes (i.e., those isolated from iWAT or BAT; Figure 1, A and B). Next, we assessed the dynamic expression patterns of *Htr2a* and *Htr2b* in eWAT during HFD feeding. *Htr2a* expression increased beginning from 1 week after HFD feeding and remained increased throughout the HFD period (Figure 1C). In contrast, *Htr2b* expres-

sion did not increase until 2 weeks after HFD feeding and started to increase after 5 weeks of HFD feeding (Figure 1D). Expression of both *Htr2a* and *Htr2b* was also upregulated in visceral adipocytes of *ob/ob* mice (Figure 1, E and F). These results suggest a possible role of serotonergic signaling through HTR2A and HTR2B in eWAT under metabolic stress conditions. We previously reported the lipogenic actions of HTR2A in WAT (13, 17). However, a role for HTR2B in eWAT has not been elucidated, although *Htr2b* expression increased more robustly than *Htr2a* expression in visceral adipocytes of obese mouse models.

To gain insight into possible roles of HTR2B in WAT, we analyzed multi-omics data sets of the BXD mouse cohort, focusing on associations of *Htr2b* expression in WAT with clinical and molecular phenotypes (19). These analyses revealed that *Htr2b* mRNA expression levels were positively correlated with glycemia and blood levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT; Figure 1G and Supplemental Figure 1, B–D).

To further verify the physiological relevance of adipose HTR2B in humans, we assessed *HTR2A* and *HTR2B* expressions in human adipose tissues. Both *HTR2A* and *HTR2B* expressions were increased in visceral WAT of obese subjects, regardless of blood glucose levels (Figure 2, A and B). Interestingly, *HTR2A* and *HTR2B* expressions correlated with body mass index (BMI) in humans (Figure 2, C and D). Furthermore, consistent with our mouse data, both plasma AST and ALT concentrations correlated more highly with *HTR2B* expression than with *HTR2A* expression in human WAT (Figure 2, E–H). Taken together, these data suggest that HTR2B in WAT might have an important role under





**Figure 2. HTR2B signaling is upregulated in visceral adipose tissue of obese humans. (A–H)** Potential role of HTR2A and HTR2B in human omental adipose tissue. **(A and B)** HTR2A and HTR2B expression in human omental fat from lean subjects ( $n = 10$ ), nondiabetic obese subjects ( $n = 9$ ), and diabetic obese subjects ( $n = 9$ ). **(C–H)** Correlation of HTR2A and HTR2B expression in human omental fat with BMI **(C and D)**, AST **(E and F)** and ALT **(G and H)** ( $n = 27$ ). Pearson's  $r$  correlation coefficient with corresponding  $P$  values. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , 1-way ANOVA with post hoc Tukey's test used in **A and B**).

chronic obesity conditions, prompting us to explore the metabolic function of serotonergic signaling through HTR2B in visceral WAT in greater detail.

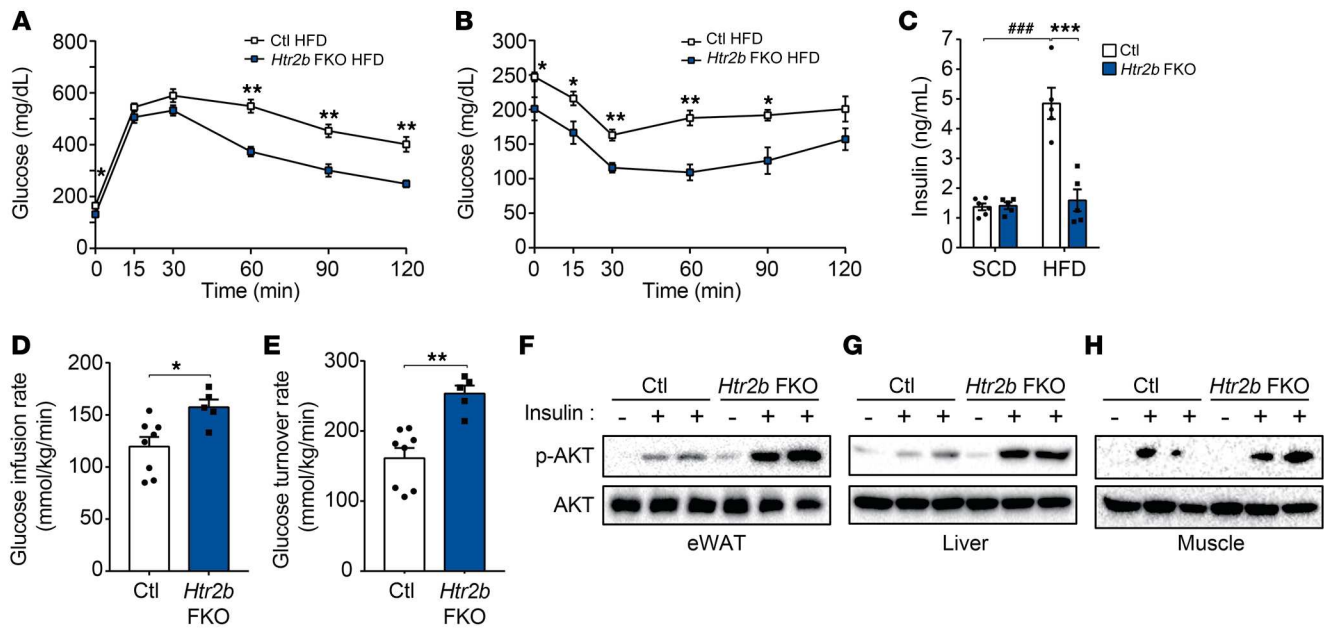
**Inhibiting adipose HTR2B signaling ameliorates HFD-induced systemic insulin resistance.** To investigate the functional role of 5-HT signaling through HTR2B in WAT in vivo, we generated adipocyte-specific *Htr2b*-KO (*Adiponectin-Cre*<sup>-/-</sup> *Htr2b*<sup>fl/fl</sup> [*Htr2b*-FKO]) mice and induced obesity by feeding them a HFD for 10 weeks (Supplemental Figure 2A). Glucose tolerance and body weight of *Htr2b*-FKO mice were comparable to those of littermate control (*Htr2b*<sup>fl/fl</sup>) mice when fed a standard chow diet (SCD) (Supplemental Figure 2, B and C). Upon HFD feeding, *Htr2b*-FKO mice showed improved glucose tolerance despite a similar gain in body weight (Figure 3A and Supplemental Figure 2B). Furthermore, blood glucose concentrations of *Htr2b*-FKO mice were lower than control mice during insulin tolerance tests, and plasma insulin concentrations were also decreased compared with control mice (Figure 3, B and C). However, body composition, food intake, and energy expenditure in HFD-fed *Htr2b*-FKO mice were comparable to those in control mice on HFD (Supplemental Figure 2, D–K). In addition, oral lipid tolerance test revealed that lipid absorption was not affected in the gut of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 2L). These data suggest that, unlike the case in *Tph1*-FKO mice, HFD-induced insulin resistance is ameliorated

in *Htr2b*-FKO mice without a reduction in body weight or an increase in energy consumption.

To further evaluate the effect of *Htr2b*-FKO on insulin sensitivity, we performed hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Glucose infusion rate and glucose turnover rate were increased in HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Figure 3, D and E). Moreover, insulin-stimulated AKT phosphorylation was enhanced in eWAT, liver, and muscle in *Htr2b*-FKO mice (Figure 3, F–H and Supplemental Figure 2, M–O). These results indicate that inhibiting adipose HTR2B signaling improves systemic insulin sensitivity in a HFD-induced mouse model of obesity.

