

Bartosz Zglinicki

**Wpływ usunięcia genu *Dicer1* w tkance tłuszczowej
na metabolizm myszy transgenicznych
Dicer^{AdipoqCreERT2}**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Modeli Zwierzęcych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Urszula Wojda

PROMOTOR POMOCNICZY:
Dr Witold Konopka

Warszawa, rok 2020

Chciałbym bardzo podziękować prof. dr hab. Urszuli Wojdzie oraz dr. Witoldowi Konopce za opiekę naukową i pomoc w realizacji pracy doktorskiej, w szczególności dr. Konopce za umożliwienie indywidualnego rozwoju oraz za cierpliwość i opanowanie.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
ABSTRACT.....	9
STRESZCZENIE.....	11
1. WPROWADZENIE	13
1.1 Biała tkanka tłuszczowa (z ang. <i>White Adipose Tissue</i> , WAT).....	13
1.1.1 Metaboliczna odpowiedź organizmu na restrykcję pokarmową	15
1.1.2 Sekrecyjna rola białej tkanki tłuszczowej	22
1.2 Brązowa tkanka tłuszczowa (z ang. <i>Brown Adipose Tissue</i> , BAT).....	26
1.2.1 Termogeniny - białka rozprzegające	27
1.3 Rola cząsteczek mikroRNA w regulacji procesów biologicznych.....	31
1.3.1 Biogeneza mikroRNA	31
1.3.2 Funkcja regulatorowa mikroRNA	34
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	36
3. MATERIAŁY I METODY	37
3.1 Zwierzęta doświadczalne	37
3.1.1 Myszy typu dzikiego - szczep C57Bl/6J	37
3.1.2 Myszy transgeniczne $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ zawierające tkankowo specyficzny system indukcji mutacji genu <i>Dicer1</i>	37
3.1.3 Myszy transgeniczne $tdTomato^{AdipoqCreERT2}$ zawierające tkankowo specyficzny system indukcji ekspresji znacznika fluorescencyjnego.....	39
3.2 Warunki hodowli zwierząt doświadczalnych.....	39
3.3 Pobieranie tkanek zwierzęcych do analiz.....	39
3.3.1 Tkanka tłuszczowa	40
3.3.2 Tkanka wątrobowa	40
3.3.3 Fragment ogona.....	40
3.3.4 Krew (osocze).....	40
3.4 Podstawowe techniki pracy z kwasami nukleinowymi	40
3.4.1 Izolowanie DNA z tkanek	40
3.4.2 Izolowanie RNA z tkanek	41
3.4.3 Oznaczenie stężenia kwasu nukleinowego w próbce	41
3.4.4 Analiza genotypu zwierząt transgenicznych	41
3.4.5 Reakcje odwrotnej transkrypcji.....	42
3.4.6 Metoda ilościowa PCR w czasie rzeczywistym (ang. real time quantitative PCR, RT-qPCR)	43
3.4.7 Profilowanie mikroRNA - metoda ilościowa RT-qPCR	44
3.5 Indukowanie systemu Cre-loxP.....	45
3.6 Obrazowanie makroskopowe do obserwacji sygnału fluoroscencyjnego	46

3.7 Indukowanie termogenezy z wykorzystaniem agonisty receptora β_3 -adrenergicznego	46
3.8 Procedury restrypkji pokarmowej.....	47
3.8.1 Głózenie krótkoterminowe (ang. <i>short-term fasting</i>)	47
3.8.2 Restrykcja kaloryczna (ang. <i>caloric restriction, CR</i>)	47
3.10 Badanie parametrów metabolicznych myszy z wykorzystaniem systemu Phenomaster TSE Systems.....	47
3.10.1 Pomiary poboru pokarmu, wody oraz wagi zwierząt	48
3.10.2 Pomiary aktywności fizycznej zwierząt	48
3.10.3 Pomiary składu powietrza	48
3.10.4 Czasowo-zależna dystrybucja pokarmu	49
3.11 Badania motywacji zwierząt z wykorzystaniem systemu Med Associates Inc. Operant Behavior Chamber	49
3.12 Monitorowanie temperatury ciała zwierząt z wykorzystaniem kamery termowizyjnej	50
3.13 Analiza biochemiczna krwi zwierząt.....	50
3.13.1 Pomiary stężenia glukozy	51
3.13.2 Pomiary stężenia kwasów tłuszczowych.....	51
3.13.3 Pomiary stężenia ciał ketonowych	51
3.13.4 Pomiary stężenia hormonów	52
3.14 Analiza statystyczna	52
4. WYNIKI.....	53
4.1 Wpływ pentobarbitalu na zawartość kwasów tłuszczowych w osoczu myszy	53
4.2 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu myszy typu dzikiego, w warunkach restrypkji pokarmowych.....	54
4.3 Wpływ restrypkji pokarmowych na metabolizm myszy typu dzikiego.....	59
4.4 Wpływ restrypkji pokarmowych i hormonu leptyny na motywację myszy typu dzikiego do zdobywania pokarmu	61
4.5 Profil mikroRNA w białej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, w warunkach restrypkji pokarmowych.	63
4.6 Wynik genotypu zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} oraz tdTomatoDicer ^{AdipoqCreERT2} ...	75
4.7 Weryfikacja skuteczności działania systemu Cre-loxP u zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} oraz tdTomato ^{AdipoqCreERT2}	76
4.8 Wpływ Tamoxifenu oraz jego rozpuszczalników na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu	78
4.9 Zawartość substratów energetycznych w osoczu zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} w warunkach głódkwki krótkookresowej.....	79
4.10 Wpływ głódkwki krótkookresowej na metabolizm zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2}	80
4.11 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu myszy typu dzikiego poddanych działaniu agonisty receptorów β -adrenergicznych.....	85

4.12 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} poddanych działaniu agonisty receptorów β -adrenergicznych.	87
4.13 Wyniki badania metabolizmu myszy typu dzikiego po aktywacji procesu termogenezy z wykorzystaniem systemu Phenomaster.....	87
4.14 Wyniki badania metabolizmu zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} po aktywacji procesu termogenezy z wykorzystaniem systemu Phenomaster.....	89
4.15 Zmiany temperatury ciała zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2} po aktywacji procesu termogenezy monitorowane z wykorzystaniem kamery termowizyjnej.....	91
4.16 Profil mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, po indukcji procesu termogenezy.....	93
5. DYSKUSJA.....	100
5.1 W restrykcjach pokarmowych czas między kolejnymi posiłkami dyktuje intensywność przemian metabolicznych.....	100
5.2 W restrykcjach pokarmowych zmiany hormonalne współtworzą przemiany metaboliczne i warunkują motywację do poszukiwania jedzenia	102
5.3 Podobieństwa i różnice między restrykcją pokarmową a procesem termogenezy	103
5.4 Skuteczność systemu Cre-loxP warunkuje obserwację fenotypu zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2}	104
5.5 Zwierzęta transgeniczne Dicer ^{AdipoqCreERT2} charakteryzują się obniżoną termogenezą	105
5.6 Zmieniony profil ekspresji mikroRNA w brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego dostarcza wskazówek dla wyjaśnienia fenotypu obniżonej termogenezy u zwierząt transgenicznych Dicer ^{AdipoqCreERT2}	106
5.7 Zmieniony profil ekspresji mikroRNA w białej tkance tłuszczowej jest powiązany z fenotypem metabolicznej odpowiedzi organizmu na restrykcję pokarmową.....	107
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	109
7. LITERATURA	110

Wykaz stosowanych skrótów

- ACC – (z ang. *acetyl-CoA carboxylase*) karboksylaza acetylo-koenzymu A
- ACO – (z ang. *acetyl-CoA oxidase*) oksydaza acetylo-koenzymu A
- ADRP – (z ang. *adipose differentiation-related protein*) białko adipofiliny
- AGO – (z ang. *argonaute*) białka AGO
- AgRP – (z ang. *agouti-related peptide*) peptyd agouti
- Akt – kinaza Akt
- AMPK – (z ang. *5'AMP-activated protein kinase*) kinaza aktywowana 5'AMP
- ASP – (z ang. *acylation-stimulating protein*) białko stymulujące acylację
- ATGL – (z ang. *adipose triglyceride lipase*) lipaza trójglicerydu
- ATP – (z ang. *adenosine triphosphate*) trójfosforan adenozyne
- BAT – (z ang. *brown adipose tissue*) brązowa tkanka tłuszczowa
- BMR – (z ang. *basic metabolic rate*) współczynnik metabolizmu podstawowego
- BOH – (z ang. *beta hydroxybutyrate*) beta hydroksymaślan
- C/EBP – (z ang. *CCAAT enhancer binding proteins*) białka wiążące się z sekwencją CCAAT
- cAMP – (z ang. *cyclic adenosine monophosphate*) cykliczny adenozynomonofosforan
- CCR4-NOT – (z ang. *carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less complex*)
- CoA – (z ang. *coenzyme A*) koenzym A
- CPT1 – (z ang. *carnitine palmitoyltransferase I*) palmitoilotransferaza karnitynowa I
- CRH – (z ang. *corticotropin-releasing hormone*) kortykoliberyna
- DCP2 – (z ang. *mRNA-decapping enzyme 2*) enzym usuwający strukturę czapeczki w mRNA
- DGCR8 – (z ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) krytyczny region syndromu DiGeorge'a
- EGP – (z ang. *endogenous glucose production*) endogenna produkcja glukozy
- ER – (z ang. *endoplasmic reticulum*) reticulum endoplazmatyczne / siateczka śródplazmatyczna
- ERK – (z ang. *extracellular signal-regulated kinase*) kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
- FADH₂ – (z ang. *flavin adenine dinucleotide*) dinukleotyd flawinoadeninowy
- FAS – (z ang. *fatty acid synthase*) syntaza kwasów tłuszczowych
- FFA – (z ang. *free fatty acids*) wolne kwasy tłuszczowe
- FGF21 – (z ang. *fibroblast growth factor 21*) czynnik wzrostu fibroblastu 21
- FIAP – (z ang. *fasting-induced adipose factor*) czynnik tkankowy indukowany głodem

FXR1 – (z ang. *Fragile-x-mental retardation related protein 1*) białko związane z upośledzeniem w zespole łamliwego chromosomu X

GDP – (z ang. *guanosine diphosphate*) dwufosforan guanozyny

GLU – glukoza

GLUT – (z ang. *glucose transporter*) transporter glukozy

GMP – (z ang. *guanosine monophosphate*) monofosforan guanozyny

GNG – (z ang. *gluconeogenesis*) glukoneogeneza

GSK – (z ang. *glycogen synthase*) syntaza glikogenu

GTP – (z ang. *guanosine triphosphate*) trójfosforan guanozyny

HMG – (z ang. *hydroxymethylglutarate*) - hydroksymetyloglutaran

HSL – (z ang. *hormone sensitive lipase*) lipaza zależna od hormonów

IL6 – (z ang. *interleukine 6*) interleukina 6

INS – insulina

ITT – (z ang. *insulin tolerance test*) test tolerancji insuliny

JAK – (z ang. *Janus-activated kinase*) kinaza Janusa

KB – (z ang. *ketone bodies*) ciała ketonowe

KLF – (z ang. *Kruppel-like factor*) czynnik podobny do Kruppela

LEP – leptyna

LEPR – (z ang. *leptin receptor*) receptor leptynowy

MAGL – (z ang. *monoacylglyceride lipase*) lipaza monoacyloglicerydowa

MAPK – (z ang. *mitogen-activated protein kinase*) kinaza białkowa aktywowana mitogenami

MCAD – (z ang. *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) dehydrogenaza acylokoenzymu A średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych

MCP1 – (z ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) białko chemotaktyczne monocytu 1

miRISC – (z ang. *miRNA induced silencing complex*) indukowany przez mikroRNA kompleks wyciszający

MRE – (z ang. *miRNA response elements*) rejon odpowiedzi na (przyłączania) mikroRNA

mTOR – (z ang. *mammalian target of rapamycin*) ssaczy cel rapamycyny

NADH – (z ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NPY – (z ang. *neuropeptide Y*) neuropeptyd Y

OGTT – (z ang. *oral glucose tolerance test*) doustny test obciążenia glukozą

PAI-1 – (z ang. *plasminogen activator inhibitor 1*) inhibitor aktywatora plasminogenu 1

PDE3B – (z ang. *phosphodiesterase 3*) fosfodiesteraza 3

PET – (z ang. *positron emission tomography*) pozytronowa tomografia emisyjna

PG – (z ang. *perigonadal*) okołogonadalny

PI3K – (z ang. *phosphoinositide 3-kinase*) kinaza fosfatydylinozytolu

PLIN – (z ang. *perilipin*) białko perilipiny

POMC – (z ang. *proopiomelanocortin*) proopiomelanokortyna

PPAR – (z ang. *peroxisome proliferatoractivated receptor*) receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomalne

PTP1B – (z ang. *protein-tyrosine phosphatase 1B*) białkowa fosfataza tyrozyny 1B

PUMP – (z ang. *plant uncoupling mitochondrial protein*) roślinne białko rozprężania w mitochondrium

Raf – białko protoonogenu Raf

Ras – białko GTPazy Ras

RMR – (z ang. *resting metabolic rate*) współczynnik metabolizmu spoczynkowego

ROS – (z ang. *reactive oxygen species*) reaktywne formy tlenu

SC – (z ang. *subcutaneous*) podskórny

SOCS – (z ang. *suppressor of cytokine signaling*) supresor sygnalizacji cytokin

SREBP-1 – (z ang. *sterol regulatory element-binding transcription factor 1*) białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole

STAT – (z ang. *signal transducer and activator of transcription*) przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji

TAG – (z ang. *triacylglyceride*) trójglicerydy

TCA – (z ang. *tricarboxylic acid cycle*) cykl kwasów trójkarboksylowych

TG – (z ang. *triglyceride*) trójglicerydy

TGFβ – (z ang. *tumor growth factor β*) czynnik wzrostu nowotworu β

TIP47 – (z ang. *tip-interacting protein*) białko oddziałujące z ogonem

TNFα – (z ang. *tumor necrosis factor α*) czynnik martwicy nowotworu α

TNRC6 – (z ang. *trinucleotide repeat-containing gene 6*) białko genu 6 zawierające powtórzenie trójnukleotydowe

UCP – (z ang. *uncoupling protein*) białko rozprężające

UTR – (z ang. *untranslated region*) region nieulegający translacji

V – (z ang. *visceral*) trzewny

WAT – (z ang. *white adipose tissue*) biała tkanka tłuszczowa

XPO – (z ang. *exportin*) białko eksportyny

XRN1 – (z ang. *exoribonuclease 1*) egzorybonukleaza

ABSTRACT

This dissertation demonstrates the role of microRNAs present in white and brown adipose tissue in the regulation of the body's metabolism of transgenic mouse model and wild type mice. miRNAs are small, non-coding RNA molecules which are known to play a posttranskryptional regulatory role in the organism. They exert their function by homology binding to mRNAs and blocking the process of translation. MicroRNAs, together with several proteins, form a miRNA-induced silencing complex (miRISC) to target specific mRNA. A necessary endoribonuclease to obtain mature, functional miRNAs forming miRISC is Dicer. Therefore, to achieve a deletion of miRNA molecules, we used transgenic mouse line *Dicer^{AdipoqCreERT2}*. This line allows us to tackle Dicer protein selectively in the adipose tissue of adult animals. Parallel to experiments in transgenic mice, we introduced challenges to both types of adipose tissue in wild-type animals, to explain the overall effect of miRNA action. As a challenge for white adipose tissue we applied food restrictions, since the main role of this tissue is storing energy substrates in the form of lipids and using them in times of hunger. Applied types of food restrictions were short-term fasting (24-hour food suspension) and caloric restriction (CR). Since the main role of brown adipose tissue is to produce heat in times of hypothermic condition, as a challenge for BAT we employed β_3 -adrenergic receptor activator CL-316,243 as thermogenic process is initiated through these receptors.

After introduction of food restrictions in transgenic animals, we observed a very subtle phenotype change in white adipose tissue, mostly regarding glucose regulation. Moreover, the transgenic animals showed a reduced energy expenditure in fasting during the light (inactive) phase, but still sufficient enough for survival. However, the overall profile of miRNA molecules in white adipose tissue of wild-type animals changed significantly upon food restrictions. These results indicate an important role of such miRNAs as miR-29c, let-7i, miR-21, miR-196b, miR-199a-3p, miR-188-5p, miR-126-5p, miR-142-3p, miR-322 in the response to food restriction. Some of these miRNAs were also predicted using bioinformatic tools as potentially targeting these mRNAs that yield proteins associated with fasting response. The observed weak fasting response in transgenic animals may be a result of short period of food restriction and could be more severe after its longer periods. In turn, in transgenic mice, in brown adipose tissue after thermogenic activator administration, we observed a clear phenotypic change. These animals were less capable of heat production as revealed by measurements of body temperature. Mean difference in temperature was almost 2°C. Moreover, statistically significant differences were found in microRNA profile in brown adipose tissue after administration of adrenergic β -

receptor agonist in wild-type animals. In line with this result, using bioinformatic tools I demonstrated that upon CL-316,243 agonist action the most significantly altered miRNA molecules: miR-150, miR-676, miR-203, miR-146a, miR-106b, miR-124, miR-182 are indeed associated with the process of thermogenesis.

STRESZCZENIE

W niniejszej rozprawie wykazano wpływ cząsteczek mikroRNA obecnych w białej oraz brązowej tkance tłuszczowej na metabolizm organizmu u myszy typu dzikiego oraz w modelu myszy transgenicznym. MikroRNA są niewielkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA, znanymi ze swojej funkcji regulacyjnej w organizmie. MikroRNA blokują proces translacji w komórkach poprzez kompleks miRISC (z ang. *miRNA-induced silencing complex*) tworzony wraz z szeregiem białek i działający na docelowe mRNA. Usunięcie mikroRNA było możliwe dzięki wykorzystaniu linii transgenicznych myszy - *Dicer*^{AdipoqCreERT2}. Linia ta pozwala na indukowalne usunięcie fragmentu genu *Dicer1*, niezbędnego dla powstawania dojrzałych form mikroRNA, specyficznie w tkance tłuszczowej. Równolegle do doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych, prowadzono badania na zwierzętach typu dzikiego, u których wprowadzono czynniki indukujące zmiany metaboliczne, wymierzone w obydwa typy tkanki tłuszczowej i pełnione przez nie funkcje. W przypadku białej tkanki tłuszczowej zwierzęta poddano restrykcjom pokarmowym, z uwagi na wiodącą rolę tej tkanki, jaką jest gromadzenie materiału zapasowego w postaci trójglicerydów i możliwego wykorzystania ich w czasach deficytu energetycznego. Zastosowanymi restrykcjami pokarmowymi była głódówka krótkookresowa (24-godzinna) oraz restrykcja kaloryczna, w której zwierzę otrzymywało niewielką porcję pokarmu raz dziennie. W przypadku brązowej tkanki tłuszczowej zwierzęta poddano działaniu aktywatora termogenezy, z uwagi na proces generowania ciepła w warunkach obniżonej temperatury, charakterystyczny dla tej tkanki. Wykorzystanym aktywatorem termogenezy był agonista receptorów β_3 -adrenergicznych - CL-316,243 – jako że proces termogenezy jest zależny od tej klasy receptorów.

W wyniku prowadzonych badań w przypadku białej tkanki tłuszczowej u zwierząt transgenicznych, zaobserwowano niewielkie odstępstwa od normy po wprowadzeniu restrykcji pokarmowej, w porównaniu do grupy kontrolnej, dotyczące regulacji metabolizmu glukozy. Ponadto zwierzęta transgeniczne charakteryzowały się obniżonym wydatkiem energetycznym w głódówce podczas fazy jasnej (nieaktywnej). Ogólny profil ekspresji mikroRNA u zwierząt typu dzikiego uległ jednak znaczącej zmianie podczas odstępstwa od pokarmu, co wskazuje na istotność cząsteczek mikroRNA dla metabolicznej odpowiedzi organizmu na głodzenie. Część zmienionych mikroRNA (w szczególności miR-29c oraz let-7i) została potwierdzona przez zastosowanie narzędzi bioinformatycznych jako cząsteczki celujące w mRNA dla białek zaangażowanych w utrzymanie homeostazy energetycznej. W przypadku brązowej tkanki

tłuszczowej u zwierząt transgenicznych, zaobserwowano obniżoną odpowiedź na działanie aktywatora termogenezy. Pomiar ciepłoty ciała u tych zwierząt wykazał ich mniejszą zdolność do generowania ciepła, sięgającą ok. 2°C w porównaniu do grupy kontrolnej. Profil ekspresji mikroRNA w tej tkance u zwierząt typu dzikiego również uległ zmianie na skutek działania agonisty receptora adrenergicznego. Ponownie korzystając z narzędzi bioinformatycznych potwierdzono, iż istotnie zmienione mikroRNA (miR-150, miR-676, miR-203, miR-146a, miR-106b, miR-124, miR-182) w brązowej tkance tłuszczowej zaangażowane są w proces termogenezy.

1. WPROWADZENIE

Pozyskiwanie energii to kluczowy element funkcjonowania każdego organizmu, niezbędny dla przetrwania w środowisku. Do wykonania nawet najprostszych czynności organizm potrzebuje energii dostarczanej z przemian metabolicznych z udziałem węglowodanów, lipidów i białek, oraz mikroelementów (Bjorntorp, 1991; Jéquier, 1994; Lonnie et al., 2018). Rośliny i zwierzęta różnią się pod względem zapewniania sobie odpowiedniej puli tych surowców. O ile rośliny po części są samowystarczalne, tzn. same potrafią wytwarzać substraty energetyczne w procesie fotosyntezy (Nevins, 1995), o tyle zwierzęta zmuszone są do aktywnego poszukiwania tych substratów, a ich źródłem są inne organizmy. Dawniej, zanim nasi przodkowie nauczyli się wykorzystywać potencjał środowiska, standard życia ludzi nie odbiegał zasadniczo od standardu życia zwierząt. Zdobywanie pożywienia, które jest podstawą piramidy potrzeb, uwarunkowane było nie tylko czynnikami środowiskowymi czy geograficznymi, ale też umiejętnościami danej jednostki lub grupy, pozwalającymi zdobyć pożywienie. Skutkowało to często ograniczonym dostępem do pokarmu i tym samym narzucało restrykcję pokarmową danej grupie (Bogin, 1998; Luca, Perry, & Di Rienzo, 2010; Terragni, Garnweidner, Pettersen, & Mosdøl, 2014). Aby przetrwać, organizm musiał adaptować się do niestalego napływu substratów energetycznych i modulować procesy metaboliczne w sposób, który zapewnia optymalne wykorzystanie tych substratów (Luca et al., 2010).

1.1 Biała tkanka tłuszczowa (z ang. *White Adipose Tissue*, WAT)

Wspomniana modulacja metabolizmu jest możliwa m.in. dzięki obecności białej tkanki tłuszczowej, która spełnia rolę bufora w organizmie, gromadząc cząsteczki trójglicerydów jako zapasowy materiał energetyczny. W wyniku restrykcji pokarmowej, z lipidów zaczynają uwalniać się kwasy tłuszczowe będące jednym z substratów energetycznych. Odwrotne zjawisko występuje w sytuacji nadwyżki dostarczanego pożywienia. Nadmiar energii zostaje zamknięty w formie lipidów i przechowywany na wypadek konieczności jego użycia w mniej lub bardziej odległym czasie (Frayn, 2002). To właśnie ten ostatni mechanizm sprzyja zjawisku otyłości. Wśród rzędu naczelnych jest on charakterystyczny przede wszystkim dla *homo sapiens*. Przeciętny człowiek gromadzi tkankę tłuszczową w ilości 20-30% swojej masy ciała, podczas gdy najbliższej spokrewniony z człowiekiem szympanz już tylko ok 4% (Zihlman &

Bolter, 2015). Nierzadko w przypadku tych ostatnich wartość ta spada poniżej 1%, co w przypadku człowieka najczęściej oznacza stan patologiczny. U kobiet, u których magazyn lipidów w tkance tłuszczowej osiągnie zbyt niskie wartości, występuje zahamowanie funkcji reprodukcyjnych, ponieważ wydawanie potomstwa w warunkach krytycznie ujemnego bilansu energetycznego, jest niekorzystne ewolucyjnie (Huss-Ashmore, 1980).

Ze względu na rozmieszczenie białej tkanki tłuszczowej w organizmie, można rozróżnić podskórną tkankę tłuszczową (z ang. *subcutaneous*, SC) oraz tkankę zlokalizowaną wokół narządów (z ang. *visceral*, V) (Bjørndal, Burri, Staalesen, Skorve, & Berge, 2011). U zwierząt często odróżnia się dodatkowo gonadalną tkankę tłuszczową, ze względu na jej duże ilości gromadzące się wokół narządów rodnych (z ang. *perigonadal*, PG). Ponadto można wyróżnić także śródskórną warstwę komórek tej tkanki, niezależnie od występowania skupisk podskórnych (Festa et al., 2011).

Białą tkankę tłuszczową tworzy heterogeniczna populacja komórek, składająca się z fibroblastów, komórek śródbłonna, komórek układu odpornościowego, komórek prekursorowych dla adipocytów oraz właściwych, dojrzałych adipocytów, z wyraźnie zaznaczoną frakcją magazynującą trójglicerydy (Cinti, 2005). Komórki prekursorowe (preadipocyty) stanowią istotną subpopulację komórek dla utrzymania właściwej homeostazy energetycznej (Ali, Hochfeld, Myburgh, & Pepper, 2013). Pod działaniem czynników transkrypcyjnych takich jak C/EBPs oraz KLFs (z ang. *Kruppel-like factors*), a także z wykorzystaniem receptora jądrowego PPAR γ (z ang. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) jako głównego regulatora adipogenezy, różnicują one bowiem w dojrzałe formy adipocytów (Farmer, 2006; Tontonoz, Hu, & Spiegelman, 1994) (Hegele, Cao, Frankowski, Mathews, & Leff, 2002). Komórki te dostarczają w ten sposób nową pulę, w których dochodzi do syntezy lub rozpadu trójglicerydów.

Zdolność magazynowania trójglicerydów w komórce jest zachowana w ewolucji i obserwuje się ją u roślin, drożdży oraz u zwierząt, zarówno bezkręgowych jak i kręgowych. Rośliny składują krople lipidowe w nasionach, korzeniu oraz w liściach (Denis J. Murphy, Hernández-Pinzón, & Patel, 2001). Ssaki natomiast we wspomnianych, dojrzałych adipocytach, w których rozmiar magazynu lipidowego (kropli lipidowej) może sięgać 200 μ m w pojedynczej komórce i zawierać oprócz trójglicerydów także estry steroli (D. J. Murphy, 2001). W warunkach osiągnięcia maksymalnej pojemności tkanki tłuszczowej lub w szeregu stanów patologicznych, cząstki lipidowe mogą gromadzić się również w komórkach innych tkanek: hepatocytach, kardiomiocytach, komórkach mięśni szkieletowych, trzustki, grasicy, w enterocytach oraz makrofagach (Hill, Metcalfe, & McTernan, 2009). Każdy z wymienionych

typów komórek jest w stanie magazynować duże ilości cząsteczek lipidowych. Jednak w odróżnieniu od adipocytów, charakteryzujących się pojedynczą, dużą kroplą lipidową, komórki pozostałych typów posiadają wiele mniejszych, równo rozmieszczonych kropel w cytoplazmie (Walther & Farese, 2009). Biosynteza trójglicerydów możliwa jest dzięki obecności enzymów siateczki śródplazmatycznej (ER), mitochondriów i pokrewnych organelli (Coleman & Lee, 2004; Stone et al., 2009). Postuluje się, że miejscem formowania się kropel lipidowych jest hydrofobowe środowisko dwuwarstwy siateczki śródplazmatycznej, jednak występuje wiele sprzecznych ze sobą teorii opisujących to zagadnienie (Walther & Farese, 2009). Ostatecznie, powstająca kropla lipidowa składa się z pojedynczej warstwy fosfolipidów, zamykającej w sobie zapas TAG i angażującej po stronie cytozolowej zespół białek, spełniających m.in. funkcję stabilizującą nowopowstałej kropli wewnątrz komórki (Blanchette-Mackie et al., 1995). W miarę zwiększania się magazynu lipidowego, białka te stają się niezbędne dla skutecznej ochrony przed degradacją przez lipazy obecne w cytoplazmie. Białek stabilizujących krople lipidowe jest wiele i należą do nich m.in. kaweolina oraz białka perilipin (Kimmel, Brasaemle, McAndrews-Hill, Sztalryd, & Londos, 2010). Obecnie wyróżnia się pięć różnych perilipin. Pierwsze trzy, czyli PLIN1, PLIN2 (białko ADRP) oraz PLIN3 (białko TIP47) wspólnie tworzą rodzinę białek PAT i są zachowane w ewolucji u wszystkich zwierząt (Bickel, Tansey, & Welte, 2009; Londos, Sztalryd, Tansey, & Kimmel, 2005; Miura et al., 2002). Pozostałe - PLIN4 (białko S3-12) oraz PLIN5 – występują dodatkowo u ssaków. W stabilizacji dużych kropel lipidowych (występujących w komórkach białej tkanki tłuszczowej) biorą udział białka PLIN1 oraz PLIN2, natomiast przy formowaniu się mniejszych kropel (charakterystycznych dla innych typów komórek) niezbędne są białka PLIN3 oraz PLIN4 (Wolins et al., 2005).

1.1.1 Metaboliczna odpowiedź organizmu na restrykcję pokarmową

Zapotrzebowanie organizmu zwierzęcego na energię zaspokajane jest przede wszystkim na drodze trzech głównych, współdziałających procesów komórkowych: glikolizy (dostarczającej dwóch cząsteczek kwasu pirogronowego do syntezy cząsteczek acetylo-CoA oraz NADH), cyklu kwasów trójkarboksylowych (pozwalającego poprzez wykorzystanie acetylo-CoA uzyskać elektrony i protony uwięzione w nośnikach NADH i FADH₂) oraz łańcucha transportu elektronów (wykorzystującego przekaźniki elektronów do uzyskiwania cząsteczki ATP, będącej podstawowym wymiennikiem energii). Istnieje również proces

pozyskiwania energii związany z przekształceniem pirogronianu do mleczanu, odbywający się w warunkach deficytu tlenowego. Udział tego procesu dla dostarczania ogólnej puli ATP u zwierząt jest jednak niewielki i dotyczy tylko szczególnych sytuacji dla organizmu, takich jak intensywny wysiłek fizyczny, czy niektóre stany patologiczne.

Przyjmuje się, że nadrzędnym substratem energetycznym dla organizmu jest cukier prosty - glukoza. Substrat ten zapoczątkowuje proces glikolizy i tym samym powstawanie ATP na późniejszych etapach. W sytuacji, w której stężenie glukozy we krwi spada poniżej wartości krytycznej, następuje zmiana w wykorzystaniu dostępnych substratów. Organizm zaczyna uruchamiać zapasy lipidowe, zgromadzone w białej tkance tłuszczowej oraz wątrobie i w procesie β -oksydacji kwasów tłuszczowych dostarczać cząsteczek ATP, poprzez włączanie tych kwasów do cyklu Krebsa. Całkowita β -oksydacja jednej cząsteczki kwasu palmitynowego ($C_{15}H_{31}COOH$) dostarcza 8 jednostek dwuwęglowych, które ostatecznie po utlenieniu pozwalają uzyskać 129 cząsteczek ATP. Kataboliczne reakcje glukozy dostarczają natomiast 38 cząsteczek ATP, czyli ponad 3 razy mniej niż w przypadku utleniania kwasów tłuszczowych. Można się zastanawiać zatem, dlaczego to węglowodany są wiodącym substratem energetycznym. Wskazówek dostarcza szereg obserwacji. Glukoza jest jednym z monosacharydów, powstających z formaldehydu w reakcji formozowej, w warunkach, które zbliżone były do tych, panujących na Ziemi zanim powstało życie (Aleksandr Butlerov, 1861). Możliwe jest zatem, że pierwotne organizmy, spośród łatwo dostępnych surowców, wybrały glukozę jako paliwo energetyczne, zaś cecha ta utrwaliła się w drodze ewolucji do dnia dzisiejszego. Glukoza odznacza się również słabą tendencją do nieenzymatycznego przyłączania białek. W formie otwartej, tak jak inne monosacharydy, może wiązać białka poprzez ich grupy aminowe, tworząc zasady Schiffa. Jednak tak niespecyficznie zmodyfikowane białka często nie funkcjonują efektywnie (Yamamoto & Kawasaki, 2010). Ponadto glukoza ma znacznie większą tendencję do występowania w formie pierścieniowej, co z kolei uniemożliwia jej łączenie się z białkami. Istotny jest również fakt, iż glukoza to jedyny przyswajalny substrat energetyczny dla czerwonych krwinek ("Glucose Metabolism in the Red Blood Cell," 1960), oraz dla mózgu w warunkach optymalnych, w których organizm nie jest poddany restrykcji pokarmowej (Mergenthaler, Lindauer, Dienel, & Meisel, 2013). Zaadaptowanie glukozy jako uniwersalnego paliwa energetycznego dla każdego typu komórek przez organizmy zwierząt wydaje się być zatem uzasadnione.

W warunkach *ad libitum* glukoza w największych ilościach dostarczana jest do wnętrza komórki i wykorzystywana w procesach energetycznych w mięśniach. Transport glukozy do komórki mięśniowej jest możliwy dzięki translokacji przenośnika GLUT4 do błony

komórkowej (DeFronzo RA, 1981). Translokacja zachodzi ostatecznie dzięki aktywacji substratu Akt o masie cząsteczkowej 160 kDa (AS160) przez kinazę Akt. Równocześnie zachodzi aktywacja kinazy syntazy glikogenu (GSK) zaangażowanej w regulację glikogenu (Kramer HF, 2006). Ogólny pobór glukozy w trakcie restrykcji pokarmowej maleje znacząco, co zostało potwierdzone przez liczne badania z wykorzystaniem testu tolerancji insuliny ITT (z ang. *insulin tolerance test*) (Cahill GF Jr, 1966; Norton L, 2007), OGTT (Anderson JW, 1972; Fery F, 1999; Horton TJ, 2001) oraz technikę klamry metabolicznej (Bergman BC, 2007; S. H. Soeters MR, Dubbelhuis PF, Groener JE, Ackermans MT, Fliers E, Aerts JM, Serlie MJ., 2008; van der Crabben SN, 2008; Vendelbo MH, 2012). Badania te pokazują spadek poboru glukozy w stosunku do warunków *ad libitum*, sięgający ok. 40%. Spadek ten wymaga ok. 48 godzin regularnego odżywiania aby przywrócić pobór glukozy do poziomu sprzed restrykcji. Informacje na temat GLUT4 są jednak niejednoznaczne. Według jednego z doniesień, transporter ten ulega zmniejszonej ekspresji zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka po 48 godzinach głodzenia, by wzrosnąć ponownie po 24 godzinach w warunkach *ad libitum* (Norton L, 2007), jednak informacja ta nie została potwierdzona w innych badaniach. (Pilegaard H, 2003); (Vendelbo MH, 2012).

Przejście od metabolizmu opartego na węglowodanach do metabolizmu opartego na kwasach tłuszczowych, poprzedzone jest lipolizą trójglicerydów. W tkance tłuszczowej znajdują się trzy lipazy uczestniczące w hydrolizie kwasów tłuszczowych - lipaza trójglicerolowa (ATGL), lipaza monoacyloglicerolowa (MAGL) oraz lipaza hormonowrażliwa (HSL), hydrolizująca diacyloglicerole. HSL może być aktywowana (fosforylowana) przez kinazy białkowe, które przekierowują ją w okolice skupisk lipidów. Równolegle zachodzi fosforylacja białka pirilipiny (PLIN), która odsłaniając powierzchnię lipidu, ułatwia dostęp do niego lipazie hormonowrażliwej (Lafontan & Langin, 2009). U ludzi procesy lipolityczne nasilają się szczególnie po kilkunastu godzinach od wprowadzenia restrykcji pokarmowej, zaś zawartość kwasów tłuszczowych we krwi rośnie dwu-, trzykrotnie po 3 dniach restrykcji (Klein, Sakurai, Romijn, & Carroll, 1993). Zapasy lipidowe zgromadzone w tkance tłuszczowej w dużym stopniu określają maksymalny, możliwy czas trwania głodówki - większy zapas triacylogliceroli pozwala dłużej przetrwać bez dostępu do pożywienia (Drenick, Swendseid, Bland, & Tuttle, 1964; Stewart & Fleming, 1973).

Insulina jako hormon zaangażowany w regulację metabolizmu lipidów

Procesy lipolityczne są regulowane hormonalnie. Najważniejszym hormonem zaangażowanym w te procesy jest insulina. Obecnie wiadomo, że insulina działa

antylipolitycznie przez wiązanie się do receptora insulinowego i aktywowania ścieżki $PI3K \rightarrow Akt \rightarrow PDE3B$. Fosfodiesteraza-3B katalizując reakcję degradacji cyklicznego AMP (cAMP) odpowiedzialnego za aktywację kinazy A (PKA) obniża jej aktywność i w następstwie aktywność lipazy hormonowrażliwej i perilipiny (Lafontan & Langin, 2009). Uważa się również, że działanie insuliny wpływa dodatkowo na aktywność lipazy ATGL poprzez aktywację mTORC1 i następnie czynnika Egr1, hamującego ATGL. Aktywacja kinazy mTORC1 odbywa się przez kompleks PI3K/Akt (Chakrabarti et al., 2013).

Zwiększone tempo lipolizy jest nie tylko wynikiem spadku zawartości insuliny podczas restrykcji pokarmowej, ale także wynikiem wzrastającej insulinooporności komórek. Testy tolerancji insuliny (ITT) pokazują, że stosując określone i stałe stężenie tego hormonu, wraz z wydłużaniem czasu przegłodzenia organizmu, trudniej jest przywrócić stężenie kwasów tłuszczowych we krwi do ich poziomu sprzed restrykcji (Johnson et al., 2006). Podobne wyniki otrzymuje się z zastosowaniem testów tolerancji glukozy (OGTT, z ang. *oral glucose tolerance test*). Ilość tego cukru prostego, niezbędnego do obniżenia ilości kwasów tłuszczowych we krwi w trakcie krótszej restrykcji pokarmowej, rośnie wraz z wydłużaniem czasu jej trwania (Göschke, 1977). Stymulacja produkcji insuliny poprzez przyjmowanie posiłku, tuż po zakończeniu restrykcji pokarmowej, nie normalizuje stężenia kwasów tłuszczowych odpowiednio szybko do poziomu obserwowanego w warunkach sprzed głodówki (Horton & Hill, 2001). Obserwacje te dowodzą, że proces lipolizy nie jest zahamowany natychmiast po zakończeniu restrykcji pokarmowej. Potrzeba czasu, aby organizm wrócił do stanu, w którym poszczególne metabolity energetyczne osiągają swój poziom wyjściowy.

Badania nad insulinoopornością wyłoniły kwasy tłuszczowe i ich pochodne jako główne czynniki obniżające przekąźnictwo w szlaku insulinowym (Holland WL, 2007; Samuel VT, 2012; van Herpen NA, 2008). Wiadomo również, że triacyloglicerole, których rozpad przyczynia do zwiększenia poziomu kwasów tłuszczowych, są gromadzone w dużych ilościach w tkankach odpowiadających na insulinę (np. mięśnie, tkanka tłuszczowa, wątroba).

Obecnie, aby zakwalifikować dany związek jako czynnik powodujący insulinooporność, musi on spełnić kilka warunków. Po pierwsze ilość tego czynnika musi być podwyższona we krwi osób otyłych (otyłość jest ściśle związana z występowaniem insulinooporności). Po drugie zwiększenie stężenia czynnika powinno nasilać insulinooporność. Po trzecie zmniejszenie stężenia czynnika powinno dawać odwrotny efekt. Jak dotąd tylko kwasy tłuszczowe spełniają wszystkie te kryteria, zaś ich negatywny wpływ na szlak insulinowy określany jest mianem lipotoksyczności (Boden, 2008).

Metabolizm kwasów tłuszczowych podczas restrykcji pokarmowej

WzmóŜona lipoliza w białej tkance tłuszczowej w trakcie głodówki dostarcza tak duŜych ilości kwasów tłuszczowych, Ŝe organizm nie nadąŜa nad włączaniem ich w reakcję β -oksydacji (Carlson, Snead, & Campbell, 1994; Elia, Zed, Neale, & Livesey, 1987; Wolfe et al., 1987). Ogromna podaż FFA prowadzi w znacznym stopniu do reestryfikacji trójglicerydów, czyli ich ponownego formowania się z glicerolu i kwasów tłuszczowych. Proces reestryfikacji zachodzi głównie w tkance tłuszczowej, natomiast ma ono miejsce również w mięśniach oraz w mniejszym stopniu w wątrobie (Jensen, Ekberg, & Landau, 2001; Johnson et al., 2006; Landau, Wahren, Previs, et al., 1996; Wolfe et al., 1987). Wzrastający poziom trójglicerydów nie jest efektem lipogenezy *de novo*, w trakcie której dochodzi do powstawania „świeŜych” kwasów tłuszczowych poprzez wydłużanie ich łańcucha węglowego. W trakcie restrykcji pokarmowej, na skutek zmniejszającego się wydzielania insuliny, następuje bowiem zahamowanie lipogenezy. Ponadto niektóre czynniki transkrypcyjne, jak na przykład SREBP-1c, stymulujący lipogenezę, ulegają zmniejszeniu ekspresji, co tylko potwierdza dominującą rolę reestryfikacji w formowaniu się TG (Tsintzas et al., 2006). Należy teŜ pamiętać, Ŝe proces reestryfikacji trójglicerydów jest kosztowny energetycznie. Wykorzystanie nadwŜyŜki kwasów tłuszczowych oraz energii w formie ATP napędza proces lipolizy oraz β -oksydacji, tworząc cykl przemian trójglicerydów, który jest wyraźnie nasilony w trakcie restrykcji pokarmowej (Elia et al., 1987).