Next, because obesity-induced insulin resistance is accompanied by adipose tissue remodeling, exemplified by adipocyte hypertrophy, macrophage infiltration, and proinflammatory cytokine production (2), we performed histological analyses of eWAT from HFD-fed *Htr2b*-FKO mice. Adipocyte size was more uniform and the proportion of hypertrophic adipocytes was reduced in eWAT of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice, but average adipocyte size was comparable (Figure 4, A and B, and Supplemental Figure 3A). Macrophage infiltration was diminished and *F4/80* expression was decreased in eWAT of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Figure 4, C and D). However, no histological change was detected in iWAT or BAT of *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 3, B and C). qRT-PCR exhibited the expressions of genes involved in proinflammatory pathways was reduced and adiponectin expression was increased in visceral adipocytes and stromal vascular fraction (SVF) isolated from eWAT of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Figure 4, E–H). The expressions of genes involved in adipogenesis and lipolysis were not changed in eWAT of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 3, D–H). These results indicate that inhibiting adipose HTR2B signaling resolves key characteristics of insulin resistance in eWAT in a mouse model of diet-induced obesity.

**5-HT signaling through HTR2B promotes lipolysis in eWAT.** To further explore the metabolic pathways underlying the attenuated systemic insulin resistance in HFD-fed *Htr2b*-FKO mice, we performed global metabolomics profiling on the plasma of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice and control mice. Among 827 metabolites detected in 9 super-pathways (Supplemental Figure 4A), 151 metabolites were significantly changed in *Htr2b*-FKO mice, with



**Figure 3. *Htr2b*-FKO mice are protected from HFD-induced systemic insulin resistance.** (A–H) Twelve-week-old control and *Htr2b*-FKO mice were fed a SCD or HFD for 10 weeks. (A) IPGTT after 16 hours fasting ( $n = 8$ /group) and (B) IPITT after 6 hours fasting ( $n = 5$ /group) in HFD-fed mice. (C) Plasma insulin levels (SCD-fed control mice,  $n = 6$ ; SCD-fed *Htr2b*-FKO mice,  $n = 5$ ; HFD-fed mice,  $n = 5$ /group). (D and E) Glucose infusion rate (D) and glucose turnover rate (E) in HFD-fed mice, measured by hyperinsulinemic-euglycemic clamp (control,  $n = 8$ /group; *Htr2b*-FKO,  $n = 5$ /group). (F–H) Insulin-induced AKT phosphorylation in eWAT (F), liver (G), and skeletal muscle (H) of HFD-fed control and *Htr2b*-FKO mice, as assessed by Western blotting. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's  $t$  test used in A, B, D, and E or 2-way ANOVA with post hoc Tukey's test used in C).

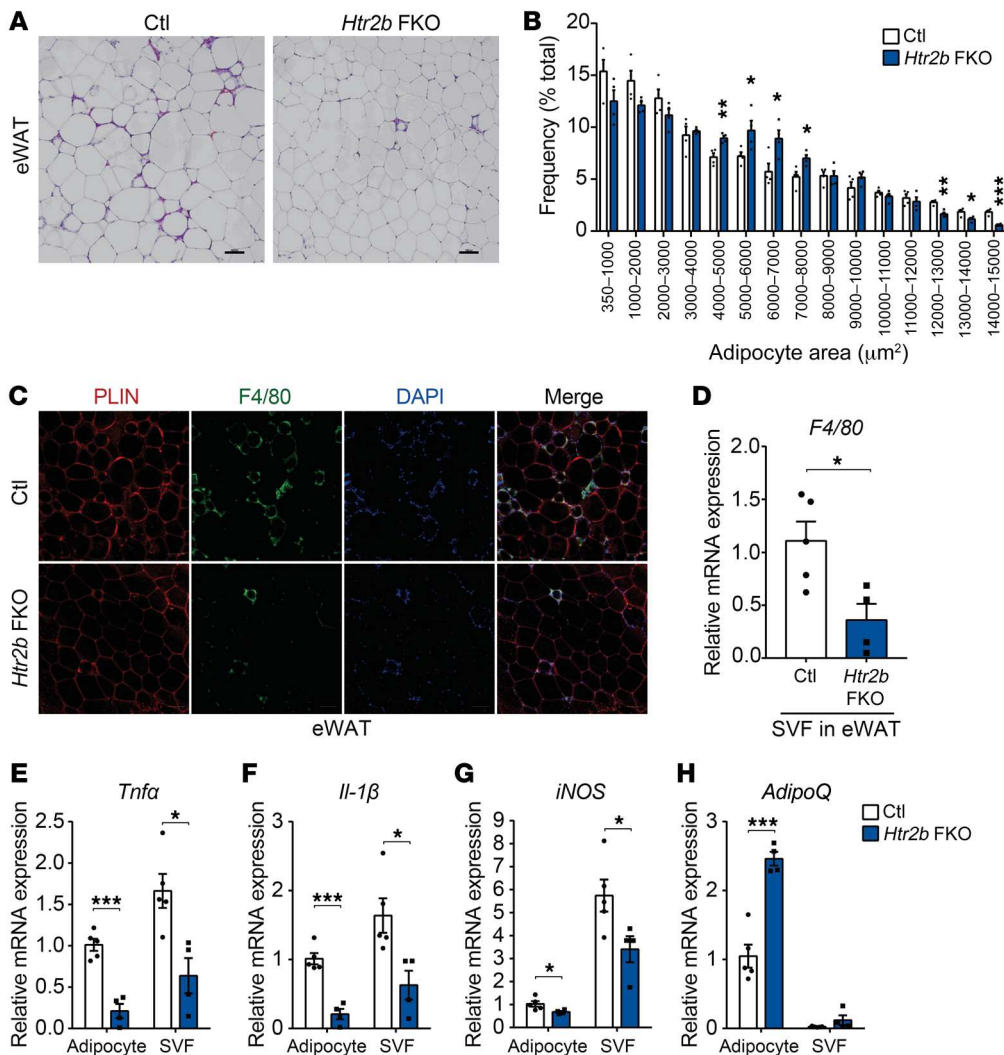
57 metabolites exhibiting an increase and 94 metabolites exhibiting a decrease (Supplemental Figure 4, B–D). An analysis of the 151 significantly changed metabolites, performed by enrichment on 62 subpathways containing 5 or more metabolites out of the 827 detected metabolites, identified the top 10 enriched subpathways (Figure 5A). Interestingly, 3 subpathways related to long-chain fatty acids (FAs) were included in these top 10 enriched subpathways, and most long-chain FAs were decreased in *Htr2b*-FKO mice compared with control mice (Figure 5A and Supplemental Figure 4, E–G). These data suggest a decrease in plasma FFA levels in *Htr2b*-FKO mice. Indeed, plasma FFA concentration was decreased in the plasma of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Figure 5B).

HFD feeding is known to increase plasma FFA concentrations, which are primarily regulated by adipocyte lipolysis in WAT and are positively correlated with insulin resistance (20). Therefore, we examined whether 5-HT signaling through HTR2B can directly regulate lipolysis in visceral adipocytes. Primary visceral adipocytes isolated from eWAT of HFD-fed mice were treated with 5-HT or the HTR2B agonist BW 723C86. Both 5-HT and BW 723C86 activated HSL by inducing HSL phosphorylation (Figure 5, C and D and Supplemental Figure 4, H and I). 5-HT-induced HSL phosphorylation was blunted by the HTR2B antagonist SB 204741 (Figure 5E and Supplemental Figure 4J). Moreover, BW 723C86 increased glycerol release from primary visceral adipocytes (Figure 5F). However, 5-HT did not induce phosphorylation of HSL in primary subcutaneous adipocytes isolated from iWAT of HFD-fed mice (Supplemental Figure 4K). In addition, neither 5-HT nor BW 723C86 induced HSL phosphorylation in primary visceral adipocytes isolated from SCD-fed mice (Supplemental Figure 4L). These data suggest that increased *Htr2b* expression

is necessary for the induction of HSL phosphorylation in visceral adipocytes by 5-HT. Consistently, i.p. injection of 5-HT increased HSL phosphorylation in eWAT of HFD-fed control mice but not in eWAT of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Figure 5G and Supplemental Figure 4M). These results suggest that adipose 5-HT signaling through HTR2B promotes lipolysis in visceral adipocytes of obese mice through HSL phosphorylation and decreases systemic insulin sensitivity by increasing plasma FFA levels.