Wolne kwasy tłuszczowe mogą poddawać się teŜ innym przemianom metabolicznym w trakcie głodówki. Reabsorbcja FFA przez mięśnie moŜe prowadzi do formowania się ceramidów (M. R. Soeters et al., 2008), część z kwasów przyłącza reszty karnitynowe, tworząc krótkie acylokarnityny (np. acetylokarnitynę, ketokarnitynę) (M. Soeters et al., 2011; M. R. Soeters et al., 2009). W wątrobie zachodzi proces utleniania kwasów tłuszczowych, efektem którego moŜe być powstawanie ciał ketonowych, które słuŜą jako alternatywne Ŝródło energii dla wybranych tkanek (Fukao, Lopaschuk, & Mitchell, 2004).

Glukoneogeneza podczas restrykcji pokarmowej

Wykorzystanie kwasów tłuszczowych jako wiodącego substratu energetycznego nie oznacza całkowitego wyłączenia węglowodanów z procesów utleniania komórkowego czyli uzyskiwania energii. ZaangaŜowanie glukozy w wytwarzanie cząsteczek ATP zachodzi dalej, ale na duŜo niŜszym poziomie. Jest to moŜliwe dzięki produkcji glukozy, będącej następstwem zmian w gospodarce hormonalnej, jakie zachodzą podczas restrykcji pokarmowej (Hojlund et al., 2001). Spadkowi wydzielania insuliny towarzyszy wzrost wydzielania glukagonu przez

komórki α w trzustce. Hormon ten łącząc się ze swoim receptorem zwiększa stężenie wewnątrzkomórkowego cAMPa, uruchamiając procesy glikogenolizy oraz glukoneogenezy (GNG), które wspólnie określają endogenną produkcję glukozy (EGP) (Hojlund et al., 2001; G. Jiang & Zhang, 2003). Produkcja ta zachodzi przede wszystkim w wątrobie. Nie może ona jednak trwać nieustannie i obserwuje się jej spadek sięgający ok 30% po okresie 60-godzinnego głodzenia (M. R. Soeters et al., 2007). Przyczyną malejącego EGP jest zmniejszenie udziału glikogenolizy w tym procesie. Spadek glikogenu w wątrobie jest najbardziej widoczny podczas pierwszych 24 godzin głodzenia, po których zawartość tego materiału zapasowego wynosi ok. 15% ilości początkowej (Nilsson & Hultman, 1973). Z biegiem czasu spadek ten jest mniej widoczny. Ustalono, że wątroba traci mniej więcej 40% swojej początkowej objętości, na skutek ubytku glikogenu oraz cząsteczek wody, niezbędnych w reakcji hydrolizy. W miarę jak udział glikogenolizy na ogólną produkcję glukozy w trakcie restrykcji pokarmowej maleje, udział glukoneogenezy rośnie. Wzrost może wynieść ok. 70% po 22 godzinach od zapoczątkowania restrykcji pokarmowej i osiągnąć wartość 90% po 42 godzinach (Landau, Wahren, Chandramouli, et al., 1996). Warto też wspomnieć, że miejscem, w którym zachodzi glukoneogeneza jest nie tylko wątroba, ale również nerki, gdzie proces ten przyczynia się do produkcji 20-25% całkowitej glukozy (Ekberg et al., 1999).

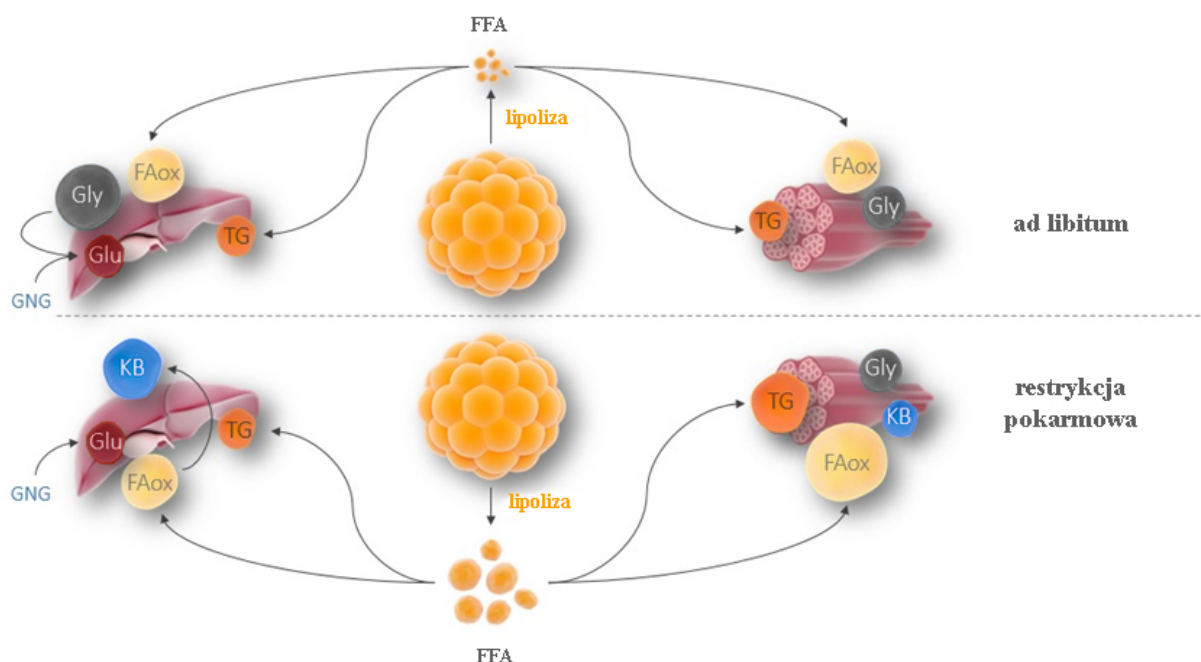
Pirogronian, mleczan oraz niektóre aminokwasy takie jak alanina czy glutamina to fundamentalne jednostki dla glukoneogenezy (Cahill, 1970; Felig, Owen, Wahren, & Cahill, 1969; Hankard, Haymond, & Darmaun, 1997). Również część glicerolu powstającego w warunkach przegłodzenia jest włączana do tego procesu (M. D. Jensen et al., 2001). Badania pokazują, że po 60 godzinach głodzenia, zamiana glicerolu w glukozę dostarcza 15% całkowitej ilości tego substratu podczas EGP (Landau, Wahren, Previs, et al., 1996).

Ciała ketonowe – alternatywne źródło energii dla mózgu

Ośrodkowy układ nerwowy korzysta głównie z glukozy jako substratu energetycznego w warunkach normalnych. Natomiast jako alternatywne źródło energii służą mu także ciała ketonowe (KB) (Owen OE, 1967). Podczas długookresowego przegłodzenia ostateczne wykorzystanie glukozy w cyklu Krebsa i łańcuchu oddechowym szacuje się na ok. 24 g/dobę, czyli znacznie mniej niż w warunkach *ad libitum*, w których szacunkowa wartość to ok. 80 g/dobę (Owen OE, 1967). Utlenianie glukozy spada zauważalnie podczas pierwszych 24 godzinach głodzenia, przy jednoczesnym wzroście lipolizy i oksydacji kwasów tłuszczowych (Klein S, 1993; Romijn JA, 1990).

Ciała ketonowe, jako drugie paliwo dla ośrodkowego układu nerwowego, są wynikiem utleniania kwasów tłuszczowych, zaś znaczenie ketogenezy rośnie w miarę jak maleją zapasy glikogenu w wątrobie (Cahill GF Jr, 1966; Fukao T, 2004; Jr., 1976). Do ciał ketonowych należą kwas beta-hydroksymasłowy (ok. 80% wszystkich KB), kwas acetylooctowy (ok. 20% wszystkich KB) oraz aceton (mniej niż 2% wszystkich KB). Powstawanie KB jest uzależnione od dostępności FFA (tym samym od procesu lipolizy zachodzący w tkance tłuszczowej), od wejścia FFA do wątrobowego mitochondrium, w którym proces ketogenezy zachodzi oraz od aktywności enzymu – syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA), który odpowiedzialny jest za początkowy i nieodwracalny krok w formowaniu ciał ketonowych (Fukao T, 2004). Obecność glukozy, jak i stosunek insuliny do glukagonu wydaje się mieć tutaj istotne znaczenie. Sam glukagon zwiększa ekspresję HMG-CoA, co nasila powstawanie KB. Insulina zaś wywołuje efekt odwrotny. Poprzez defosforylację fosfodiesterazy-3B hamuje lipolizę w tkance tłuszczowej i tym samym zmniejsza dostępność kwasów tłuszczowych do syntezy KB (Lafontan M, 2009). W wątrobie insulina zwiększa wychwyt glukozy, podnosząc poziom obecnego tam malonylo-CoA i hamując utlenianie FA (Fukao T, 2004).

Ciała ketonowe to nie tylko alternatywne paliwo energetyczne. Ich obecność wpływa także na inne procesy biologiczne. Występując w dużych ilościach (podobnie jak nadmiar kwasów tłuszczowych) i podlegając rozpadowi przyczyniają się do powstawania dodatkowych ilości acetylo-CoA, który hamuje utlenianie glukozy, przez działanie na dehydrogenazę pirogronianową (Sugden MC, 2006). Podwyższona ilość KB zmniejsza również wchłanianie glukozy podczas stymulacji insuliną, co może wskazywać na rozregulowanie szlaku insulinowego przez ciała ketonowe lub niższe produkty ketolizy (Webber J, 1994). Wytwarzane w wątrobie KB przedostają się w dużych ilościach do mięśni, gdzie mogą być utleniane i magazynowane w postaci estrów karnitynowych. Tak zwane „ketokarnityny” wytwarzane są dzięki syntazie acylo-CoA oraz transferazom acylokarnitynowym i ich stężenie („ketokarnityn”) silnie koreluje z całkowitą produkcją KB przez organizm (Hack A, 2006; S. M. Soeters MR, Sauerwein HP, Duran M, Ruiter JP, Kulik W, Ackermans MT, Minkler PE, Hoppel CL, Wanders RJ, Houten SM., 2012). Ketokarnityny są wskazywane jako jedne z możliwych czynników wywołujących insulinooporność (An J, 2004). Podobnie jak w przypadku acylokarnityny, ich stężenie wzrasta w trakcie głodzenia i może osiągnąć stężenie ok. 30-krotnie większe po 62 godzinach braku posiłku. Aczkolwiek zmianie tej nie towarzyszą zaburzenia w poborze glukozy, przy jednoczesnym podawaniu insuliny (S. M. Soeters MR, Sauerwein HP, Duran M, Ruiter JP, Kulik W, Ackermans MT, Minkler PE, Hoppel CL, Wanders RJ, Houten SM., 2012).



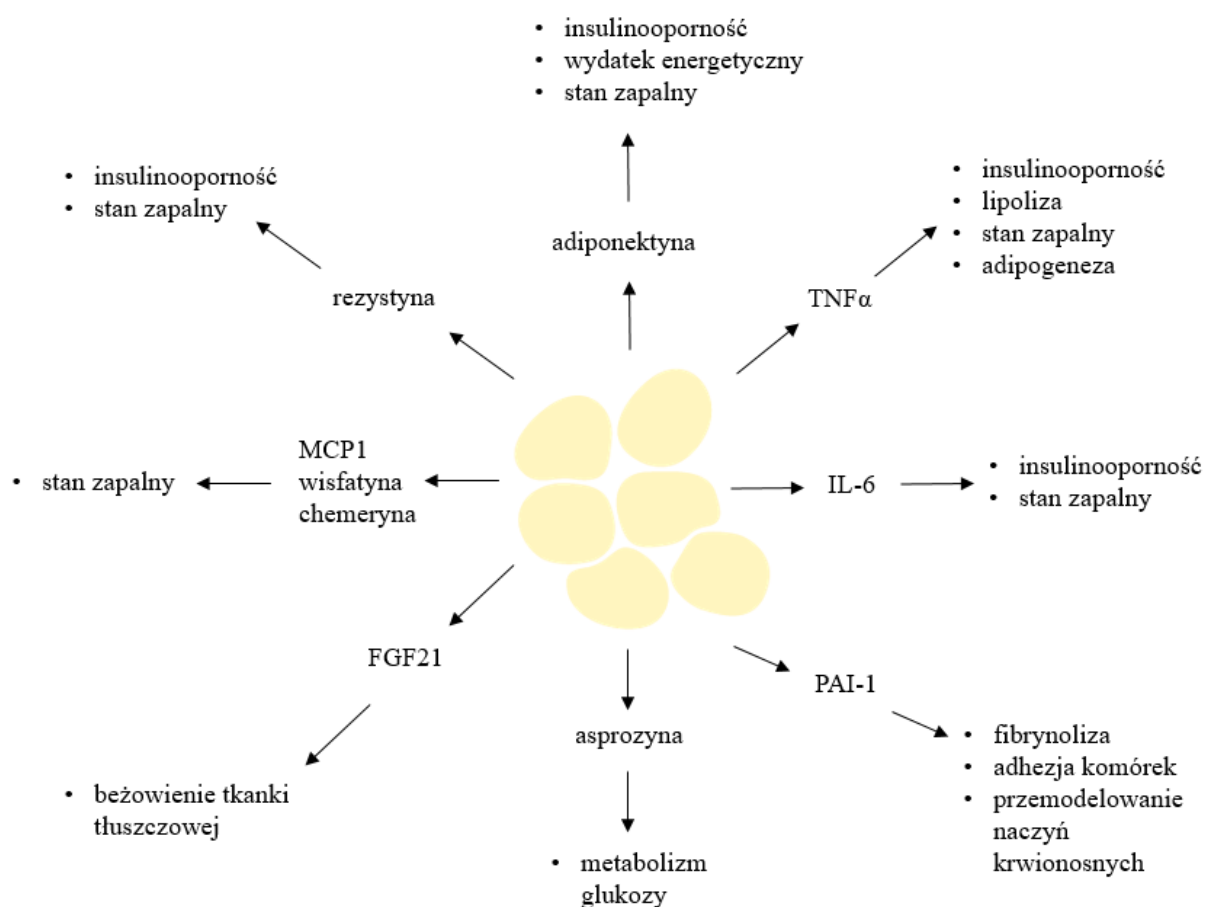
Rycina 1. Uproszczony schemat przedstawiający porównanie gospodarowania substratami energetycznymi w stanie wolnego dostępu do pożywienia (*ad libitum*) i w warunkach restrykcji pokarmowej; FFA – wolne kwasy tłuszczowe, FAox – utlenione kwasy tłuszczowe, TG – trójglicerydy, Glu – glukoza, Gly – glikogen, KB – ciała ketonowe

1.1.2 Sekrecyjna rola białej tkanki tłuszczowej

Przez długi czas panował pogląd na temat pasywnej roli białej tkanki tłuszczowej (WAT), związanej z omówionym zagadnieniem gromadzenia zapasu trójglicerydów w adipocytach. Dopiero w roku 1994 nastąpiła zmiana w postrzeganiu funkcjonowania WAT za sprawą odkrycia leptyny, jako hormonu produkowanego i wydzielanego przez komórki tej tkanki (Friedman, 1997; Yiyang Zhang et al., 1994). Kolejne lata w połączeniu z odkrywaniem kolejnych, nowych, czynnych biologicznie cząsteczek wydzielanych przez WAT ugruntowały również aktywną, endokrynną rolę białej tkanki tłuszczowej, wedle której oddziałuje ona na komórki innych tkanek w organizmie (Trayhurn & Beattie, 2001).

Cząsteczki aktywne biologicznie, wydzielane przez WAT nazywane są adipokinami. Do chwili obecnej odkryto kilkaset takich cząsteczek (Fasshauer & Blüher, 2015). Mają one wpływ na wiele procesów komórkowych (ryc. 2) i poza najlepiej poznaną leptyną zalicza się do nich m.in.: adiponektynę (Scherer, Williams, Fogliano, Baldini, & Lodish, 1995), czynniki prozapalne TNF α (ang. *tumor necrosis factor α*), TGF β (ang. *tumor growth factor β*),

interleukinę 6 (Coppack, 2001) oraz MCP1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) (Weisberg et al., 2003), czynnik FGF21 (ang. *fibroblast growth factor 21*) (Fisher et al., 2012), PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor 1*) (Lundgren, Brown, Nordt, Sobel, & Fujii, 1996), chemerynę (Goralski et al., 2007), wisfatynę (Hug & Lodish, 2005), rezystynę (Steppan et al., 2001), asprozynę (Romere et al., 2016), angiotensynogen (Safonova, Aubert, Negrel, & Ailhaud, 1997), białko ASP (ang. *acylation-stimulating protein*) (Cianflone, Maslowska, & Sniderman, 1999), a także czynnik FIAF (ang. *fasting-induced adipose factor*) (Kersten et al., 2000)



Rycina 2. Schemat przedstawiający wpływ wybranych adipokin na procesy komórkowe w organizmie (bez uwzględnienia leptyny).

Leptyna jako hormon kluczowy w homeostazie energetycznej

Leptyna została odkryta w 1994 roku przez Jeffreya Friedmana i opisana przez niego jako hormon odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy energetycznej (Friedman, 1997; Yiyang Zhang et al., 1994). Gen leptyny *ob(Lep)* znajduje się na chromosomie 7 u ludzi, zaś u

mysz na chromosomie 6. Zmiany w sekwencji tego genu doprowadzają do powstawania nieaktywnej formy tego hormonu, skutkującej występowaniem otyłości (np. mysie modele otyłości ob/ob) (Drel et al., 2006).

Mimo, że komórkami produkującymi i wydzielającymi leptynę są przede wszystkim dojrzałe adipocyty, hormon ten może powstawać także w innych narządach, ale w znacznie mniejszych ilościach (Kochan Z., 2004). Synteza leptyny i wzrost jej stężenia we krwi są dodatnio skorelowane z masą zgromadzonej tkanki tłuszczowej (Y. Zhang, Guo, Diaz, Heo, & Leibel, 2002). Osoby otyłe mają stale podwyższony poziom tego hormonu, który może być obniżony poprzez zmniejszenie wagi (Friedman, 1997).

Leptyna działa za pośrednictwem receptorów LEPR i obecnie znanych jest 5 izoform tego receptora – oznaczanych LEPRa-e. Ostatni z nich (LEPR_e) jest jedynym, pozbawionym sekwencji kotwiczącej w błonie komórkowej i dzięki temu występuje w formie niezwiązanej (Fei et al., 1997). Z całej grupy najistotniejszą izoformą, poprzez którą leptyna wywołuje działanie biologiczne jest długa postać receptora LEPR_b (L. Jiang, Li, & Rui, 2008). Mutacja właśnie w tym receptorze pozwala uzyskać jego nieaktywną formę, co skutkuje brakiem odpowiedzi na leptynę i rozwijaniem otyłości (np. mysie modele otyłości db/db) (Chen et al., 1996; Cohen et al., 2001).

Analiza rozmieszczenia receptorów leptynowych w organizmie pozwala stwierdzić na jakie tkanki hormon ten wywiera wpływ. Uważa się, że najistotniejszym celem leptyny jest podwzgórze, uznawane za ośrodek głodu i sytości, integrujący sygnały obwodowe informujące o statusie energetycznym organizmu (Fei et al., 1997; X. F. Huang, Koutcherov, Lin, Wang, & Storlien, 1996; J. G. Mercer et al., 1996). Neurony tworzące podwzgórze są zróżnicowane pod względem wytwarzanych neuropeptydów i neurotransmiterów. Jedną grupę stanowią neurony oreksygeniczne, stymulujące poczucie głodu. Stymulacja głodu możliwa jest m.in. dzięki ekspresji neuropeptydu Y (NPY) oraz peptydu agouti (AgRP) (Beck et al., 1990; Broberger, Johansen, Johansson, Schalling, & Hökfelt, 1998). Inną grupę neuronów podwzgórza tworzą neurony anoreksygeniczne, hamujące poczucie głodu. Hamowanie jest możliwe z kolei dzięki ekspresji proopiomelanokortyny (POMC) oraz kortykoliberyny (CRH) (A. J. Mercer, Hentges, Meshul, & Low, 2013; Richard & Baraboi, 2004). Każda z cząsteczek obydwu grup neuronów wykazuje swoiste działanie i przekazuje sygnał dalej (także do innych struktur mózgowych). W zależności od właściwości fizykochemicznych tych cząsteczek oraz sposobu transdukcji sygnału, informacja może być przekazywana szybko lub wolno. Wypadkowa działania sygnału oreksy- oraz anoreksygennego informuje czy organizm ma do czynienia z dodatnim bądź

ujemnym bilansem energetycznym i czy powinien zacząć przyjmować kalorie czy je wydatkować (Schneeberger, Gomis, & Claret, 2014).

Leptyna jest cząsteczką, będącą jednym z sygnałów obwodowych. Trafiając do podwzgórza przyłącza się do receptora błonowego w neuronach tej struktury, i prowadzi do zahamowania ekspresji białek oreksygennych oraz indukcji ekspresji białek anoreksygennych. Ostatecznie więc hamuje poczucie łaknienia i ogranicza przyjmowanie dodatkowych kalorii (Coppari et al., 2005; Donato, Cravo, Frazão, & Elias, 2011). Hormon ten powoduje także zwiększenie wydatku energetycznego, m.in. przez nasilenie motywacji i aktywności lokomotorycznej. Może to być związane z bezpośrednim działaniem na ośrodki lokomotoryczne w mózgu, lub pośrednim (np. przez informację biegnącą od podwzgórza do ośrodków ruchu) (Coppari et al., 2005; Fernandes et al., 2015; Sakkou et al., 2007).

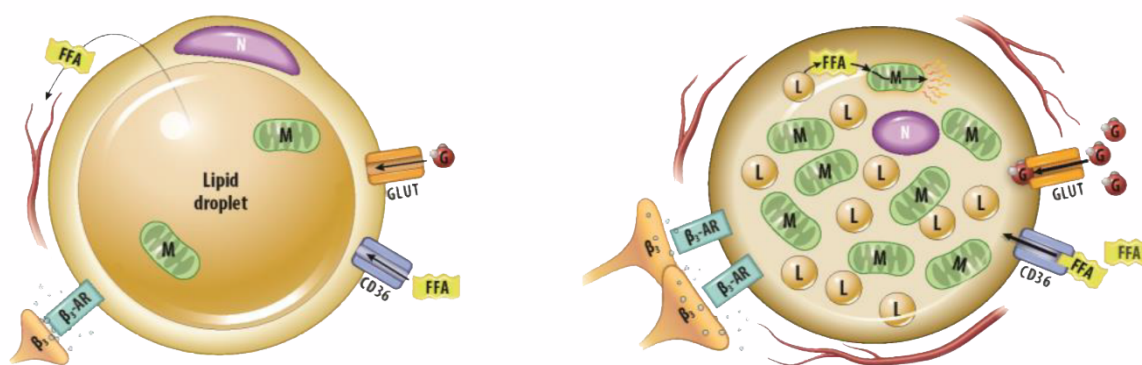
Obwodowo leptyna pełni funkcję antylipogeniczną i lipolityczną, działając na ekspresję genów zaangażowanych w te procesy. Możliwe jest, że z pomocą włókien układu współczulnego hormon ten przesyła informację z podwzgórza do tkanki tłuszczowej i wywołuje represję genów kodujących czynniki transkrypcyjne SREBP-1 oraz PPAR γ (Buettner et al., 2008). Oba te czynniki wykazują działanie lipogenne, angażując w proces biosyntezy kwasów tłuszczowych m.in. syntazę kwasów tłuszczowych (FAS) oraz karboksylazę acetylo-CoA (ACC) (Park et al., 2006). Działanie lipolityczne hormonu leptyny jest z kolei związane z aktywacją lipazy zależnej od hormonów (HSL), której zadaniem jest uwalnianie kwasów tłuszczowych, na skutek hydrolizy diacylogliceroli (Buettner et al., 2008). Indukowanie lipolizy może być skutkiem bezpośredniego, auto- lub parakrynnego działania leptyny na adipocyty (Frühbeck, Aguado, & Martínez, 1997).

Zjawisko insulinooporności jest powszechnie znane i obserwowane w tkankach, w których wzrost stężenia insuliny nie wykazuje spodziewanego efektu spadku stężenia glukozy we krwi. W przypadku hormonu leptyny mówi się o podobnym zjawisku i jest ono również charakterystyczne dla osób otyłych. Terapie z zastosowaniem leptyny wśród tych osób, które już wyjściowo odznaczają się wysokim stężeniem prawidłowo funkcjonującego hormonu, nie przynoszą rezultatów w regulowaniu homeostazy energetycznej. Leptynooporność jest więc zjawiskiem ogólnie akceptowanym w środowisku naukowym, natomiast w dalszym ciągu nie wyjaśnionym na poziomie molekularnym. Jedną z teorii tłumaczy brak efektu działania leptyny stopniem maksymalnego wysycenia receptorów leptynowych, powyżej którego coraz większe dawki hormonu nie dają już zauważalnych rezultatów (Gruzdeva, Borodkina, Uchasova, Dyleva, & Barbarash, 2019).

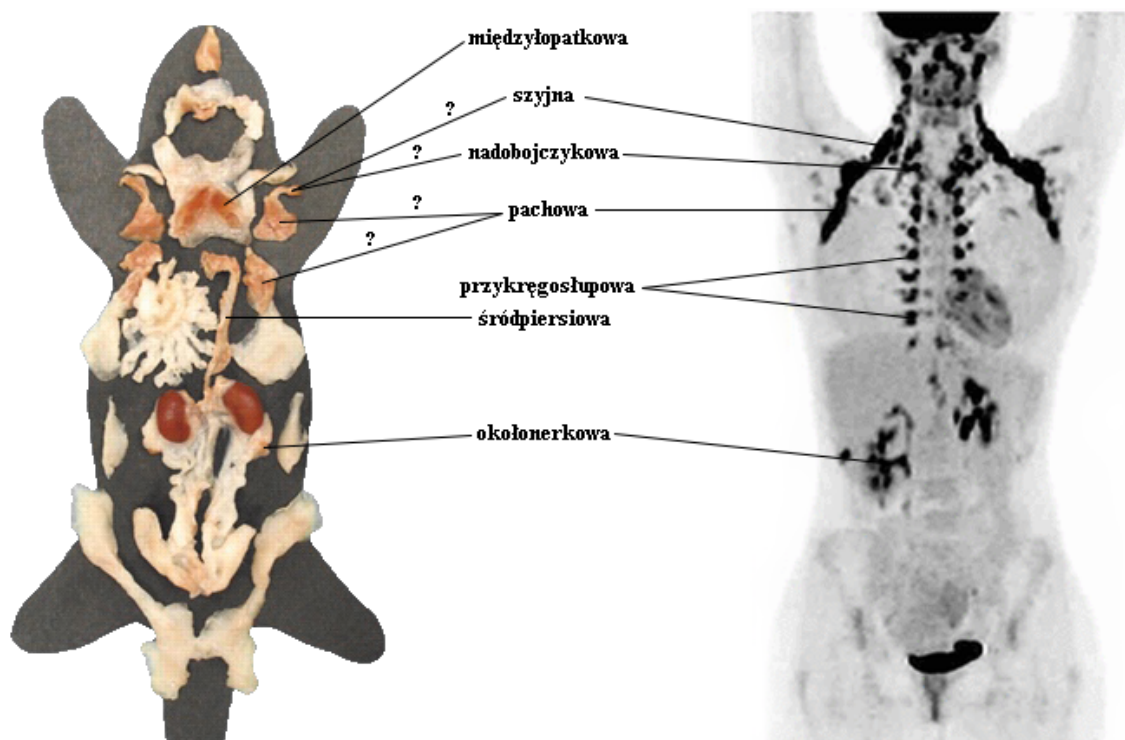
1.2 Brązowa tkanka tłuszczowa (z ang. *Brown Adipose Tissue*, BAT)

Organizm moduluje procesy metaboliczne nie tylko w celu optymalnego wykorzystania substratów do produkcji energii w postaci ATP, ale również energii cieplnej (Donhoffer, SÁRdy, & SzegvÁRi, 1964; Sheldon, 1924). Do tego celu także wykorzystuje lipidy tkanki tłuszczowej jako paliwo energetyczne (Townsend & Tseng, 2014).

Brązowa tkanka tłuszczowa jest drugim rodzajem tkanki tłuszczowej, którego podstawową funkcją jest generowanie ciepła. Morfologicznie brązowa tkanka tłuszczowa różni się od białej tkanki tłuszczowej pod kilkoma względami. W przeciwieństwie do posiadania jednego, dużego skupiska lipidów, spychającego na peryferia komórki pozostałe jej elementy, BAT charakteryzuje się komórkami z wieloma mniejszymi skupiskami lipidów i centralnie rozmieszczonym jądrem komórkowym. BAT zawiera liczne mitochondria w komórce, wypełniające większość cytoplazmy, a ich liczba porównywalna jest z ilością mitochondriów w kardiomiocytach. Charakterystyczne, ciemnobrązowe zabarwienie tkanki jest wynikiem występowania w niej znaczących ilości jonów żelaza, będących kofaktorem dla cytochromów obecnych w mitochondriach oraz silną waskularyzacją tkanki (Cinti, 2005; Frankl, Sherwood, Clegg, Scherer, & Öz, 2019).



Rycina 3. Porównanie komórek białej tkanki tłuszczowej (z lewej) oraz brązowej tkanki tłuszczowej (z prawej); komórki brązowej tkanki, w przeciwieństwie do komórek białej tkanki, charakteryzują się licznymi, małym kroplami lipidowymi równomiernie rozmieszczonymi wewnątrz komórki, licznymi mitochondriami oraz silną podatnością na stymulację receptora beta-adrenergicznego (Frankl et al, 2019); brązowa tkanka tłuszczowa wyróżnia się silną waskularyzacją ; G – glukoza, FFA – wolne kwasy tłuszczowe, L – lipidy, M – mitochondrium, GLUT – transporter glukozy, CD36 – translokaza kwasów tłuszczowych, β -AR – receptor beta-adrenergiczny



Rycina 4. Lokalizacja brązowej tkanki tłuszczowej w ciele myszy (na podstawie Thien Toan Tran, C. Ronald Kahn, 2010) i człowieka (Crandall et al, 2018); wizualizacja tkanki człowieka uzyskana z pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej z wykorzystaniem fluorodeoksyglukozy (FDG) jako kontrastu.

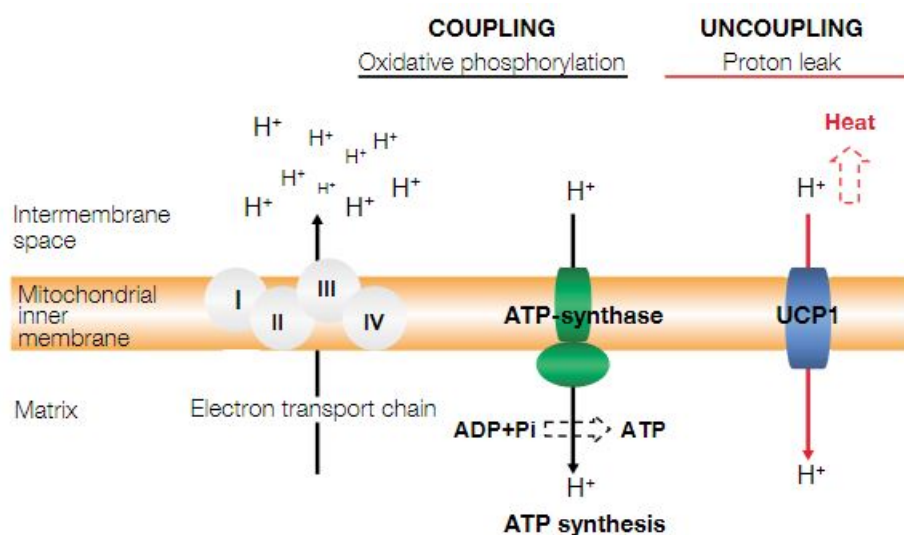
Większość ssaków posiada brązową tkankę tłuszczową (BAT). BAT jest charakterystyczny przede wszystkim dla zwierząt hibernujących oraz bardzo młodych. Wraz z wiekiem niektóre skupiska tkanki zanikają, co napędza przekonanie, że u dorosłych osobników (np. u ludzi) brązowa tkanka nie występuje w ogóle (Cinti, 2005; R. E. Smith & Hock, 1963). Badania histologiczne oraz pozytonowa tomografia emisyjna (PET) dostarczają jasnych dowodów na błędność tego przekonania. BAT występuje przez całe życie u ludzi, jej niewielkie skupiska rozmieszczone są w wielu miejscach w organizmie, zaś funkcjonowanie w dalszym ciągu podtrzymane i nasilone w sytuacjach, w których generowanie ciepła jest pożądane (Crandall et al., 2018; Tran & Kahn, 2010).

1.2.1 Termogeniny - białka rozprzegające

Wytwarzanie energii cieplnej przez brązową tkankę tłuszczową jest składową procesy termoregulacji, uruchamianego przez organizm w sytuacji, w której warunki otoczenia odbiegają od warunków termoneutralnych. Termoneutralność określa temperaturę w środowisku, przy której ogólny wydatek energetyczny w stanie spoczynku (z ang. *resting*

metabolic rate, RMR) jest najniższy (Cannon & Nedergaard, 2011). Termoregulacja z udziałem brązowej tkanki jest możliwa dzięki obecności białka termogeniny (z ang. *uncoupling protein 1*, UCP1) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Termogenina jest białkiem rozprzegającym, tzn. wykorzystuje elektrony w łańcuchu oddechowym oraz gradient protonów wodoru po obu stronach błony mitochondrialnej do przepływu tych protonów do wnętrza mitochondrium (Brondani et al., 2012). Transport protonów przez UCP1 najprawdopodobniej odbywa się z wykorzystaniem grup karboksylowych kwasów tłuszczowych zlokalizowanych w błonie, w bliskim sąsiedztwie termogeniny. Na proces ten składa się szereg reakcji egzoergicznych, zatem powoduje uwalnianie energii cieplnej (Klingenberg & Echay, 2001).

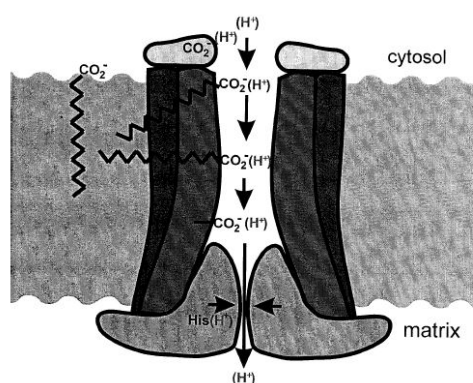
Oprócz UCP1 znane są obecnie jeszcze cztery formy tego białka - UCP2-5. UCP2 oraz UCP4-5 występują w mitochondriach komórek ośrodkowego układu nerwowego (Fleury et al., 1997; Mao et al., 1999; Sanchis et al., 1998), zaś UCP3 w komórkach mięśni szkieletowych oraz mięśnia sercowego (Boss et al., 1997). Udowodniono, że białka rozprzegające obecne w neuronach, poprzez zmniejszanie potencjału błonowego w mitochondriach, obniżają powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS – z ang. *reactive oxygen species*) (Diano et al., 2003; Sullivan, Dubé, Dorenbos, Steward, & Baram, 2003) oraz zmniejszają napływ jonów wapnia do wnętrza mitochondriów (Teshima, Akao, Jones Steven, & Marbán, 2003). UCP pełnią więc rolę neuroprotekcyjną, z uwagi na niekorzystny efekt działania ROS oraz nadmiar jonów Ca^{2+} (Stout, Raphael, Kanterewicz, Klann, & Reynolds, 1998).



Rycina 5. Schemat transportu elektronów na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i ich ostatecznej utylizacji na skutek sprzęgania, z wykorzystaniem syntazy-ATP (wytwarzania ATP) lub rozprzegania, z wykorzystaniem białka UCP1 (wytwarzania ciepła), (Brondani et al, 2012); coupling – sprzęganie, uncoupling – rozprzęganie, oxidative phosphorylation – fosforylacja oksydacyjna, proton leak – przepływ protonów, heat – ciepło, intermembrane space – przestrzeń międzybłonowa, mitochondrial inner membrane – wewnętrzna błona mitochondrialna, matrix – macierz mitochondrialna, ATP-synthase – syntaza ATP, ATP synthesis – synteza ATP, electron transport chain – transport elektronów w łańcuchu mitochondrialnym

Występowanie białek rozprzegających nie ogranicza się tylko do organizmów zwierzęcych. U roślin odpowiednikiem termogeniny jest białko PUMP (z ang. *plant uncoupling mitochondrial protein*) o bardzo zbliżonej budowie i funkcjonowaniu (Vercesi et al., 1995). Jednakże ze względu na znacznie mniejszą zawartość, ich głównym przeznaczeniem nie jest termogeneza sama w sobie (podobnie jak w przypadku zwierzęcych UCP2-5). Ich funkcja dalej związana jest ściśle z rozprzeganiem łańcucha mitochondrialnego. Elektrony nie mogą zostać wykorzystane do wytwarzania znacznych ilości reaktywnych form tlenu (Moller, 2001). Dodatkowo „wymiatanie” elektronów napędza regenerację ich przenośników i w ten sposób napędza cykl kwasów karboksylowych, w których te przenośniki są niezbędne, dostarczając związków pośredniczących cyklu TCA do reakcji anabolicznych (A. M. Smith, Ratcliffe, & Sweetlove, 2004).

Białka rozprzegające pochodzenia zarówno roślinnego jak i zwierzęcego regulowane są w komórce w podobny sposób. Indukcja transportu jonów wodorowych jest silnie zależna od obecności kwasów tłuszczowych, które uważa się za aktywatory białek rozprzegających. Obok aktywatorów, w mitochondrium znajdują się także inhibitory tych białek w postaci nukleotydów. UCP1 wykazuje duże powinowactwo do kwasów di- oraz trifosfonukleinowych zawierających w swojej strukturze zasady purynowe (GDP, GTP, ATP). Adenozynotrifosforan jako produkt syntazy ATP znajdującej się na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, może więc hamować reakcję rozprzegania w sytuacjach intensywnej produkcji ATP. Monofosfonukleotydy (GMP, AMP) również są w stanie wiązać się z UCP1, ale ich powinowactwo do białka jest 50-krotnie słabsze niż dwu- i trifosforanów (Klingenberg & Echtay, 2001).



Rycina 6. Proponowany mechanizm transportu protonów wodorowych z udziałem białka UCP1. Kationy wodorowe przenoszone są między sąsiadującymi grupami karboksylowymi kwasów tłuszczowych, wnikać do wnętrza kanału bezpośrednio z błony mitochondrialnej. Kanał, którą jony wodorowe wędrują w zaznaczonym kierunku może ulegać zwężeniu na skutek wiązania nukleotydu (Klingenberg and Echtay, 2000); cytosol – strona cytozolowa mitochondrium, matrix – macierz mitochondrialna

Działanie brązowej tkanki tłuszczowej utrzymane jest pod kontrolą układu współczulnego, zaś efektem jest noradrenalina (Florez-Duquet, Horwitz, & McDonald, 1998; Herron et al., 1990). Hormon ten działa poprzez receptory α - oraz β -adrenergiczne danej tkanki, natomiast dla funkcjonowania BAT istotna jest tylko ostatnia z tych grup receptorów (P. Lee, Swarbrick, & Ho, 2013). Termogeneza uruchamiana jest w wyniku aktywacji receptorów β przez noradrenalinę, uwalnianą w warunkach temperatury otoczenia poniżej warunków termoneutralnych (Klingenberg & Echtay, 2001). System β -adrenergiczny składa się z trzech klas receptorów: β_1 , β_2 i β_3 . Ich udział dla funkcjonowania brązowej tkanki został określony podczas intensywnych badań na mysich modelach, z których wnioskuje się, że obecność klasy β_1 oraz β_2 jest wystarczająca dla prawidłowego funkcjonowania BAT. Nokaut receptora tylko klasy β_3 nie powoduje dysfunkcji brązowej tkanki tłuszczowej (Bachman et al., 2002; Susulic et al., 1995). Natomiast klasa β_3 wykorzystywana jest szeroko w badaniach laboratoryjnych, w których aktywację osiąga się przez zastosowanie selektywnych agonistów tej konkretnej klasy receptorów. Należy pamiętać, że wykorzystanie noradrenaliny w badaniach (bądź umieszczenie zwierzęcia w niskiej temperaturze) skutkuje aktywacją receptorów zarówno α - oraz β -adrenergicznych, i uruchamianiem procesów związanych nie tylko z funkcjonowaniem BAT.