*5-HT phosphorylates HSL through the  $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG cascade in visceral adipocytes.* Because HTR2B is a  $G_q$  protein-coupled receptor ( $G_q$ PCR), when activated, it increases intracellular  $Ca^{2+}$ , which can lead to the production cAMP and cGMP and thereby activate protein kinase A (PKA) and protein kinase G (PKG), respectively (21–23). To identify the downstream mechanism by which 5-HT induces HSL phosphorylation, we treated visceral adipocytes isolated from HFD-fed mice with the intracellular  $Ca^{2+}$  chelator BAPTA-AM. BAPTA-AM reduced 5-HT-induced HSL phosphorylation in visceral adipocytes, indicating that HSL phosphorylation in response to 5-HT stimulation depends on intracellular  $Ca^{2+}$  levels (Figure 5H and Supplemental Figure 4N).

HSL phosphorylation is mediated by PKA and PKG (24, 25). Since PKA is a major regulator of HSL phosphorylation in adipocytes, we first examined whether 5-HT-induced HSL phosphorylation depends on PKA. Arguing against this, neither the PKA inhibitor KT 5720 nor the adenylyl cyclase (AC) inhibitors SQ 22536 and KH7 inhibited 5-HT-induced HSL phosphorylation in visceral adipocytes (Supplemental Figure 4, O and P). Instead, the selective PKG inhibitor KT 5823 and selective guanylyl cyclase (GC) inhibitors ODQ and NS 2028 reduced 5-HT-induced HSL phosphorylation in visceral adipocytes, indicating that 5-HT-



**Figure 4. HFD-induced adipose tissue insulin resistance is ameliorated in *Htr2b*-FKO mice.** (A) Representative eWAT histology, assessed by H&E staining. Scale bars: 100 μm. (B) Histogram showing the distribution of adipocyte frequency according to diameter in eWAT (*n* = 4/group, 5 images per mouse). (C) Immunofluorescence (IF) staining of the eWAT marker perilipin 1 (PLIN1, red) and macrophage marker F4/80 (green), and staining of nuclei with DAPI (blue). (D) *F4/80* mRNA expression in SVF isolated from eWAT, as assessed by qRT-PCR (control, *n* = 5/group; *Htr2b*-FKO, *n* = 4/group). (E–H) Relative expression of mRNA for proinflammatory pathway-related genes (E–G) or adiponectin (H), as assessed by qRT-PCR in adipocytes and SVF isolated from eWAT (control, *n* = 5/group; *Htr2b*-FKO, *n* = 4/group). Data are expressed as mean ± SEM (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, Student's *t* test used in B, D–H).

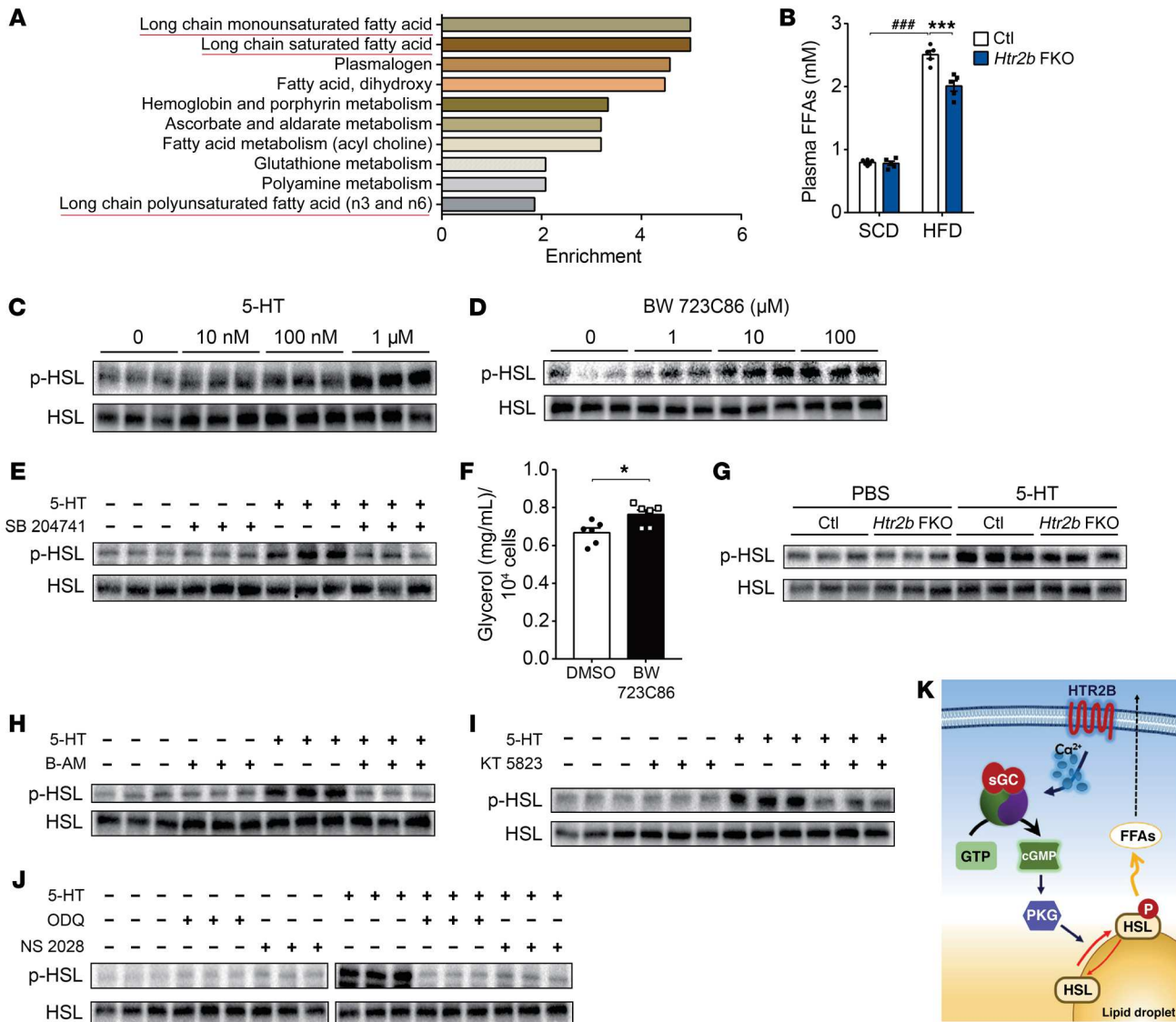
induced HSL phosphorylation is mediated by cGMP-PKG rather than cAMP-PKA (Figure 3, I and J and Supplemental Figure 4, Q and R). Taken together, our data indicate that adipose 5-HT signaling through HTR2B activates a Ca<sup>2+</sup>-cGMP-PKG cascade that increases HSL phosphorylation and ultimately increases lipolysis in visceral adipocytes of obese mice (Figure 5K).

**Inhibiting adipose HTR2B signaling ameliorates HFD-induced hepatic steatosis.** During insulin resistance, increased lipolysis in adipocytes increases hepatic FFA influx and thereby promotes hepatic steatosis (26). In quantitative terms, 60% of triglycerides (TGs) in the livers of patients with NAFLD originates from WAT (27). Because adipose 5-HT signaling through HTR2B promotes lipolysis in visceral adipocytes and thereby increases plasma FFA concentrations, we evaluated the hepatic phenotype of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice and found that lipid accumulation and hepatic TG levels were decreased in *Htr2b*-FKO mice compared with control mice (Figure 6, A and B).

To monitor changes in hepatic metabolism secondary to *Htr2b*-FKO, we performed gene expression analyses on an extensive array of metabolic markers. Expression of genes involved in FA uptake and TG synthesis were generally decreased in the livers of *Htr2b*-FKO mice compared with that in control mice (Figure 6,

C and D). However, with the exception of *Srebp1c*, genes involved in de novo lipogenesis were not significantly changed in the livers of HFD-fed *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 5A). Plasma AST and ALT levels were reduced in HFD-fed *Htr2b*-FKO mice, a finding that aligns with the association between adipose *Htr2b* expression and plasma AST and ALT levels in the BXD mouse cohort and in humans (Figure 1G, Figure 2, F and H, and Figure 6E). These results suggest that the protective effect of *Htr2b*-FKO mice against HFD-induced hepatic steatosis is attributable to the reduction in FA flux from WAT to liver.

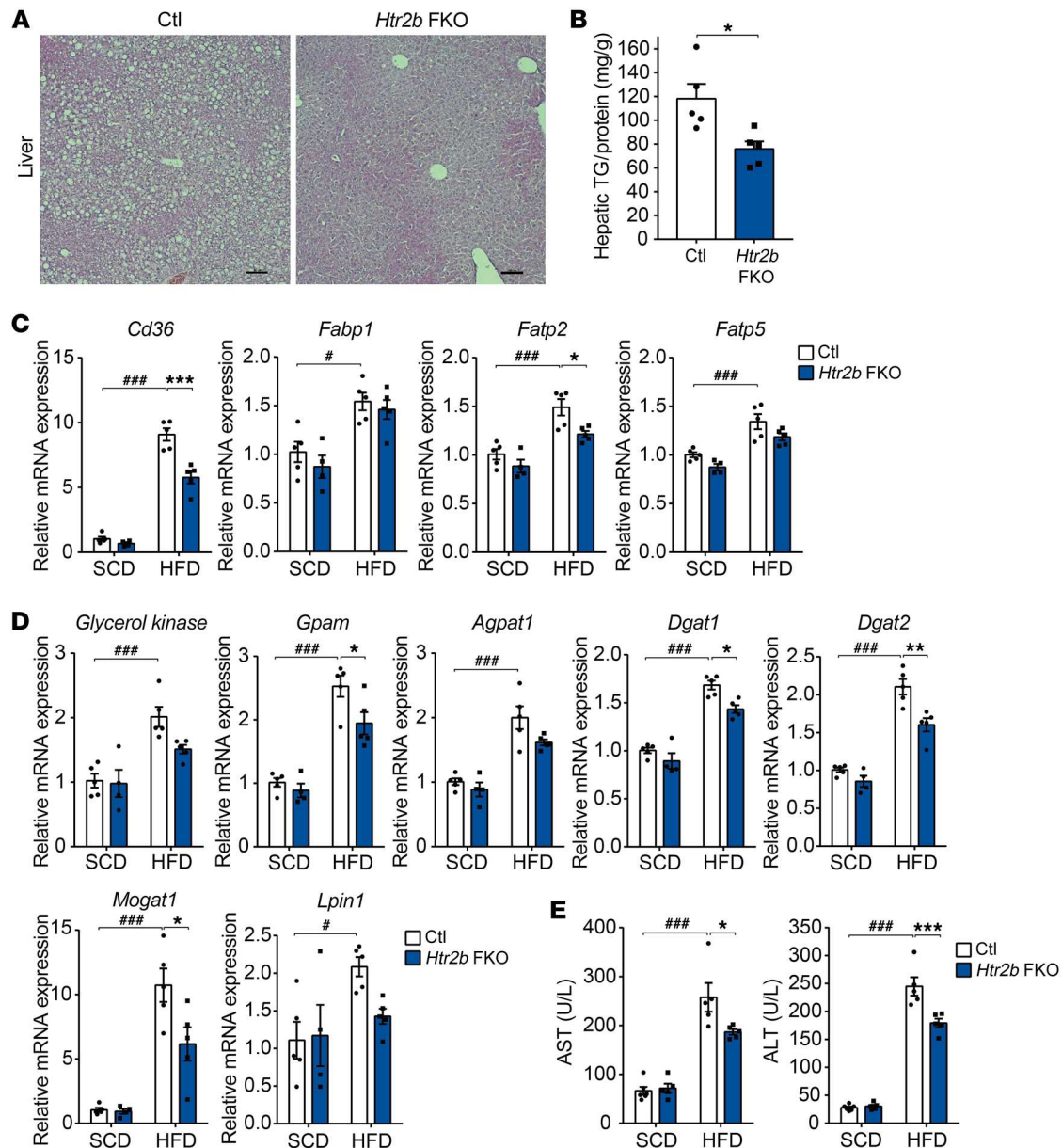
**Pharmacological inhibition of HTR2B improves HFD-induced metabolic dysfunction.** Taken together, data from *Htr2b*-FKO mice establish that inhibiting adipose HTR2B signaling protects against HFD-induced metabolic dysfunctions, including systemic insulin resistance, visceral adipose tissue inflammation, and hepatic steatosis. These results led us to evaluate the possibility of selective HTR2B antagonism as a novel therapeutic strategy for obesity-related metabolic dysfunctions. To this end, we fed mice HFD for 10 weeks and then administered SB 204741 daily via i.p. injection while continuing HFD feeding for 3 weeks (Supplemental Figure 6A). Treatment of mice with SB 204741 improved glucose tolerance and reduced plasma insulin levels without affecting body



**Figure 5. 5-HT signaling via HTR2B promotes lipolysis in visceral adipocytes of obese mice.** (A and B) Twelve-week-old control and *Htr2b*-FKO mice were fed HFD for 10 weeks. (A) Metabolomics was performed on plasma for significant enrichment. Only the top 10 enrichment subpathways are shown ( $n = 6$ /group). (B) Plasma FFA levels in HFD-fed mice (control and *Htr2b*-FKO,  $n = 5$ ) and SCD-fed mice (control,  $n = 6$ ; *Htr2b*-FKO,  $n = 5$ ). (C–E and G–J) Western blot of p-HSL and HSL using adipocytes isolated from eWAT of HFD-fed mice. (C–D) Treatment with different concentrations of 5-HT (C) or BW 723C86 (D) for 15 minutes. (E) Treatment with 1  $\mu$ M 5-HT for 15 minutes, with or without pretreatment for 30 minutes with 10  $\mu$ M SB 204741. (F) Assay of glycerol release in conditioned media after treatment with 10  $\mu$ M BW 723C86 for 6 hours using adipocytes isolated from eWAT of HFD-fed mice. (G) Treatment with 4  $\mu$ g/kg 5-HT (i.p.) for 15 minutes. (H) Treatment with 1  $\mu$ M 5-HT for 15 minutes, with pretreatment with 1  $\mu$ M BAPTA-AM for 30 minutes. (I) Treatment with 1  $\mu$ M 5-HT for 15 minutes, with pretreatment with 1  $\mu$ M KT 5823 for 30 minutes. (J) Treatment with 1  $\mu$ M 5-HT for 15 minutes, with pretreatment with 10  $\mu$ M ODQ and 10  $\mu$ M NS 2028 for 30 minutes. (K) Graphical summary. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ , ###, \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's *t* test used in F or 2-way ANOVA with post hoc Tukey's test used in B).

weight or body composition (Figure 7, A and B and Supplemental Figure 6, B–E). The effects of SB 204741 treatment closely resembled those of *Htr2b*-FKO mice: it decreased the proportion of hypertrophic adipocytes without change of average adipocyte size; decreased visceral adipose tissue inflammation; reduced plasma FFA levels; improved hepatic steatosis accompanied by downregulation of expression of genes involved in FA uptake, TG synthesis, and de novo lipogenesis; decreased plasma AST and ALT levels; and was characterized by the absence of histological changes in iWAT and BAT (Figure 7, C–M and Supplemental Figure 6, F–K).