1.3 Rola cząsteczek mikroRNA w regulacji procesów biologicznych

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) należą do grupy niekodujących RNA, która zyskała na popularności w początku lat '90 XX w., kiedy opisanopierwsze mikroRNA *lin-4*, odkryte u *Caenorhabditis elegans*. Udowodniono, że cząsteczka *lin-4* jest regulatorem genu *lin-14*, niezbędnym dla rozwoju *C.elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993; Wightman, Ha, & Ruvkun, 1993). Odkrycie to zapoczątkowało serię poszukiwań nowych mikroRNA, wykazujących podobny mechanizm regulacji ekspresji genów. Badania te potwierdziły również, że RNA niekodujące żadnych białek często odgrywa rolę istotną dla funkcjonowania organizmu (Almeida, Reis, & Calin, 2011; R. Lee, Feinbaum, & Ambros, 2004).

MikroRNA są niewielkimi cząsteczkami RNA, najczęściej zawierającymi 21-22 nukleotydy (O'Brien, Hayder, Zayed, & Peng, 2018). Cząsteczki te są kluczowe na wczesnych etapach rozwoju organizmu, ale pełnią funkcję regulatorową także u dorosłych osobników w szeregu procesów biologicznych, takich jak apoptoza, kontrola cyklu komórkowego, czy procesy plastyczności neuronalnej i formowania pamięci (Bueno & Malumbres, 2011; Fiorenza & Barco, 2016; Ivey & Srivastava, 2015; W. Konopka et al., 2010; Witold Konopka, Schütz, & Kaczmarek, 2011; Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, 2015; Subramanian & Steer, 2010). Początkowo przyjmowano, że cząsteczki mikroRNA pełnią swoją rolę w obrębie komórki, w której powstają. W ostatnich latach jednak wykazano obecność również pozakomórkowych mikroRNA, które poprzez związanie z odpowiednimi nośnikami są w stanie przetrwać w środowisku zewnątrzkomórkowym i oddziaływać na inne tkanki poza miejscem powstania (Boon & Vickers, 2013; Cortez et al., 2011). Zmieniony, odbiegający od normy profil ekspresji mikroRNA w danej tkance obserwuje się w wielu stanach chorobowych (Ardekani & Naeini, 2010; Paul et al., 2017). Dzięki temu istnieje możliwość wykorzystywania ich jako potencjalnych biomarkerów dla tych chorób (Hayes, Peruzzi, & Lawler, 2014; W. Huang, 2017; Nagaraj et al., 2017; Wang, Chen, & Sen, 2016).

1.3.1 Biogeneza mikroRNA

Szacuje się, że około połowa zidentyfikowanych obecnie mikroRNA bierze swój początek z sekwencji intronowych genów kodujących białka. W ten sposób równocześnie w komórce może powstawać białko spełniające określoną funkcję i element regulatorowy. Pozostała część mikroRNA powstaje z własnych, oddzielnych genów, z własnym promotorem (de Rie et al., 2017; Kim & Kim, 2007). Niektóre mikroRNA występują w genomie w tzw. klastrach, skupione i powstające razem z jednego, dłuższego transkryptu. O rodzinie

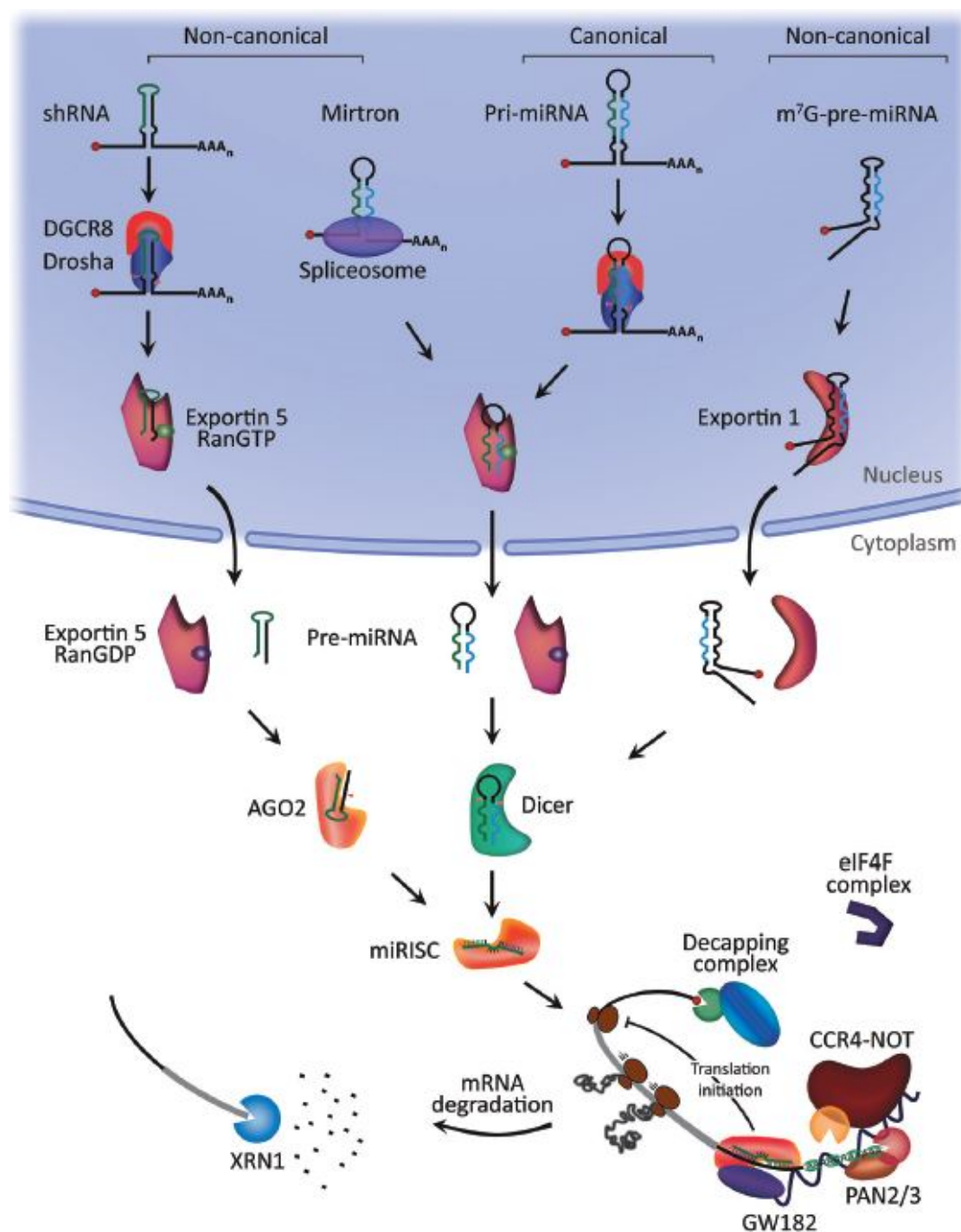
mikroRNA mówimy wtedy, gdy każde mikroRNA zawiera identyczny region sekwencji komplementarnej do sekwencji w 3'UTR regulowanego mRNA (z ang. *seed region*) (Tanzer & Stadler, 2004) (ryc. 7). Transkrypty dla mikroRNA powstają w wyniku działania polimeraz RNA II lub III, zaś kolejne etapy procesowania transkryptów do form dojrziałych mikroRNA można podzielić na ścieżki kanoniczne lub niekanoniczne, w zależności od struktury pierwotnego transkryptu i miejsca jego powstawania (Ha & Kim, 2014; O'Brien et al., 2018).

Ścieżka kanoniczna rozpoczyna się transkrypcją genów dla mikroRNA, prowadzącą do wytworzenia pri-miRNA (z ang. *primary miRNA*) o charakterystycznej strukturze szpilki. Następnie system złożony z białka DGCR8 (z ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) oraz enzymu Drosha (rybonukleazy III) procesuje pri-miRNA do postaci prekursorowej pre-miRNA (z ang. *precursor miRNA*). DGCR8 rozpoznaje sekwencje w motywie szpilki do włosów, zaś enzym Drosha jest odpowiedzialny za wycięcie sekwencji nukleotydowej przy podstawie szpilki. Powstałe pre-miRNA zostaje przetransportowane z jądra do cytoplazmy komórki przez kompleks eksportyny 5 (XPO5) oraz RanGTP. W cytoplazmie białko Dicer usuwa pętlę w strukturze szpilki pre-miRNA i ostatecznie endorybonukleaza ta przyczynia się do powstania dojrzalej formy duplexu mikroRNA. Duplex mikroRNA składa się z nici 5p oraz nici 3p, określanych przez ich kierunkowość. Nici 5p posiada swój koniec 5' przy strukturze szpilki w pre-miRNA i analogicznie nici 3p swój koniec 3' przy strukturze szpilki. Każda z nici może potencjalnie zostać włączona do kompleksu białek z rodziny AGO, ale dla każdego mikroRNA selektywność nici 5p lub 3p jest różna i zależna od specyficznych warunków, takich jak typ komórek, w których się znajdują, czy stabilność termodynamiczna wariantów 5p oraz 3p. Nici, która nie zostanie włączona do kompleksu AGO ulega degradacji (Ha & Kim, 2014; Khvorova, Reynolds, & Jayasena, 2003; Meijer, Smith, & Bushell, 2014; O'Brien et al., 2018).

Ścieżek niekanonicznych do dnia dzisiejszego odkryto kilka i ogólnie można je podzielić na ścieżki niezależne od kompleksu Drosha/DGCR8 oraz niezależne od białka Dicer. Przykład stanowią pre-miRNA zwane mirtronami, które powstają z sekwencji intronowych w mRNA (Ruby, Jan, & Bartel, 2007) oraz pre-miRNA opatrzone czapeczką 7-metyloguanozyny (Xie et al., 2013). W obydwu przypadkach dojrzewanie tych mikroRNA odbywa się bez udziału rybonukleazy Drosha. Ponadto pre-miRNA z czapeczką transportowane są do cytoplazmy z udziałem innego białka transportującego, aniżeli w ścieżce kanonicznej - eksportyny 1.

let-7a	3'-UUGAUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5'
let-7b	3'-UUGGUGUGUUGGAUGAUGGAGU-5'
let-7c	3'-UUGGUAUGUUGGAUGAUGGAGU-5'
let-7d	3'-UUGAUACGUUGGAUGAUGGAGA-5'
let-7e	3'-UUGAUAUGUUGGAGGAUGGAGU-5'

Rycina 7. Identyczny *seed region* dla różnych mikroRNA z rodziny *let-7* (Y. Wang et al., 2015)



Rycina 8. Schemat ścieżek powstawania dojrzałych form mikroRNA oraz ich działanie represyjne, w które zaangażowany jest szereg białek i kompleksów białkowych (O'Brien, Hayder, Zayed, & Peng, 2018).

Obecność 7-metyloguanozyny na końcu 5' pre-miRNA powoduje, że do kompleksu AGO "załadowana" zostaje tylko nieć 3p (Xie et al., 2013). Przykładem pre-miRNA powstającego niezależnie od białka Dicer jest np. miR-451, które do powstania dojrzałej formy wymaga procesowania przez kompleks AGO2 rozcinający strukturę tych cząsteczek na końcach 5' oraz 3'. Cząsteczka ta jest bowiem zbyt krótka, aby stanowić substrat dla białka Dicer. (Cheloufi, Dos Santos, Chong, & Hannon, 2010; Yang et al., 2010).

W niniejszej pracy istotne znaczenie miały mikroRNA zależne od funkcjonowania białka Dicer, z uwagi na zastosowanie określonego modelu zwierząt transgenicznych. Model ten pozwalał na selektywną inaktywację genu *Dicer1* i uniemożliwienie powstawania dojrzałych form mikroRNA.

1.3.2 Funkcja regulatorowa mikroRNA

MikroRNA pełnią swoją funkcję regulatorową w powiązaniu z wieloma kompleksami białkowymi. Podstawowym funkcjonalnym kompleksem jest tzw. miRISC (z ang. *miRNA induced silencing complex*), składający się z mikroRNA i białek z grupy AGO (Kawamata & Tomari, 2010). Udział mikroRNA polega na tworzeniu połączenia z mRNA, do którego dochodzi w ściśle określonym rejonie zarówno w cząsteczce mikroRNA, jak i mRNA. W obrębie mikroRNA rejonem tym jest wspomniany już „seed region”, obejmujący nukleotydy 2-8, aczkolwiek często wspomagany dodatkowo sekwencją nukleotydów 12-18 (Ryc. 9), (Bartel, 2018). W mRNA natomiast rejon połączenia zwany jest MRE (z ang. *miRNA response elements*) i zawiera sekwencje komplementarne do wspomnianych sekwencji w mikroRNA. MRE występują najczęściej w rejonie 3'UTR matrycy mRNA. Stopień komplementarności między regionem *seed* danego mikroRNA a regionem MRE w mRNA decyduje, czy nastąpi degradacja matrycy, czy zahamowanie translacji (Jo et al., 2015). Pełna komplementarność indukuje endonukleolityczną aktywność białek AGO, chociaż trzeba zaznaczyć, że w świecie zwierząt znaczna większość mikroRNA łączy się z matrycą nie w pełni komplementarnie i jak dotąd odnotowano tylko kilkadziesiąt przypadków, w których działanie mikroRNA prowadzi do przecięcia i degradacji matrycowego RNA (Shin et al., 2010). W przypadku braku pełnej komplementarności sekwencji mRNA i mikroRNA, białka AGO rekrutują rodzinę białek zwanych GW182 (do których należy m.in. białko TNRC6), które z kolei tworzą rusztowanie dla kolejnych białek efektorowych. Należą do nich kompleks PAN1-PAN2 oraz CCR4-NOT odpowiedzialne wspólnie za deadenylację ogona poli(A) na końcu 3' mRNA. Następnie białko

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Badania nad plastycznością neuronalną i formowaniem pamięci prowadzone w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Nenckiego, w których wykorzystano transgeniczną linię myszy, umożliwiającą selektywne usunięcie mikroRNA w mózgu, wykazały podwyższoną zdolność uczenia się zwierząt (W. Konopka et al., 2010). Co ciekawe, fenotyp ten nie był jedynym, zaobserwowanym podczas doświadczeń. Zwierzęta transgeniczne wykazywały również silną tendencję do przybierania na wadze, wynoszącą w swoim maksimum ok. 70-100% wagi początkowej. Zjawisko to jest ściśle powiązane z zaangażowaniem mikroRNA w ścieżkę przekazywania sygnałów związanych z mTOR w podwzgórzu (Vinnikov et al., 2014). Struktura podwzgórza stanowi istotne centrum dla ośrodka głodu i sytości, które odgrywa kluczową rolę w homeostazie energetycznej organizmu i które integruje sygnały obwodowe pochodzące m.in. od tkanki tłuszczowej. Ze względu na dowody świadczące o wpływie mikroRNA na ogólny status energetyczny zwierzęcia oraz fakt, iż tkanka tłuszczowa stanowi nieodzowny element tego statusu, celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu usunięcia mikroRNA w tkance tłuszczowej na metabolizm organizmu myszy.

Cele szczegółowe:

- Określenie wpływu restrykcji pokarmowej na profil metaboliczny myszy typu dzikiego, szczepu C57Bl6.
- Metaboliczna charakteryzacja procesu termogenezy aktywowanego agonistą receptorów β_3 -adrenergicznych u myszy szczepu C57Bl6.
- Określenie fenotypu myszy linii transgeniczej $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ w warunkach podstawowych oraz po wprowadzeniu restrykcji pokarmowej lub aktywacji procesu termogenezy z użyciem agonisty receptorów β_3 -adrenergicznych.
- Określenie wpływu usunięcia cząsteczek mikroRNA na funkcjonowanie białej oraz brązowej tkanki tłuszczowej.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Zwierzęta doświadczalne

Wszystkie doświadczenia opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej wykonano zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie, we wnioskach:

- „Rola miRNA w metabolicznej odpowiedzi na głodzenie u myszy” o numerze 100/2016
- „Wpływ tkankowo specyficznych miRNA na termogenezę w brązowej tkance tłuszczowej u myszy” o numerze 870/2019.

3.1.1 Myszy typu dzikiego - szczep C57Bl/6J

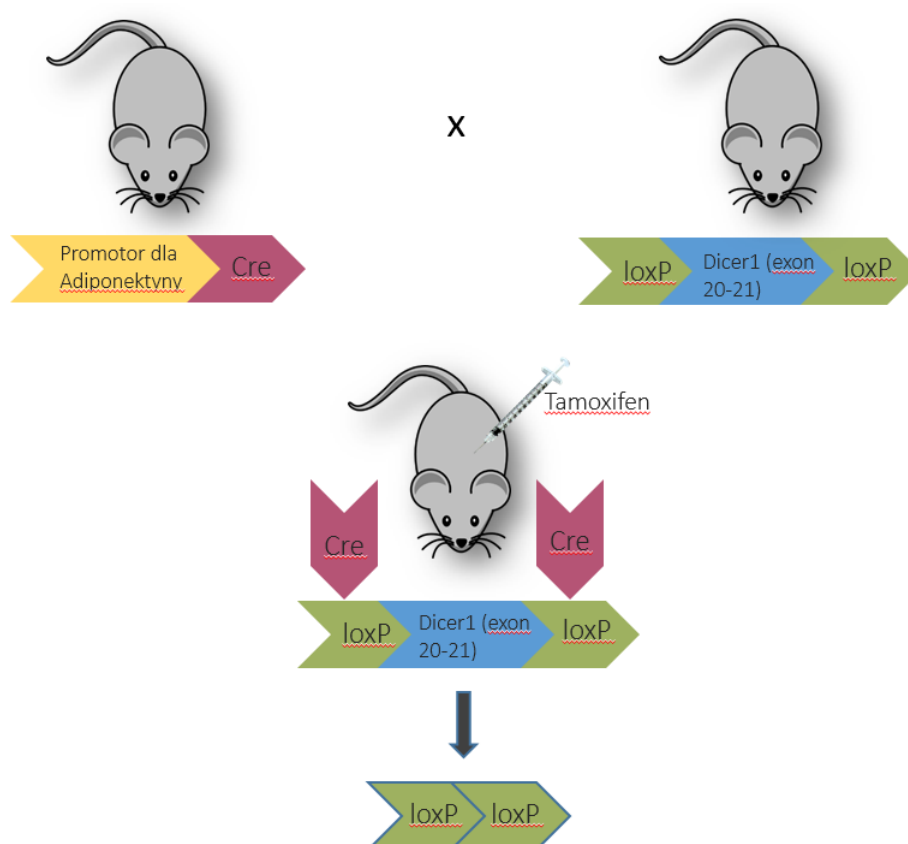
W doświadczeniach wykorzystano myszy laboratoryjne należące do szczepu C57Bl/6J, które pozyskano ze zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie lub z Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku. W badaniach wykorzystano samce w przedziale wiekowym 2-5 miesięcy, o wadze 25-30 gramów.

3.1.2 Myszy transgeniczne *Dicer*^{AdipoqCreERT2} zawierające tkankowo specyficzny system indukcji mutacji genu *Dicer1*

Myszy transgeniczne hodowano na podłożu genetycznym szczepu C57Bl/6J. Linie myszy *Dicer*^{AdipoqCreERT2} uzyskano poprzez kojarzenie myszy z dwóch linii transgenicznych: linii *Dicer*^{flox/flox}, która została wytworzona w grupie Matthiasa Merkenschlagera w Imperial College London w Wielkiej Brytanii (Cobb et al., 2005) oraz linii *AdipoqCreERT2*, która została wytworzona w grupie kierowanej przez Stefana Offermann oraz Ninę Wettschureck z Max Planck Institute, Bad Neuheim w Niemczech (Sassmann, Offermanns, & Wettschureck, 2010). Otrzymane zwierzęta transgeniczne *Dicer*^{AdipoqCreERT2} zawierają elementy systemu indukowalnej ekspresji genów Cre-loxP w swoim genomie. Usunięcie genu *Dicer1* umożliwia zablokowanie syntezy dojrzałych cząsteczek mikroRNA w komórkach tkanki tłuszczowej. System Cre-loxP składa się z dwóch elementów. Pierwszy stanowi rekombinaza Cre znajdująca się w genomie pod tkankowo-specyficznym promotorem białka adiponektyny, charakterystycznego dla tkanki tłuszczowej. Rekombinaza Cre występuje tutaj w zmienionej formie tzn. jako białko fuzyjne ze zmodyfikowanym fragmentem receptora estrogenowego (ER^{T2}) podatnego na działanie analogu estrogenu – Tamoxifenu. Wiązanie Tamoxifenu do fragmentu ER^{T2} powoduje translokację rekombinazy CreERT2 do jądra komórkowego i działanie na drugi element systemu Cre-loxP. Elementem tym jest wybrana sekwencja DNA w

genomie, zawarta pomiędzy dwoma krótkimi (42 nukleotydy) sekwencjami *loxP* (gen oflankowany, ang. floxed gene), które są rozpoznawalne przez rekombinazę Cre. Białko Cre po przyłączeniu do fragmentów *loxP* umożliwia rekombinację sekwencji DNA pomiędzy nimi. Odpowiednie ułożenie fragmentów *loxP* (5'-3') względem siebie pozwala na usunięcie oflankowanej sekwencji. W moich badaniach tą sekwencją jest fragment DNA obejmujący eksony 20-21 genu *Dicer1*, który koduje domenę RNazy III, kluczowej w dojrzewaniu mikroRNA. Zatem usunięcie tych eksonów prowadzi do wytworzenia нефunkcjonalnego białka Dicer w komórkach tkanki tłuszczowej i tym samym zahamowanie powstawania w nich nowych cząsteczek mikroRNA.

Myszy *Dicer^{AdipoqCreERT2}* były hodowane i dostarczone przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie. W badaniach wykorzystano samce w przedziale wiekowym 2-5 miesięcy, o wadze 25-30 gramów. Preferencja wykorzystania samców w badaniach wynika z obecności znacznie większej liczby natywnych receptorów estrogenowych u samic, podatnych na działanie Tamoxifenu, który wykorzystywany był w systemie Cre-*loxP*. Modulacja aktywności receptorów estrogenowych u samic mogłaby powodować występowanie niepożądanych efektów w większym stopniu niż u samców.



Rycina 10. Schemat uzyskania mysiego modelu indukowalnej mutacji genu *Dicer1* w systemie Cre-*loxP*

3.1.3 Myszy transgeniczne $tdTomato^{AdipoqCreERT2}$ zawierające tkankowo specyficzny system indukcji ekspresji znacznika fluorescencyjnego

Linie myszy $dTomato^{AdipoqCreERT2}$ uzyskano poprzez kojarzenie myszy z dwóch linii transgenicznych: linii $AdipoqCreERT2$ oraz linię $Rosa26-tdTomato$, która została wytworzona w Allen Institute for Brain Science (Madisen et al., 2010) jako Cre-zależna linia reporterowa dla zwierząt transgenicznych z obecnym systemem Cre-loxP. Otrzymane zwierzęta transgeniczne $tdTomato^{AdipoqCreERT2}$ dzięki obecności białka fluorescencyjnego umożliwia weryfikację skuteczności systemu Cre-loxP i określenie wzoru komórek, w których nastąpiła rekombinacja. Sekwencja kodująca białko fluorescencyjne $tdTomato$ poprzedzona jest kodonem „stop”, otoczonym fragmentami *loxP*, rozpoznawanymi przez rekombinazę *Cre* (analogicznie do genu *Dicer*). Indukcja mutacji przez podanie Tamoxifenu zwierzętom tej linii transgenicznej umożliwia pozbycie się kasety „stop” i transkrypcje białka $tdTomato$ w tkance tłuszczowej, determinowane specyficznością promotora *Adipoq*.

3.2 Warunki hodowli zwierząt doświadczalnych

Zwierzęta umieszczano w klatkach hodowlanych o wymiarach [dł. 37 cm x szer. 56 cm x wys. 30 cm] z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia, chyba że procedura doświadczalna przewidywała inny sposób. W zależności od specyfikacji doświadczenia myszy były przetrzymywane w grupach lub pojedynczo. Badania z udziałem klatek metabolicznych, powiązane z wprowadzaniem restrykcji pokarmowej lub badania termogenezy wymagają trzymania zwierząt pojedynczo na poszczególnych etapach. Wówczas klatki zaopatrzone były w elementy wzbogacające środowisko, takie jak klocki do ścierania zębów, bawełniane kokony do budowy gniazda, tunele z celulozy. Zwierzęta utrzymywane były na ściółce Lignocel Select - włókna drewna z topoli 3,5 mm, w temperaturze 21-23°C, o wilgotności powietrza 50-60%. Wprowadzony został także cykl dobowy, o odwróconej dobie, z fazą aktywną (ciemną) trwającą od godziny 9:00 do 21:00.

3.3 Pobieranie tkanek zwierzęcych do analiz

W celu pobrania tkanek do analizy myszy uśmiercano przez przerwanie rdzenia kręgowego lub poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodu (morbitalu – Biowet Puławy) w dawce 200 mg/kg masy ciała.

3.3.1 Tkanka tłuszczowa

Białą tkankę tłuszczową pobierano z dwóch miejsc w organizmie zwierzęcia: z okolicy pasa biodrowego (SC, z ang. *subcutaneous*) oraz z okolicy narządów rodnych (PG, z ang. *perigonadal*). Brązową tkankę tłuszczową pobierano z rejonu między łopatkami, bliżej karku, unikając pomieszania z fragmentami białej tkanki tłuszczowej.

Próbki tkanek umieszczano w roztworze odczynnika *RNAlater* (ThermoFischer Scientific) i przechowywano w temp. -20°C wg. zaleceń producenta do momentu ich wykorzystania.

3.3.2 Tkanka wątrobowa

Pobierano niewielki fragment wątroby (ok. 1cm²), zawsze z tego samego płata tkanki, a następnie umieszczano w roztworze odczynnika *RNAlater* (ThermoFischer Scientific) i przechowywano w temp. -20°C wg. zaleceń producenta do momentu ich wykorzystania.

3.3.3 Fragment ogona

Pobierano niewielki fragment końca ogona (ok. 5 mm) i przechowywano w temp. -20°C do momentu jego wykorzystania.

3.3.4 Krew (osocze)

Krew pobierano pośmiertnie, bezpośrednio z serca, po otwarciu klatki piersiowej. Korzystano ze strzykawki insulinowej o pojemności 1 ml po uprzednim przepłukaniu strzykawki wraz z igłą heparyną (Heparinum WZF – Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A.). Pobraną krew przenoszono do probówki typu eppendorf (1,5 ml) i wirowano przez 5 min. przy prędkości 5000 x g w 4°C. Do nowej probówki eppendorfa przenoszono samo osocze (górną warstwę) i tak przygotowaną próbkę umieszczano w temp. -80 °C do chwili wykonania oznaczeń.

3.4 Podstawowe techniki pracy z kwasami nukleinowymi

3.4.1 Izolowanie DNA z tkanek

Do wyizolowania próbek zawierających DNA zwierzęcia wykorzystywano zestaw *Genomic Mini* (A&A Biotechnology) i postępowano zgodnie z opisanym protokołem. Metoda izolacji oparta jest na działaniu roztworów lizujących tkankę i proteinaz usuwających białka

przez ich strawienie, wraz z oczyszczaniem docelowego materiału na kolumnach chromatograficznych. DNA zawieszano w wybranej objętości buforu Tris o pH równym 8.0 załączonego w zestawie lub wody dejonizowanej (100µl) i przechowywano w temp. -20 °C.

3.4.2 Izolowanie RNA z tkanek

Do wyizolowania próbek zawierających RNA zwierzęcia wykorzystywano zestaw *mirVana Paris* (Invitrogen/ThermoFischer Scientific) i postępowano zgodnie z opisanym protokołem. Metoda izolacji zakłada homogenizację wybranej tkanki (~100mg) i oparta jest na ekstrakcji mieszaniną fenol:chloroform wraz z oczyszczaniem docelowego materiału na kolumnach chromatograficznych. RNA zawieszano w wybranej objętości buforu elucyjnego załączonego do zestawu (100µl) i przechowywano w temp. -80 °C.

3.4.3 Oznaczenie stężenia kwasu nukleinowego w próbce

Stężenie DNA bądź RNA oznaczane było spektrofotometrycznie z wykorzystaniem systemu *NanoDrop* (ThermoFischer Scientific) oraz dla potwierdzenia wyniku fluorometrycznie z wykorzystaniem systemu *Q-bit* (ThermoFischer Scientific) według protokołu załączonego przez producenta.

3.4.4 Analiza genotypu zwierząt transgeniczných

Genotyp zwierząt z linii Dicer^{AdipoqCreERT2} oraz tdTomato^{AdipoqCreERT2} określany był standardową metodą PCR, z zastosowaniem par starterów specyficznych dla każdego z genów. Mieszanina reakcyjna przygotowywana była według protokołu z zestawu Syngen Gold Hot Start DNA Polymerase, dostarczającego odczynników do reakcji PCR. Produkt reakcji rozdzielany był na 2% żelu agarozowym, przygotowanym na bazie roztworu TBE, z dodatkiem bromku etydyny. Obserwację otrzymanego produktu na żelu agarozowym prowadzono z użyciem lampy UV w systemie BioDock-It firmy UVP.

Stosowane startery:

Dicer_Forward:	5' - CCATTTGCTGGAGTGACTCTG
Dicer_Reverse:	5' – TAAATCTGGCAAGCGAGACG
CreER ^{T2} _Forward:	5' – GGCTGGTGTGTCCATCCCTGAA
CreER ^{T2} _Reverse:	5' – GGTCAAATCCACAAAGCCTGGCA

Tomato_wt_Forward:	5' - AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA
Tomato_wt_Reverse:	5' - CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC
Tomato_mut_Forward:	5' - GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC
Tomato_mut_Reverse:	5' - CTG TTC CTG TAC GGC ATG G

Warunki reakcji PCR:

95°C	5 min	}	30 cykli
95°C	30 s		
60°C	60 s		
72°C	90 s		
72°C	10 min		
4°C	forever		

Roztwór TBE (5 x stężony): 54g Trisu, 27g kwasu borowego, 3,72g kwasu wersenowego (EDTA) na 1l wody dejonizowanej.

Roztwór obciążający dla zamplifikowanych próbek DNA po reakcji PCR do nakładania na żel agarozowy: 1:1 glicerol:woda, barwny związek fenolowy.

3.4.5 Reakcje odwrotnej transkrypcji

W celu pozyskania materiału cDNA, odwrotną transkrypcję przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu transkryptazy *SuperScript III* (ThermoFischer Scientific) lub z wykorzystaniem zestawu *High Capacity Reverse Transcription Kit* (ThermoFischer Scientific). W zależności od przeznaczenia próbek cDNA na kolejnych etapach, ilość RNA użytego do odwrotnej transkrypcji wynosiła 100 ng (w przypadku oznaczania ekspresji genu *Dicer1*) lub 2 ug (w przypadku oznaczania mikroRNA). Wodę wolną od RNAz niezbędną w reakcji, przygotowywano przez dodanie dietylopirowęgla (DEPC) do wody, w celu otrzymania roztworu 0,1% (v/v). Roztwór mieszało się na wytrząsarce przez 2 godziny w temp. 37 °C, a następnie autoklawowano w celu usunięcia pozostałości dietylopirowęgla.

Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji (na 1 próbkę):

<i>SuperScript III kit</i>	<i>High Capacity kit</i>
6,9µl woda DEPC	3,2µl woda DEPC
4µl bufor	2µl bufor

1μl	DTT	2μl	odpowiednie startery
1μl	inhibitor RNaz	1μl	inhibitor RNaz
1μl	dNTPs	0,8μl	dNTPs
0,1μl	startery (ang. Random Primers)	1μl	odwrotna transkryptaza MultiScribe
1μl	odwrotna transkryptaza SuperScript III	10μl	RNA (2μg)
5μl	RNA (100ng)		

Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji:

<i>SuperScript III kit</i>	<i>High Capacity kit</i>
65°C 5 min	25°C 10 min
25°C 5 min	37°C 2h
50°C 60 min	85°C 5 min
70°C 15 s	4°C forever
4°C forever	

3.4.6 Metoda ilościowa PCR w czasie rzeczywistym (ang. real time quantitative PCR, RT-qPCR)

W metodzie wykorzystano działanie sond molekularnych, komplementarnych do pożądanej sekwencji w genomie zwierzęcia. W moim przypadku jest to sekwencja w obrębie exonu 20-21 genu *Dicer1*, tego samego exonu, który może ulec wycięciu na skutek działania systemu Cre-loxP. Sonda opatrzona jest na swoim jednym końcu cząsteczką emitującą sygnał fluorescencyjny, zaś na drugim końcu tzw. niwelatorem sygnału (z ang. quencher). W trakcie reakcji polimeryzacji następuje uwolnienie fluorochromu wraz z emisją sygnału, którego niwelator nie jest już w stanie wyciszyć. Sygnał rejestrowany jest przez maszynę, w której przeprowadzana jest reakcja qPCR. Analizie poddano próbki tkanki tłuszczowej (białej podskórnej, białej gonadalnej i brązowej tkanki tłuszczowej) oraz próbki tkanki wątrobowej jako dodatkowej kontroli negatywnej w linii AdipoqCreERT2 dla systemu Cre-loxP.

Składniki reakcji qPCR (na 1 próbkę):

10μl	TaqMan Fast Advanced Master Mix (ThermoFischer Scientific)
1μl	sonda molekularna (<i>Mm00521730_m1</i> ThermoFischer Scientific)

sonda molekularna (*Mm03024075_m1* ThermoFischer Scientific)

9µl materiał cDNA zwierzęcia (~100ng) uzyskany z reakcji odwrotnej transkrypcji wykonanej przy użyciu zestawu *SuperScript III*.

Warunki reakcji qPCR:

	95°C	5 min	}	40 cykli
	95°C	30 s		
	60°C	60 s		
(odczyt sygnału w cyklu)	72°C	90 s		

Wyniki ekspresji genu *Dicer1* (sonda *Mm00521730_m1*) zostały znormalizowane do wyników ekspresji genu *Hprt* (sonda *Mm03024075_m1*) z tych samych próbek danej tkanki.

3.4.7 Profilowanie mikroRNA - metoda ilościowa RT-qPCR

Profilowanie mikroRNA zostało wykonane z wykorzystaniem zestawu *TaqMan Low Density Array* (ThermoFischer Scientific), w którym analiza próbek opiera się o technikę qPCR. Zestaw zawiera płytki 384-dołkowe wypełnione sondami molekularnymi (analogicznymi do sond opisywanych wcześniej dla techniki qPCR), komplementarnymi do sekwencji poszczególnych mikroRNA wraz ze specyficznymi starterami dla tych mikroRNA. Każda z płytek zawiera również sondy i startery dla genów stanowiących kontrole endogenne, niezbędnych dla późniejszej analizy ekspresji mikroRNA. Jeden zestaw (2 płytki A i B) pozwala na przeanalizowanie ponad 700 najistotniejszych mikroRNA, ustalanych przez producenta w odniesieniu do bazy danych *Sanger miRBase*.

Profilowanie wykonane zostało na próbkach białej (podskórnej) tkanki tłuszczowej oraz brązowej tkanki tłuszczowej zwierząt, poddanych określonym warunkom eksperymentalnym. Badając zmiany mikroRNA potencjalnie zaangażowanych w proces termogenezy, próbki brązowej tkanki tłuszczowej pobrano od zwierząt po 2 godz. od podania agonisty receptorów β_3 -adrenergicznych. Sprawdzając zmiany mikroRNA potencjalnie istotnych dla procesów modulujących wykorzystanie poszczególnych substratów energetycznych, próbki białej tkanki tłuszczowej pobrano od zwierząt po 6 godz. od wprowadzenia głodzenia krótkoterminowego oraz od zwierząt z wprowadzoną restrykcją kaloryczną, po 4 tygodniach, w porze karmienia.

Składniki reakcji qPCR (na 1 płytkę *TLDA*):

400μl woda DEPC

400μl *TaqMan Universal Master Mix II, no UNG* (ThermoFischer Scientific)

20μl materiał cDNA zwierzęcia (~2μg) uzyskany z reakcji odwrotnej transkrypcji wykonanej przy użyciu zestawu *High Capacity Reverse Transcription Kit*.

Każda z płytek *TLDA* wypełniona została objętością powyższej mieszaniny w ilości 800μl zgodnie z zaleceniami producenta.

Warunki reakcji qPCR:

	95°C	5 min	}	40 cykli
	95°C	30 s		
	60°C	60 s		
(odczyt sygnału w cyklu)	72°C	90 s		

Wyniki ekspresji poszczególnych mikroRNA z danej próbki (1 płytka *TLDA*) zostały znormalizowane do wyniku ekspresji sno202 oraz U6 z tej samej próbki (tej samej płytki *TLDA*), bądź do średniej ekspresji dla wszystkich mikroRNA uzyskanej z tej próbki (normalizacja globalna).

3.5 Indukowanie systemu Cre-loxP

Indukcja rekombinacji genu *Dicer1* lub indukcji ekspresji białka fluorescencyjnego dTomato w komórkach tkanki tłuszczowej aktywowana była przez dootrzewnowe podanie Tamoxifenu. Roztwór Tamoxifenu przygotowywany był poprzez rozpuszczenie Tamoxifenu w etanolu i oleju roślinnym w ilościach:

100 mg Tamoxifenu (Sigma – Aldrich)

1 ml etanolu 99,8% Pure PA (Polskie Odczynniki Chemiczne)

9 ml oleju słonecznikowego (Sigma – Aldrich)

Roztwór chroniony przed światłem przechowywano w 4 °C.

Roztwór Tamoxifenu podawano zwierzętom z użyciem strzykawki insulinowej 2x dziennie, w odstępach co najmniej 6-godzinnych (rano i wieczorem), przez 5 kolejnych dni. Pojedynczy zastrzyk zawierał 1 mg Tamoxifenu (100 μ l roztworu).

3.6 Obrazowanie makroskopowe do obserwacji sygnału fluoroscencyjnego

Zwierzęta transgeniczne tdTomato^{AdipoqCreERT2} poddane zostały perfuzji 4% roztworem paraformaldehydu w celu utrwalenia tkanek. Następnie zwierzęta zostały pozbawione skóry i poddane ponownej perfuzji, z wykorzystaniem koktajlu związków (zawierających m.in. aminoalkohole) przez 5 kolejnych dni. Procedurę wykonano w oparciu o zoptymalizowaną metodę CUBIC (z ang. *clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis*) (Matryba et al., 2018; Susaki et al., 2014) Zastosowanie wspomnianej mieszaniny związków powoduje zmniejszenie współczynnika załamania światła w tkance i umożliwia obserwację tkanek położonych również głęboko wewnątrz organizmu. Dzięki temu możliwe jest wychwycenie sygnału fluorescencyjnego z wnętrza tkanki, pochodzącego np. od białka fluorescencyjnego. W przypadku myszy tdTomato^{AdipoqCreERT2} białkiem fluorescencyjnym było białko tdTomato, dające sygnał w miejscu indukcji systemu Cre-loxP, czyli miejscu działania rekombinazy Cre. Do zarejestrowania sygnału pochodzącego od zwierzęcia wykorzystano technikę mikroskopii arkusza obrazu LSM (za ang. *light-sheet fluorescence microscopy*) (Matryba et al., 2018)

3.7 Indukowanie termogenezy z wykorzystaniem agonisty receptora β_3 -adrenergicznego

Przygotowano roztwór agonisty receptora β_3 -adrenergicznego - CL 316,243 (Sigma-Aldrich) o stężeniu 10 mg/ml w wodzie dejonizowanej. Związek ten podawano zwierzętom w iniekcji dootrzewnowej w dawce 1 mg/kg masy ciała. Obserwacje prowadzono przez 4 godziny od momentu podania agonisty.

3.8 Procedury restrykcji pokarmowej

3.8.1 Głodzenie krótkoterminowe (ang. *short-term fasting*)

Głodzenie krótkoterminowe to wariant restrykcji pokarmowej, polegający na czasowym usunięciu pokarmu. W doświadczeniu zwierzęta pozbawiono jedzenia z początkiem fazy aktywnej (ciemnej) o godz. 9:00, na okres maksymalnie 24 godzin, w trakcie których dokonywano obserwacji. Dostęp do wody nie był ograniczony. Po okresie głodzenia zwierzętom przywracano ponownie dostęp do pożywienia.

3.8.2 Restrykcja kaloryczna (ang. *caloric restriction, CR*)

Restrykcja kaloryczna to wariant restrykcji pokarmowej, polegający na ograniczeniu dziennej podaży pokarmu, w celu uzyskania wagi zwierzęcia stanowiącej ~70% wagi początkowej. Ilość karmy dostarczanej jednej myszy w ciągu dnia wynosiła 2-2,5g. Schemat badania przewidywał trzy warianty restrykcji kalorycznej różniące się porą dnia, w której zwierzęta otrzymywały karmę. W pierwszym wariantcie pożywienie dostarczone było codziennie z początkiem fazy aktywnej (godz. 9:00). W drugim wariantcie pożywienie dostarczone było w środku fazy aktywnej (godz. 15:00). W trzecim wariantcie, wraz z końcem fazy aktywnej (godz. 21:00). Powyższy schemat restrykcji pokarmowej utrzymywany był minimum przez 4 tygodnie w celu uzyskania i utrzymania żądanej wagi zwierzęcia (70% wagi początkowej) oraz w celu uzyskania pełnej adaptacji metabolicznej organizmu do zmienionych warunków żywienia.