We further validated the efficacy of SB 204741 on *Htr2b*-FKO mice with the same strategy (Supplemental Figure 7A). Unlike WT mice, SB 204741 treatment did not affect glucose tolerance, plasma insulin level, and plasma FFA levels in *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 7, B–D). In addition, SB 204741 treatment did not induce any histological changes in eWAT, liver, iWAT, and BAT of *Htr2b*-FKO mice (Supplemental Figure 7, E–H). These results demonstrate that HTR2B antagonism improves metabolic dysfunction in HFD-fed mice, likely through mechanisms in common with those of *Htr2b*-FKO mice.



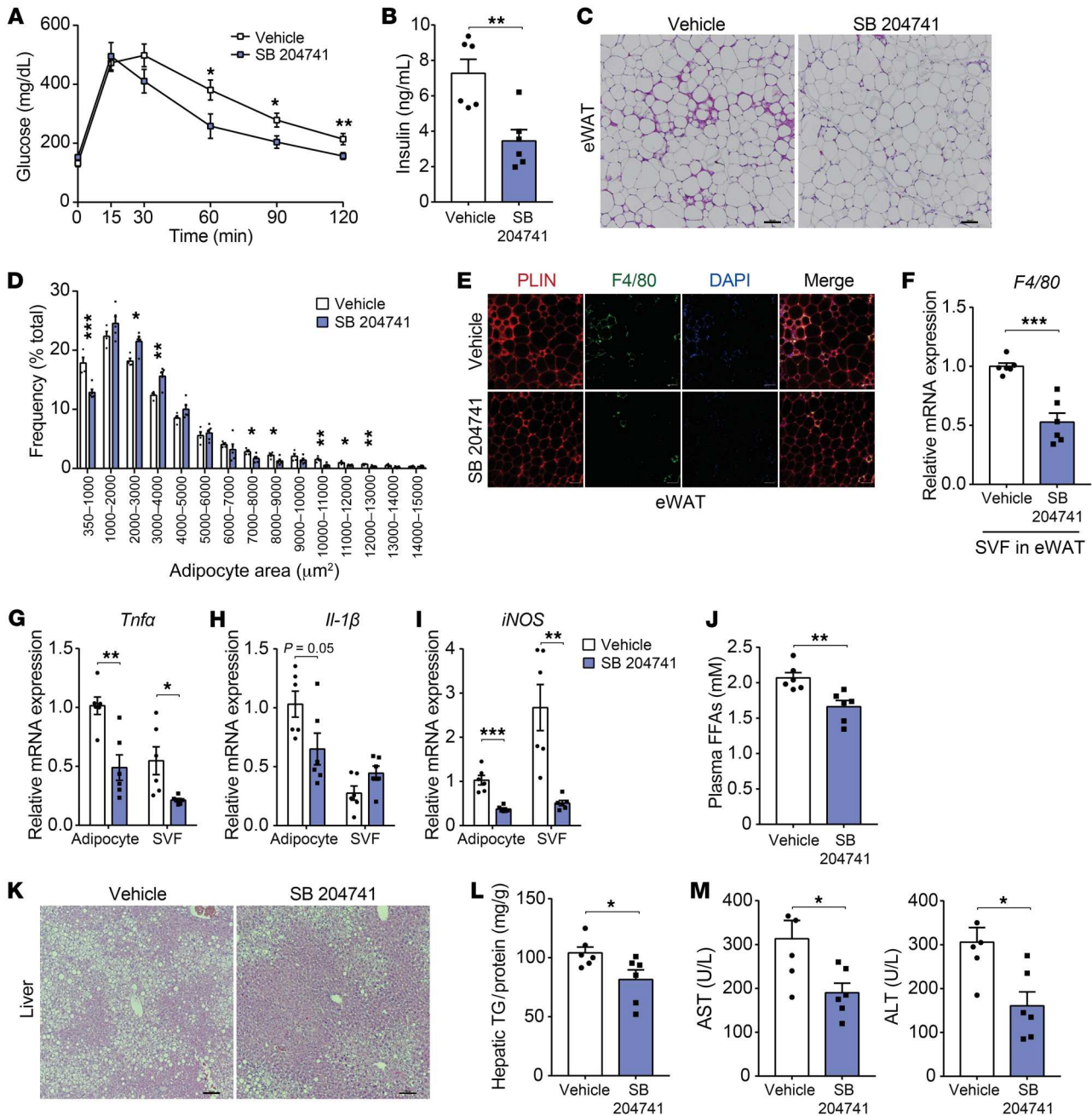
**Figure 6. HFD-induced hepatic steatosis is ameliorated in *Htr2b*-FKO mice.** (A–E) Twelve-week-old control and *Htr2b*-FKO mice were fed a SCD or HFD for 10 weeks. (A) Representative liver histology of HFD-fed control and *Htr2b*-FKO mice, as assessed by H&E staining. Scale bars: 100  $\mu$ m. (B) Hepatic TG levels ( $n = 5$ /group). (C and D) Relative expression of mRNA for genes involved in FA uptake (C) and TG synthesis (D) in the liver, as assessed by qRT-PCR ( $n = 5$ /group). (E) Plasma AST and ALT levels (SCD-fed control mice,  $n = 6$ ; SCD-fed *Htr2b*-FKO mice,  $n = 5$ ; HFD-fed mice,  $n = 5$ /group). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (#, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ###, \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's  $t$  test used in B or 2-way ANOVA with post hoc Tukey's test used in C–E).

## Discussion

Peripheral 5-HT is emerging as a regulator of energy metabolism during obesity-related insulin resistance, exerting its roles in liver and adipose tissues (11–13, 17, 28). Adipocyte-derived 5-HT inhibits adaptive thermogenesis in brown and subcutaneous adipose tissues, whereas gut-derived 5-HT regulates hepatic lipid accumulation through the gut–liver axis. However, a direct functional role of 5-HT in visceral WAT has not yet been elucidated. Here, we demonstrate that inhibition of adipose HTR2B signaling ameliorates systemic insulin resistance, visceral adipose tissue inflammation, and hepatic steatosis accompanied by decreased plasma

FFA levels. Mechanistically, adipose 5-HT signaling via HTR2B promotes lipolysis by inducing HSL phosphorylation through the  $Ca^{2+}$ -cGMP-PKG axis in visceral adipocytes. On the basis of these results, we propose that adipose HTR2B signaling acts as a regulator of systemic insulin resistance by promoting lipolysis.