3.10 Badanie parametrów metabolicznych myszy z wykorzystaniem systemu *Phenomaster TSE Systems*

Phenomaster (TSE-systems) umożliwia przeprowadzenie długotrwałej, przeżyciowej charakterystyki metabolicznej pojedynczego zwierzęcia wewnątrz klatki, w warunkach o ograniczonym stresie. Jest to system modułowy, który w zależności od potrzeb eksperymentatora lub dostępności modułów, umożliwia analizę poszczególnych parametrów.

3.10.1 Pomiary poboru pokarmu, wody oraz wagi zwierząt

Pomiar poboru pokarmu, wody i wagi zwierzęcia wykonywano przy użyciu sensorów wagowych. W celu prawidłowego rejestrowania danych sensory kalibrowano z wykorzystaniem wzorców wagowych dostarczonych przez producenta.

3.10.2 Pomiary aktywności fizycznej zwierząt

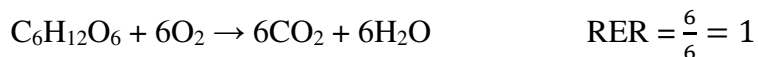
Pomiar aktywności zwierząt mierzono stosując kołowrotek (o średnicy 10cm) z elektronicznymi czujnikami ruchu. Parametry takie jak przebyty dystans, prędkość, czy czas spędzony na aktywności fizycznej określany był automatycznie na podstawie wymiarów kołowrotka.

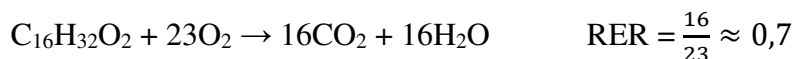
3.10.3 Pomiary składu powietrza

Pomiar składu powietrza możliwy był dzięki obecności sensorów gazowych cząsteczek tlenu i dwutlenku węgla. Szczelna konstrukcja klatek metabolicznych i oprogramowanie sterujące umożliwiają kontrolowaną wymianę powietrza wewnątrz klatki. Dzięki temu możliwe jest przeprowadzenie wiarygodnego pomiaru gazów, będących wynikiem metabolizmu zwierzęcia, przy jednoczesnym zachowaniu komfortu oddechowego tego zwierzęcia. W celu prawidłowego rejestrowania danych sensory kalibrowano z wykorzystaniem dwóch butli wzorcowych o ściśle określonej zawartości O₂ i CO₂ dostarczonych przez producenta.

Zmiany składu powietrza w czasie hodowli zwierząt mogą dostarczać informacji na temat podstawowych parametrów metabolicznych zwierząt, jak pobór tlenu, wydalanie dwutlenku węgla, współczynnik oddechowy (RER z ang. *Respiratory Exchange Ratio*), czy wydatek energetyczny (EE z ang. *Energy Expenditure*).

Współczynnik oddechowy RER dostarcza informacji na temat tego, jaki substrat energetyczny jest wiodącym substratem dostarczającym wymiennika energii ATP. Jego wartość otrzymuje się porównując ilość CO₂ wydychanego przez organizm do ilości wdychanego O₂. Zależność tą można łatwo przedstawić za pomocą równań stechiometrycznych reakcji spalania węglowodanu (glukozy) i kwasu tłuszczowego (palmitynowego):





Stechiometria reakcji pokazuje zatem, że wartość współczynnika RER wynosząca ok.1 świadczy o wykorzystaniu węglowodanów jako głównego źródła energii, zaś wartość ok. 0,7 wskazuje na kwasy tłuszczowe jako główne źródło powstawania ATP.

3.10.4 Czasowo-zależna dystrybucja pokarmu

Zestaw klatek metabolicznych został wzbogacony o dodatkowy, prosty układ pozwalający na czasowo-zależne dostarczanie porcji pożywienia do wnętrza klatki. Ułatwiło to przeprowadzenie analizy metabolicznej w doświadczeniach z wprowadzoną restrykcją kaloryczną, w której porcję pożywienia należało dostarczyć zwierzęciu w ściśle określonych punktach czasowych (godz.9:00, 15:00 oraz 21:00). Do kontroli działania układu sterującego wykorzystano elektroniczną platformę *Arduino*.

3.11 Badania motywacji zwierząt z wykorzystaniem systemu *Med Associates Inc. Operant Behavior Chamber*

System *Operant Behavior* zwany klatką Skinnera (od pomysłodawcy i pierwszego konstruktora projektu Burrhusa Frederica Skinnera) jest zautomatyzowanym urządzeniem pozwalającym na przeprowadzanie doświadczeń przeżyciowych, związanych z warunkowaniem zwierzęcia na określone bodźce. W zależności od modelu, system umożliwia dostarczenie m.in. bodźca świetlnego, dźwiękowego, elektrycznego lub mechanicznego w formie dźwigni zamontowanej wewnątrz klatki i dostępnej dla zwierzęcia. W zależności od wymogów eksperymentatora, bodźce mogą zostać sprzężone ze sobą, lub z nagrodą otrzymywaną w formie niewielkiej porcji pokarmu (peletu), w obecnym wewnątrz klatki podajniku. Na potrzeby niniejszego badania zwierzęta uwarunkowano w sposób, w którym naciśnięcie dźwigni przez zwierzę doprowadza do otrzymania pastylki karmy (z ang. pellet).

W doświadczeniu określano stopień motywacji zwierząt do pozyskania pokarmu, poddanym procedurom restrykcji pokarmowych. Badano zwierzęta po 6-godzinnej głodówce, po 24-godzinnej głodówce oraz w reżimie restrykcji kalorycznej (CR). Zwierzęta z grupy CR poddano badaniu w środku fazy aktywnej, tuż przed podaniem ich dziennej porcji pokarmu. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta z wolnym dostępem do pożywienia (*ad libitum*). Ponadto, aby określić wpływ hormonu leptyny na stopień motywacji, wykorzystano zwierzęta objęte

restrykcją kaloryczną, po uprzednim, dootrzewnowym podaniu hormonu leptyny o stężeniu 1,25 mg/kg masy ciała w formie zastrzyku (300 µl). Leptynę podano na 30 minut przed badaniem w klatce Skinnera, tak aby czas testu przypadał na środek fazy aktywnej zwierząt, tuż przed podaniem ich dziennej porcji pokarmu. Grupę kontrolną dla tych zwierząt stanowiły również zwierzęta CR, po uprzednim, analogicznym do leptyny, dootrzewnowemu podaniu roztworu soli fizjologicznej.

Schemat doświadczenia obejmował 7-dniowy okres warunkowania, w którym każde zwierzę poddano sesji treningowej raz dziennie, przez 20 minut, w trakcie ich fazy aktywnej. 8-ego dnia, o tej samej porze jak w sesjach treningowych, odbywał się ostateczny test zwierzęcia, podczas którego zliczano całkowitą liczbę naciśnieć dźwigni. Dootrzewnowe podanie leptyny lub roztworu soli fizjologicznej zwierzętom CR miało miejsce tylko w dniu właściwego testu.

3.12 Monitorowanie temperatury ciała zwierząt z wykorzystaniem kamery termowizyjnej

Monitorowanie temperatury ciała zwierząt prowadzono z użyciem kamery termowizyjnej *Pi 640* firmy *Optris*. Pomiar prowadzono na otwartej klatce, przez umieszczenie kamery bezpośrednio nad klatką, w odległości ok. 30 centymetrów i skierowaną w dół. Pomiar trwał przez 1 minutę i prowadzony był z wykorzystaniem oprogramowania dołączonego do kamery *Optris PIX Connect*. Z 1-minutowego nagrania wybrano moment, w którym zwierzę optymalnie (wyraźnie) eksponowało stronę grzbietową i zanotowano wartość temperatury.

3.13 Analiza biochemiczna krwi zwierząt

Analiza biochemiczna opierała się na badaniach wykonanych pośmiertnie, z krwi pobranej od zwierząt w istotnych dla doświadczenia punktach czasowych i przy ściśle zachowanych warunkach doświadczalnych.

3.13.1 Pomiary stężenia glukozy

Pomiar glukozy przeprowadzony został przy użyciu glukometru *Accu-Check Performa Nano* (Roche Diabetes Care) oraz pasków glukometrycznych o tej samej nazwie i pochodzących od tego samego producenta. Zaletą metody jest łatwość i szybkość wykonania analizy. Działanie glukometru opiera się na metodzie elektrochemicznej. Każdy z pasków glukometrycznych zawiera elektrody umieszczone w niewielkiej komorze reakcyjnej, w której dochodzi do utlenienia cząsteczek glukozy pod wpływem obecnego enzymu dehydrogenazy. Uwolnione w wyniku reakcji elektrony powodują powstanie różnicy potencjałów między elektrodami, proporcjonalnej do stężenia mierzonej glukozy, analizowanej przez glukometr. Ilość próbki potrzebnej do wykonania pomiaru jest niewielka i wynosi $<1\mu\text{l}$. Ponieważ w moich doświadczeniach próbką badaną było osocze, chcąc podać wynik stężenia glukozy dla krwi, należy uwzględnić fakt, że glukoza znajduje się w fazie wodnej krwi, która zawiera także wiele innych komponentów. Stężenie glukozy we krwi będzie zatem niższe niż w wyizolowanym osoczu (doświadczalnie ustalone na około 13% niższe). Ostateczny wynik otrzymano stosując poniższy wzór:

$$y = 0,87 \cdot x$$

y = wynik dla krwi (mg/dL)

x = wynik dla osocza (mg/dL, odczytany z glukometru)

3.13.2 Pomiary stężenia kwasów tłuszczowych

Pomiar wolnych kwasów tłuszczowych przeprowadzony został przy użyciu zestawu *NEFA-HR R1-R2* (Wako Chemicals GmbH) według protokołu producenta. Działanie zestawu opiera się na 2-etapowej reakcji enzymatycznej, wykorzystującej syntetazę acylo-CoA oraz oksydazę acylo-CoA do przekształcania obecnych w próbce kwasów tłuszczowych, z wytworzeniem barwnego produktu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali głównej 546nm (charakterystycznej dla powstającego produktu barwnego) oraz bocznej 660nm i zanotowano różnicę w wartościach absorbancji. Ostatecznie wynik stężenia kwasów tłuszczowych odczytano z krzywej wzorcowej, przygotowanej z pięciu, 10-cio krotnych rozcieńczeń standardu kwasu oleinowego o stężeniu równym 1 mmol/L, poddanych tej samej reakcji barwnej.

3.13.3 Pomiary stężenia ciał ketonowych

Przeprowadzony został przy użyciu zestawu *Ketone Body Assay* (Sigma-Aldrich). Zestaw zawiera odczynniki wykrywające kwas acetoctowy (AcAc) oraz kwas β -

hydroksymasłowy (BOH), jednak ze względu na relatywnie niski przyrost AcAc w stosunku do BOH w badanych reakcjach ketogenezy, w analizie wykorzystano jedynie pomiar ostatniego ze związków. Działanie zestawu opiera się na reakcji ciała ketonowego ze składnikami odczynników zestawu, prowadzącej do zmiany stosunku NAD^+/NADH . Zmianę tę wykrywano przez pomiar absorbancji przy długości fali 340 nm (charakterystycznej dla NADH). Ostatecznie wynik stężenia kwasu β -hydroksymasłowego odczytano z krzywej wzorcowej, przygotowanej z pięciu, 10-cio krotnych rozcieńczeń standardu tego kwasu o stężeniu 80 mM, poddanych tej samej reakcji chemicznej.

3.13.4 Pomiary stężenia hormonów

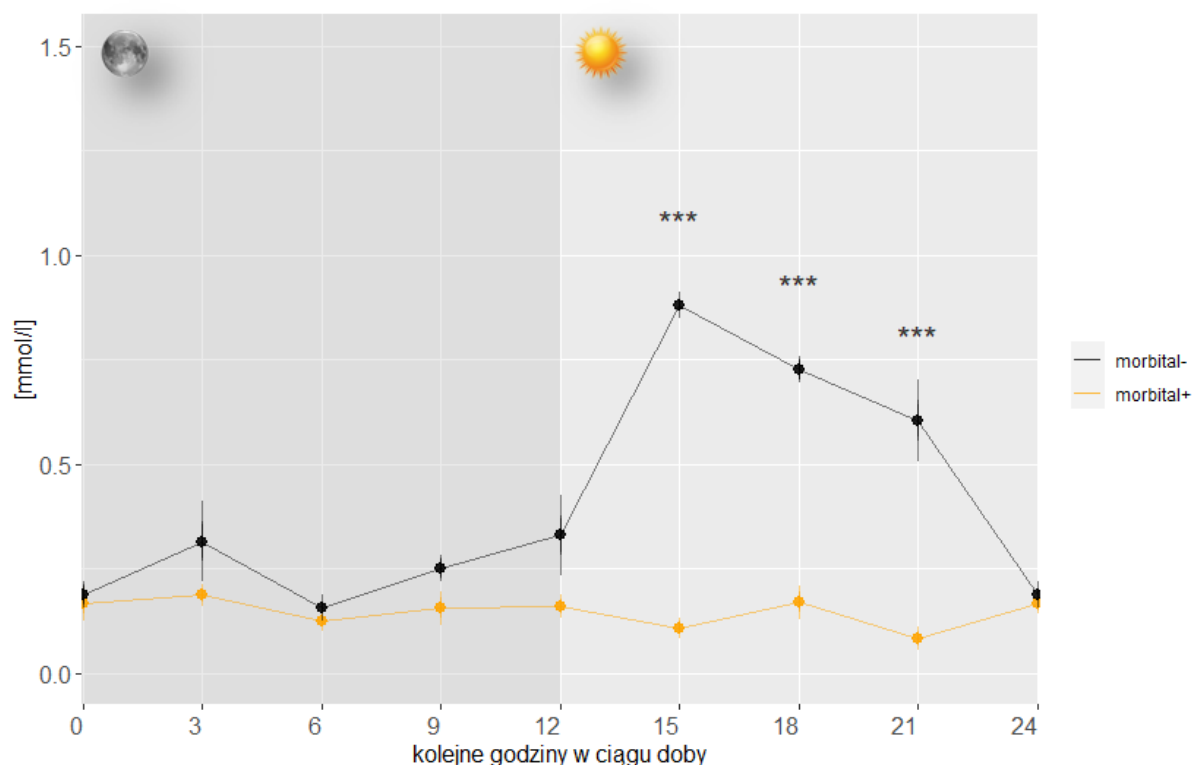
Pomiar hormonów insuliny i leptyny przeprowadzono przy użyciu zestawów *Rat/Mouse Insulin ELISA* oraz *Mouse Leptin ELISA* (Merck-Millipore). Działanie zestawu opiera się na reakcji hormonów ze skierowanym przeciw nim przeciwciałem biotynylowanym, oraz streptawidyny wykazującej powinowactwo do biotyny, sprzężonej z enzymem peroksydazy chrzanowej (HRP). Enzym HRP przeprowadza reakcję z wykorzystaniem substratu tetrametylobenzydyny (TMB), dającej barwny produkt. Następnie zmierzono w próbkach absorbancję przy długości fali 450 nm (charakterystycznej dla produktu barwnego). Ostatecznie wynik stężenia hormonów odczytano z krzywej wzorcowej, przygotowanej z pięciu, 10-cio krotnych rozcieńczeń standardu danego hormonu dostarczonego z zestawem, poddanych tej samej reakcji chemicznej.

3.14 Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki wraz z analizą statystyczną wykonane zostały z wykorzystaniem oprogramowania *R studio*. Wyniki przedstawiono w formie wykresów typu boxplot oraz wykresów liniowych. Na wykresach typu boxplot wyniki z błędem grubym (z ang. „outlier”) zaznaczono jako punkty nie mieszczące się w „minimum” oraz „maximum” wykresu. W analizie wykorzystano test jednoczynnikowy ANOVA oraz test t-Studenta. Wartości istotności statystycznej oznaczono wg. zapisu *p <0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

4. WYNIKI

4.1 Wpływ pentobarbitalu na zawartość kwasów tłuszczowych w osoczu myszy

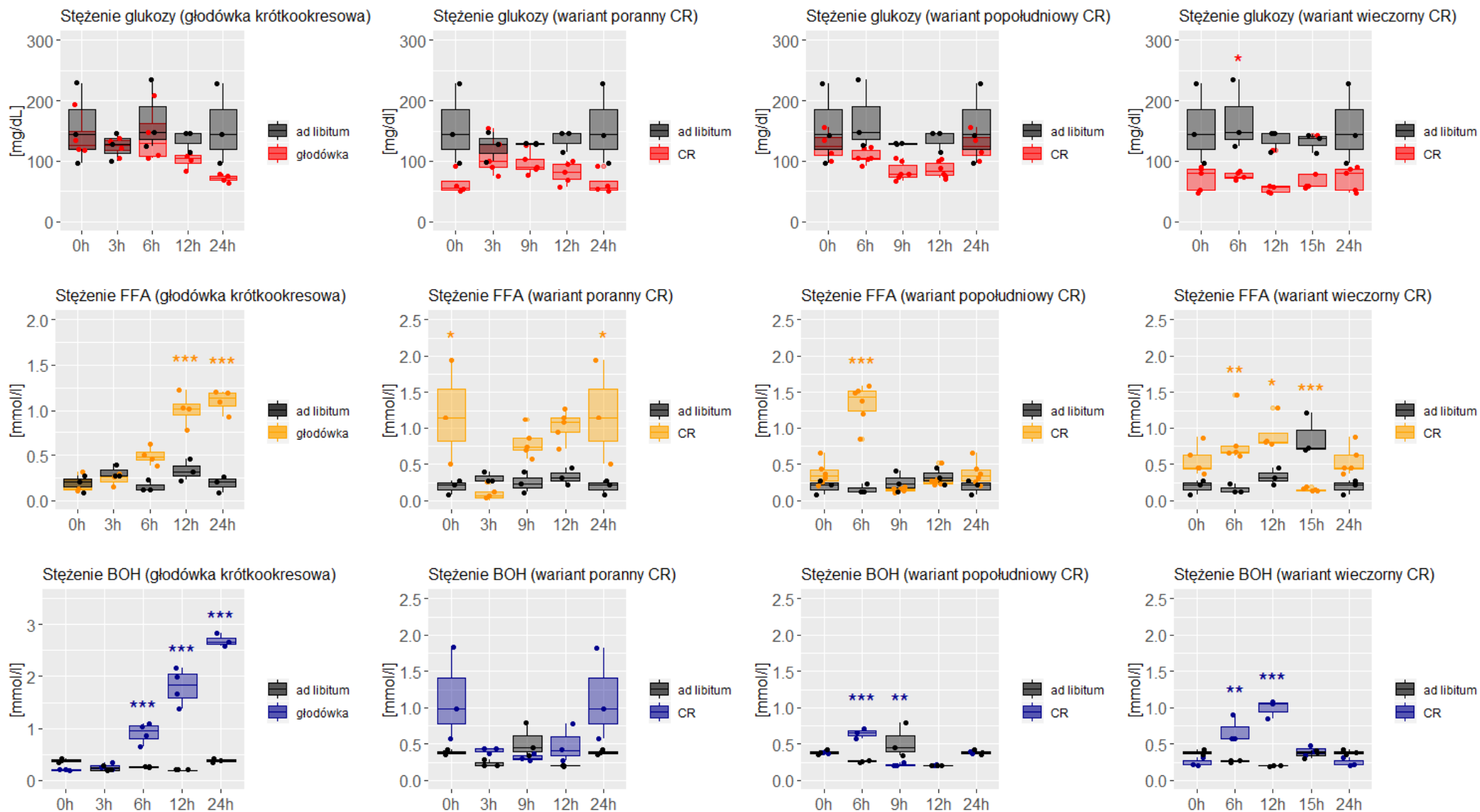


Rycina 11. Wpływ morbitalu na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w osoczu myszy typu dzikiego. Każdy punkt czasowy przedstawia wartość średnią dla jednej z dwóch grup zwierząt; liczba zwierząt w grupie wynosiła 3; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); *** $p < 0,001$

Wstępne próby analizy zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu dostarczyły wątpliwych danych. Uzyskiwano bowiem stężenia FFA na bardzo niskim poziomie, nawet u zwierząt, u których wprowadzano restrykcję pokarmową, co jest sprzeczne z ogólnie przyjętą wiedzą. Źródła literaturowe podają, iż jedną z możliwych przyczyn tych obserwacji może być wykorzystanie pentobarbitalu (substancji czynnej w preparacie morbital) do eutanazji zwierząt. W celu sprawdzenia wpływu pentobarbitalu na ostateczne wyniki w moich badaniach, zmierzono stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w cyklu okołodobowym u zwierząt w dwóch wariantach. W pierwszym wariantcie zwierzęta zostały poddane eutanazji poprzez podanie morbitalu, w drugim zaś poprzez szybką dyslokację kręgów szyjnych (bez użycia jakichkolwiek środków farmakologicznych). Wyniki potwierdziły wcześniejsze doniesienia. Widoczny wzrost zawartości FFA zaobserwowany został w fazie nieaktywnej

zwierząt (metabolizujących wówczas przede wszystkim trójglicerydy), tylko w wariancie nie wykorzystującym pentobarbitalu w celu uśmiercenia zwierząt (ryc. 11). Dalsze doświadczenia, związane z analizą metabolitów i hormonów, wykonane zostały więc tylko na osoczu pochodzącym od zwierząt poddanych eutanazji przez dyslokację kręgów szyjnych.

4.2 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu myszy typu dzikiego, w warunkach restrykcji pokarmowych



Rycina 12. Zawartość glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych w osoczu podczas 24h głódówki oraz w warunkach różnych wariantów restrikcji kalorycznej (CR) u myszy typu dzikiego, w cyklu okołodobowym. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta *ad libitum* (z wolnym dostępem do pokarmu). W wariantcie porannym CR pokarm dostarczano wraz z rozpoczęciem fazy aktywnej (0h), w wariantcie popołudniowym CR pokarm dostarczano w środku fazy aktywnej (6h), w wariantcie wieczornym CR pokarm dostarczano wraz z końcem fazy aktywnej (12h); liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 6; w analizie statystycznej wykorzystano test ANOVA jednoczynnikowy; *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001. FFA – wolne kwasy tłuszczowe, BOH – ciała ketonowe

W celu wybrania odpowiedniej strategii doświadczalnej do określenia wpływu mikroRNA na funkcjonowanie białej tkanki tłuszczowej wykonano wstępne badania różnych wariantów restrykcji pokarmowych. Stanowiły one czynnik wywołujący zmiany w gospodarce energetycznej i pozwoliły wyodrębnić punkty czasowe dla tych zmian, istotne z perspektywy dalszych doświadczeń.

Zgodnie z przewidywaniami, w przypadku każdego wariantu restrykcji pokarmowej (porannej, popołudniowej oraz wieczornej) rosła zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu, w odpowiedzi na zapotrzebowanie energetyczne organizmu. Utrzymanie malejącego stężenia glukozy, która dla części tkanek stanowi jedyne źródło energii np. mózgu, wiązała się również ze wzrostem stężenia ciał ketonowych, które w warunkach deficytu pokarmowego stanowią dla nich dodatkowe źródło ATP. Każdy z wariantów restrykcji kalorycznej (CR) wykazał podobną kinetykę zmian metabolitów energetycznych w cyklu okołodobowym. Wzrost FFA i KB następował w danym cyklu do chwili podania zwierzętom porcji pokarmu. Po 3 godz. od podania jedzenia odnotowano ich znaczny spadek, a następnie w kolejnych godzinach zawartość kwasów i ciał ketonowych rosła ponownie, osiągając swoje maksimum o stałej porze karmienia (ryc. 12).

Znając dynamikę zmian wybranych substratów energetycznych w poszczególnych wariantach restrykcji pokarmowych, możliwe było oszacowanie potencjalnego ich udziału w wytwarzaniu ATP (ryc. 13).

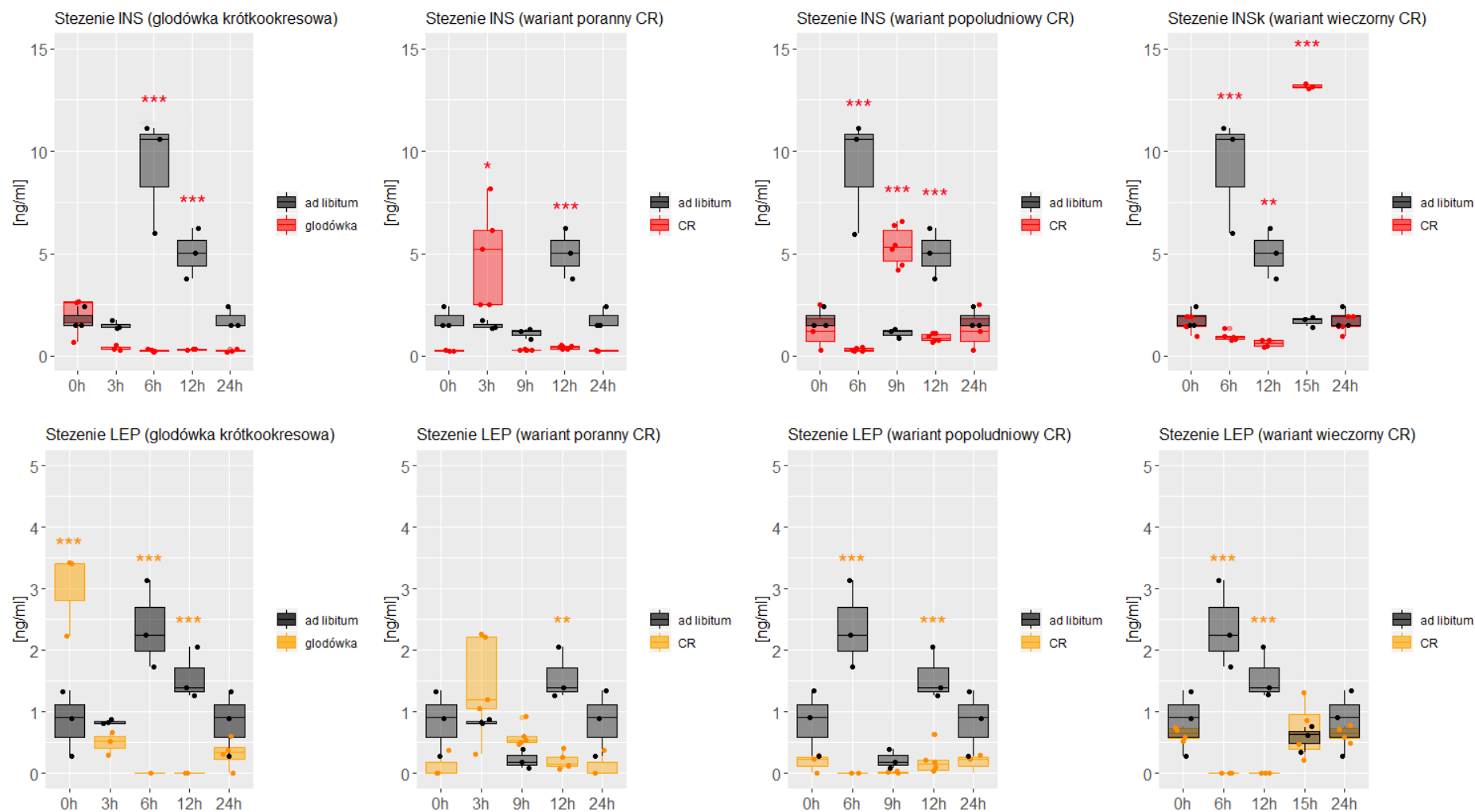


Rycina 13. Różnice w wykorzystaniu metabolitów energetycznych do produkcji ATP w trakcie 24-godzinnej głodówki oraz restrykcji kalorycznej (wariant wieczorny) u myszy typu dzikiego; liczba zwierząt w grupie w danym punkcie czasowym wynosiła od 3 do 6; słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej (SEM); na wykresach kołowych wartości stężeń ATP są wartościami średnimi dla danych punktów czasowych.

Opierając się na stechiometrii reakcji utleniania cząsteczek glukozy, kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych, można odczytać ilość moli cząsteczek ATP dostarczanych z utleniania 1 mola substratu energetycznego. Wynoszą one odpowiednio ≈ 38 (GLU), ≈ 129 (FFA) i ≈ 22 (KB). Korzystając z tej informacji wyliczono następnie średnią, potencjalną ilość ATP produkowaną w kluczowych punktach głodówki krótkookresowej oraz restrykcji kalorycznej i porównano z ilością ATP w grupach kontrolnych zwierząt. W przypadku głodówki były to 24 godz. od momentu wprowadzenia restrykcji, w przypadku CR była to pora karmienia zwierząt (w przedstawionym wariancie wieczornym; 12-sta godz. w cyklu restrykcji). Oszacowana liczba cząsteczek ATP w każdej z grup była zbliżona i zawierała się w granicach od 330 do 360. Otrzymane wyniki wskazują na to, że organizm stara się utrzymać możliwie stałą podaż wymiennika energii, prawdopodobnie w celu zapewnienia jak najdłuższego, optymalnego funkcjonowania i dzięki temu zwiększa szanse na przetrwanie. Utrzymanie ustalonej podaży jest kosztowne i w okresach deficytu pokarmowego zależne od wyjściowej zawartości trójglicerydów w tkance tłuszczowej. Jak już wspomniano, są one źródłem wysokoenergetycznych kwasów tłuszczowych a przez to także ciał ketonowych, powstających z tych kwasów. Organizm jest w stanie zapewnić dopływ nowych cząsteczek ATP tak długo, jak dostępne są zasoby zgromadzone w tkance tłuszczowej. Ponadto cząsteczki węglowodanów i kwasów tłuszczowych pełnią także funkcje strukturalne. Zaangażowanie ich w inne procesy aniżeli dostarczanie ATP, ma również wkład w ustalaniu ogólnego bilansu energetycznego.

Obserwowane zmieniające się wykorzystanie substratów energetycznych w restrykcjach pokarmowych zależy w dużej mierze od regulacji hormonalnej. Dlatego też w dalszej części badań postanowiono oznaczyć dwa hormony w głównej mierze zaangażowane w regulację poziomu glukozy we krwi czyli insulinę oraz w regulację wykorzystania kwasów tłuszczowych – leptynę (ryc. 14). Funkcjonowanie tkanki tłuszczowej wiąże się z działaniem różnych białek hormonalnych, natomiast leptyna jest głównym z nich, bezpośrednio zaangażowanym w homeostazę energetyczną.

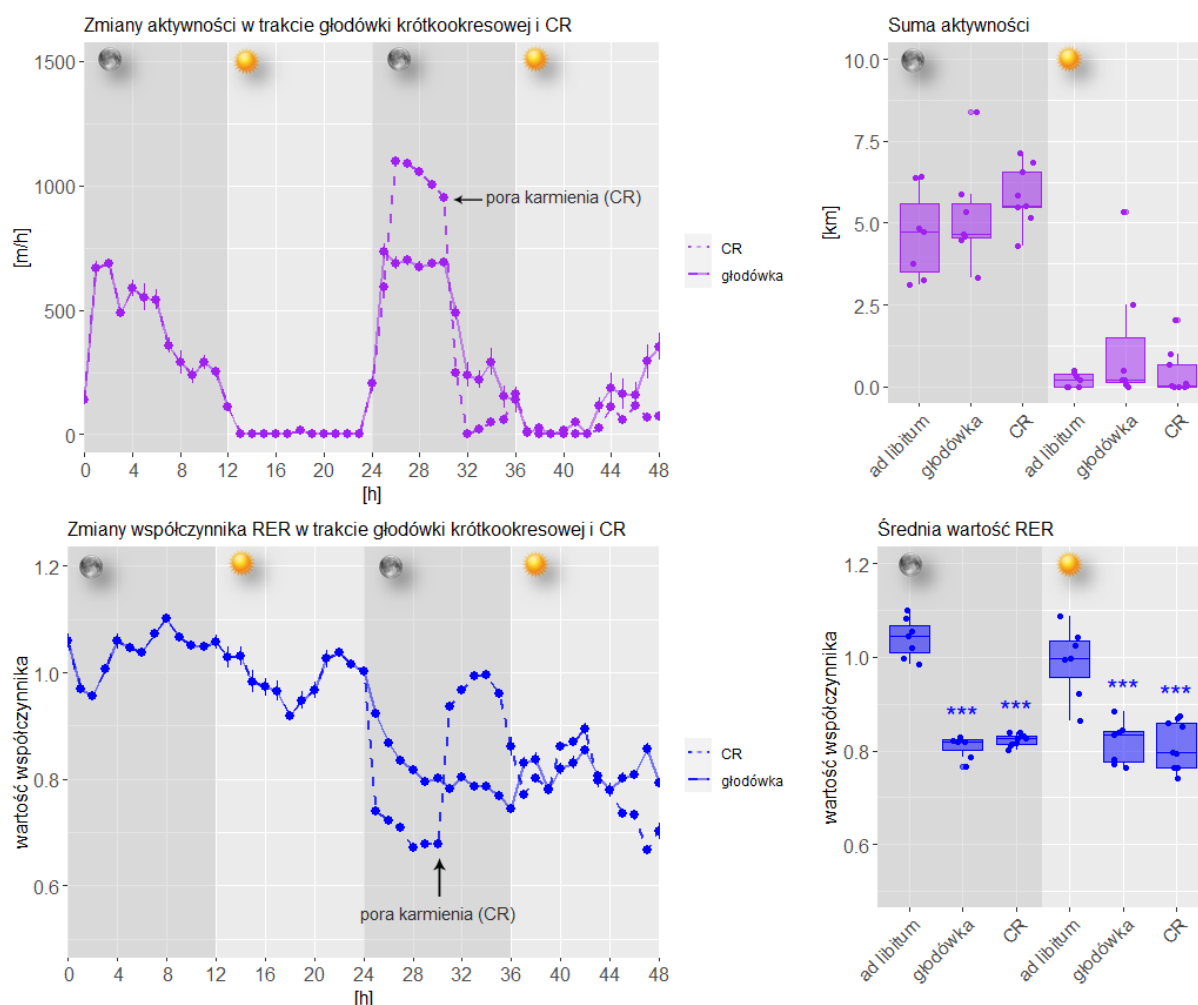
Brak pokarmu powodował spadek obydwu hormonów i utrzymanie niskiego poziomu bez znaczących fluktuacji. W każdym cyklu restrykcji kalorycznej, po 3 godzinach od podania porcji pokarmu zawartość hormonów zwiększała się, w reakcji na wzrastające stężenie węglowodanów we krwi w przypadku insuliny oraz informacje o możliwości odbudowania tkanki tłuszczowej w przypadku leptyny. Wyjściowa jak i aktualna objętość tkanki tłuszczowej zwierzęcia wydaje się istotna dla otrzymywanych wartości stężeń kwasów tłuszczowych i hormonu leptyny w doświadczeniu.

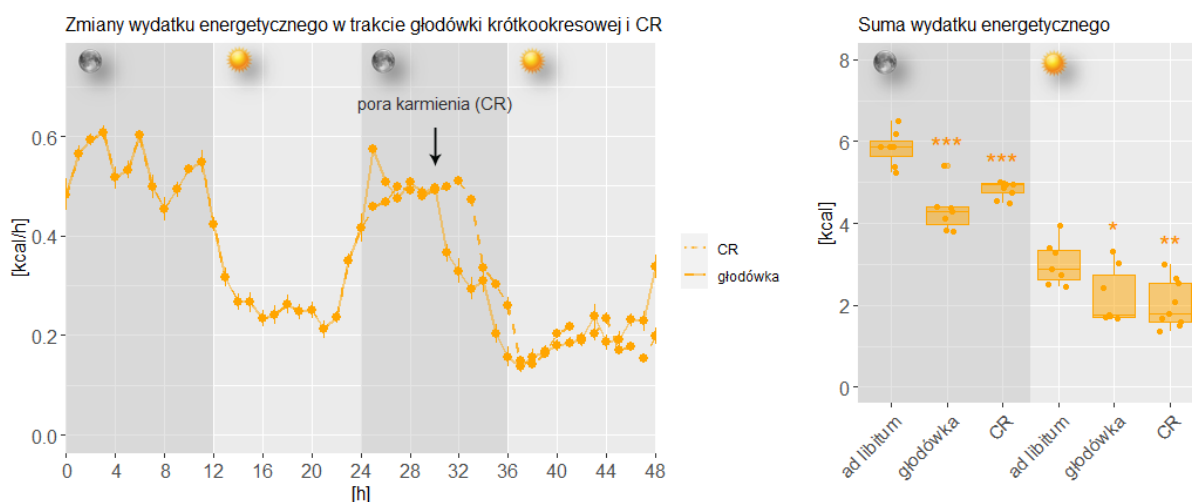


Rycina 14. Zawartość hormonów insuliny i leptyny w osoczu, podczas 24h głodówki oraz w warunkach różnych wariantów restrykcji kalorycznej (CR) u myszy typu dzikiego, w cyklu okołodobowym. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta *ad libitum* (z wolnym dostępem do pokarmu). W wariantcie porannym CR pokarm dostarczano wraz z rozpoczęciem fazy aktywnej (0h), w wariantcie popołudniowym CR pokarm dostarczano w środku fazy aktywnej (6h), w wariantcie wieczornym CR pokarm dostarczano wraz z końcem fazy aktywnej (12h); liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 6; w analizie statystycznej wykorzystano test ANOVA jednoczynnikowy; *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001. INS – insulina, LEP – leptyna

4.3 Wpływ restrykcji pokarmowych na metabolizm myszy typu dzikiego

Korzystając z systemu Phenomaster zmierzono szereg parametrów metabolicznych, z których najistotniejsze były wskaźniki wydatku energetycznego, aktywności oraz współczynnika oddechowego (RER). Pomiary wagi, choć istotne i pożądane, zostały wykluczone ze względu na wysokie obciążenie błędem, który wynikał z konstrukcji i aplikacji sensorów wagowych, dokonujących pomiar ciężaru zwierzęcia. Problematiczne również były próby mierzenia ciężaru zwierząt (umiejscowionych w klatkach metabolicznych) za pomocą zwykłej wagi. Jakakolwiek ingerencja w system Phenomaster, związana z otwarciem klatek metabolicznych, powodowała wymianę powietrza między wnętrzem klatki a środowiskiem zewnętrznym i zaburzenia w pomiarach parametrów, co uniemożliwiało prawidłowe działanie systemu. Wszelkie pomiary parametrów, których wartości powinny być normalizowane do wagi zwierzęcia, zostały zestawione z wartościami bazowymi (z ang. *baseline*) dla tych parametrów, z okresu przed wprowadzeniem restrykcji pokarmowych (ryc. 15).





Rycina 15. Porównanie zmian parametrów metabolicznych w trakcie 24-godzinnej głodówki oraz restrykcji kalorycznej (variant popołudniowy), wykonane na tych samych grupach zwierząt; pierwsze 24 godziny stanowiły dobę z wolnym dostępem do pokarmu (*baseline*), w kolejnych 24 godzinach prowadzono restrykcję pokarmową; liczba zwierząt w grupie wynosiła 7 lub 8; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej (*ad libitum*); *p<0,05 **p<0,005 ***p<0,001

Wyniki z klatek metabolicznych pokazały zmiany w rytmie okołodobowym zwierząt, poddanych różnym restrykcjom pokarmowym. Wprowadzenie restrykcji kalorycznej znacząco wzmacniało aktywność zwierząt do czasu otrzymania porcji pokarmu w każdym wariancie CR. Najprawdopodobniej wprowadzenie ograniczeń pokarmowych odzwierciedlone jest w zachowaniu myszy czyli aktywnym poszukiwaniu jedzenia (z ang. *food-seeking behavior*), które ustępuje niemal natychmiast po jego otrzymaniu. Rozpoczęcie głodówki krótkoterminowej (24-godzinnej) miało natomiast nieznaczny wpływ na zmiany aktywności. Niewielki wzrost zaobserwowano w pierwszej połowie fazy nocnej i pod koniec fazy dziennej zwierząt. Trzeba zaznaczyć jednak, że w obydwu przypadkach restrykcji pokarmowych, pomimo zaobserwowanych fluktuacji w ciągu doby (w obydwu fazach aktywności), całkowity dystans pokonany przez zwierzęta nie uległ zmianie (ryc. 15).

Każdy z cykli dobowych CR charakteryzował się okresową, bardzo niską wartością współczynnika wymiany oddechowej, niższą niż w przypadku 24-godzinnej głodówki. Może to świadczyć o znacznie lepszej wydajności w wykorzystaniu wolnych kwasów tłuszczowych do produkcji ATP i być może włączenia do procesu uzyskania energii także ciał ketonowych. Konfrontując wyniki z systemu Phenomaster z wynikami dla substratów energetycznych z osocza, zaskakujący jest mniejszy spadek współczynnika RER w głodówce krótkookresowej, przy jednoczesnej wysokiej zawartości ciał ketonowych. Jest jednak prawdopodobne, że przy dużej podaży kwasów tłuszczowych ciała ketonowe nie były wykorzystywane w procesach utleniania i wytwarzania energii. Inne wyjaśnienia można doszukiwać się też w odrębnych

grupach zwierząt wykorzystanych do obydwu doświadczeń i przez to w przesunięciach w czasach inicjacji poszczególnych procesów metabolicznych. Prawdopodobny (a nawet spodziewany) jest spadek współczynnika wymiany oddechowej w miarę przedłużania czasu głodówki bądź wprowadzania cyklicznej restrykcji pokarmowej, jak w przypadku CR. U zwierząt z wprowadzoną restrykcją kaloryczną, od chwili konsumpcji karmy wskaźnik RER rósł bardzo szybko, osiągając poziom, charakteryzujący spalanie przede wszystkim węglowodanów. Poziom ten spodziewanie obniżał się w miarę jak porcja pokarmu została zjedzona, a pula uwolnionych węglowodanów wyczerpana. Ze względu na cykliczne fluktuacje współczynnika oddechowego u zwierząt CR, średnia wartość RER w każdej fazie dobowy była ostatecznie zbliżona do wartości RER u zwierząt poddanych głodówce.

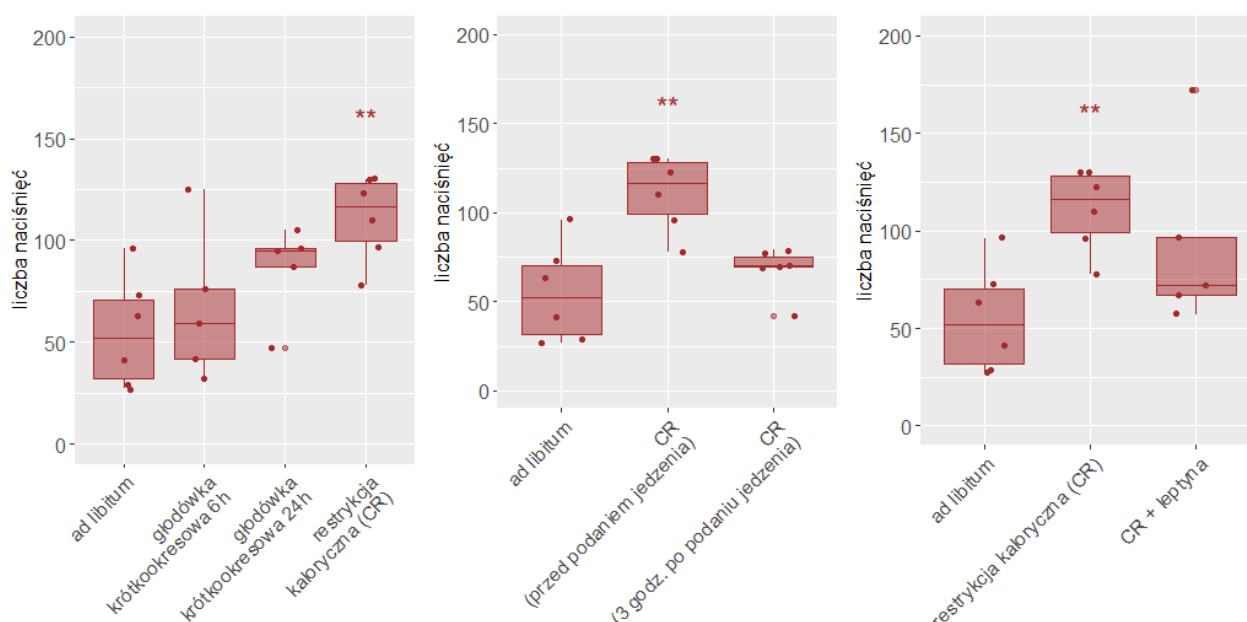
Ogólny wydatek energetyczny na skutek ograniczeń kalorycznych uległ obniżeniu. Wydawać by się mogło, że zwłaszcza początkowe etapy wprowadzenia restrykcji pokarmowej nie będą wpływały na całkowitą ilość spalanych kalorii, a utrzymanie stałego poziomu ich wydatku odbywać by się miało kosztem utylizacji zapasów lipidowych i tym samym spadku wagi zwierzęcia. Tymczasem wydatek energetyczny w głodówce 24-godzinnej był nawet niższy aniżeli w cyklach restrykcji kalorycznej (CR), przy zachowaniu tego samego (ilościowego) poziomu aktywności w ciągu doby. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z tezą, według której organizm stara się bronić pewnego poziomu energetycznego w postaci magazynu tkanki tłuszczowej (z ang. *defended adiposity*), zarządzając m.in. wydatkiem energetycznym, zależnie od podaży substratów. Już w latach '90 XX w. Jeffrey Friedman potwierdził, że hormon leptyny jest jednym z białek, pośrednio odpowiedzialnym za taką regulację (Friedman, 1997).

4.4 Wpływ restrykcji pokarmowych i hormonu leptyny na motywację myszy typu dzikiego do zdobywania pokarmu

Aktywne poszukiwanie pokarmu w okresie deficytu energetycznego jest niezbędne zwierzęciu do przetrwania. W odpowiedzi na niską podaż substratów energetycznych organizm obniża wydatkowanie kalorii, jednak taki stan ma swoje oczywiste ograniczenia. Przedstawiony w poprzednim doświadczeniu wzrost aktywności zwierzęcia głodzonego można rozumieć jako jego chęć/motywację do uzupełnienia brakujących kalorii. Aby zestawić pomiar aktywności zwierząt w restrykcjach pokarmowych z pomiarem ich motywacji, wykorzystano w doświadczeniu klatkę Skinnera (ryc. 16). Analogicznie do wyników otrzymanych przy

użyciu systemu Phenomaster, najwyższą motywacją odznaczały się zwierzęta utrzymywane w restrykcji kalorycznej, w czasie sprzed pory karmienia. Zgodnie z przewidywaniami motywacja ta spadała do poziomu grupy kontrolnej zaraz po zaspokojeniu deficytu kalorycznego. Niższy stopień motywacji reprezentowały zwierzęta po jednorazowym, 24-godzinny głodzeniu. Mimo wyższych wartości od zwierząt kontrolnych, utrzymywały się one na granicy istotności statystycznej, co również pokrywało się z wynikami aktywności z klatek metabolicznych (ryc.15).

W doświadczeniu zbadano wpływ białka leptyny na stopień motywacji. Efekt działania tego hormonu na podwzgórzowy ośrodek głodu i sytości oraz pośredni wpływ na ośrodki lokomotoryczne/motywacyjne był jasno zaznaczony w moim badaniu. Podanie hormonu leptyny zwierzętom wykazującym największą motywację do zdobycia pokarmu, skutkowało zauważalnie zmniejszoną liczbą naciśnień dźwigni. Liczba ta statystycznie nie różniła się od liczby naciśnień przez zwierzęta z grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiło jedno zwierzę, u którego stopień motywacji był nieoczekiwanie bardzo wysoki. Możliwe było jednak, że ze względu na różnice osobnicze, tempo usuwania białka było szybsze u tego osobnika niż wskazywałyby na to przyjęty czas połowicznego rozkładu leptyny w organizmie. Przyjęto zatem, że szczytowy moment działania hormonu leptynowego rozminął się w czasie z momentem testowania tego zwierzęcia w klatce Skinnera (ryc. 16).



Rycina 16. Stopień motywacji zwierząt mierzony liczbą naciśnień dźwigni w klatce Skinnera; testowano wpływ restrykcji pokarmowych oraz hormonu leptyny na zmiany stopnia motywacji; liczba zwierząt w grupie wynosiła 5 lub 6; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej (*ad libitum*); ** $p < 0,005$

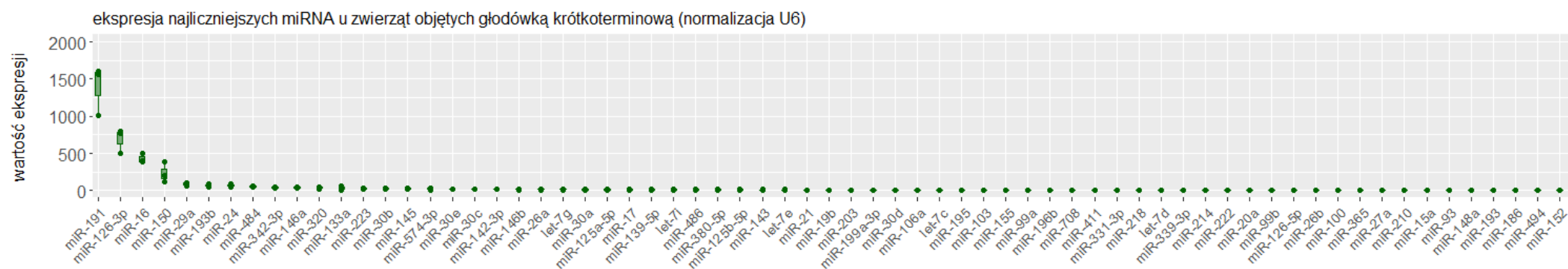
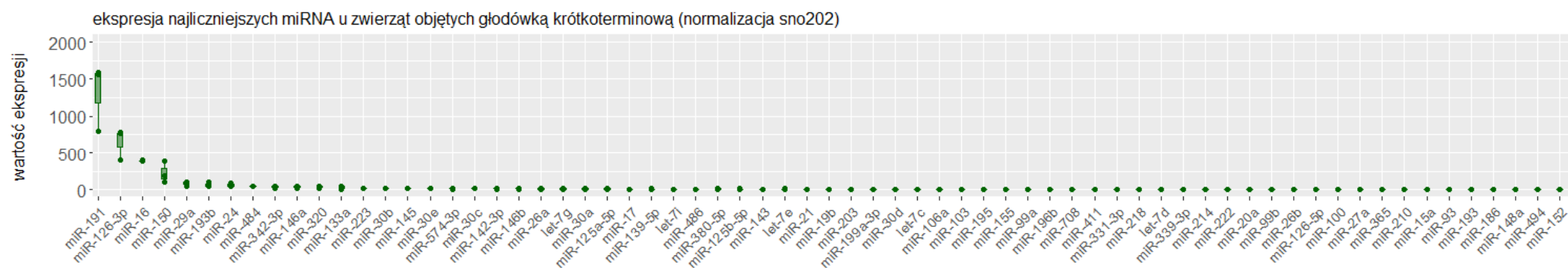
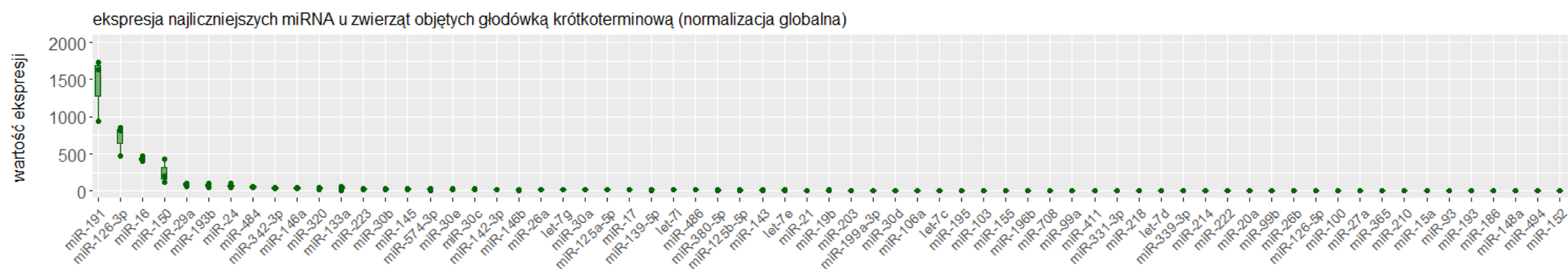
4.5 Profil mikroRNA w białej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, w warunkach restrykcji pokarmowych.

Cechą wspólną głodówki krótkookresowej i restrykcji kalorycznej (CR) w moim badaniu jest 24-godzinny okres odstąpienia od pokarmu. W przypadku głodówki jest to usunięcie jednorazowe, zaś w przypadku CR wielokrotne, powtarzające się cyklicznie. Przyjęto zatem, że głodówka krótkookresowa pozwoli prześledzić początek ewentualnych zmian w profilu mikroRNA tkanki tłuszczowej, zaś restrykcja kaloryczna określić już ustabilizowany poziom tych cząsteczek, uczestniczących w podtrzymaniu zmiany metabolicznej.

Do przeprowadzenia profilowania mikroRNA istotne było dobranie kluczowych punktów czasowych w trakcie trwania restrykcji pokarmowych. Posłużyły temu wyniki z wcześniejszych doświadczeń. Czas przypadający na środek fazy aktywnej zwierząt objętych 24-godzinną głodówką odznaczał się początkiem prostoliniowego przyrostu wolnych kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych oraz istotnym spadkiem zawartości glukozy w osoczu. Była to 6 godzina od rozpoczęcia głodówki, w której nastąpiło uruchomienie procesów adaptacyjnych do nowych warunków pokarmowych. W tej samej porze dnia (w tej samej godzinie) odbywało się karmienie zwierząt objętych CR w wariacie popołudniowym. U zwierząt tych procesy adaptacyjne zostały zakończone i obserwowano identycznie powtarzające się cykle szybkich przemian metabolicznych w odpowiedzi na warunki pokarmowe. Ze względu na fakt, że wszystkie warianty restrykcji pokarmowych przebiegały analogicznie, wybrany przez nas wariant popołudniowy pozwolił przeprowadzić analizę mikroRNA z jednego punktu czasowego – wspomnianej 6 godziny fazy nocnej – dla obydwu wariantów restrykcji pokarmowych.

Uzyskane wartości ekspresji pozwoliły prześledzić grupę najliczniej występujących mikroRNA (ryc. 17). Do grupy tej zaliczały się miR-191, miR-126-3p, miR-193b oraz miR-150, miR-16. Ich wysoka zawartość potwierdziła aktualne doniesienia literaturowe, wykazujące szereg mikroRNA charakterystycznych dla białej tkanki tłuszczowej (Brandão, Guerra, & Mori, 2017). Zawartość tych cząsteczek odznaczała się wysokim poziomem ekspresji w każdej z grup doświadczalnych.







Rycina 17. Ekspresja mikroRNA o najwyższym poziomie w białej tkance tłuszczowej u zwierząt kontrolnych (*ad libitum*) oraz zwierząt objętych restrykcjami pokarmowymi; wartości ekspresji zostały znormalizowane do zaznaczonych kontroli endogennych lub znormalizowane globalnie; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 5.

Wyselekcjonowano następnie grupy wszystkich mikroRNA istotnie statystycznie zmienionych w restrykcjach pokarmowych, w stosunku do grupy kontrolnej (ryc. 18-22).

miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-223	0.00527**	1.691782	27.493821
miR-30a	0.00554**	1.670179	13.800226
let-7i	0.00604**	1.667831	13.506323
miR-30d	0.02479*	1.850291	6.819445
miR-182	0.02625*	2.032559	0.849239
miR-322	0.02915*	-2.157640	1.130256

Rycina 18. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, poddanych **głodówce krótkookresowej** (6-ta godzina fazy nocnej); wartości ekspresji zostały **znormalizowane globalnie** i odniesione do grupy kontrolnej (*ad libitum*)

miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-99b	0.00759**	1.936598	3.3280393
miR-223	0.01045*	2.195410	27.0966753
let-7i	0.01067*	2.169138	13.3141557
miR-30a	0.01156*	2.174047	13.6072129
miR-376a	0.01600*	1.905738	0.2079867
miR-182	0.01795*	2.574640	0.8375865
miR-30d	0.01814*	2.304861	6.7276953
miR-744	0.02544*	2.521721	0.6765438
miR-20b	0.03293*	2.076432	0.2126238
miR-125a-5p	0.03711*	1.627052	13.5767569
miR-16	0.04665*	1.584118	428.7325863
miR-145	0.04676*	1.597720	26.7080922
miR-218	0.04925*	1.572565	3.3716865

Rycina 19. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, poddanych **głodówce krótkookresowej** (6-ta godzina fazy nocnej); wartości ekspresji zostały **znormalizowane względem genu U6** i odniesione do grupy kontrolnej (*ad libitum*)



miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-29c	0.00043***	29.181022	21.92258231
miR-199a-3p	0.00067***	-5.265568	1.31832503
miR-196b	0.00069***	7.134101	22.45255894
miR-218	0.00101**	-6.188361	0.47342865
miR-21	0.00189**	-26.942335	0.21327036
miR-145	0.00214**	-2.860157	8.02794926
miR-27a	0.00244**	-5.014438	0.41378874
miR-125a-5p	0.00254**	-2.505577	4.55807684
miR-15b	0.00257**	-6.593054	0.19490530
miR-188-5p	0.00309**	12.446211	2.19133366
miR-146b	0.00368**	-2.690726	5.13806170
let-7i	0.00376**	-56.831524	0.14249372
let-7e	0.00403**	-4.902578	2.34102907
miR-210	0.00487**	-6.571087	0.37447107
miR-142-3p	0.00521**	-15.021953	1.12825562
miR-30b	0.00620**	-3.275552	9.99097006
miR-322	0.00621**	-16.552835	0.14732738
miR-15a	0.00630**	-11.343322	0.21438535
miR-27b	0.00641**	-3.917429	0.26087938
miR-146a	0.00739**	-4.810520	8.27271266
miR-93	0.00761**	-3.655000	0.67317929
miR-680	0.00852**	4.205460	0.81665011
miR-23a	0.01103*	-7.662067	0.13282626
miR-223	0.01253*	-3.132272	5.18837340
miR-365	0.01409*	-2.819746	0.87838243
miR-99b	0.01561*	-2.492841	0.97045317
miR-25	0.01627*	-3.617520	0.10769133
miR-451	0.01664*	-3.688582	0.21021427
miR-125b-5p	0.02098*	-6.372164	2.24761726
miR-126-5p	0.02234*	9.315598	32.25334892
miR-142-5p	0.03066*	-20.975272	0.10319440
miR-140	0.03208*	-1.962207	0.52994080
miR-342-3p	0.03478*	-3.665972	11.07321618



let-7b	0.03510*	-3.560649	0.49439314
miR-148a	0.03677*	-1.920281	0.53022729
miR-19b	0.03860*	-3.976852	1.85512420
miR-29a	0.04043*	-1.783367	37.49290385
miR-30a	0.04233*	-1.742924	4.74072483
miR-340-5p	0.04634*	-5.151238	0.06920109
miR-139-5p	0.04758*	1.593475	22.19548115
miR-30e	0.04825*	2.552969	38.13810888

Rycina 20. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, poddanych **głodówce krótkookresowej** (6-ta godzina fazy nocnej); wartości ekspresji zostały **znormalizowane globalnie** i odniesione do grupy kontrolnej (*ad libitum*)

miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-29c	0.00574**	83.793194	70.2356724
miR-196b	0.00592**	23.175212	71.6810163
miR-21	0.00700**	-8.799182	0.6079704
miR-411	0.00710**	4.006934	10.1013125
miR-191	0.00873**	3.678695	4355.1722856
miR-139-5p	0.00984**	5.254512	71.2279299
miR-19a	0.00997**	3.200462	1.2386903
miR-320	0.01133*	4.150215	139.6778756
miR-376a	0.01248*	3.853862	0.5553321
miR-130a	0.01423*	9.279759	6.9035334
miR-195	0.01664*	3.462644	17.2770777
let-7i	0.01822*	-15.435188	0.4920948
miR-30e	0.02004*	8.293323	116.2902836
miR-322	0.02095*	-4.405677	0.5180299
miR-103	0.02170*	9.092872	31.5532538
miR-188-5p	0.02322*	44.310260	7.9133671
miR-15a	0.02596*	-3.711855	0.6107083
miR-328	0.02773*	4.796683	2.0660624
miR-106a	0.02778*	4.855259	16.7801399
miR-126-5p	0.02852*	27.629439	101.7257414
miR-494	0.02930*	5.163918	4.4375973
miR-142-3p	0.03304*	-4.547739	3.5106116



miR-744	0.03501*	2.774567	1.1850574
miR-542-5p	0.03584*	3.928102	0.5181271
miR-484	0.03671*	3.576969	132.2318579
miR-16	0.03915*	1.894240	653.5178271
miR-222	0.04100*	3.398577	8.5146524
miR-680	0.04258*	14.441409	2.8039857
miR-708	0.04803*	3.120681	8.4034660
miR-410	0.04921*	2.607407	0.2441580

Rycina 21. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego poddanych **restrykcji kalorycznej (CR)** (6-ta godzina fazy nocnej); wartości ekspresji zostały **znormalizowane względem genu *sno202*** i odniesione do grupy kontrolnej (*ad libitum*)

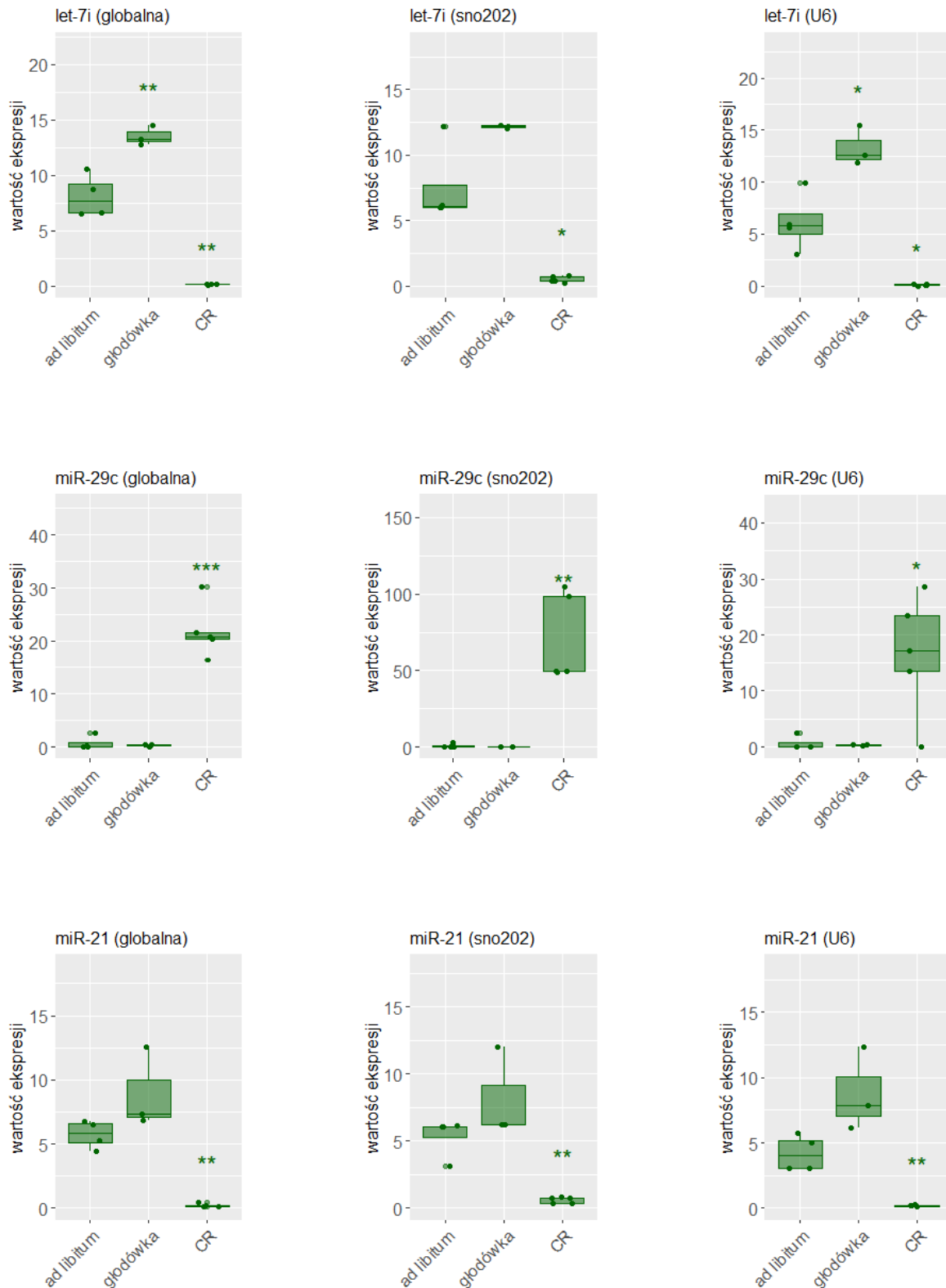
miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-199a-3p	0.00307**	-6.348852	0.98578169
miR-322	0.00725**	-15.083451	0.14343093
miR-210	0.00736**	-7.450955	0.29280700
miR-214	0.00737**	-4.510959	0.69358638
miR-29c	0.00828**	24.135958	20.65569144
miR-23a	0.00837**	-5.788465	0.12428288
miR-126-5p	0.00887**	6.552550	25.18057736
miR-196b	0.00955**	7.123106	21.30303908
miR-21	0.01008*	-27.498750	0.19073323
miR-218	0.01356*	-7.733991	0.34653335
miR-93	0.01482*	-3.824414	0.57193933
let-7e	0.01657*	-4.535232	2.30844248
miR-99b	0.01921*	-3.144450	0.68314717
miR-146b	0.02037*	-2.754744	4.54174167
miR-451	0.02147*	-4.553476	0.16098515
miR-145	0.02318*	-3.348942	6.23942317
let-7i	0.02452*	-55.513644	0.13820912
miR-130a	0.02490*	2.867735	2.20200615
miR-142-3p	0.03365*	-14.864650	1.08864332
miR-15a	0.03416*	-12.251444	0.19161716
miR-142-5p	0.03951*	-14.589965	0.11028058
miR-27a	0.04338*	-5.368421	0.36692838
miR-340-5p	0.04908*	-5.754209	0.05743991

Rycina 22. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, poddanych **restrykcji kalorycznej (CR)** (6-ta godzina fazy nocnej); wartości ekspresji zostały **znormalizowane względem genu *U6*** i odniesione do grupy kontrolnej (*ad libitum*)

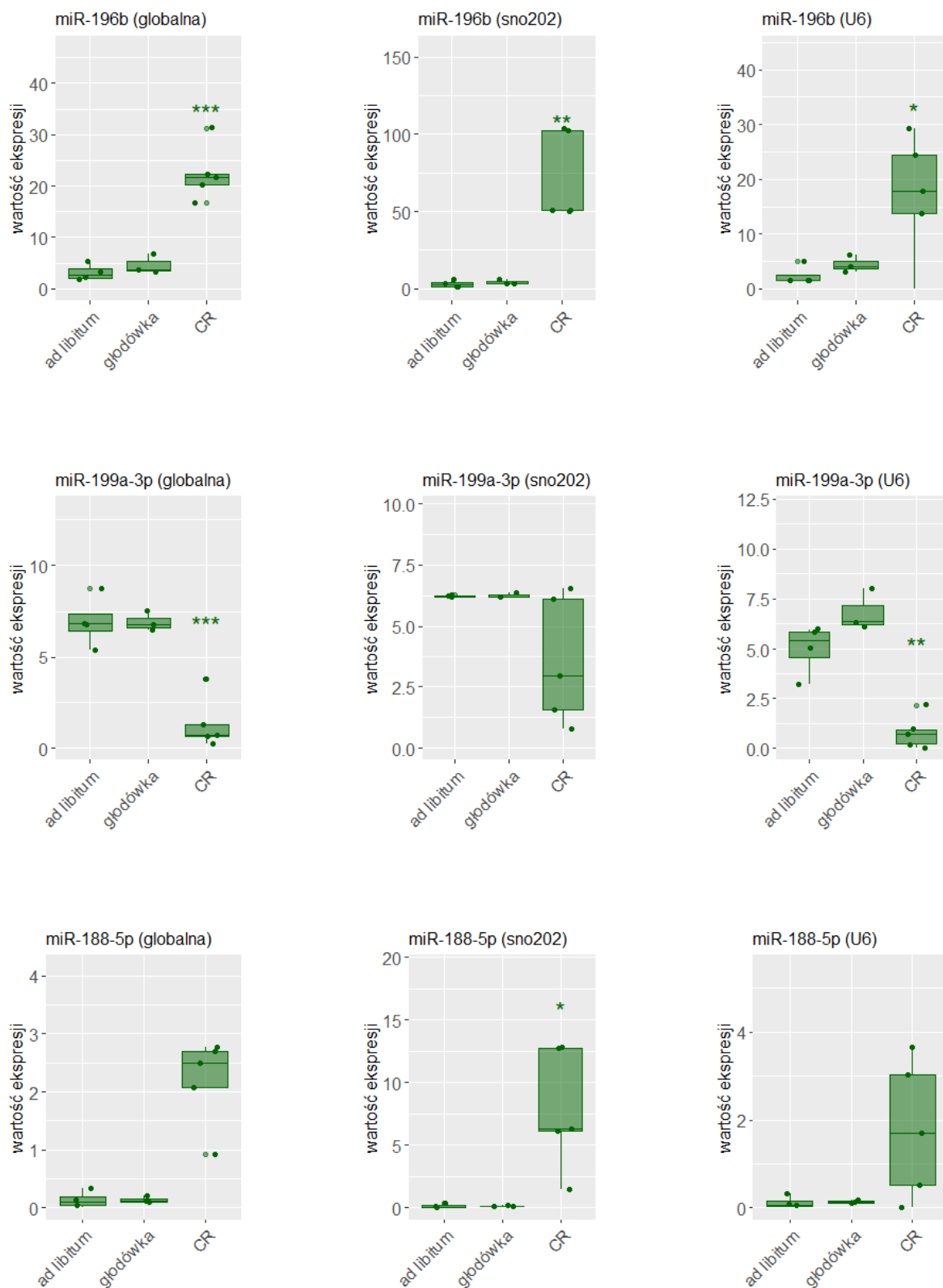
Stosując 3 różne metody normalizacji wyników ekspresji w każdej z restrykcji pokarmowych, tylko normalizacja do genu *sno202* w przypadku głodówki krótkookresowej nie wykazała żadnych istotnych statystycznie zmian w poziomach mikroRNA. W przypadku zastosowania pozostałych metodach normalizacji zmiana w profilu mikroRNA była zauważalna. Jednocześnie w grupie zwierząt poddanym głodówce krótkookresowej liczba wyselekcjonowanych cząsteczek była niższa. Mając na uwadze, że ta forma restrykcji pokarmowej miała w tym doświadczeniu reprezentować początek zmian metabolicznych związanych z utylizacją substratów energetycznych, mniejsza liczba zmienionych istotnie mikroRNA nie była zaskoczeniem. Wzrost ich liczby natomiast był spodziewany w miarę postępowania zmian metabolicznych i rzeczywiście, zgodnie z oczekiwaniem wykazały to wyniki w grupie zwierząt objętych restrykcją kaloryczną (CR).

Nadrzędnym wnioskiem płynącym z wyników profilowania mikroRNA jest udział wielu cząsteczek mikroRNA białej tkanki tłuszczowej, a nie jednej lub kilku, w zmianach metabolicznych związanych z wprowadzeniem restrykcji pokarmowych. Niestety, ten fakt komplikuje próbę wyjaśnienia wpływu pojedynczych mikroRNA na zmiany metaboliczne. Aby zaproponować grupę tych cząsteczek, które mogą być kluczowe dla badanego problemu, pokierowano się przede wszystkim wskaźnikiem istotności statystycznej zmian w poziomach mikroRNA w porównywanych grupach zwierząt oraz krotnością zmiany. Wyodrębnione w ten sposób mikroRNA i dane charakteryzujące zmiany ich poziomu zebrano na wykresach poniżej (ryc. 23-25).

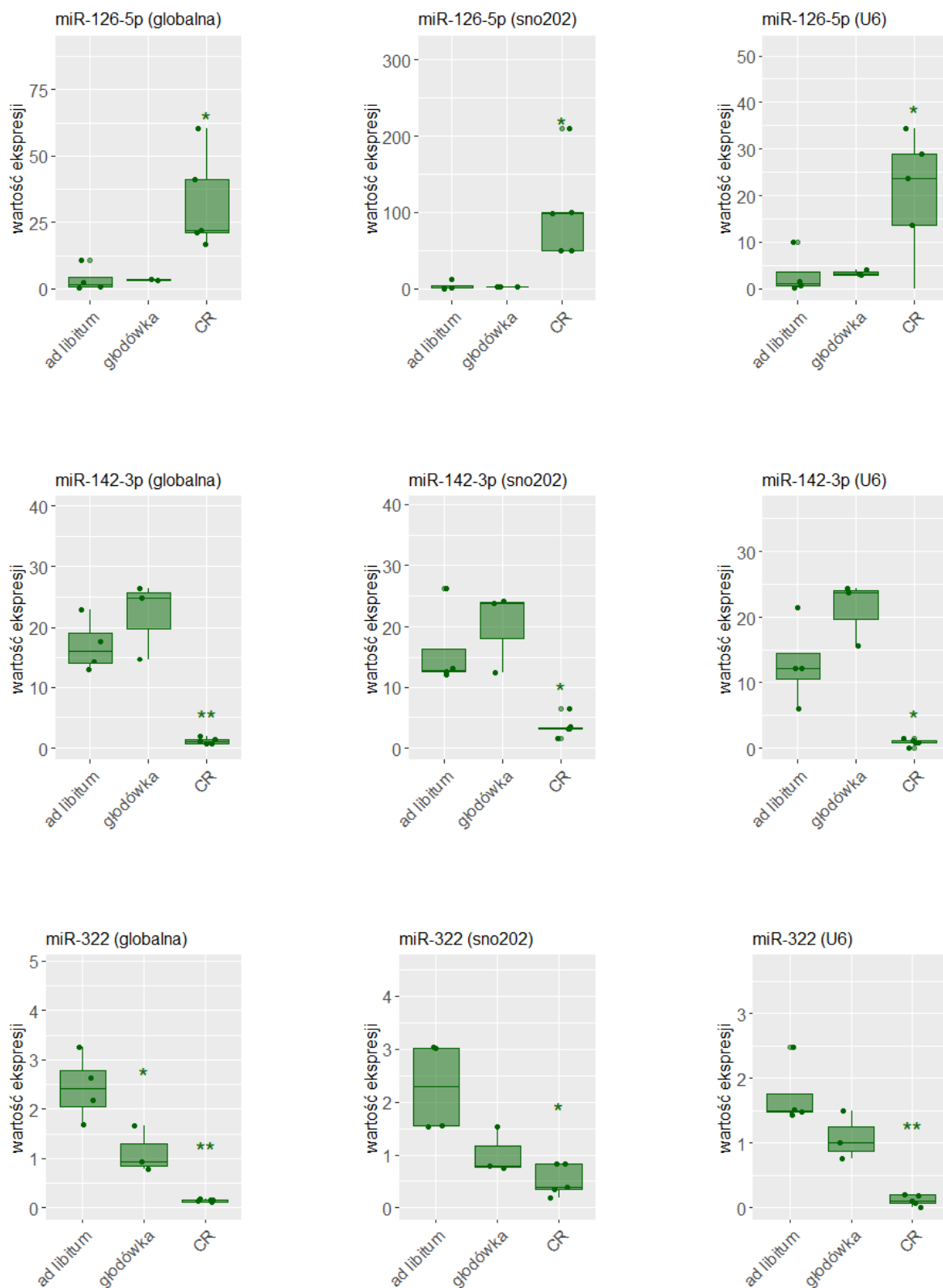




Rycina 23. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej we wprowadzonych restrykcjach pokarmowych u myszy typu dzikiego; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genów *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 5; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej (*ad libitum*); * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



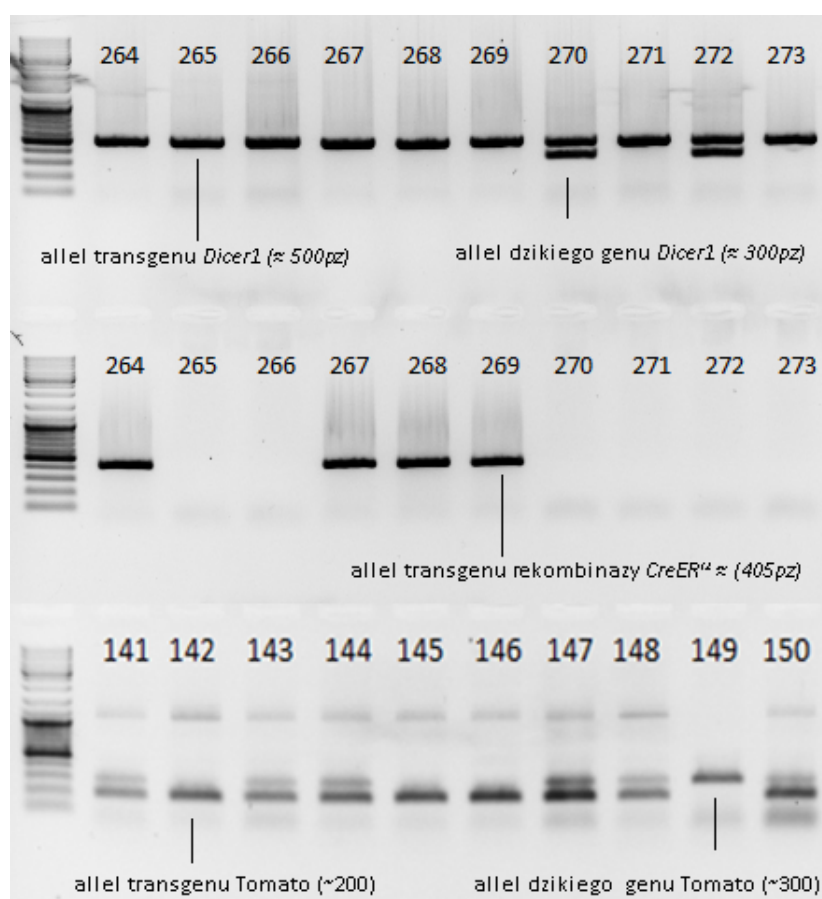
Rycina 24. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej we wprowadzonych restrykcjach pokarmowych u myszy typu dzikiego, cd.; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genów *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 5; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej (*ad libitum*); * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



Rycina 25. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w białej tkance tłuszczowej we wprowadzonych restrykcjach pokarmowych u myszy typu dzikiego, cd.; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genów *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 5; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej (*ad libitum*); * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

4.6 Wynik genotypu zwierząt transgeniczných $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ oraz $tdTomatoDicer^{AdipoqCreERT2}$

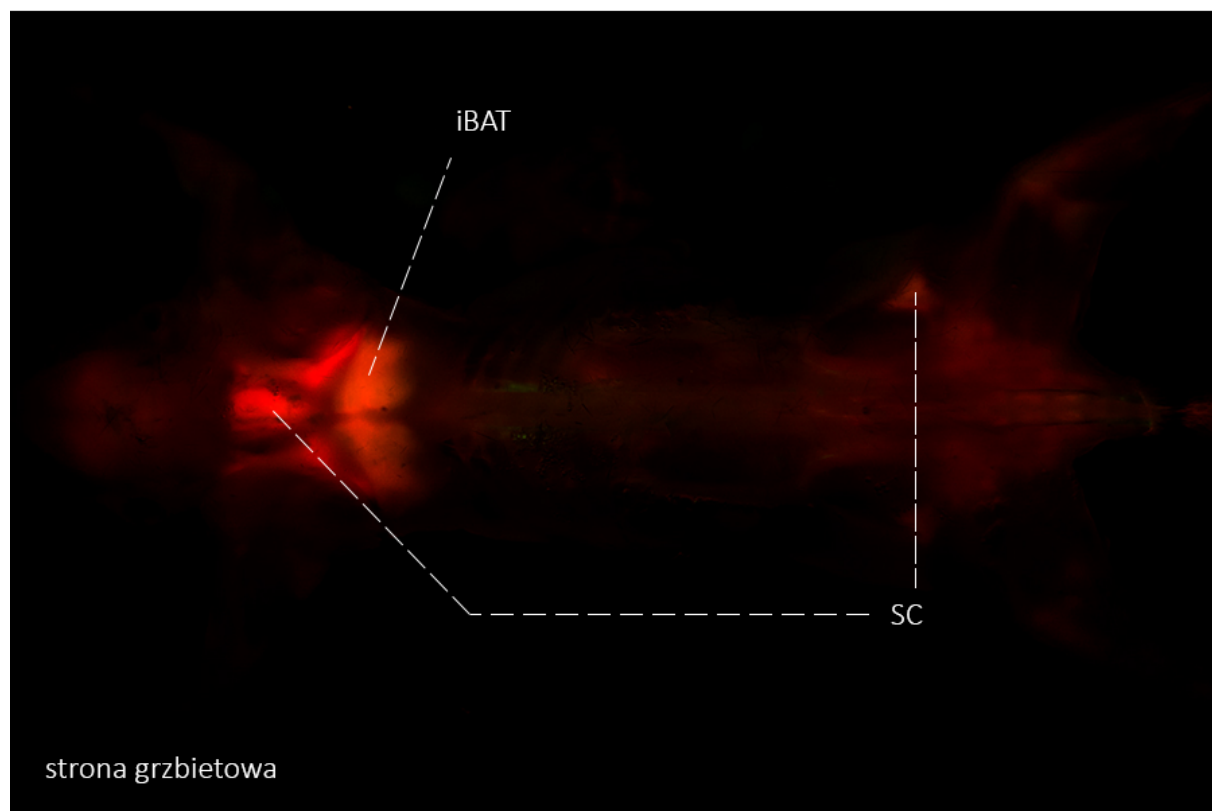
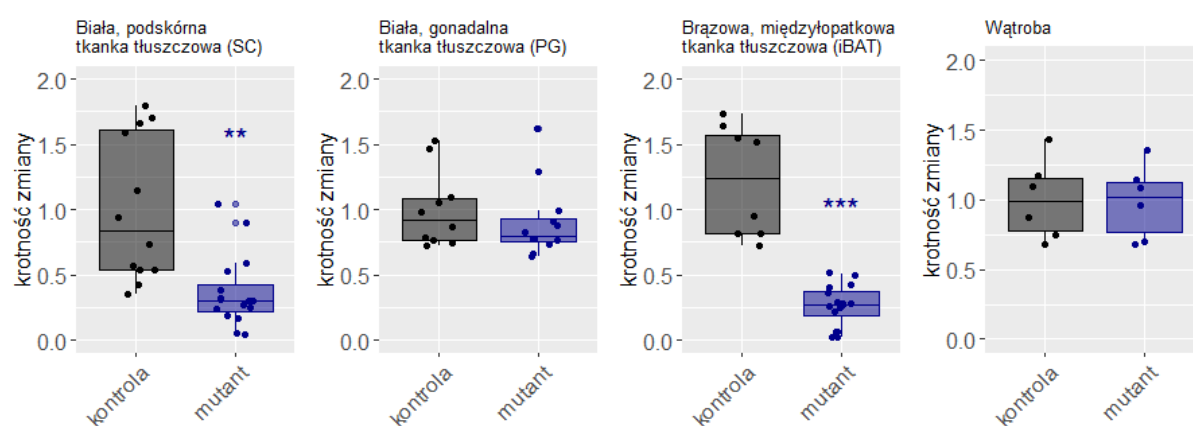
W oparciu o wiedzę o powiązaniu mikroRNA ze zmianami w stosowanych restrykcjach pokarmowych, został zbadany wpływ usunięcia globalnego mikroRNA w białej tkance tłuszczowej na funkcjonowanie organizmu. W tym celu wykorzystano transgeniczną linię myszy $Dicer^{AdipoqCreERT2}$, u której istnieje możliwość indukcji wycięcia fragmentu genu *Dicer1*, niezbędnego dla powstawania w pełni funkcjonalnych cząsteczek mikroRNA. Dla skutecznego pozbawienia zwierzęcia cząsteczek mikroRNA, niezbędne było dobranie zwierząt transgeniczných zawierających obydwa zmutowane allele genu *Dicer1* z obecnym allele genu rekombinazy Cre. Gen *tdTomato* posłużył w badaniu jedynie do sprawdzenia skuteczności mutacji, zaindukowanej przez podanie Tamoxifenu.