A high plasma 5-HT concentration is positively correlated with BMI and glycated hemoglobin in human subjects (29). Similarly, the concentration of plasma 5-HIAA, the final metabolite of 5-HT, is positively correlated with fasting glucose levels and is higher in subjects with metabolic syndrome than in those without it (30). In the present study, we verified that WAT *HTR2B* expression is increased



**Figure 7. Pharmacological inhibition of HTR2B improves HFD-induced metabolic dysfunction.** (A–M) Twelve-week-old mice were fed a HFD for 10 weeks and treated with vehicle or SB 204741 daily via i.p. injection for 3 weeks while continuing HFD feeding. (A) IPGTTs of HFD-fed vehicle and SB 204741-treated mice ( $n = 6/\text{group}$ ). (B) Plasma insulin levels in HFD-fed mice treated with vehicle or SB 204741 ( $n = 6/\text{group}$ ). (C) Representative eWAT histology in HFD-fed mice treated with SB 204741, as assessed by H&E staining. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . (D) Histogram showing the distribution of adipocyte frequency according to diameter (vehicle,  $n = 4$ ; SB 204741,  $n = 5$ , 5 images per mouse) (E) IF staining for perilipin 1 (red) and F4/80 (green) in eWAT from HFD-fed mice treated with vehicle or SB 204741, and counterstaining of nuclei with DAPI (blue). (F) *F4/80* mRNA expression in SVF isolated from eWAT, as assessed by qRT-PCR (vehicle,  $n = 6$ ; SB 204741,  $n = 6$ ). (G–I) Relative expression of mRNA for genes involved in proinflammatory pathways in adipocytes and SVF isolated from eWAT, as assessed by qRT-PCR ( $n = 6/\text{group}$ ). (J) Plasma FFA levels ( $n = 6/\text{group}$ ). (K) Representative liver histology in HFD-fed mice treated with vehicle or SB 204741, as assessed by H&E staining. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . (L) Hepatic TG levels ( $n = 6/\text{group}$ ). (M) Plasma AST and ALT levels ( $n = 6/\text{group}$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's  $t$  test used in A, B, D, F–J, L, and M).

in mouse models of obesity (HFD-fed mice, *ob/ob* mice) and humans (Figure 1, B and F and Figure 2B). Furthermore, *HTR2B* expression is positively correlated with glycemia and plasma AST and ALT levels in a BXD mouse cohort (Supplemental Figure 1, B–D) and with BMI and plasma AST and ALT levels in humans (Figure 2, D, F, and

H). These data are generally supportive of the idea that adipose 5-HT signaling through HTR2B contributes to the pathogenesis of obesity-related metabolic dysfunction in both mice and humans.

A high lipolysis rate is associated with low insulin sensitivity, and inhibiting adipose tissue lipolysis, whether by knocking out

adipocyte-specific adipose triglyceride lipase (ATGL) or through HSL haploinsufficiency, improves obesity-related insulin resistance without causing a change in body weight (31, 32). However, there are limitations to using ATGL and HSL as therapeutic targets for obesity-related insulin resistance, since these enzymes are physiologically essential for maintaining energy homeostasis. In this study, we demonstrated that adipose HTR2B signaling activates lipolysis specifically in visceral adipocytes under obese conditions (Figure 5, C, D, and F and Supplemental Figure 4, H, I, K, and L). Furthermore, *Htr2b*-FKO mice improved insulin resistance only in the HFD-fed state, without causing metabolic changes in the SCD-fed state (Figure 3A and Supplemental Figure 2C). Our findings highlight the potential of adipose HTR2B signaling as a novel therapeutic target for obesity-related insulin resistance through modulating effects on lipolysis in visceral adipose tissue.

NAFLD, which refers to a group of conditions characterized by excessive fat accumulation in the liver, progresses from hepatic steatosis to steatohepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (33). Despite the increasing global burden of NAFLD, no pharmacological agents have been approved for its treatment. A previous study reported that HTR2B signaling in hepatic stellate cells promotes fibrosis by inducing the expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 (34). In the present study, we showed that hepatic steatosis and elevated plasma AST and ALT levels induced by HFD feeding were ameliorated in *Htr2b*-FKO mice (Figure 6, A, B, and E). In addition, administering a selective HTR2B antagonist after 10 weeks of HFD feeding produced similar outcomes (Figure 7, K–M). Considering that liver-specific *Htr2b*-KO mice exert no protective effect against HFD-induced hepatic steatosis (11), these effects are likely mainly attributable to HTR2B actions in adipose tissue. Taken together, our results and those of others suggest that systemic HTR2B antagonism, which simultaneously inhibits hepatic steatosis and fibrosis, may be an effective therapeutic strategy against NAFLD. Drugs that modulate 5-HT signaling pathways are widely used to treat various human diseases (35–40) and thus could be repurposed to treat NAFLD-related steatohepatitis and fibrosis, underscoring the importance of evaluating the therapeutic efficacy of systemic HTR2B antagonism in this setting.

In conclusion, our findings verify a role for adipose HTR2B signaling in energy homeostasis and suggest that inhibition of adipose HTR2B signaling may be a promising strategy for the targeted treatment of obesity-related insulin resistance. Future studies evaluating the significance of this pathway in humans with obesity and insulin resistance are needed.

## Methods

All materials and reagents are listed in Supplemental Table 1.

**Animal experiments.** *Htr2b*<sup>fl/fl</sup> mice were crossed with *Adiponectin*-Cre mice to generate adipose tissue-specific *Htr2b*-knockout (*Htr2b*-FKO) mice. *Htr2b* floxed mice and *Adiponectin*-Cre mice have been previously described (10, 41). C57BL/6J mice were purchased from Charles River Japan. Mice were housed in a specific pathogen-free barrier facility under a 12-hour light/dark cycle. Chow and water were provided ad libitum. At 12 weeks of age, mice were fed a SCD or a HFD (60% of calories from fat). Food consumption was measured by weighing the food in individual cages every other day. Mice were euthanized by cervical dis-

location. Fluid and lean and fat mass were measured in live mice using a body composition analyzer (LF50 BCA Analyzer; Bruker).

**Adipocyte isolation and stromal vascular fractionation.** Visceral adipose tissue (epididymal adipose tissue) was isolated from 22-week-old lean or obese mice. Adipocytes and the stromal vascular fraction (SVF) of epididymal adipose tissue were separated by collagenase digestion by mincing and then incubating tissue in isolation buffer (3% BSA in HBSS) containing 1 mg/mL collagenase type II (LS004176; Worthington) in a 37°C shaking incubator for 30 minutes. The digested tissue was filtered through a 100-mm mesh filter (BD Bioscience). Mature adipocytes and connective tissues were separated from the cell pellet by centrifuging at 800g for 10 minutes at 4°C and then washing cells twice with culture media. Pelleted stromal vascular cells and adipocytes in the upper supernatant were resuspended in TRIzol reagent.

**Primary adipocyte culture.** Isolated primary adipocytes from adipose tissue were cultured in DMEM supplemented with 100  $\mu$ g/mL penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Chemical treatments were applied to floating adipocytes on a shaker at 120 to 150 rpm. After treatment, the infranatant solution was removed using a 1 mL pipette, and primary adipocytes were prepared for isolation of RNA or protein.

**Blood profiling.** After fasting for 6 hours, mice were sacrificed and blood samples were obtained by cardiac puncture. Blood profiling was performed by GC Pharma (Green Cross Corporation). ALT and AST were detected using a modified International Federation of Clinical Chemistry UV method (without pyridoxal phosphate or sample blank). FFA was detected with an in vitro enzymatic colorimetric assay (NEFA HR.II; Wako) using a Cobas 8000 clinical analyzer with a c702 module (Roche).

**Metabolic analysis.** For measurement of metabolic rates, mice housed individually in an 8-chamber, open-circuit Oxymax/CLAMS (Columbus Instruments Comprehensive Lab Animal Monitoring System) apparatus were assessed for 72 hours in the fed state. The respiratory exchange ratio (RER = VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) and heat production (HP = (3.185 + 1.232 × RER) × VO<sub>2</sub>) were calculated.