Rycina 26. Wyniki elektroforezy na żelu agarozowym pozwalającym dobrać do badania zwierzęta o odpowiednim genotypie.

4.7 Weryfikacja skuteczności działania systemu *Cre-loxP* u zwierząt transgeniczych *Dicer^{AdipoqCreERT2}* oraz *tdTomato^{AdipoqCreERT2}*

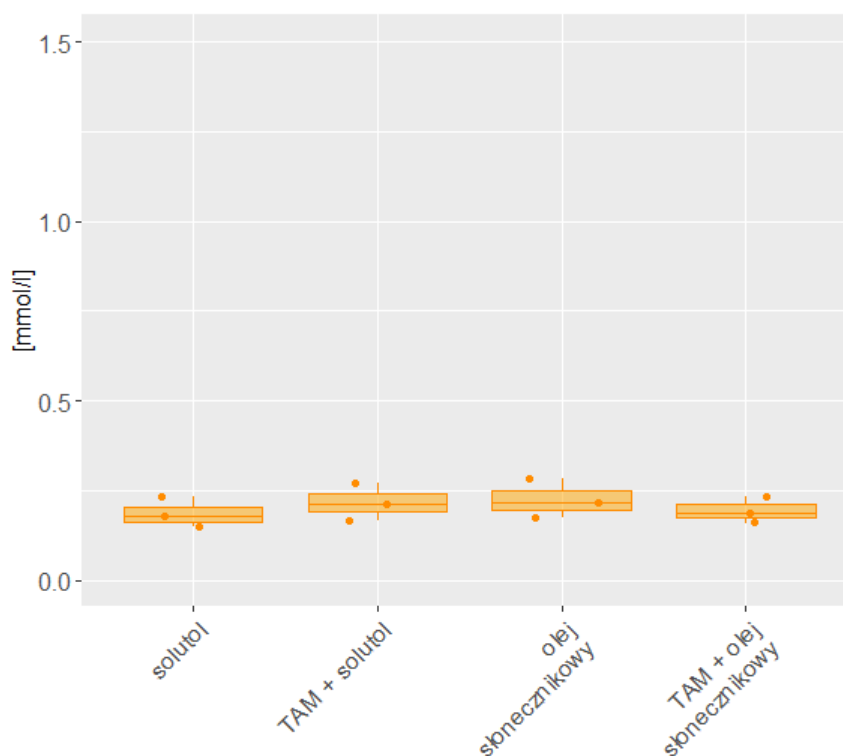
Do weryfikacji skuteczności systemu *Cre-loxP* w moich badaniach zastosowano metodę qPCR w celu określenia ekspresji genu *Dicer1*, niezbędnego dla powstawania dojrzałych form mikroRNA. Drugą metodą było makroskopowe obrazowanie zwierzęcia, wykorzystujące technikę CLARITY, umożliwiającą obserwację sygnału pochodzącego od fluorescencyjnego białka tdTomato bez konieczności przygotowywania skrawków z danej tkanki (ryc. 27).



Rycina 27. Wyniki badania ekspresji genu *Dicer1* uzyskane metodą qPCR (wykresy boxplot) oraz intensywności świecenia białka tdTomato (zdjęcie na dole ryciny); liczba zwierząt w grupie przy określaniu ekspresji *Dicer1* wynosiła od 6 do 15; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$

Metodą qPCR sprawdzono ekspresję genu *Dicer1* w 3 podtypach tkanki tłuszczowej: białej podskórnej (SC – z ang. *subcutaneous*), białej okołogonadalnej (PG – z ang. *perigonadal*) oraz międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej (iBAT – z ang. *interscapular brown adipose tissue*). Dodatkowo do potwierdzenia specyficzności tkankowej systemu *Cre-loxP* w oznaczeniu uwzględniono tkankę wątrobową jako kontrolę negatywną. Obniżoną zawartość mRNA dla genu *Dicer1* zaobserwowano w podtypach SC i iBAT tkanki tłuszczowej. Nie zaobserwowano jej natomiast w podtypie PG. Natomiast nie wykazano zmian w ekspresji genu *Dicer1* w wątrobie pomiędzy myszami kontrolnymi i mutantami, co świadczy o lokalnym, tkankowo specyficznym działaniu rekombinazy Cre. Obrazowanie makroskopowe zwierząt dTomato^{AdipoqCreERT2} pozwoliło na obserwację sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od białka tdTomato. Wyniki tych obserwacji potwierdziły te uzyskane metodą qPCR. Fluorescencję zaobserwowano tylko w przypadku białej podskórnej tkanki tłuszczowej oraz brązowej, międzyłopatkowej tkanki tłuszczowej. Przy czym fluorescencja (a w konsekwencji rekombinacja) w brązowej tkance tłuszczowej była najsilniejsza, co wydaje się być sprzeczne w obserwacjami twórców linii AdipoqCreERT2 (Sassmann et al., 2010).

4.8 Wpływ Tamoxifenu oraz jego rozpuszczalników na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu



Rycina 28. Wpływ Tamoxifenu oraz jego potencjalnych rozpuszczalników - solutolu oraz oleju słonecznikowego - na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w osoczu myszy typu dzikiego; każdy z roztworów podawany był zwierzętom według przyjętego wcześniej protokołu indukcji mutacji Tamoxifenem; osocze do oznaczenia FFA pobrano w trzeciej godzinie fazy nocnej zwierząt; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 8;

W obawie przed ewentualnym wpływem roztworu Tamoxifenu i/lub jego rozpuszczalników na wyniki późniejszych badań z wykorzystaniem zwierząt z linii *Dicer^{AdipoqCreERT2}*, zwierzęta typu dzikiego poddane zostały działaniu tych rozpuszczalników i samego czynnika aktywującego system *Cre-loxP* (ryc. 28). Istnieją bowiem doniesienia na temat efektów ubocznych stosowania Tamoxifenu, jako modulatora receptora estrogenowego, mogącego wpływać na funkcjonowanie m.in. tkanki tłuszczowej (L. Liu et al., 2015; Z. Liu et al., 2018; Ye et al., 2015). Testowanie mieszanin odbywało się zgodnie z przyjętym wcześniej protokołem podawania Tamoxifenu - poprzez zastrzyki dootrzewnowe 2 x dziennie w dawce 1 mg (100 μ l roztworu), przez 5 kolejnych dni. Następnie po upływie tygodnia zwierzęta uśmiercono, a pobrane osocze wykorzystano do pomiaru zawartości wolnych kwasów tłuszczowych. Badanymi rozpuszczalnikami dla Tamoxifenu były olej słonecznikowy oraz

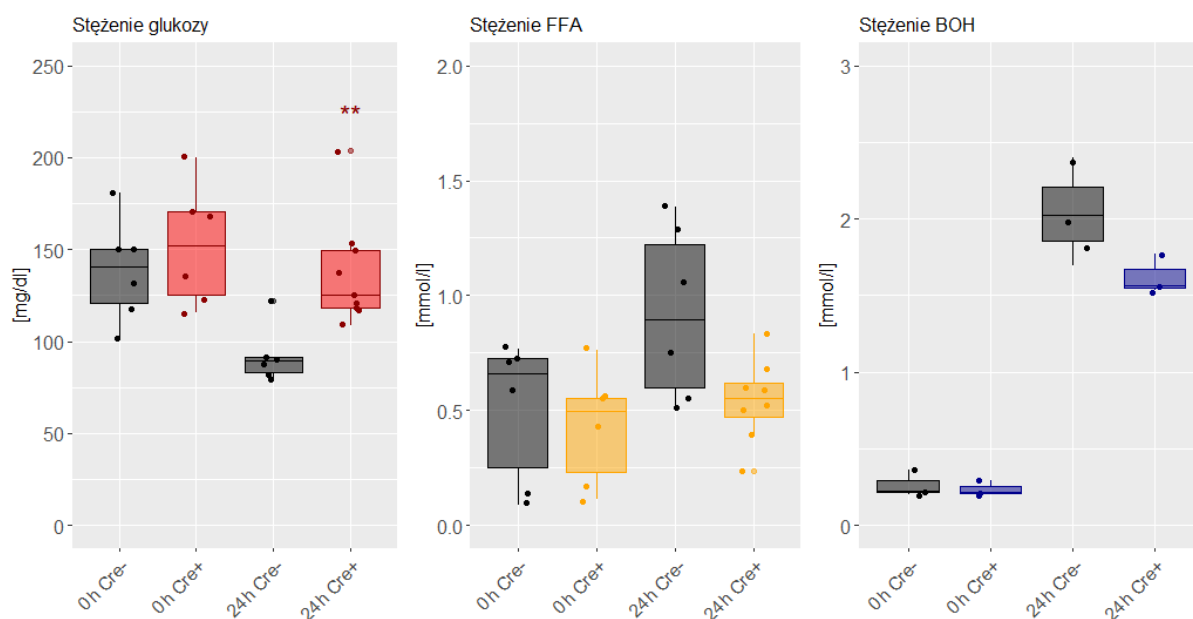
związek o konsystencji podobnej do oleju – solutol (BASF). Według danych producenta solutol odznacza się mniejszą toksycznością komórkową niż inne, szeroko stosowane w tych celach środki, takie jak olej.

Wyniki doświadczenia nie wykazały wpływu żadnego z testowanych mieszanin na zmiany w zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, w danym punkcie czasowym. Nie dostrzeżono również u zwierząt żadnych zewnętrznych objawów toksyczności. Bazując na tej informacji oraz ze względu na zauważalnie lepszą rozpuszczalność Tamoxifenu w oleju słonecznikowym, ostatecznie do przeprowadzenia kolejnych doświadczeń na zwierzętach z linii Dicer^{AdipoqCreERT2} wykorzystywano roztwór tego właśnie rozpuszczalnika.

4.9 Zawartość substratów energetycznych w osoczu zwierząt transgenicznym Dicer^{AdipoqCreERT2} w warunkach głodówki krótkookresowej

Aby określić ewentualny skutek mutacji u zwierząt Dicer^{AdipoqCreERT2}, w pierwszej kolejności zmierzono zawartość substratów energetycznych w osoczu, przed i po wprowadzeniu restrykcji pokarmowej. Jako formę restrykcji wybrano głodówkę 24-godziną. Restrykcja kaloryczna nie została uwzględniona w doświadczeniu ze względu na duże podobieństwo do głodówki i zaangażowanie tych samych procesów metabolicznych. Osocze do pomiaru metabolitów zostało pobrane od zwierząt w dwóch punktach czasowych - z chwilą rozpoczęcia głodówki krótkookresowej oraz po kolejnych 24 godzinach.

Wyniki co prawda pokazały odstępstwa od prawidłowej odpowiedzi organizmu na deficyt pokarmowy u zwierząt transgenicznym (Cre+), aczkolwiek odniesienie ich do wyników z grupy kontrolnej nie dało zadowalającego rezultatu. Po 24 godzinach restrykcji pokarmowej zawartość glukozy nie zmieniła się istotnie w stosunku do czasu sprzed restrykcji. Organizm tych zwierząt produkował jednak w dalszym ciągu dużą ilość kwasu β -hydroksymasłowego (ryc. 29). Wynik zawartości BOH jest zastanawiający biorąc pod uwagę fakt, że proces ketogenezy jest ściśle powiązany z metabolizmem kwasów tłuszczowych. U zwierząt kontrolnych (lub zwierząt typu dzikiego z wcześniejszych doświadczeń) wzrastająca zawartość kwasów tłuszczowych w odpowiedzi na deficyt pokarmowy napędza powstawanie ciał ketonowych. U zwierząt pozbawionych mikroRNA w tkance tłuszczowej ta zależność nie była jasno zaznaczona. Wydaje się mało wiarygodnym, aby proces ketogenezy zachodził niezmiennie przy jednoczesnym zahamowaniu procesów lipolitycznych.

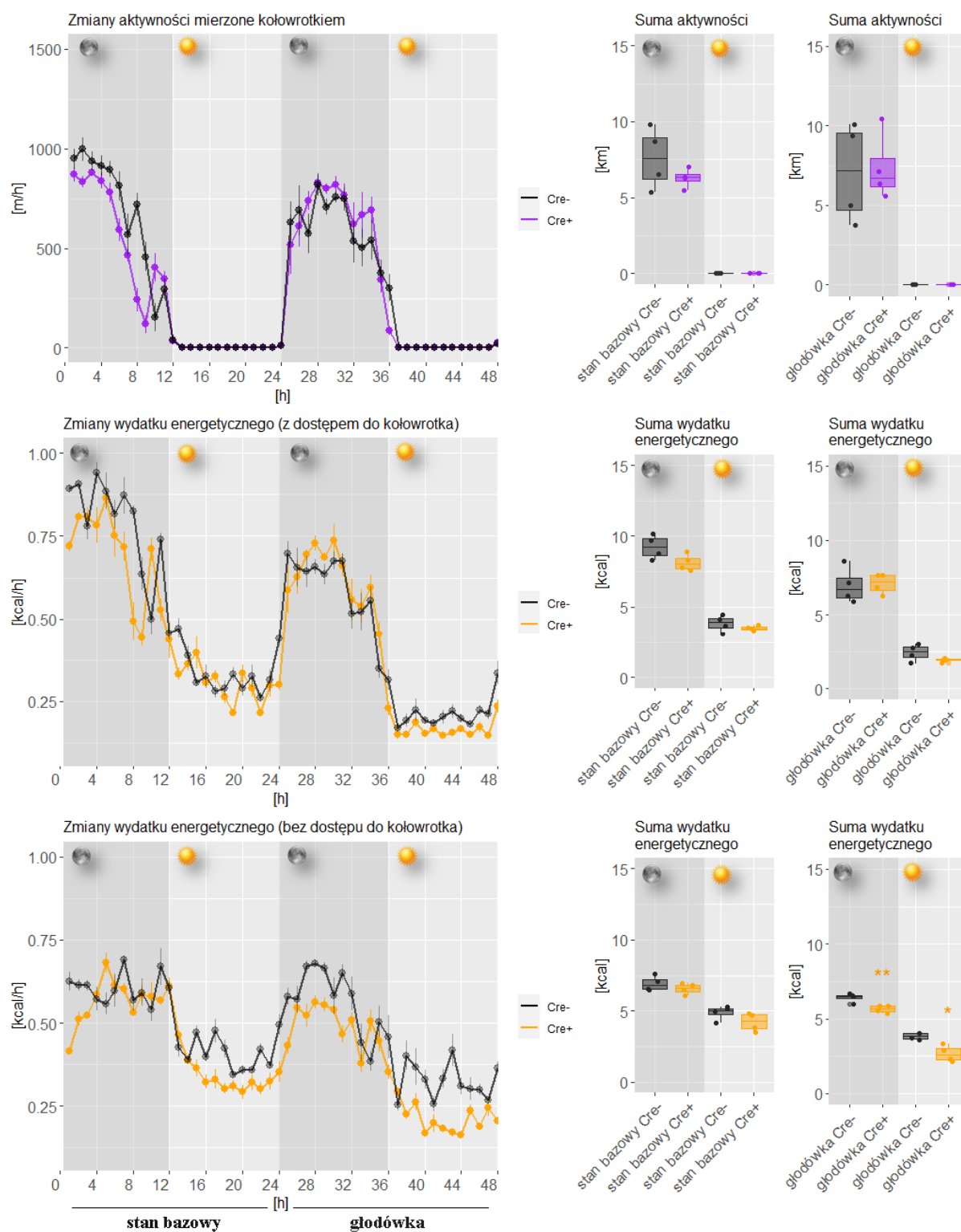


Rycina 29. Zawartość substratów energetycznych w osoczu zwierząt *Dicer^{AdipoqCreERT2}* przed i po wprowadzeniu głodówki 24-godzinnej; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 3 do 6; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy z tego samego punktu czasowego; ** $p < 0,01$

Kolejnym etapem było skonfrontowanie powyższych wyników z monitorowaniem odpowiedzi metabolicznej zwierząt w czasie rzeczywistym (za pomocą współczynnika RER), które umożliwiłoby prześledzenie zmian w trakcie 24 godzin trwania restrykcji pokarmowej.

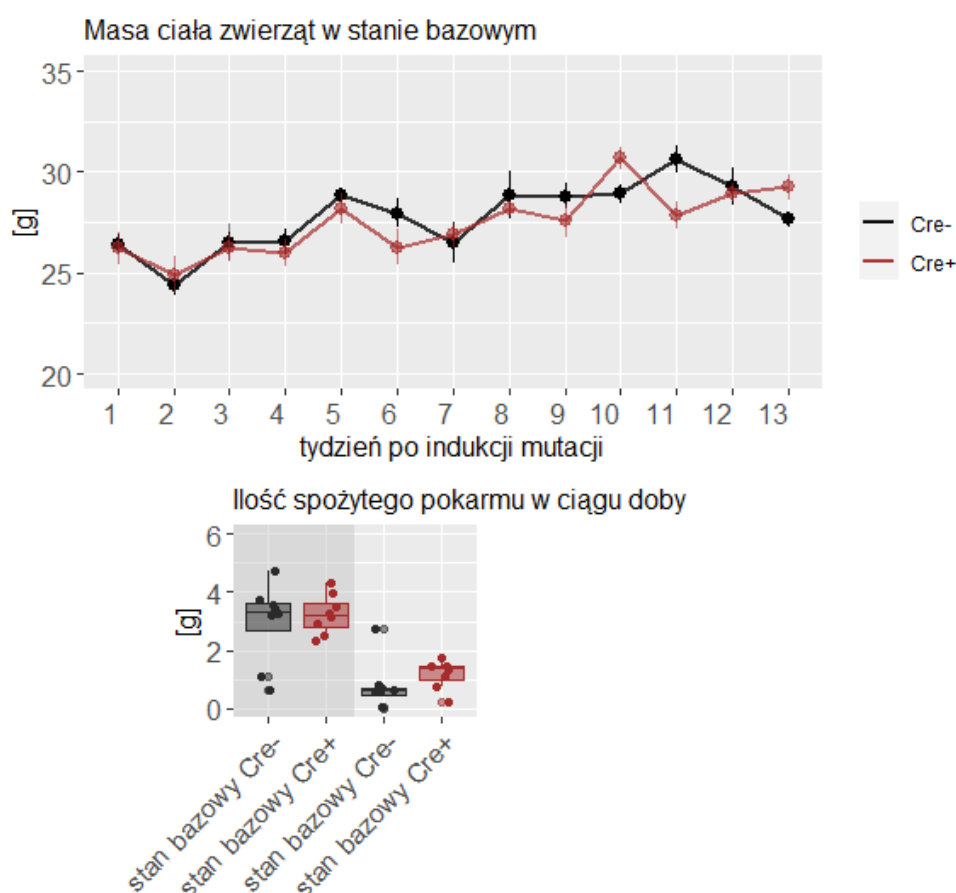
4.10 Wpływ głodówki krótkookresowej na metabolizm zwierząt transgeniczných *Dicer^{AdipoqCreERT2}*

Analizę w klatkach metabolicznych wykonano w dwóch wariantach – z kołowrotkiem mierzącym aktywność zwierząt, oraz bez kołowrotka. Planowano w ten sposób dodatkowo określić zmianę wydatku energetycznego, spowodowanego ewentualną zwiększoną aktywnością zwierzęcia. W każdym wariancie 24-godzinny okres głodówki poprzedzony został 24-godzinnym okresem z wolnym dostępem do pokarmu (stan bazowy) (ryc. 30).

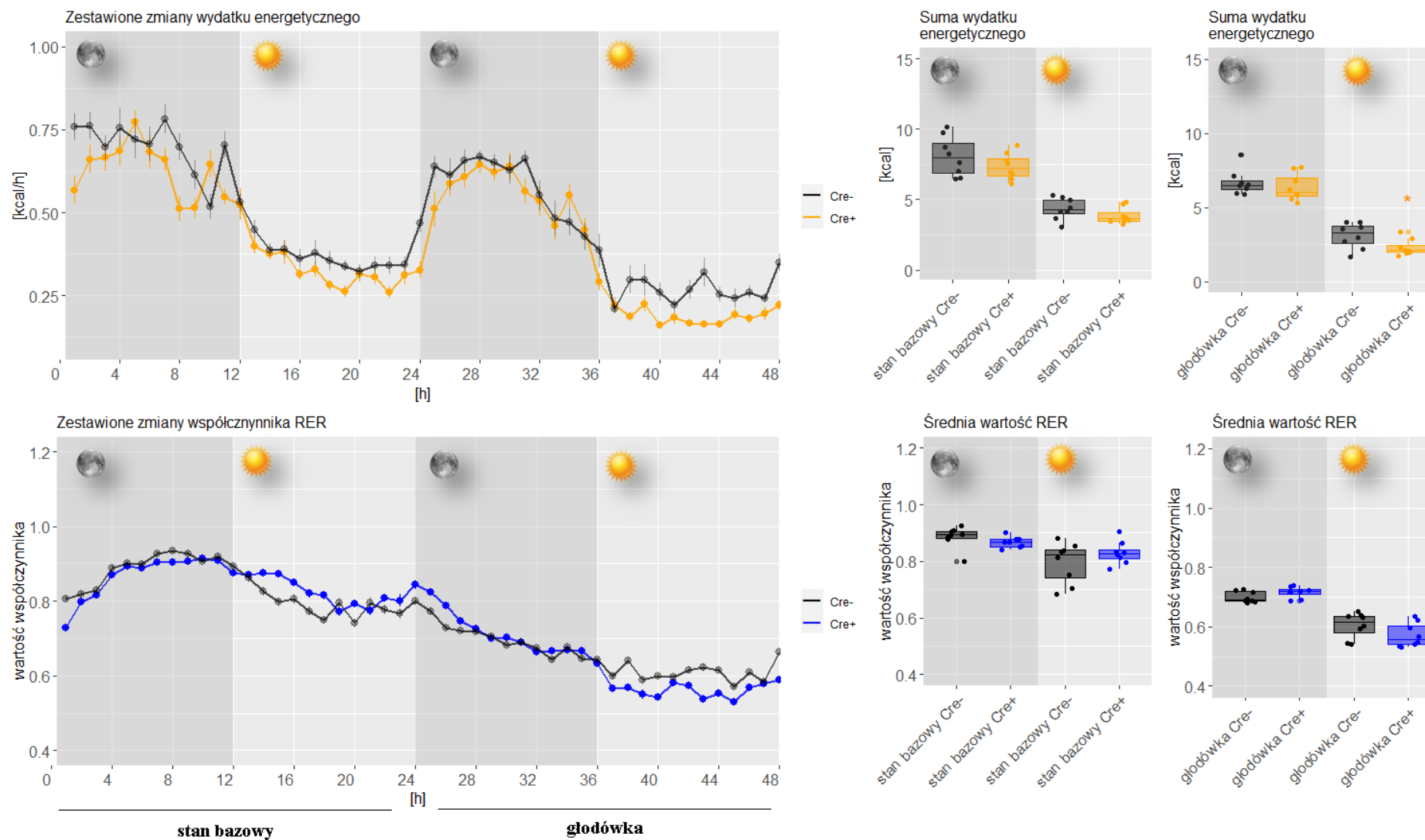


Rycina 30. Porównanie zmian parametrów metabolicznych u zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$; pierwsze 24 godziny stanowiły dobę z wolnym dostępem do pokarmu (stan bazowy), kolejne 24 godziny z wprowadzoną głodówką; liczba zwierząt w grupie wynosiła 4; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$

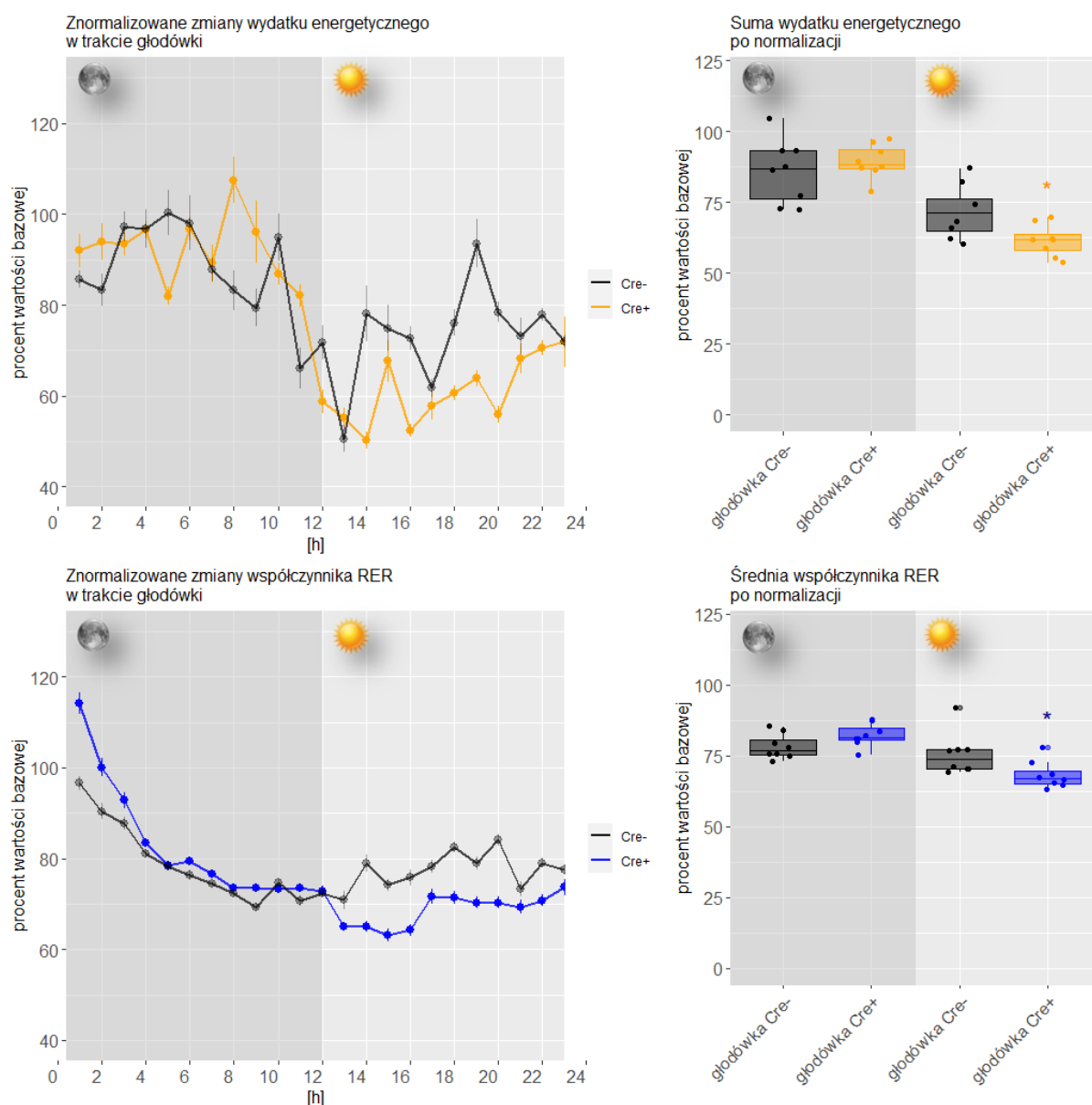
Uzyskane dane pozwoliły potwierdzić spodziewaną zależność między dostępem zwierząt do kołowrotka a wydatkiem energetycznym. Zwiększona dzięki niemu aktywność w ciągu fazy aktywnej (nocnej) zwierząt skutkowała większą ilością spalanych kalorii, natomiast mniejszą w trakcie fazy dziennej, podczas której zwierzę odpoczywa. Dostęp do kołowrotka powodował zatem większe fluktuacje między fazami aktywności w wydatku energetycznym, aniżeli bez dostępu do niego. Nie odnotowano jednak istotnych różnic w przebytych dystansie między zwierzętami z grupy kontrolnej i badanej (mutantami). Zarówno w fazie aktywnej, jak i fazy nieaktywnej zwierzęta z obu grup pokonywały podobną, średnią odległość. Dzięki tej informacji można zatem wnioskować, że ewentualne różnice wydatkowania kalorii między badanymi grupami mutantów i zwierząt kontrolnych (Cre+ i Cre-) wynikałyby bezpośrednio z różnic w podstawowej przemianie materii (BMR) (z ang. *basic metabolic rate*). Dała ona również podstawy do zestawienia zwierząt z obydwu wariantów doświadczenia w celu dalszej, wspólnej analizy.



Rycina 31. Porównanie zmian poboru pokarmu (wykres dolny) oraz zmian wagi w trakcie stanu bazowego u zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 6 do 8; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM)



Rycina 32. Porównanie zmian parametrów metabolicznych u zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$; wyniki zestawiono z 2 wariantów doświadczalnych (z i bez kółka biegowego); pierwsze 24 godziny stanowiły dobę z wolnym dostępem do pokarmu (stan bazowy), kolejne 24 godziny z wprowadzoną głodówką; liczba zwierząt w grupie wynosiła 8; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$



Rycina 33. Porównanie zmian znormalizowanych parametrów metabolicznych u zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$, z wprowadzoną głodówką krótkookresową; liczba zwierząt w grupie wynosiła 8; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$

Śledząc wartości wydatku energetycznego nie zaobserwowano różnic między grupą badaną ($Dicer^{AdipoqCreERT2}$) i kontrolną w warunkach swobodnego dostępu do pożywienia (stan bazowy). Pobór pokarmu w tym okresie również nie wykazał istotnie statystycznych różnic. Długoterminowe monitorowanie wagi zwierząt z grupy badanej i kontrolnej, w następujących po sobie tygodniach od momentu zaindukowania mutacji nie ujawniło różnic w przyroście masy ciała, co może świadczyć o tym, że mutacja genu *Dicer1* w białej tkance tłuszczowej nie zmienia znacząco gospodarki energetycznej organizmu (ryc. 31). Wartości współczynnika oddechowego RER również nie różniły się istotnie między obydwoma grupami.

W trakcie głodówki krótkookresowej różnice występowały w wariancie bez dostępu do kółka biegowego. Grupa zwierząt badanych odznaczała się wówczas niższą ilością spalanych kalorii niż grupa kontrolna. Wartości te utrzymywane były na niższym poziomie w ciągu całej doby. Aby uniknąć błędnej interpretacji wyników wskutek różnic osobniczych, wartości parametrów z restrikcji pokarmowej dla wszystkich zwierząt zostały znormalizowane do wartości z ich stanu bazowego (ryc. 33).

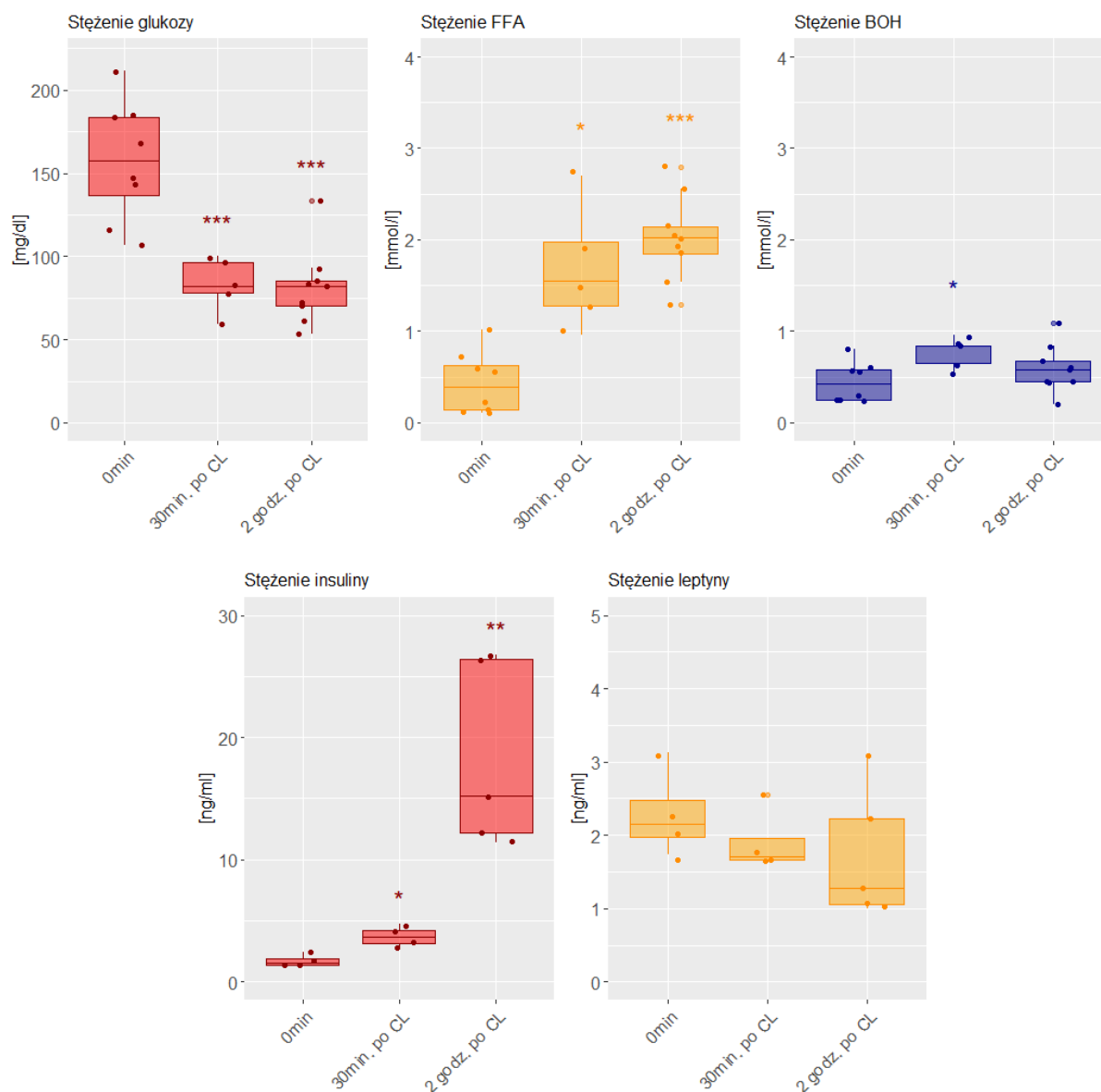
Ostatecznie różnice pomiędzy grupą badaną i kontrolną po normalizacji dały się zauważyć podczas głodówki 24-godzinnej, w fazie nieaktywnej zwierząt. Zwierzęta Cre+ charakteryzowały się wówczas niższymi wartościami wydatku energetycznego i współczynnika RER. Taki obraz sugerowałby zwiększone metabolizowanie kwasów tłuszczowych przez organizm, ale też ich mniejsze, całkowite zużycie podczas okresu z deficytem pokarmowym. Obraz ten pokazywałby także, że zwierzęta pozbawione genu Dicer za pomocą systemu Cre-loxP wykazują zmiany tylko po wystawieniu ich na pewien czynnik „mobilizujący” tkankę, w której zachodzi indukcja mutacji.

4.11 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu myszy typu dzikiego poddanych działaniu agonisty receptorów β -adrenergicznych.

Wspomniany czynnik „mobilizujący” w przypadku białej tkanki tłuszczowej stanowiły warianty restrikcji pokarmowej. Aby zbadać natomiast wpływ mikroRNA na funkcjonowanie brązowej tkanki tłuszczowej (przede wszystkim na jej zdolność do generowania ciepła), w badaniach wykorzystano agonistę receptora β 3-adrenergicznego - CL-316,243. Związek ten był czynnikiem aktywującym termogenezę u zwierząt i pozwolił wyodrębnić punkt czasowy dla zmian tego procesu, istotny z perspektywy dalszych doświadczeń. Na podstawie informacji dostępnych w literaturze (Heine et al., 2018) stwierdzono efekt działania agonisty trwający około 4 godzin, ze szczytem przypadającym pomiędzy 30 a 120 minutą od chwili jego podania. W moim doświadczeniu osocze do analiz zawartości metabolitów i hormonów pobrano zatem od zwierząt w podobnych punktach czasowych, tj. po 30min oraz po 2 godz. od podania agonisty.

Odpowiedź organizmu na aktywator termogenezy obserwowano już po 30 minutach, kiedy to odnotowano znaczny spadek zawartości glukozy oraz przyrost wolnych kwasów tłuszczowych. Zmiana ta utrzymywała się przez kolejne 1,5 godziny. Początkowy wzrost

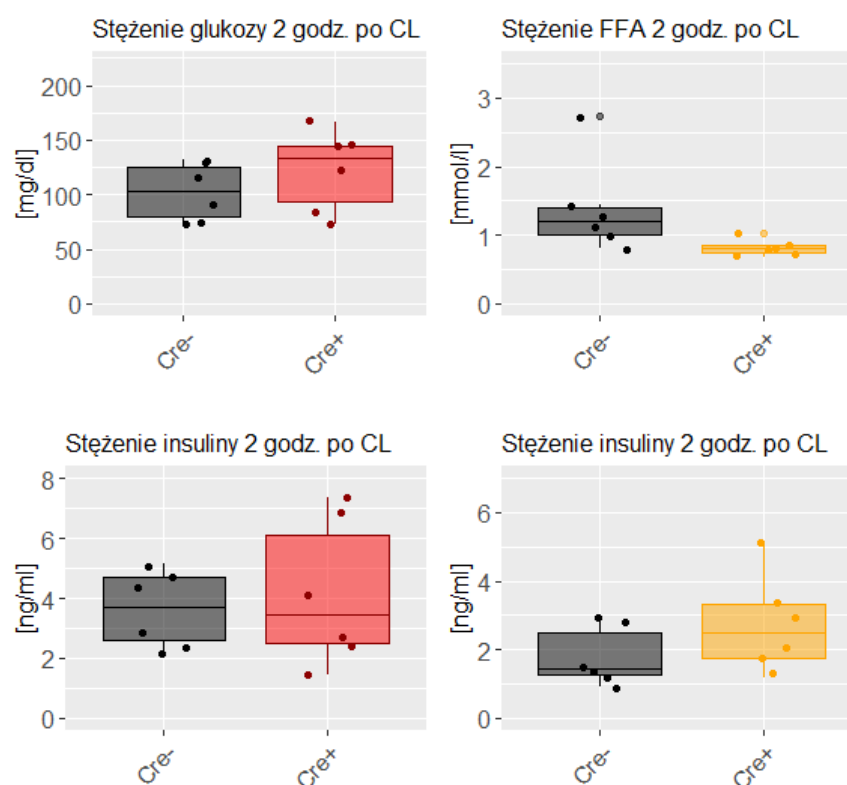
poziomu ciała ketonowych (po 30 min.) był nieznaczny i zanikał po 2 godzinach od indukcji (ryc. 34). Zaaobserwowano również stopniowy wzrost stężenia insuliny po podaniu związku CL-316,243, który wzrósł 10-krotnie po 2 godzinach. Natomiast stężenie leptyny pozostało bez zmian przez cały czas trwania doświadczenia. (ryc. 34).