**Histological analysis.** For H&E staining, harvested white or brown adipose tissues and liver were fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five-micron-thick tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with H&E. For immunofluorescence staining, harvested epididymal adipose tissues were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hour and whole-mounted. After blocking with 5% goat or donkey serum (Jackson ImmunoResearch) in PBST (0.3% Triton X-100 in PBS) for 1 hour at room temperature, whole-mounted tissue was incubated overnight with primary antibodies at 4°C. After several washes with PBST, samples were incubated for 2 hours at room temperature with FITC-conjugated goat anti-rat or TRITC-conjugated goat anti-guinea pig secondary antibody, as appropriate. Samples were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1  $\mu$ g/mL) to detect nuclei.

**Glucose and insulin tolerance tests.** For glucose tolerance test (GTT), mice were injected i.p. with 2 g/kg D-glucose (MilliporeSigma) after fasting for 16 hours. For insulin tolerance test (ITT), mice were injected i.p. with 1 U/kg human insulin (Humulin R; Lilly) after fasting for 6 hours. Glucose concentrations were measured in tail vein blood immediately before and 15, 30, 60, and 120 minutes after injection using a Gluco DR TOP glucometer (Allmedicus).

**Oral lipid tolerance tests.** For lipid tolerance tests, mice were administered corn oil (10  $\mu$ L/g) by oral gavage after fasting for 16

hours. Blood samples were collected immediately before and at 1, 2, 3, and 4 hours in tail vein after oral bolus load. Plasma TGs were detected by Triglyceride Reagent (Sigma-Aldrich).

**Hyperinsulinemic-euglycemic clamp study.** A hyperinsulinemic-euglycemic clamp study was performed in conscious mice 4 days after vein cannulation, as previously described (42). Briefly, after overnight fasting, a 2-hour hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed using a 900 pmol/kg priming dose and a continuous infusion of human regular insulin (Novolin) at 15 pmol/min, after which 20% glucose was infused at variable rates to maintain glucose at a constant concentration of 5–6 mM. Insulin-stimulated whole-body glucose-uptake rates were estimated using continuous infusion of [3-<sup>3</sup>H] glucose 0.1  $\mu$ Ci/min; PerkinElmer Life and Analytical Sciences) through-out clamps. Tissue 2-[<sup>14</sup>C]DG 6-phosphate (2-[<sup>14</sup>C]DG-6-P) content was determined by separating 2-DG-6-P from 2-DG in supernatants of homogenized tissue samples using an ion exchange column. Insulin-stimulated whole-body glucose-uptake rates were calculated by dividing [<sup>3</sup>H] glucose infusion rates [disintegrations per minute (dpm/min)] by the specific activities of plasma glucose (dpm/ $\mu$ mol) during the final 30 minutes of clamps. Hepatic glucose production (HGP) during clamps was determined by subtracting the glucose infusion rate from the whole-body glucose-uptake rate.

**In vivo insulin signaling.** Overnight-fasted mice were injected i.p. with 1 U/kg human insulin (Humulin R; Lilly) or an equal volume of saline (control). After 15 minutes, the animals were sacrificed and blood was collected by cardiac puncture. eWAT, liver, and soleus muscle were quickly dissected and frozen in liquid nitrogen for subsequent analysis.

**Quantitative RT-PCR.** TRIzol reagent (Ambion) was used for total RNA extraction from harvested tissues or primary adipocytes. cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). qRT-PCR was performed on a ViiA 7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Expressional profiles were quantified according to the relative ddCt method using 36B4 as a reference gene. The primer sequence is provided in Supplemental Table 2.

**Western blot analysis.** Whole-cell lysates were prepared by incubating cells in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease and phosphatase inhibitors (Invitrogen). After briefly centrifuging samples, supernatants were collected and assayed for protein concentration using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Cell lysates were then mixed with an equal volume of RIPA buffer and boiled for 10 minutes at 95 °C. Samples were then separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). After blocking in a 5% BSA solution, the membranes were incubated with the following specific primary antibodies: anti-phospho-HSL (Ser660) (diluted 1:1000; Cell Signaling, catalog 4126), anti-HSL (diluted 1:1000; Cell Signaling, catalog 4107), anti-AKT (diluted 1:1000; Cell Signaling, catalog 9272), anti-phospho-AKT (Ser473) (diluted 1:1000; Cell Signaling, catalog 9271), and anti- $\beta$ -actin (diluted 1:1000; Cell Signaling, catalog 3700). The membranes were then washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBST) and incubated with horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibody. Immunoreactive proteins were detected using Western Chemiluminescent HRP

Substrate (ECL) (EMD Millipore), and signals were captured using a ChemiDoc MP system (Bio-Rad).

**Glycerol release assay.** Lipolysis was quantified as the rate of glycerol release using a free glycerol reagent (MilliporeSigma), following the manufacturer's protocol. Briefly, isolated primary adipocytes in a round-bottom 14-mL tube were incubated with 5-HT or HTR2B agonist (BW 723C86; Tocris) in Krebs Ringer phosphate buffer (136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.9 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>) containing 4% fatty acid-free BSA (MilliporeSigma) for 24 hours. After incubation, 30  $\mu$ L of the cell culture supernatant was mixed with 0.1 ml of the free glycerol reagent, and the mixture was then incubated at 37°C for 5 minutes. The absorbance of the sample at 540 nm was determined using a spectrophotometer (DU730 Life Science UV/Vis; Beckman Coulter). The amount of glycerol released was expressed relative to the cellular protein content.

**Global metabolomics profiling.** Global metabolomics profiling of plasma from HFD-fed littermate control and *Htr2b*-FKO mice was performed by Metabolon, Inc. Plasma samples were processed and frozen at -70°C until analyzed. Compounds were identified by comparison with Metabolon's library of authenticated standards or recurrent unknown entities. The analysis revealed the presence of 827 compounds of known identity (named biochemicals). Enrichment was calculated according to the formula:  $(k/m)/\{(n-k)/(N-m)\}$ , where  $k$  is the number of significantly changed metabolites in a subpathway,  $m$  is the total number of detected metabolites in the subpathway,  $n$  is the total number of significantly changed metabolites, and  $N$  is the total number of detected metabolites. Welch's 2-sample  $t$  test was used to identify biochemicals that differed significantly between experimental groups.  $P$  less than 0.05 was considered statistically significant.

**Quantification of hepatic TGs.** Liver tissues were homogenized in 5% NP-40 using FastPrep-24 (MP Biomedicals). TGs were solubilized by 2 cycles of heating homogenates to 95°C for 5 minutes and then cooling to 23°C. Triglyceride Reagent (Sigma-Aldrich) or PBS was added, and TGs were hydrolyzed into glycerol by incubating samples at 37°C for 30 minutes. For colorimetric assay of hydrolyzed TG levels, samples were incubated with Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) at 37°C for 5 minutes. Differences in absorbance at 540 nm between hydrolyzed and nonhydrolyzed TGs were quantified using a glycerol standard (Sigma-Aldrich). TG content was normalized to the protein concentration in homogenates, and measured using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

**Bioinformatic analyses.** Bioinformatic analyses using GeneNetwork (<http://www.genenetwork.org/>) were performed as described in previous studies (43–45). All phenotype data sets in the BXD mouse cohort were downloaded from GeneNetwork. *Htr2b* mRNA expression in adipose tissue in the BXD family was searched and analyzed by correlating with published BXD phenotypes. BXD mouse phenotypes showing a significant correlation with *Htr2b* expression in murine transcriptome data sets were defined by performing an unbiased bioinformatics analysis. Correlation analyses were based on Pearson product-moment correlation coefficients, determined using the GeneNetwork website. Volcano plots shown are based on Pearson's  $r$  and  $P$  values. Specific BXD cohort phenotypes showing a significant correlation with *Htr2b* expression in adipose tissue (glycemia during GTT in HFD, AST level in HFD, ALT level in HFD) are presented.