Rycina 34. Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu zwierząt typu dzikiego, poddanych działaniu agonisty (CL-316,243) receptorów β -adrenergicznych; eksperyment rozpoczęto w 3 godzinie fazy aktywnej zwierząt; po podaniu agonisty zwierzęta zostały pozbawione pokarmu na czas trwania eksperymentu; liczba zwierząt w grupie wynosiła od 4 do 9; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy "0 min."; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

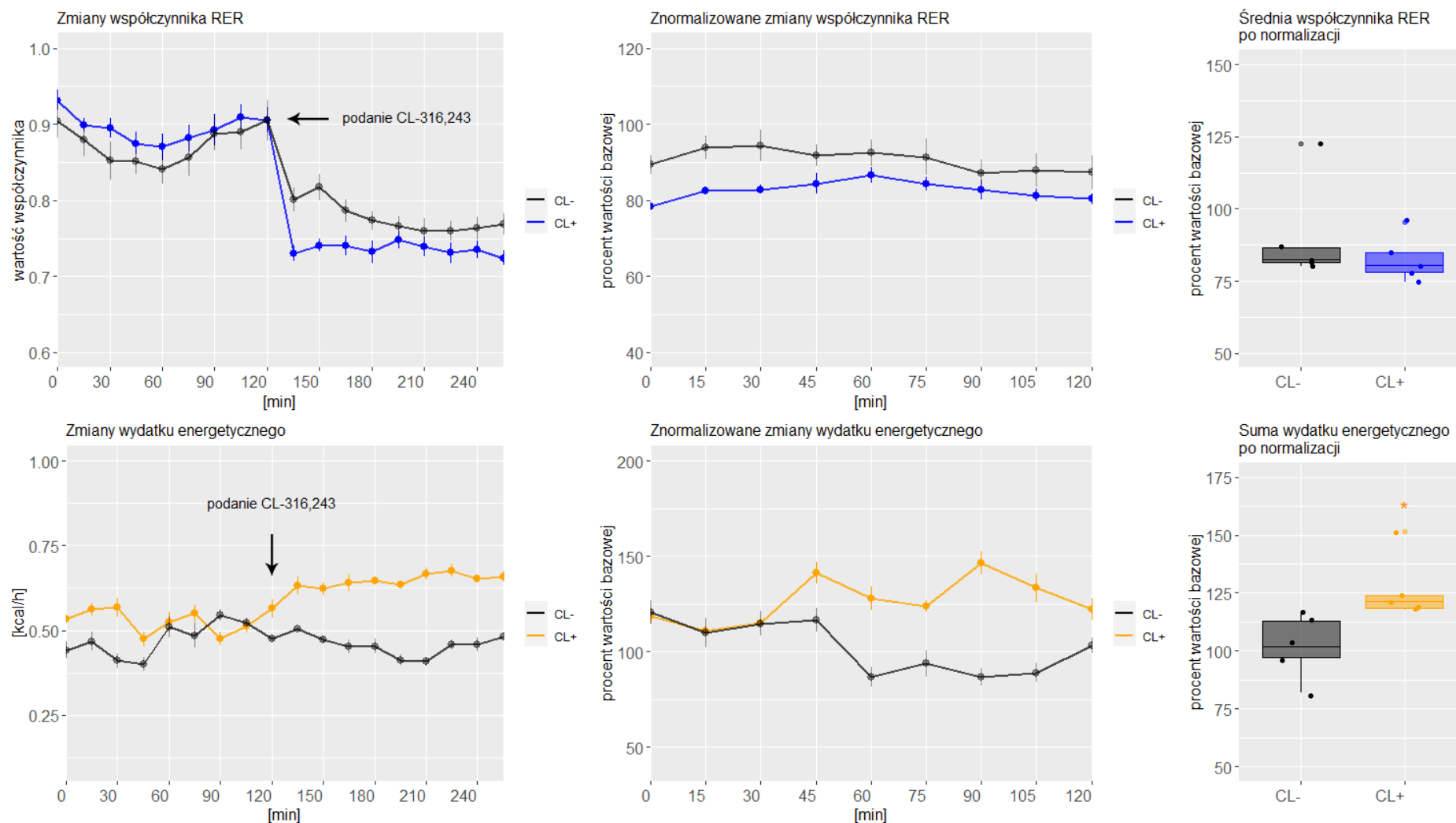
4.12 Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu zwierząt transgeniczných Dicer^{AdipoqCreERT2} poddanych działaniu agonisty receptorów β -adrenergicznych.

Po 2 godzinach od podania agonisty nie zaobserwowano różnic w zawartości glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych oraz hormonów insuliny i leptyny w osoczu zwierząt, pomiędzy grupą badaną a kontrolną (ryc. 35).



Rycina 35. Zawartość substratów energetycznych oraz wybranych hormonów w osoczu zwierząt Dicer^{AdipoqCreERT2}, poddanych działaniu agonisty (CL-316,243) receptorów β -adrenergicznych; eksperyment rozpoczęto w 3 godzinie fazy aktywnej zwierząt; po podaniu agonisty zwierzęta zostały pozbawione pokarmu na czas trwania eksperymentu; liczba zwierząt w grupie wynosiła 6; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych;

4.13 Wyniki badania metabolizmu myszy typu dzikiego po aktywacji procesu termogenezy z wykorzystaniem systemu Phenomaster



Rycina 36. Porównanie zmian parametrów metabolicznych u zwierząt typu dzikiego, po aktywacji procesu termogenezy; pierwsze 120 minut stanowiło stan bazowy zwierząt przed aktywacją, kolejne 120 minut stanowiło czas po podaniu agonisty; zwierzęta kontrolne (CL-) traktowano roztworem soli fizjologicznej; liczba zwierząt w grupie wynosiła 5; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$

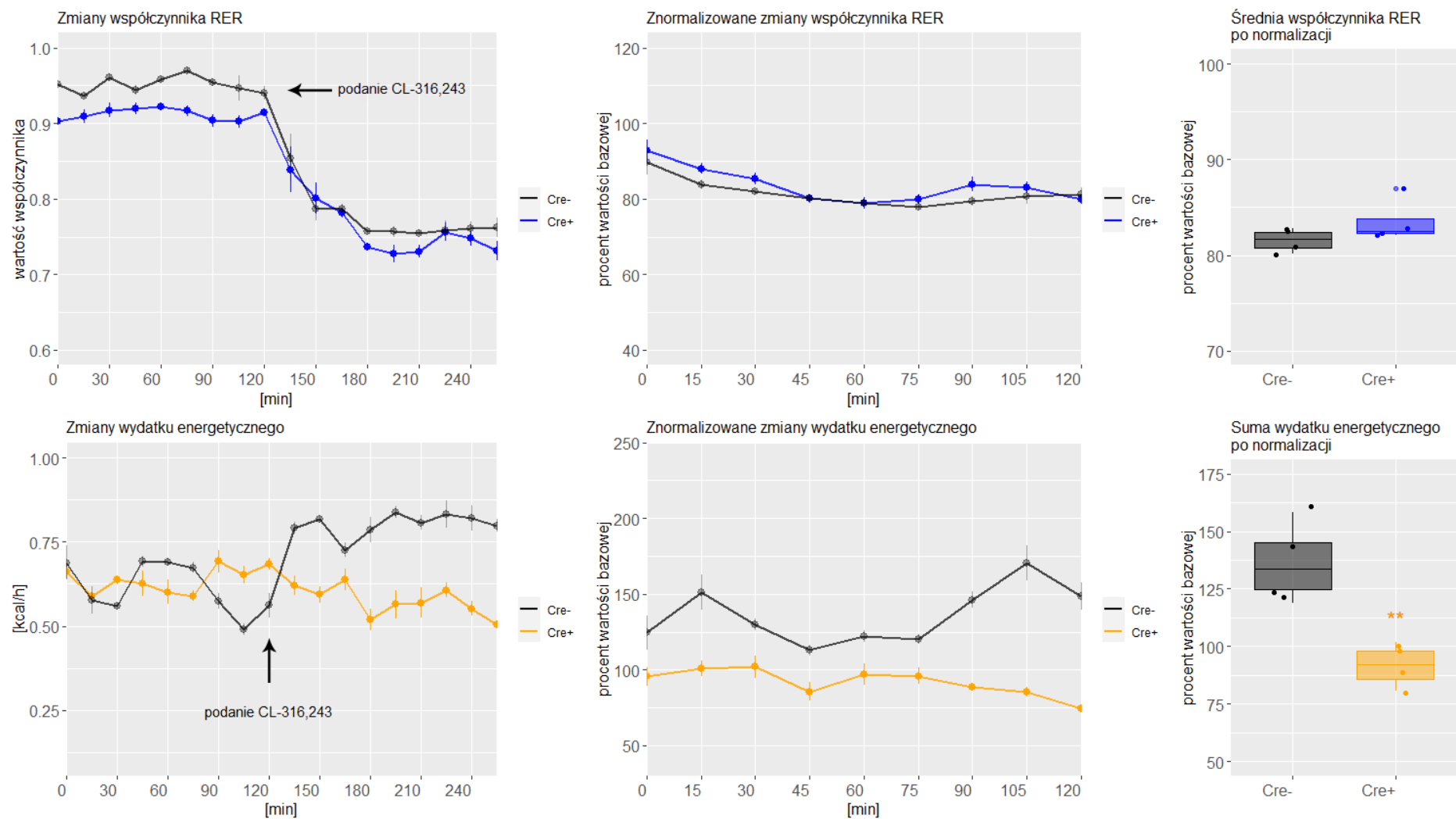
Ze względu na charakter badania obejmującego proces termogenezy, najistotniejsze było zwrócenie uwagi na parametry wydatku energetycznego i współczynnika oddechowego. Wartości tych parametrów zostały znormalizowane do wartości ze stanu bazowego tych zwierząt, z tego samego przedziału czasowego. W doświadczeniu zwierzęta nie miały dostępu do kółka biegowego, które mogło wpływać na zmiany mierzonych parametrów i utrudniać interpretację wyników. Z tego samego względu obie grupy zwierząt pozbawione zostały także pokarmu od chwili podania agonisty, na czas trwania badania.

Generowanie energii cieplnej przez zwierzęta indukowane aktywatorem termogenezy było dobrze widoczne w ilości spalanych kalorii (ryc. 36). Poziom wydatku energetycznego był u tych zwierząt (CL+) wyższy, aniżeli u zwierząt kontrolnych (CL-). (Heine et al., 2018) oraz wcześniejsze wyniki pokazały, że uwalniane z tkanki tłuszczowej wolne kwasy tłuszczowe są źródłem napędzania procesu termogenezy. Wiadome jest, że metabolizowanie tego substratu energetycznego obniża wartości parametru współczynnika oddechowego. W moim doświadczeniu średnia wartość współczynnika RER była wprawdzie nieco niższa dla grupy badanej w ciągu całych 2 godzin działania agonisty, natomiast wynik ten odbiegał od istotności statystycznej.

4.14 Wyniki badania metabolizmu zwierząt transgenicznych Dicer^{AdipoqCreERT2} po aktywacji procesu termogenezy z wykorzystaniem systemu Phenomaster

Doświadczenie zostało przeprowadzone analogicznie do doświadczenia z użyciem zwierząt typu dzikiego. Jednak tutaj obydwie grupy badanych zwierząt zostały poddane działaniu agonisty CL-316,243. Również i w tym przypadku monitorowano parametry współczynnika oddechowego i wydatku energetycznego.

Liczba spalanych kalorii przez zwierzęta kontrolne była zauważalnie wyższa w porównaniu do zwierząt badanych Dicer^{AdipoqCreERT2} i utrzymana na wysokim poziomie już od momentu podania aktywatora termogenezy, przez kolejne 2 godziny trwania doświadczenia. Wartości dla współczynnika oddechowego były natomiast zbliżone, z odnotowaną średnią nieznacznie wyższą dla zwierząt Cre+, co wskazywałoby na niższą utylizację kwasów tłuszczowych. Jednak podobnie jak w doświadczeniu z wykorzystaniem zwierząt typu dzikiego, różnica ta nie była istotna statystycznie.



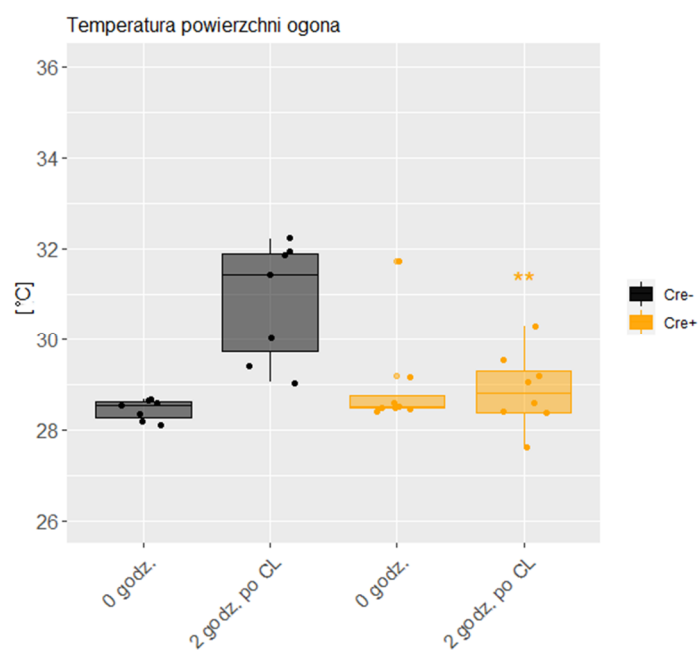
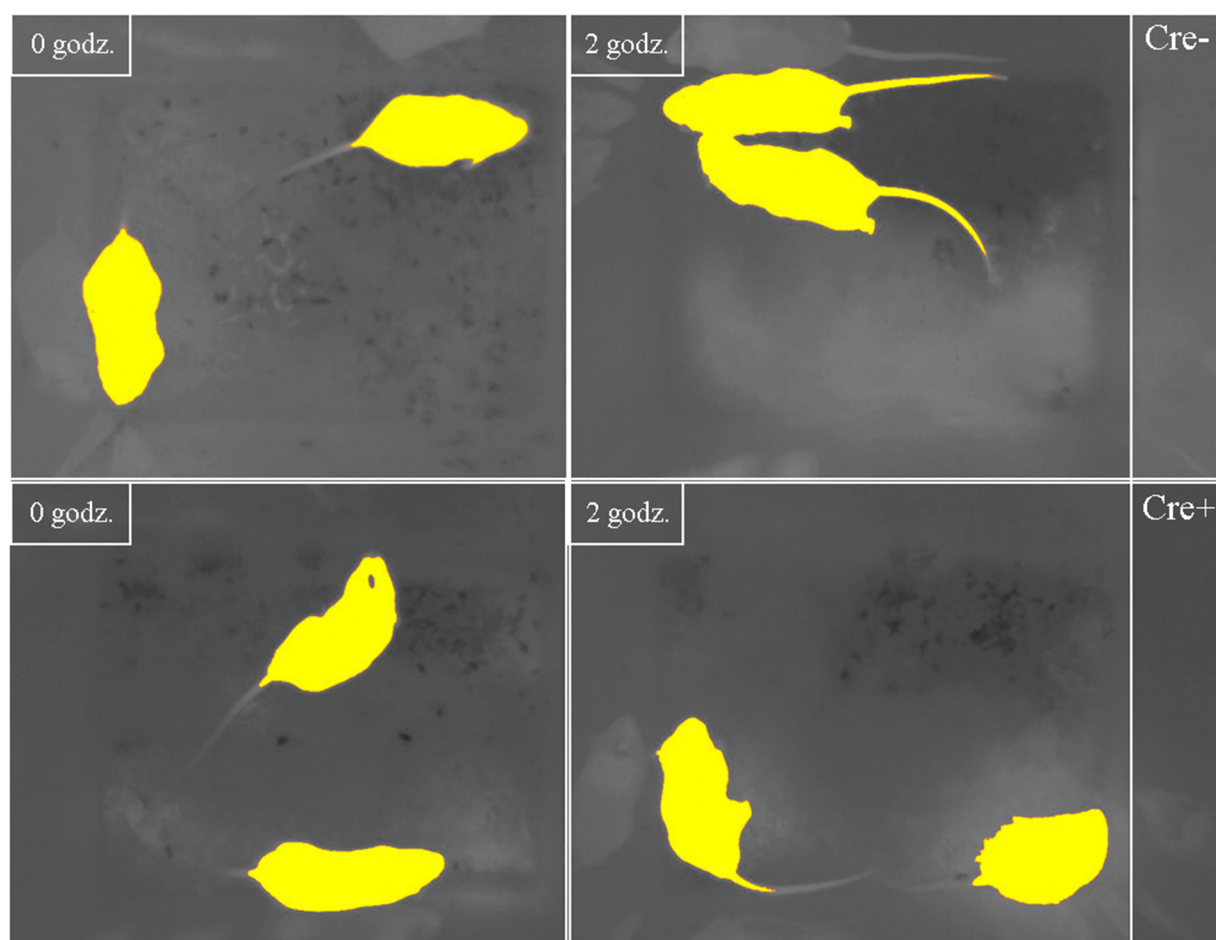
Rycina 37. Porównanie zmian parametrów metabolicznych u zwierząt $Dicer^{AdipogCreERT2}$, po aktywacji procesu termogenezy; pierwsze 120 minut stanowiło stan bazowy zwierząt przed aktywacją, kolejne 120 minut stanowiło czas po podaniu agonisty; zarówno zwierzęta badane (Cre+) jak i kontrolne (Cre-) zostały poddane działaniu aktywatora; liczba zwierząt w grupie wynosiła 4; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; słupki błędów na wykresach liniowych przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM); poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; ** $p < 0,01$

4.15 Zmiany temperatury ciała zwierząt transgenicznych Dicer^{AdipoqCreERT2} po aktywacji procesu termogenezy monitorowane z wykorzystaniem kamery termowizyjnej

Zastosowanie kamery termowizyjnej miało na celu potwierdzenie wniosków płynących z badań w klatkach metabolicznych, w których zwierzęta transgeniczne, pozbawione mikroRNA w tkance tłuszczowej wykazują zaburzoną zdolność do indukcji wydatku energetycznego w procesie generowania ciepła (ryc. 37).

Początkowo rejestrowanie ciepłoty ciała prowadzone było z okolic brązowej tkanki tłuszczowej, między łopatkami zwierzęcia. Każdemu z nich usunięto fragment futra w tej okolicy dla skutecznej obserwacji. Podanie agonisty CL-316,243 podnosiło wprowadzie temperaturę ciała w tym rejonie, natomiast bez spodziewanych różnic między grupą kontrolną a badaną. Rejestrowana temperatura osiągała wówczas wysokie wartości tj. powyżej 38°C. Ponieważ są to wartości zbliżające się do niebezpiecznej granicy, w której dochodzi do denaturacji białek, spodziewano się dyssypacji energii cieplnej w inne rejony ciała. Kończyny i ogon zwierzęcia intuicyjnie stanowią odpowiedni punkt do obserwacji badanych zmian, nie tylko ze względu na położenie względem brązowej tkanki tłuszczowej, ale także ze względu na brak sierści. Ostatecznie zdecydowano się na monitorowanie temperatury z ogona, który był zawsze dobrze widoczny na kamerze termowizyjnej.

Mając na uwadze powyższe wnioski i dokonując ponownej analizy temperatur, uzyskano wynik potwierdzający rezultaty otrzymane systemem Phenomaster. Zwierzęta z grupy badanej (mutanty), po 2 godz. od momentu zaindukowania procesu termogenezy, charakteryzowały się mniejszą ciepłotą monitorowanego ogona niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Różnica była wyraźnie zaznaczona, ze średnią między grupami wynoszącą blisko 2°C. Mając na względzie zakres temperatur, w jakich organizm funkcjonuje optymalnie, różnica 2°C jest zasadnicza (ryc. 38).



Rycina 38. Obrazowe (zdjęcia w górnej części ryciny) i wartościowe (wykres w dolnej części) przedstawienie ciepłoty ogona zwierząt $Dicer^{AdipoqCreERT2}$, poddanych działaniu agonisty (CL-316,243); po podaniu agonisty zwierzęta zostały pozbawione pokarmu na czas trwania doświadczenia; wartości temperatur odczytano z nasady ogona; liczba zwierząt w grupie wynosiła 7 lub 8; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grup kontrolnych, z tych samych punktów czasowych; **p<0,01

4.16 Profil mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, po indukcji procesu termogenezy.

Badania zwierząt transgeniczných Dicer^{AdipoqCreERT2} w klatkach metabolicznych oraz przy użyciu kamery termowizyjnej pokazały zaburzenia tych zwierząt w zdolności do wytwarzania energii cieplnej w procesie termogenezy. Ze względu na występującą u nich mutację, prowadzącą ostatecznie do zaniku dojrzałych form mikroRNA w tkance tłuszczowej, można wnioskować, że fenotyp obniżonej termogenezy jest w tym przypadku ściśle związany z funkcjonowaniem mikroRNA. W celu określenia poszczególnych mikroRNA zaangażowanych w ten proces, wykonano profilowanie tych cząsteczek w sposób analogiczny do profilowania z udziałem restrykcji pokarmowych.

Kluczowym punktem czasowym do badania profilu był punkt 2 godzin od podania zwierzętom aktywatora termogenezy. W serii poprzednich doświadczeń, obejmujących badania metabolitów, hormonów, parametrów metabolicznych i ciepłoty ciała, efekty działania agonisty były wyraźnie widoczny w tym punkcie czasowym.

Uzyskane wartości ekspresji pozwoliły prześledzić grupę mikroRNA o najwyższej ekspresji (ryc. 39-40). Podobnie jak w przypadku białej tkanki tłuszczowej, zaliczały się do niej przede wszystkim miR-191, miR-133a, miR-126-3p, miR-193b, oraz miR-150 i miR-16. Ich wysoka zawartość potwierdziła aktualne doniesienia literaturowe, wykazujące szereg mikroRNA charakterystycznych dla brązowej tkanki tłuszczowej (Güller et al., 2015). Zawartość tych cząsteczek odznaczała się wysokim profilem ekspresji w obydwu grupach doświadczalnych.

Wyselekcjonowano następnie grupy wszystkich mikroRNA istotnie statystycznie zmienionych podczas aktywacji termogenezy, w stosunku do grupy kontrolnej (ryc. 41-42). Stosując 3 różne metody normalizacji wyników ekspresji, tylko normalizacja do genu *U6* nie wykazała żadnych istotnie zmienionych mikroRNA. W pozostałych metodach normalizacji zmiana w profilu mikroRNA była zauważalna. Aby ostatecznie przedstawić grupę tych mikroRNA, które moim zdaniem mogłyby być kluczowe dla badanego problemu, kierowano się przede wszystkim wskaźnikiem istotności statystycznej w porównywanych grupach oraz krotnością zmiany (ryc. 43-45).



Rycina 39. Ekspresja mikroRNA o najwyższym poziomie w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy kontrolnych typu dzikiego; wartości ekspresji zostały znormalizowane do zaznaczonych genów endogennych lub znormalizowane globalnie; liczba zwierząt w grupie wynosiła 4.



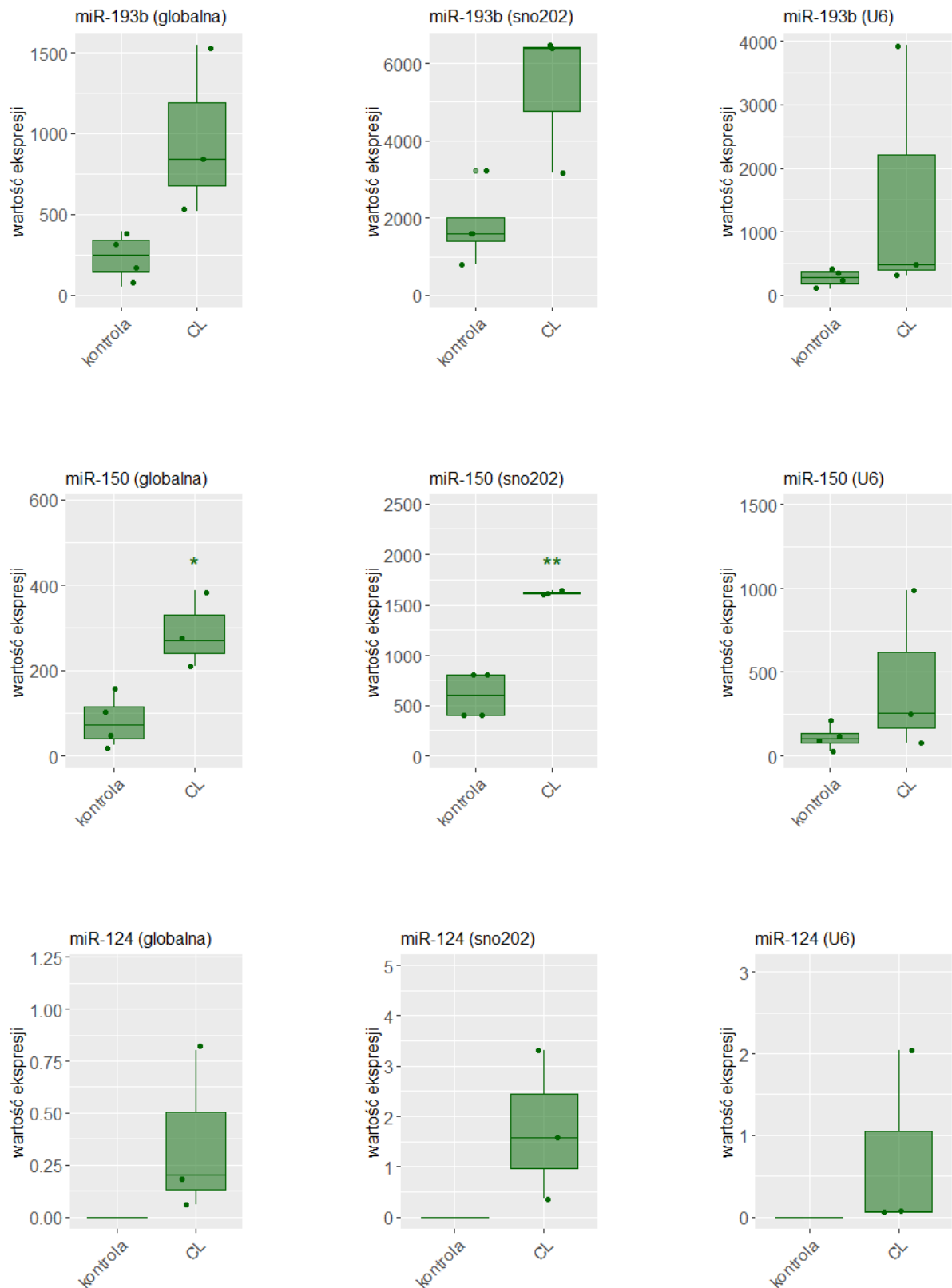
Rycina 40. Ekspresja mikroRNA o najwyższym poziomie w międzyłópkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, zaindukowanych agonistą receptorów β -adrenergicznych; wartości ekspresji zostały znormalizowane do zaznaczonych genów endogennych lub znormalizowane globalnie; liczba zwierząt w grupie wynosiła 3.

miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-425	0.00540**	3.880664	3.464963
miR-411	0.01250*	3.167607	5.552742
miR-339-3p	0.01417*	3.060807	5.593642
miR-146b	0.01613*	2.840209	11.175365
miR-146a	0.01794*	3.001859	13.791389
miR-106b	0.02814*	2.362673	1.398106
miR-139-5p	0.02989*	3.903194	35.736703
miR-676	0.03121*	6.096548	8.864858
miR-342-3p	0.03461*	6.447597	35.667286
miR-328	0.03488*	3.937555	2.266670
miR-150	0.03600*	3.502653	289.801482
miR-182	0.03941*	4.587399	17.785856
miR-484	0.04055*	3.949760	144.678526
miR-143	0.04704*	2.821237	8.968868
miR-486	0.04706*	2.839051	141.916203

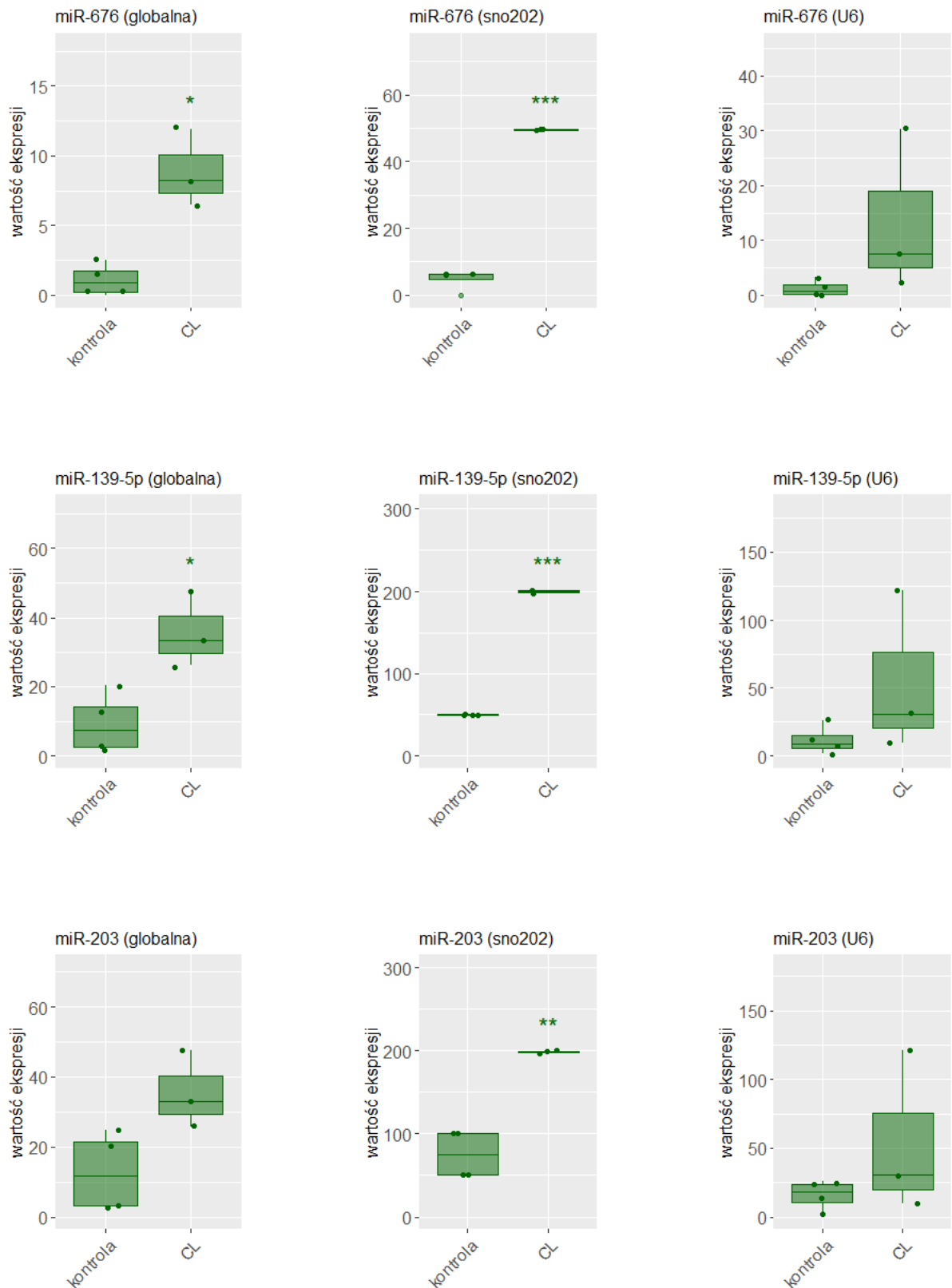
Rycina 41. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, zaindukowanych agonistą receptorów β_3 -adrenergicznych; wartości ekspresji zostały **znormalizowane globalnie** i odniesione do grupy kontrolnej

miRNA	istotność statystyczna (p)	krotność zmiany	średnia wartość ekspresji
miR-139-5p	0.00000***	4.033198	199.93840
miR-676	0.00000***	7.977186	49.57692
miR-145	0.00268**	2.272778	49.60984
miR-320	0.00271**	2.275667	401.29653
miR-150	0.00286**	2.684884	1620.35871
miR-126-3p	0.00321**	2.660225	6364.63337
miR-203	0.00333**	2.634943	198.40605
miR-342-3p	0.00335**	3.997406	199.61569
miR-182	0.00580**	2.899025	99.42332
miR-143	0.01483*	2.989986	50.21310
miR-328	0.01942*	3.513823	12.75311

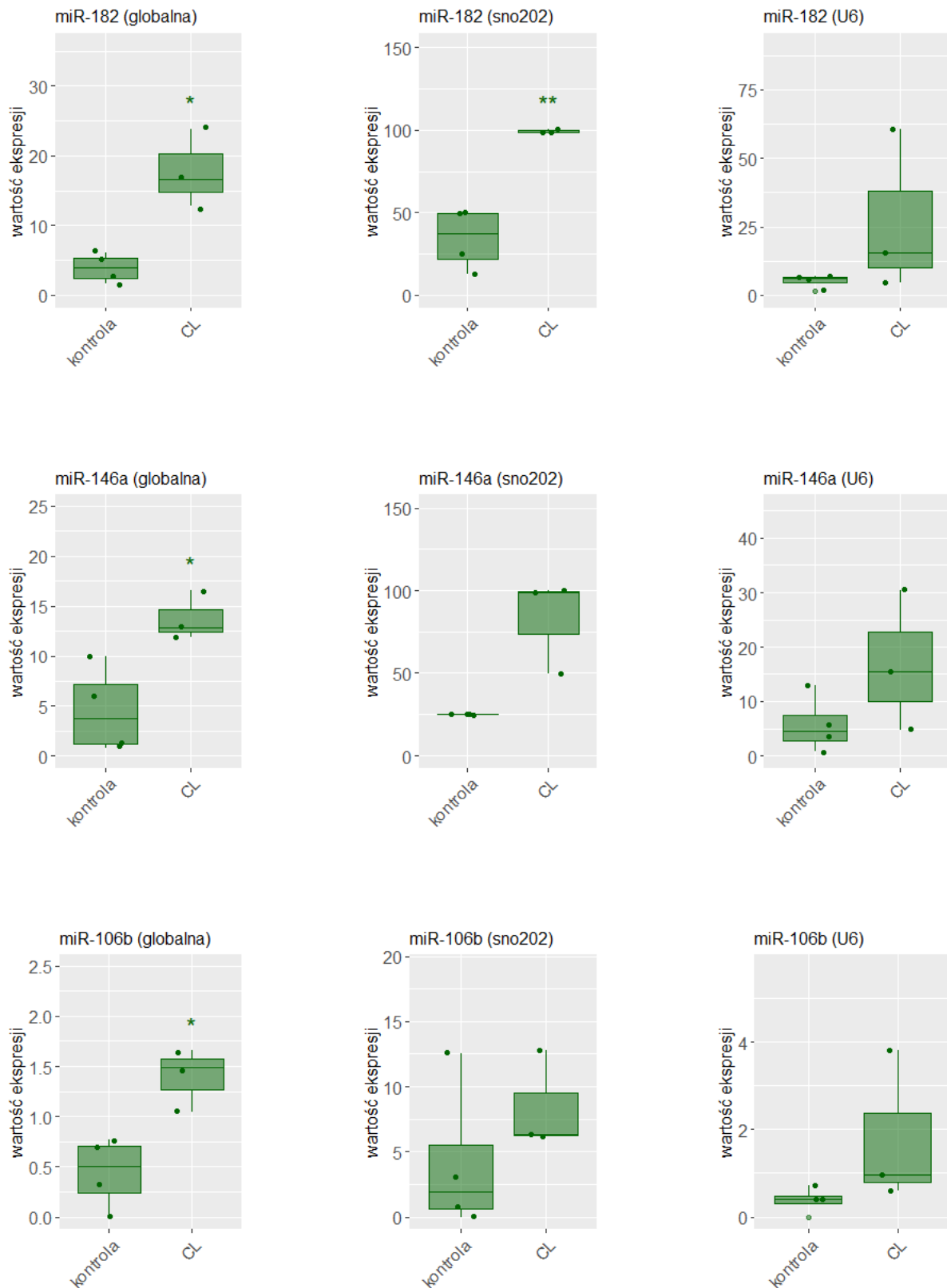
Rycina 42. Lista istotnie zmienionych mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego, zaindukowanych agonistą receptorów β_3 -adrenergicznych; wartości ekspresji zostały **znormalizowane do genu *sno202*** i odniesione do grupy kontrolnej



Rycina 43. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, po aktywacji procesu termogenezy; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genu *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła 3 lub 4; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



Rycina 44. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, po aktywacji procesu termogenezy, cd.; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genu *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła 3 lub 4; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



Rycina 45. Zmiany poziomu ekspresji wyróżnionych mikroRNA w międzyłopatkowej, brązowej tkance tłuszczowej u myszy typu dzikiego, po aktywacji procesu termogenezy, cd.; wartości ekspresji zostały znormalizowane globalnie oraz względem genu *sno202* i *U6*; liczba zwierząt w grupie wynosiła 3 lub 4; w analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych; poziom istotności dla prób badanych przedstawiony jest w odniesieniu do grupy kontrolnej; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

5. DYSKUSJA

W niniejszej pracy wykazano regulacyjną funkcję cząsteczek mikroRNA w metabolizmie białej oraz brązowej tkanki tłuszczowej poprzez zablokowanie biosyntezy mikroRNA ograniczonej do tych tkanek w mysim modelu Dicer^{AdipoqCreERT2}. Ze względu na odmienne role jakie spełniają obydwie typy tkanki, do ich badania wykorzystano różne strategie doświadczalne. W przypadku białej tkanki tłuszczowej zastosowanie restrykcji pokarmowej pozwoliło na uruchomienie procesów katabolicznych lipidów, stanowiących zapasowy materiał energetyczny dla reakcji oddychania komórkowego. Aktywacja receptorów β -adrenergicznych z wykorzystaniem odpowiedniego agonisty pozwoliła natomiast na zainicjowanie procesu termogenezy, uwalniającego w komórkach BAT energię w postaci ciepła.

5.1 W restrykcjach pokarmowych czas między kolejnymi posiłkami dyktuje intensywność przemian metabolicznych

Każdy wariant restrykcji pokarmowej prowadzi do swoistej zmiany metabolicznej, której rdzeń stanowią te same procesy biochemiczne. Jeśli organizm po raz pierwszy zetknie się z całkowitą utratą dostępu do pożywienia, uruchomienie zapasów lipidowych w tkance tłuszczowej nie jest natychmiastowe, zaś przyrost wolnych kwasów tłuszczowych we krwi następuje na przestrzeni kilkunastu godzin (ryc. 12) (M. R. Soeters, Soeters, Schooneman, Houten, & Romijn, 2012). Maksymalne stężenie FFA w osoczu podyktowane jest tempem ich przyrostu na skutek lipolizy, wykorzystaniem w procesie oddychania komórkowego oraz procesami przemian tych kwasów, takich jak reestryfikacja czy ketogeneza. Spadek zawartości glukozy również nie jest natychmiastowy w takich warunkach i osiąga swoje minimalne wartości po kilkunastu godzinach. Stężenie glukozy we krwi w stosowanych w moich badaniach restrykcjach pokarmowych nigdy nie spadło do wartości bliskich zeru. Ze względu na ścisłą zależność mózgu od glukozy stan hypoglikemii (czyli wartości stężenia glukozy we krwi poniżej 60 mg/dl u człowieka) stanowi bezpośrednie zagrożenie życia. Przełączenie metabolizmu na wykorzystanie kwasów tłuszczowych w dalszym ciągu nie zapewnia puli cząsteczek ATP dla komórek mózgu, dlatego że FFA nie mogą przedostać się z krwioobiegu do tych komórek. Komórki te polegają w dalszym ciągu na metabolizmie glukozy, a substratu tego dostarczają procesy glikogenolizy oraz glukoneogenezy oraz ciałach ketonowych.

W niniejszej pracy oprócz standardowej, jednorazowej głodówki, zastosowano również dodatkowy reżim restrykcji pokarmowej jaką jest restrykcja kaloryczna (CR). Istotą tej restrykcji było ograniczenie dziennej liczby spożywanych kalorii, dostarczanych w postaci porcji pokarmu tylko raz w ciągu doby. Konsekwentne utrzymanie tego schematu przez okres kilku tygodni pozwoliło na zaobserwowanie prawidłowości w kinetyce reakcji odpowiedzialnych za utylizację kwasów tłuszczowych, stanowiących nadrzędny substrat energetyczny w restrykcjach pokarmowych (ryc. 12, 15). Utrzymanie reżimu CR u zwierząt nie wydaje się zmieniać znacząco tempa przyrostu FFA w stosunku do głodówki krótkookresowej. Zaobserwowano natomiast mniejszy przyrost ciał ketonowych. Jest jednak możliwe, że efekt ten spowodowany jest krótszym czasem odstępu od pokarmu w trakcie restrykcji kalorycznej. Zgodnie z obserwacją zwierzę potrzebowało ok. 3 godzin na spożycie całej porcji pokarmu od chwili jego podania, co ostatecznie przekłada się na ok. 20-godzinny czas odstępstwa od pożywienia. W głodówce czas ten wynosił natomiast 24 godziny. Niespójne są jednak dane na temat pomiaru zawartości glukozy. W zależności od pory dnia, w której zwierzę otrzymywało porcję pokarmu, stężenie glukozy we krwi charakteryzowało się albo podobną kinetyką zmian tego metabolitu, jak w przypadku głodówki, albo stałym poziomem, utrzymującym się przez okres 24 godzin. Pewnym jest jednak, że wykorzystanie glukozy w restrykcji kalorycznej było najbardziej intensywne w przeciągu pierwszych godzin od podania jedzenia, czego dowodzą wyniki z pomiarów współczynnika RER uzyskanych z wykorzystaniem systemu Phenomaster, w których wartość tego współczynnika jest bliska 1, świadcząca o wykorzystaniu węglowodanów jako wiodącego metabolitu dostarczającego energii w postaci ATP (ryc. 15). Na uwagę zasługuje również zdecydowanie największy wyrzut insuliny po posiłku w reżimie CR wieczornym. Może to świadczyć o tym, że o tej porze dnia zagospodarowanie takiej samej dawki glukozy wymaga większego stężenia insuliny.