**Human adipose tissue experiments.** We obtained visceral fat tissue from the normal control subjects ( $n = 10$ ) who underwent nephrecto-



my as a donor in kidney transplantation and visceral fat from the obese patients (non-diabetes mellitus [DM] = 9, DM = 9) from weight reduction bypass surgery in Seoul National University Bundang Hospital (SNUBH). Baseline characteristics were summarized in Supplemental Table 3. RNA was extracted from frozen human adipose tissue samples using TRIzol (Ambion). For qRT-PCR analysis, 3 µg total RNA was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). SYBR Green reactions using the SYBR Green PCR Master mix (Enzymomics) were assembled along with 10 pM primers according to the manufacturer's instructions and were performed using the ViiA7 applied biosystems (Thermo Fisher Scientific).

**Statistics.** All values are expressed as mean ± SEM, and analyses were performed using SPSS Statistics version 23 (SPSS, Inc.). Two-tailed Student's *t* test or 1-way ANOVA with post hoc Tukey's test were used to compare groups. *P* less than 0.05 was considered statistically significant; individual *P* values are indicated by asterisks in graphs (\*, \**P* < 0.05, \*\*, \*\**P* < 0.01, \*\*\*, \*\*\**P* < 0.001). Statistical analyses of metabolomics results were performed using Array Studio (Omicsoft) version 7.2 and R version 3.02 (R Foundation for Statistical Computing). Biochemicals in the Metabolon analyses of plasma were rescaled to set the median to 1, based on all samples. Statistical analyses were conducted to detect differences in fold-change (i.e., scaled intensity) in metabolomics data sets.

**Study approval.** All animal experiments were performed with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the KAIST and Yeungnam University. The study in humans was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of SNUBH (IRB no. B-1801445301 and B-1812513302) and all subjects provided their written informed consent.

## Author contributions

WGC, WC, TJO, SYP, SHC, and HK designed the experiments, wrote the paper, and analyzed data. WGC, IH, SYL, HS, AL, JMS, and HK conducted the mouse experiments in vivo and in vitro. WGC, WC, and HK performed the metabolomics analysis. WGC, TJO, YKL, SHC, and HK analyzed the human data. WGC, HNC, SYP, and HK performed the CLAMP study. WGC, DR, and HK conducted the bioinformatics analysis of BXD mice. All authors reviewed and approved the manuscript.

## Acknowledgments

We thank Jueun Kim and Hwajin Kim for technical support. We also thank all members of Integrated lab of Metabolism, Obesity, and Diabetes for helpful discussions. This work was supported by grants from the National Research Foundation (NRF) of Korea (NRF-2018R1A2A3074646, NRF-2019R1A5A8083404, and NRF-2020M3A9E4038695 to HK, NRF-2016R1D1A1B04931995 to AL, NRF-2015R1A5A2009124 to SYP).

Address correspondence to: Hail Kim, Graduate School of Medical Science and Engineering, KAIST, 291 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, South Korea. Email: hailkim@kaist.edu. Or to: Sung Hee Choi, Department of Internal Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 173-82 Gumi-ro, Seongnam 13620, South Korea. Email: shchoimd@gmail.com. Or to: So-Young Park, Department of Physiology, College of Medicine, Yeungnam University, 170 Hyunchoongro, Namgu, Daegu 42415, South Korea. Email: sypark@med.yu.ac.kr.

- Friedrich MJ. Global obesity epidemic worsening. *JAMA*. 2017;318(7):603.
- Kahn CR, et al. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2019;129(10):3990–4000.
- Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):242–258.
- Fox CS, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(1):39–48.
- Walther DJ, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003;299(5603):76.
- Zhang X, et al. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 2004;305(5681):217.
- Berger M, et al. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355–366.
- Noda M, et al. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol*. 2004;29(1):31–39.
- Kim H, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med*. 2010;16(7):804–808.
- Sumara G, et al. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metabolism*. 2012;16(5):588–600.
- Choi W, et al. Serotonin signals through a gut-liver axis to regulate hepatic steatosis. *Nat Commun*. 2018;9(1):4824.
- Crane JD, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*. 2015;21(2):166–172.
- Oh CM, et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat Commun*. 2015;6:6794.
- Paulmann N, et al. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol*. 2009;7(10):e1000229.
- Coelho WS, et al. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol Genet Metab*. 2007;92(4):364–370.
- Hajduch E, et al. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13563–13568.
- Shong KE, et al. Serotonin regulates de novo lipogenesis in adipose tissues through serotonin receptor 2A. *Endocrinol Metab*. 2020;35(2):470–479.
- Hwang I, et al. GABA-stimulated adipose-derived stem cells suppress subcutaneous adipose inflammation in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(24):11936–11945.
- Li H, et al. An integrated systems genetics and omics toolkit to probe gene function. *Cell Syst*. 2018;6(1):90–102.
- Zechner R, et al. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):671–684.
- Milbourne EA, Bygrave FL. Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling? *Cell Calcium*. 1995;18(3):207–213.
- Katona D, et al. Calcium-dependent mitochondrial cAMP production enhances aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;412:196–204.
- Cameron EG, Kapiloff MS. Intracellular compartmentation of cAMP promotes neuroprotection and regeneration of CNS neurons. *Neural Regen Res*. 2017;12(2):201–202.
- Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 2009;48(5):275–297.
- Sengenes C, et al. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(49):48617–48626.
- Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019;576(7785):51–60.
- Donnelly KL, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343–1351.
- Namkung J, et al. Inhibition of serotonin synthesis induces negative hepatic lipid balance. *Diabetes Metab J*. 2018;42(3):233–243.
- Young RL, et al. Augmented capacity for peripheral serotonin release in human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(11):1880–1889.
- Fukui M, et al. High plasma 5-hydroxyindole-3-

- acetic acid concentrations in subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2012;35(1):163–167.
31. Grousse A, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol*. 2013;11(2):e1001485.
32. Schoiswohl G, et al. Impact of reduced ATGL-mediated adipocyte lipolysis on obesity-associated insulin resistance and inflammation in male mice. *Endocrinology*. 2015;156(10):3610–3624.
33. Friedman SL, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908–922.
34. Ebrahimkhani MR, et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT<sub>2</sub>B receptor in chronic liver disease. *Nat Med*. 2011;17(12):1668–1673.
35. Fournier JC, et al. Antidepressant drug effects and depression severity: a patient-level meta-analysis. *JAMA*. 2010;303(1):47–53.
36. Lyseng-Williamson KA. Telotristat ethyl: a review in carcinoid syndrome diarrhoea. *Drugs*. 2018;78(9):941–950.
37. Miyazaki M, et al. Sarpogrelate hydrochloride, a selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, improves vascular function in patients with peripheral arterial disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(4):221–227.
38. Bohula EA, et al. Cardiovascular safety of lorcaserin in overweight or obese patients. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1107–1117.
39. Tramer MR, et al. A quantitative systematic review of ondansetron in treatment of established postoperative nausea and vomiting. *BMJ*. 1997;314(7087):1088–1092.
40. Omer A, Quigley EMM. An update on prucalopride in the treatment of chronic constipation. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017;10(11):877–887.
41. Eguchi J, et al. Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell Metab*. 2011;13(3):249–259.
42. Cha HN, et al. Peroxiredoxin2 deficiency aggravates aging-induced insulin resistance and declines muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(2):147–154.
43. Andreux PA, et al. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. *Cell*. 2012;150(6):1287–1299.
44. Ryu D, et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABPbeta1 controls mitochondrial function. *Cell Metab*. 2014;20(5):856–869.
45. Li H, Auwerx J. Mouse systems genetics as a prelude to precision medicine. *Trends Genet*. 2020;36(4):259–272.