Nadrzędnym wnioskiem płynącym z doświadczeń z wykorzystaniem restrykcji kalorycznej jest przekonanie, że tempo zmian stężeń poszczególnych metabolitów nie było uzależnione od kaloryczności (wielkości porcji) pokarmu, ale raczej od czasu pomiędzy kolejnymi posiłkami. Zawartość kwasów tłuszczowych w osoczu osiągała najwyższe wartości w chwili podania jedzenia, następnie spadała gwałtownie po konsumpcji i w ciągu następnych godzin rosła ponownie aby osiągnąć swoje maksimum pod koniec cyklu restrykcji kalorycznej. Prawidłowość tą można wykorzystać przy planowaniu badań, związanych z oznaczaniem profilu metabolicznego zwierząt. W warunkach *ad libitum*, stężenie metabolitów i hormonów jest podyktowane w dużej mierze samodzielnym dawkowaniem jedzenia przez zwierzę, co jest zależne między innymi od jego aktualnej wagi (zawartości tkanki tłuszczowej), czy też

funkcjonowania ośrodków głodu i sytości w mózgu. Moment konsumpcji jedzenia w ciągu doby może różnić się między poszczególnymi osobnikami w danej grupie eksperymentalnej i przez to przekładać się na mniejsze lub większe różnice w otrzymywanych wynikach. Wykorzystanie czasowej restrykcji pokarmowej pozwala na zniwelowanie tych różnic. W takim przypadku eksperymentator ma większą kontrolę nad kinetyką reakcji metabolicznych i możliwość dobrania odpowiednich punktów czasowych dla przeprowadzanych pomiarów. Należy pamiętać, że nie jest konieczne ograniczenie dostarczanych kalorii zwierzęciu, ale raczej rozdzielenie porcji pokarmowych w czasie trwania cyklu okołodobowego. Ten rodzaj restrykcji określa się mianem czasowej restrykcji pokarmowej i skupia ona na sobie uwagę badaczy w ostatnich latach (Acosta-Rodríguez, de Groot, Rijo-Ferreira, Green, & Takahashi, 2017; Chaix, Zarrinpar, Miu, & Panda, 2014; Pellegrini et al., 2020; Rynders et al., 2019).

5.2 W restrykcjach pokarmowych zmiany hormonalne współtworzą przemiany metaboliczne i warunkują motywację do poszukiwania jedzenia

W moich badaniu zmianom stężeń substratów energetycznych w restrykcjach pokarmowych towarzyszyła zmiana w zawartości hormonów – insuliny oraz leptyny. W 24-godzinnej głodówce obniżający się poziom glukozy we krwi skorelowany był ze spadkiem hormonu insuliny, zaś przybywająca ilość wolnych kwasów tłuszczowych związana była z równoczesnym spadkiem leptyny. Spadek poziomu tego hormonu był najprawdopodobniej uwarunkowany wyczerpywaniem się zapasów trójglicerydów magazynowanych w białej tkance tłuszczowej (zmniejszaniem pojemności tkanki), będącym sygnałem regulującym sekrecję leptyny. W wariantach restrykcji kalorycznej podanie pokarmu powodowało zauważalny wzrost insuliny na skutek dostarczenia puli węglowodanów. Nie miało to jednak wyraźnego wpływu na ogólne stężenie glukozy we krwi, najprawdopodobniej ze względu na bardzo szybką asymilację tego metabolitu do wnętrza komórki. Gwałtowny wzrost współczynnika RER również wskazuje na intensywne wykorzystanie glukozy w procesach energetycznych. Tylko w przypadku porannego wariantu CR poziom glukozy wzrastał, po czym malał ponownie tak jak to miało miejsce w głodówce. Można przypuszczać, że zainicjowanie restrykcji pokarmowej po raz pierwszy, powoduje spadek glukozy w początkowej fazie trwania restrykcji, zaś później jest on utrzymywany na względnie stałym poziomie, wskutek endogennej produkcji glukozy.

Równolegle do wzrostu zawartości insuliny poposiłkowej we krwi, obserwowano przejściowy wzrost hormonu leptyny, przypuszczalnie wskutek asymilacji FFA do białej tkanki tłuszczowej (zwiększenie pojemności tkanki). Dostarczenie porcji pokarmu zwierzęciu skorelowane było także z istotnym spadkiem jego aktywności w ciągu następnych godzin. Trzeba zaznaczyć, że efekt ten nie był spowodowany tylko i wyłącznie konsumpcją pożywienia, albowiem niska aktywność utrzymywana była także po całkowitym spożyciu pokarmu. Obniżenie aktywności zwierzęcia związane jest przypuszczalnie z działaniem leptyny, wpływającej na homeostazę energetyczną m.in. poprzez regulację pośrednią lub bezpośrednią mózgowych ośrodków związanych z głodem i sytością, motywacją oraz ogólnie pojętą lokomotoryką. Kluczowa rola leptyny w aktywnym poszukiwaniu pożywienia (z ang. *food-seeking behavior*) została potwierdzona także w moich badaniach poprzez zastosowanie klatek Skinnera. Doświadczenia te dowiodły, że przegłodzone zwierzę (tuż przed kolejną porcją pożywienia), pozostające w reżimie CR oraz potraktowane leptyną, odznaczało się wyraźnie mniejszym stopniem motywacji w kierunku pozyskania pokarmu w porównaniu do zwierząt kontrolnych (ryc. 16).

5.3 Podobieństwa i różnice między restrykcją pokarmową a procesem termogenezy

Aktywacja termogenezy jest ściśle związana z rozprężaniem elektronów w błonie mitochondrialnej dzięki obecności białka UCP1. Aby proces ten mógł zachodzić wydajnie niezbędny jest stały napływ elektronów, których źródłem są bezpośrednio nośniki NADH oraz FADH₂. Obydwa przekaźniki pozyskiwane są w tej formie w cyklu Krebsa, napędzanego m.in. przez wolne kwasy tłuszczowe, tak jak ma to miejsce w restrykcji pokarmowej. Stymulacja procesu termogenezy przez aktywację receptorów β_3 -adrenergicznych w moim badaniu powodowała gwałtowny wzrost zawartości FFA we krwi przy jednoczesnym spadku glukozy. Zależność ta była analogiczna do sytuacji jaka występowała w głodówce krótkookresowej lub przy przedłużającym się stanie poposiłkowym w wariantach restrykcji kalorycznej. Wnioskuje się zatem, że to kwasy tłuszczowe są kluczowym substratem energetycznym dla procesu termogenezy.

Restrykcja pokarmowa i wytwarzanie ciepła różniły się jednak między sobą na poziomie hormonalnym. Mowa tu przede wszystkim o insulinie, której stężenie wzrosło gwałtownie po 2 godzinach od zainicjowania termogenezy. Wydaje się mało intuicyjne, aby

wzroście zawartości insuliny we krwi towarzyszył równoczesny wzrost zawartości kwasów tłuszczowych, przede wszystkim ze względu na dobrze poznane właściwości antylipolityczne tego hormonu. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że w warunkach po aktywacji receptorów β -adrenergicznych zadaniem insuliny jest nasilenie transportu FFA w postaci lipoprotein TRL (z ang. Triglyceride-Rich Lipoproteins) do wnętrza komórek brązowej tkanki tłuszczowej celem zwiększenia podaży tego substratu dla procesu termogenezy (Heine et al., 2018). Autorzy tej pracy wykazali, że zahamowanie działania insuliny lub zaburzenie przekąźnictwa insulinowego w BAT zaburza pobór tego substratu energetycznego i efektywną termogenezę.

5.4 Skuteczność systemu Cre-loxP warunkuje obserwację fenotypu zwierząt transgeniczných Dicer^{AdipoqCreERT2}

Wykorzystanie transgeniczných linii zwierząt z obniżoną zdolnością do wytwarzania cząsteczek mikroRNA w moim badaniu miało za zadanie uwidocznć fenotyp, dzięki któremu możliwe byłoby rozpoczęcie prac na określeniu roli jaką spełniają te cząsteczki w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej. Wprowadzenie czynników uruchamiających procesy ściśle związane z rolą każdej z typów tkanki u tych zwierząt przyniosło odrębne rezultaty. Zainicjowanie procesu termogenezy w brązowej tkance tłuszczowej pozwoliło zaobserwować istotnie obniżoną zdolność do generowania ciepła. Tym samym nakierowało na poszukiwanie powiązań między mikroRNA a elementami, niezbędnymi dla przeprowadzania tego procesu. Wprowadzenie restrykcji pokarmowej nie przyniosło natomiast wyraźnie zaznaczonego efektu. Zwierzęta te co prawda odznaczały się zwiększoną zawartością glukozy we krwi po 24 godzinach głodzenia w stosunku do zwierząt kontrolnych, jednak ogólna charakterystyka parametrów metaboliczných pozostawała u nich zbliżona. Warto zaznaczyć również, że wartości tych parametrów pozostawały statystycznie niezmięnione w fazie aktywnej zwierząt, podczas której procesy metaboliczne w danych warunkach doświadczalnych powinny być teoretycznie najbardziej nasilone. Również w warunkach *ad libitum* grupa zwierząt badanych nie wykazała żadnych zmian w porównaniu do grupy kontrolnej.

Szukając przyczyn dla obserwowanej charakterystyki zwierząt Dicer^{AdipoqCreERT2}, w kontekście funkcjonowania białej tkanki tłuszczowej, wyjaśnienia może dostarczyć skuteczność samego modelu doświadczalnego, umożliwiającego globalne usunięcie cząsteczek mikroRNA. Weryfikacja wydajności systemu Cre-loxP pokazała, że był on mniej specyficzny w stosunku do białej, aniżeli do brązowej tkanki tłuszczowej. Ponadto w podtypie

okołogonadalnej białej tkanki (PG) nie wykazano żadnego efektu usunięcia mikroRNA i w związku z tym tkanka ta mogła spełniać swoją właściwą funkcję. Także w innych podtypach WAT część komórek mogła pozostawać niezmienną na skutek mozaikowej rekombinacji. Wskazuje to na możliwość kompensacji układu, w którym niezmiennione komórki były w stanie zapewnić poprawne funkcjonowanie całej tkanki. Należy podkreślić, że wzór rekombinacji uzyskany w moich doświadczeniach odbiega od wzoru, który wykazali twórcy linii AdipoqCreERT2 w oryginalnej publikacji (Sassmann et al., 2010). Badacze ci za pomocą zastosowania Cre-zależnej linii reporterowej Rosa26-LacZ stwierdzili bardzo wydajną rekombinację w białej tkance tłuszczowej. Natomiast rekombinacja w brązowej tkance tłuszczowej sięgała tylko kilkunastu procent komórek. Różnice we wzorze rekombinacji w tej samej linii AdipoqCreERT2 w różnych laboratoriach może wynikać z faktu wielogeneracyjnego krzyżowania zwierząt i wprowadzania zmienionego tła genetycznego, mającego wpływ na ekspresję transgenu. Różnica ta jest obserwowana mimo, że w linii AdipoqCreERT2 rekombinaza CreERT2 jest umieszczona na sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC) o wielkości kilkudziesięciu tysięcy par zasad, co powinno uniezależniać ją od wpływu sekwencji otaczających.

5.5 Zwierzęta transgeniczne Dicer^{AdipoqCreERT2} charakteryzują się obniżoną termogenezą

Zmniejszona skuteczność wytwarzania ciepła przez zwierzęta Dicer^{AdipoqCreERT2} została potwierdzona w moim badaniu dzięki wykorzystaniu systemu klatek metabolicznych oraz zastosowaniu kamery termowizyjnej. Zwierzęta te po 2 godz. od podania agonisty receptorów β_3 -adrenergicznych charakteryzowały się mniejszym, ogólnym wydatkiem energetycznym niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Także monitorowanie temperatury na powierzchni ogona wskazywało na niższą zdolność do wytwarzania ciepła u tych zwierząt. Ponieważ linia Dicer^{AdipoqCreERT2} umożliwia usunięcie sekwencji genu *Dicer1* w komórkach tkanki tłuszczowej, wiemy, że obserwowany fenotyp jest ściśle związany z brakiem funkcjonalnych cząsteczek mikroRNA w tej tkance. Odpowiedzi na pytanie w jaki sposób proces termogenezy utrzymywany jest pod kontrolą mikroRNA miały dostarczyć m.in. informacje o zmianie w stężeniach substratów energetycznych w osoczu (przede wszystkim FFA), zaangażowanych w funkcjonowanie tego procesu. Przemiany tych substratów są bowiem ściśle kontrolowane działaniem enzymów wewnątrzkomórkowych, które stanowią cel dla wielu mikroRNA.

Jednakże myszy linii *Dicer*^{AdipoqCreERT2} nie wykazały istotnych różnic w gospodarowaniu substratami energetycznymi w porównaniu do zwierząt kontrolnych oraz do zwierząt typu dzikiego. Jako że wynik ten dostarczał informacji na temat braku zmian w osoczu, prawdopodobnie przyczyn rozregulowania procesu termogenezy należy szukać bezpośrednio wewnątrz komórek BAT. Komórki brązowej tkanki tłuszczowej mogłyby wówczas charakteryzować się zmienionym profilem substratów energetycznych przy jednoczesnym, niezmienionym profilu tych substratów w osoczu.

5.6 Zmieniony profil ekspresji mikroRNA w brązowej tkance tłuszczowej myszy typu dzikiego dostarcza wskazówek dla wyjaśnienia fenotypu obniżonej termogenezy u zwierząt transgenicznych *Dicer*^{AdipoqCreERT2}

Doświadczenia związane z aktywacją procesu termogenezy u zwierząt typu dzikiego wyłoniły szereg mikroRNA, zmienionych na skutek działania agonisty CL-316,243. Korzystając z ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych takich jak *TargetScan*, spośród listy otrzymanych przez nas mikroRNA wyselekcjonowano te, które wykazują sekwencję komplementarną (w obrębie sekwencji „seed”) do sekwencji w 3'UTR cząsteczek mRNA, kodujących białka powiązane z omawianym procesem generowania ciepła. Pięć cząsteczek mikroRNA okazała się być komplementarna do mRNA dla samego białka termogeniny (UCP1). Do tego grona zaliczono miR-150, miR-676, miR-203, miR-146a oraz miR-106b. Dodatkowo zmiana miR-193b, którego związek z funkcją białka UCP1 jest postulowany (Feuermann et al., 2013; Sun et al., 2011), w mojej analizie była bliska uzyskania istotności statystycznej na poziomie $p < 0,05$. Ponadto dwa mikroRNA - miR-124 oraz miR-182 - okazały się komplementarne do mRNA dla lipazy triacyloglicerolowej (ATGL). MiR-124 odznaczało się również wiązaniem do mRNA lipazy zależnej od hormonów (HSL), zaś wspomniane wcześniej miR-106b także do lipazy monoacyloglicerolowej (MAGL). Komórki BAT charakteryzowane są jako te, gromadzące zapasy lipidowe dla własnego użytku (Frankl et al., 2019). Wszystkie wymienione lipazy katalizują reakcję hydrolizy glicerydów, dostarczając w ten sposób kwasów tłuszczowych, które napędzają proces termogenezy. Jedynie miR-139-5p, które uzyskało w mojej analizie wysoką istotność statystyczną w normalizacji *sno202*, nie ujawniło komplementarności do cząsteczek mRNA, powiązanych z termogenezą.

Wszystkie wyszczególnione przez nas mikroRNA wykazały podwyższoną ekspresję w odpowiedzi na traktowanie agonistą CL-316,243 u zwierząt typu dzikiego. Ze względu na to,

że główną funkcją mikroRNA jest represja translacji docelowych mRNA, taki wzrost ekspresji mikroRNA po indukcji agonistą może być związanych z próbą przywrócenia prawidłowego poziomu np. wyżej opisanych lipaz. Usunięcie mikroRNA w komórkach BAT w modelu *Dicer^{AdipoqCreERT2}* może powodować rozregulowanie ekspresji białek zaangażowanych w termogenezę i brak możliwości ich kontroli w drodze translacji a w konsekwencji również kontroli poprzez modyfikacje potranslacyjne np. fosforylację. Warto dodać, że wzrost zawartości miR-203 w komórkach brązowej tkanki tłuszczowej po aktywacji procesu termogenezy został zaobserwowany również przez innych badaczy (Xiaolong et al., 2019). Ponadto pierwsze próby zahamowania ekspresji pojedynczych mikroRNA wykazały w przypadku miR-32 jego kluczową rolę w tolerancji na chłód oraz zależną od BAT termogenezę (Ng et al., 2017). Aby całkowicie wyjaśnić rolę mikroRNA w tkance tłuszczowej pożądane byłoby posiadanie informacji o zmianach w profilu mikroRNA również w komórkach WAT po aktywacji termogenezy, aby określić ich ewentualny wpływ na stan funkcjonowania lokalnych lipaz.

5.7 Zmieniony profil ekspresji mikroRNA w białej tkance tłuszczowej jest powiązany z fenotypem metabolicznej odpowiedzi organizmu na restrykcję pokarmową

Określenie wpływu cząsteczek mikroRNA na fenotyp metabolicznej odpowiedzi organizmu na restrykcję pokarmową okazało się kłopotliwe z kilku powodów. Po pierwsze w odróżnieniu od badań skupionych na brązowej tkance tłuszczowej i generowaniu przez nią ciepła, które odbywa się na drodze dobrze zdefiniowanego procesu, wprowadzenie restrykcji pokarmowej uruchamia szereg procesów w białej tkance tłuszczowej, prowadzących wspólnie do obserwowanego fenotypu. Spodziewać się należało zatem regulacji tego fenotypu nie na poziomie jednego lub kilku mikroRNA, ale raczej wielu cząsteczek z tej grupy, kontrolujących te procesy. Badania z wykorzystaniem zwierząt typu dzikiego potwierdziły te założenia, gdyż wprowadzenie restrykcji kalorycznej pozwoliło zaobserwować istotną zmianę ponad 40 mikroRNA w obrębie WAT. Niestety wykorzystanie zwierząt linii transgenicznej *Dicer^{AdipoqCreERT2}* w doświadczeniach, w których zwierzęta te poddano restrykcji pokarmowej, nie pokazało oczekiwanych, wyraźnie widocznych zaburzeń w gospodarowaniu substratami energetycznymi, ani w monitorowanych parametrach metabolicznych. Jedynie zmiany w zawartości glukozy u myszy *Dicer^{AdipoqCreERT2}* wskazują, że potencjalnie kluczowych

mikroRNA należy szukać w grupie kontrolującej ekspresję białek/enzymów powiązanych z wewnątrzkomórkową gospodarką węglowodanową. Spośród wszystkich zmienionych mikroRNA wykrytych w profilowaniu białej tkanki tłuszczowej, na uwagę zasługują dwa mikroRNA: miR-29c oraz let-7i. Według obecnego stanu wiedzy miR-29c zaangażowane jest w gospodarkę węglowodanową, celując w geny dla substratu receptora insulinowego IRS-1 (Nigi et al., 2018) oraz transportera dla glukozy GLUT4 (Esteves, Enguita, & Machado, 2017), co potwierdza powiązanie tych mikroRNA ze zmianami obserwowanymi w przeprowadzonych doświadczeniach.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W niniejszej pracy przeprowadzono badania, z których można wyciągnąć następujące wnioski:

- Mysi model $Dicer^{AdipoqCreERT2}$ stanowi skuteczne narzędzie do badania globalnej funkcji mikroRNA w tkance tłuszczowej, w szczególności w brązowej tkance tłuszczowej.
- W metabolicznej odpowiedzi organizmu na restrykcje pokarmowe oraz na indukcję termogenezy występują podobieństwa.
- MikroRNA brązowej tkanki tłuszczowej są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu termogenezy w tej tkance.
- Zidentyfikowany zestaw mikroRNA (m.in. miR-29c, let-7i, miR-21, miR-196b, miR-199a-3p, miR-188-5p, miR-126-5p, miR-142-3p, miR-322, miR-150, miR-676, miR-203, miR-146a, miR-106b, miR-124, miR-182) wydaje się pełnić istotną rolę w procesie przemian metabolicznych związanych z restrykcjami pokarmowymi oraz indukcją termogenezy.

Powyższe wnioski wskazują na kluczową rolę mikroRNA w kontroli wewnątrzkomórkowych przemian metabolicznych w tkance tłuszczowej, związanych z odpowiedzią komórki na czynniki zewnętrzne.

7. LITERATURA

- Acosta-Rodríguez, V. A., de Groot, M. H. M., Rijo-Ferreira, F., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2017). Mice under Caloric Restriction Self-Impose a Temporal Restriction of Food Intake as Revealed by an Automated Feeder System. *Cell Metab*, 26(1), 267-277.e262. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.007
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*, 92(6-7), 229-236. doi:10.1016/j.ejcb.2013.06.001
- Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res*, 717(1-2), 1-8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009
- An J, M. D., Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB. (2004). Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med*, 10, 268–274.
- Anderson JW, H. R. (1972). Effect of fasting, caloric restriction, and refeeding on glucose tolerance of normal men. *Am J Clin Nutr*, 25, 41-52.
- Ardekani, A. M., & Naeini, M. M. (2010). The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2(4), 161-179.
- Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C. Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K., & Lowell, B. B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, 297(5582), 843-845. doi:10.1126/science.1073160
- Bartel, D. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173, 20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
- Beck, B., Jhanwar-Uniyal, M., Burlet, A., Chapleur-Chateau, M., Leibowitz, S. F., & Burlet, C. (1990). Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Research*, 528(2), 245-249. doi:https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91664-3
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development*, 20(14), 1885-1898. doi:10.1101/gad.1424106
- Bergman BC, C. M., Horton TJ, Bessesen DH. (2007). Effects of fasting on insulin action and glucose kinetics in lean and obese men and women. (293), E1103-E1111.
- Bickel, P. E., Tansey, J. T., & Welte, M. A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 419-440. doi:10.1016/j.bbalip.2009.04.002
- Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skørve, J., & Berge, R. K. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes*, 2011, 490650. doi:10.1155/2011/490650
- Bjorntorp, P. (1991). Importance of fat as a support nutrient for energy: metabolism of athletes. *J Sports Sci*, 9 Spec No, 71-76. doi:10.1080/02640419108729867
- Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Barber, T., Coxey, R. A., Takeda, T., Rondinone, C. M., . . . Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *The Journal of Lipid Research*, 36(6), 1211-1226.
- Boden, G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), 635-ix. doi:10.1016/j.ecl.2008.06.007
- Bogin, B. (1998). From caveman cuisine to fast food: the evolution of human nutrition. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society*

- and the International IGF Research Society, 8 Suppl B, 79-86. doi:10.1016/S1096-6374(98)80027-0
- Boon, R. A., & Vickers, K. C. (2013). Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(2), 186-192. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300139
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., . . . Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 408(1), 39-42. doi:10.1016/s0014-5793(97)00384-0
- Brandão, B. B., Guerra, B. A., & Mori, M. A. (2017). Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox Biology*, 12, 82-102. doi:https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.020
- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. T., Haas, G., . . . Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol*, 19(12), 1324-1331. doi:10.1038/nsmb.2413
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15043-15048. doi:10.1073/pnas.95.25.15043
- Brondani, L. A., Assmann, T. S., Duarte, G. C., Gross, J. L., Canani, L. H., & Crispim, D. (2012). The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 56(4), 215-225. doi:10.1590/s0004-27302012000400001
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(5), 592-601. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002
- Buettner, C., Muse, E. D., Cheng, A., Chen, L., Scherer, T., Poci, A., . . . Buettner, C. (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nature medicine*, 14(6), 667-675. doi:10.1038/nm1775
- Cahill GF Jr, H. M., Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, Reichard GA Jr, Kipnis DM. (1966). Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest*, 45, 1751-1769.
- Cahill, G. F., Jr. (1970). Starvation in man. *N Engl J Med*, 282(12), 668-675. doi:10.1056/nejm197003192821209
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol*, 214(Pt 2), 242-253. doi:10.1242/jeb.050989
- Carlson, M. G., Snead, W. L., & Campbell, P. J. (1994). Fuel and energy metabolism in fasting humans. *Am J Clin Nutr*, 60(1), 29-36. doi:10.1093/ajcn/60.1.29
- Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., & Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism*, 20(6), 991-1005. doi:10.1016/j.cmet.2014.11.001
- Chakrabarti, P., Kim, J. Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., . . . Kandror, K. V. (2013). Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway. *Molecular and cellular biology*, 33(18), 3659-3666. doi:10.1128/MCB.01584-12
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), 584-589. doi:10.1038/nature09092

- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., . . . Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84(3), 491-495. doi:10.1016/s0092-8674(00)81294-5
- Cianflone, K., Maslowska, M., & Sniderman, A. D. (1999). Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(1), 31-41. doi:https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0272
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(1), 9-15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010
- Cobb, B. S., Nesterova, T. B., Thompson, E., Hertweck, A., O'Connor, E., Godwin, J., . . . Merkenschlager, M. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med*, 201(9), 1367-1373. doi:10.1084/jem.20050572
- Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J. M., Rohani, S. C., Feinstein, P., . . . Friedman, J. M. (2001). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest*, 108(8), 1113-1121. doi:10.1172/jci13914
- Coleman, R. A., & Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 43(2), 134-176. doi:10.1016/s0163-7827(03)00051-1
- Coppack, S. W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 60(3), 349-356. doi:10.1079/pns2001110
- Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C. E., Pullen, A. E., Kenny, C. D., McGovern, R. A., . . . Elmquist, J. K. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: A key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metabolism*, 1(1), 63-72. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.004
- Cortez, M. A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., & Calin, G. A. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(8), 467-477. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76
- Crandall, J. P., O, J. H., Gajwani, P., Leal, J. P., Mawhinney, D. D., Sterzer, F., & Wahl, R. L. (2018). Measurement of Brown Adipose Tissue Activity Using Microwave Radiometry and (18)F-FDG PET/CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 59(8), 1243-1248. doi:10.2967/jnumed.117.204339
- de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., . . . The, F. C. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872-878. doi:10.1038/nbt.3947
- DeFronzo RA, J. E., Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30, 1000-1007.
- Diano, S., Matthews, R. T., Patrylo, P., Yang, L., Beal, M. F., Barnstable, C. J., & Horvath, T. L. (2003). Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology*, 144(11), 5014-5021. doi:10.1210/en.2003-0667
- Donato, J. J., Cravo, R. M., Frazão, R., & Elias, C. F. (2011). Hypothalamic Sites of Leptin Action Linking Metabolism and Reproduction. *Neuroendocrinology*, 93(1), 9-18. doi:10.1159/000322472
- Donhoffer, S. Z., SÁRdy, F., & SzegvÁRi, G. Y. (1964). Brown Adipose Tissue and Thermoregulatory Heat Production in the Rat. *Nature*, 203(4946), 765-766. doi:10.1038/203765b0
- Drel, V. R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V. V., & Obrosova, I. G. (2006). The Leptin-Deficient (ob/ob) Mouse. *Diabetes*, 55(12), 3335. doi:10.2337/db06-0885

- Drenick, E. J., Swendseid, M. E., Bland, W. H., & Tuttle, S. G. (1964). Prolonged Starvation as Treatment for Severe Obesity. *JAMA*, 187(2), 100-105. doi:10.1001/jama.1964.03060150024006
- Ekberg, K., Landau, B. R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., & Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 48(2), 292. doi:10.2337/diabetes.48.2.292
- Elia, M., Zed, C., Neale, G., & Livesey, G. (1987). The energy cost of triglyceride-fatty acid recycling in nonobese subjects after an overnight fast and four days of starvation. *Metabolism*, 36(3), 251-255. doi:10.1016/0026-0495(87)90184-3
- Esteves, J. V., Enguita, F. J., & Machado, U. F. (2017). MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. *Journal of diabetes research*, 2017, 7267910-7267910. doi:10.1155/2017/7267910
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4(4), 263-273. doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001
- Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, 36(7), 461-470. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014
- Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R., & Friedman, J. M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 7001-7005. doi:10.1073/pnas.94.13.7001
- Felig, P., Owen, O. E., Wahren, J., & Cahill, G. F., Jr. (1969). Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*, 48(3), 584-594. doi:10.1172/JCI106017
- Fernandes, Maria Fernanda A., Matthys, D., Hryhorczuk, C., Sharma, S., Mogra, S., Alquier, T., & Fulton, S. (2015). Leptin Suppresses the Rewarding Effects of Running via STAT3 Signaling in Dopamine Neurons. *Cell Metabolism*, 22(4), 741-749. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.003
- Fery F, P. L., Balasse EO. (1999). Effect of fasting on the intracellular metabolic partition of intravenously infused glucose in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 277, E815–E823.
- Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M., & Horsley, V. (2011). Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell*, 146(5), 761-771. doi:10.1016/j.cell.2011.07.019
- Feuermann, Y., Kang, K., Gavrilova, O., Haetscher, N., Jang, S. J., Yoo, K. H., . . . Hennighausen, L. (2013). MiR-193b and miR-365-1 are not required for the development and function of brown fat in the mouse. *RNA biology*, 10(12), 1807-1814. doi:10.4161/rna.27239
- Fiorenza, A., & Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 135. doi:10.1016/j.nlm.2016.05.001
- Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., . . . Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development*, 26(3), 271-281. doi:10.1101/gad.177857.111
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., . . . Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 15(3), 269-272. doi:10.1038/ng0397-269
- Florez-Duquet, M., Horwitz, B. A., & McDonald, R. B. (1998). Cellular proliferation and UCP content in brown adipose tissue of cold-exposed aging Fischer 344 rats. *Am J Physiol*, 274(1), R196-203. doi:10.1152/ajpregu.1998.274.1.R196

- Frankl, J., Sherwood, A., Clegg, D. J., Scherer, P. E., & Öz, O. K. (2019). Imaging Metabolically Active Fat: A Literature Review and Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci*, 20(21). doi:10.3390/ijms20215509
- Frayn, K. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, 45, 1201-1210. doi:10.1007/s00125-002-0873-y
- Friedman, J. M. (1997). Leptin, leptin receptors and the control of body weight. *Eur J Med Res*, 2(1), 7-13.
- Frühbeck, G., Aguado, M., & Martínez, J. A. (1997). In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, 240(3), 590-594. doi:10.1006/bbrc.1997.7716
- Fukao T, L. G., Mitchell GA. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70, 243–251.
- Fukao, T., Lopaschuk, G. D., & Mitchell, G. A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(3), 243-251. doi:10.1016/j.plefa.2003.11.001
- Glucose Metabolism in the Red Blood Cell. (1960). *Nutrition Reviews*, 18(7), 206-207. doi:10.1111/j.1753-4887.1960.tb01772.x
- Goralski, K., McCarthy, T., Hanniman, E., Zabel, B., Butcher, E., Parlee, S., . . . Sinal, C. (2007). Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *J Biol Chem*, 282, 28175-28188. doi:10.1074/jbc.M700793200
- Göschke, H. (1977). Mechanism of glucose intolerance during fasting: Differences between lean and obese subjects. *Metabolism*, 26(10), 1147-1153. doi:https://doi.org/10.1016/0026-0495(77)90042-7
- Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., & Barbarash, O. (2019). Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 12, 191-198. doi:10.2147/DMSO.S182406
- Güller, I., McNaughton, S., Crowley, T., Gilsanz, V., Kajimura, S., Watt, M., & Russell, A. P. (2015). Comparative analysis of microRNA expression in mouse and human brown adipose tissue. *BMC Genomics*, 16(1), 820. doi:10.1186/s12864-015-2045-8
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524. doi:10.1038/nrm3838
- Hack A, B. V., Pascher B, Busch R, Bieger I, Gempel K, Baumeister FA. (2006). Monitoring of ketogenic diet for carnitine metabolites by subcutaneous microdialysis. *Pediatr Res*, 60, 93–96.
- Hankard, R. G., Haymond, M. W., & Darmaun, D. (1997). Role of glutamine as a glucose precursor in fasting humans. *Diabetes*, 46(10), 1535-1541. doi:10.2337/diacare.46.10.1535
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*, 20(8), 460-469. doi:10.1016/j.molmed.2014.06.005
- Hegele, R. A., Cao, H., Frankowski, C., Mathews, S. T., & Leff, T. (2002). PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*, 51(12), 3586-3590. doi:10.2337/diabetes.51.12.3586
- Heine, M., Fischer, A. W., Schlein, C., Jung, C., Straub, L. G., Gottschling, K., . . . Heeren, J. (2018). Lipolysis Triggers a Systemic Insulin Response Essential for Efficient Energy Replenishment of Activated Brown Adipose Tissue in Mice. *Cell Metab*, 28(4), 644-655.e644. doi:10.1016/j.cmet.2018.06.020
- Herron, D., Rehnmark, S., Néchad, M., Loncar, D., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1990). Norepinephrine-induced synthesis of the uncoupling protein thermogenin (UCP) and its mitochondrial targeting in brown adipocytes differentiated in culture. *FEBS Lett*, 268(1), 296-300. doi:10.1016/0014-5793(90)81031-i

- Hill, M. J., Metcalfe, D., & McTernan, P. G. (2009). Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run to'. *Clin Sci (Lond)*, 116(2), 113-123. doi:10.1042/cs20080050
- Hojlund, K., Wildner-Christensen, M., Eshøj, O., Skjaerbaek, C., Holst, J. J., Koldkjaer, O., . . . Beck-Nielsen, H. (2001). Reference intervals for glucose, beta-cell polypeptides, and counterregulatory factors during prolonged fasting. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(1), E50-58. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.1.E50
- Holland WL, K. T., Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. (2007). Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev*, 65, S39–S46.
- Horton, T., & Hill, J. (2001). Prolonged fasting significantly changes nutrient oxidation and glucose tolerance after a normal mixed meal. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90, 155-163. doi:10.1152/jappl.2001.90.1.155
- Horton TJ, H. J. (2001). Prolonged fasting significantly changes nutrient oxidation and glucose tolerance after a normal mixed meal. *J Appl Physiol*, 90, 155–163.
- Huang, W. (2017). MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol Biol*, 1617, 57-67. doi:10.1007/978-1-4939-7046-9_4
- Huang, X. F., Koutcherov, I., Lin, S., Wang, H. Q., & Storlien, L. (1996). Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport*, 7(15-17), 2635-2638. doi:10.1097/00001756-199611040-00045
- Hug, C., & Lodish, H. F. (2005). Visfatin: A New Adipokine. *Science*, 307(5708), 366. doi:10.1126/science.1106933
- Huss-Ashmore, R. (1980). Fat and fertility: Demographic implications of differential fat storage. *American Journal of Physical Anthropology*, 23(S1), 65-91. doi:10.1002/ajpa.1330230506
- Ivey, K. N., & Srivastava, D. (2015). microRNAs as Developmental Regulators. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(7), a008144-a008144. doi:10.1101/cshperspect.a008144
- Jensen, M. D., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Ekberg, K., Previs, S. F., Gupta, S., & Landau, B. R. (2001). Sources of blood glycerol during fasting. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(5), E998-1004. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.5.E998
- Jensen, M. D., Ekberg, K., & Landau, B. R. (2001). Lipid metabolism during fasting. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281(4), E789-E793. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.4.E789
- Jéquier, E. (1994). Carbohydrates as a source of energy. *Am J Clin Nutr*, 59(3 Suppl), 682s-685s. doi:10.1093/ajcn/59.3.682S
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(4), E671-678. doi:10.1152/ajpendo.00492.2002
- Jiang, L., Li, Z., & Rui, L. (2008). Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem*, 283(42), 28066-28073. doi:10.1074/jbc.M805545200
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular cell*, 59(1), 117-124. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.027
- Johnson, N. A., Stannard, S. R., Rowlands, D. S., Chapman, P. G., Thompson, C. H., O'Connor, H., . . . Thompson, M. W. (2006). Effect of short-term starvation versus high-fat diet on intramyocellular triglyceride accumulation and insulin resistance in physically fit men. *Exp Physiol*, 91(4), 693-703. doi:10.1113/expphysiol.2006.033399
- Jr., C. G. (1976). Starvation in man. *Clin Endocrinol Metab*, 5, 397–415.
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem Sci*, 35(7), 368-376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009

- Kersten, S., Mandard, S., Tan, N. S., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P., . . . Wahli, W. (2000). Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*, 275(37), 28488-28493. doi:10.1074/jbc.M004029200
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216. doi:10.1016/s0092-8674(03)00801-8
- Kim, Y.-K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, 26(3), 775-783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512
- Kimmel, A. R., Brasaemle, D. L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., & Londos, C. (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res*, 51(3), 468-471. doi:10.1194/jlr.R000034
- Klein, S., Sakurai, Y., Romijn, J. A., & Carroll, R. M. (1993). Progressive alterations in lipid and glucose metabolism during short-term fasting in young adult men. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 1), E801-806. doi:10.1152/ajpendo.1993.265.5.E801
- Klein S, S. Y., Romijn JA, Carroll RM. (1993). Progressive alterations in lipid and glucose metabolism during short-term fasting in young adult men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 265, E801–E806.
- Klingenberg, M., & Echay, K. S. (2001). Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), 128-143. doi:https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00242-5
- Kochan Z. , K. J. (2004). Wydzielnicza funkcja tkanki tłuszczowej. *Postępy Biochemii*, 50(3), 256-271.
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J. R., Wawrzyniak, M., . . . Schütz, G. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci*, 30(44), 14835-14842. doi:10.1523/jneurosci.3030-10.2010
- Konopka, W., Schütz, G., & Kaczmarek, L. (2011). The MicroRNA Contribution to Learning and Memory. *The Neuroscientist*, 17(5), 468-474. doi:10.1177/1073858411411721
- Kramer HF, W. C., Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, Sakamoto K, Hirshman MF, Goodyear LJ. (2006). Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes*, 55, 2067–2076.
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48(5), 275-297. doi:10.1016/j.plipres.2009.05.001
- Lafontan M, L. D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48, 275–297.
- Landau, B. R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Ekberg, K., & Kalhan, S. C. (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest*, 98(2), 378-385. doi:10.1172/jci118803
- Landau, B. R., Wahren, J., Previs, S. F., Ekberg, K., Chandramouli, V., & Brunengraber, H. (1996). Glycerol production and utilization in humans: sites and quantitation. *Am J Physiol*, 271(6 Pt 1), E1110-1117. doi:10.1152/ajpendo.1996.271.6.E1110
- Lee, P., Swarbrick, M. M., & Ho, K. K. (2013). Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocr Rev*, 34(3), 413-438. doi:10.1210/er.2012-1081
- Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell*, 116(2 Suppl), S89-92, 81 p following S96. doi:10.1016/s0092-8674(04)00035-2
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y

- Liu, L., Zou, P., Zheng, L., Linarelli, L. E., Amarell, S., Passaro, A., . . . Cheng, Z. (2015). Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. *Cell Death Dis*, 6(1), e1586. doi:10.1038/cddis.2014.553
- Liu, Z., Cheng, Y., Luan, Y., Zhong, W., Lai, H., Wang, H., . . . Zhai, Q. (2018). Short-term tamoxifen treatment has long-term effects on metabolism in high-fat diet-fed mice with involvement of *Nmnat2* in POMC neurons. *FEBS Lett*, 592(19), 3305-3316. doi:10.1002/1873-3468.13240
- Londos, C., Sztalryd, C., Tansey, J. T., & Kimmel, A. R. (2005). Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie*, 87(1), 45-49. doi:https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.12.010
- Lonnie, M., Hooker, E., Brunstrom, J. M., Corfe, B. M., Green, M. A., Watson, A. W., . . . Johnstone, A. M. (2018). Protein for Life: Review of Optimal Protein Intake, Sustainable Dietary Sources and the Effect on Appetite in Ageing Adults. *Nutrients*, 10(3). doi:10.3390/nu10030360
- Luca, F., Perry, G. H., & Di Rienzo, A. (2010). Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr*, 30, 291-314. doi:10.1146/annurev-nutr-080508-141048
- Lundgren, C. H., Brown, S. L., Nordt, T. K., Sobel, B. E., & Fujii, S. (1996). Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*, 93(1), 106-110. doi:10.1161/01.cir.93.1.106
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., . . . Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13(1), 133-140. doi:10.1038/nn.2467
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., . . . Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett*, 443(3), 326-330. doi:10.1016/S0014-5793(98)01713-X
- Matryba, P., Bozycki, L., Pawłowska, M., Kaczmarek, L., & Stefaniuk, M. (2018). Optimized perfusion-based CUBIC protocol for the efficient whole-body clearing and imaging of rat organs. *J Biophotonics*, 11(5), e201700248. doi:10.1002/jbio.201700248
- Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*, 42(4), 1135-1140. doi:10.1042/bst20140142
- Mercer, A. J., Hentges, S. T., Meshul, C. K., & Low, M. J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci*, 7, 19. doi:10.3389/fnins.2013.00019
- Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., & Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, 387(2-3), 113-116. doi:10.1016/0014-5793(96)00473-5
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, 36(10), 587-597. doi:10.1016/j.tins.2013.07.001
- Miura, S., Gan, J. W., Brzustowski, J., Parisi, M. J., Schultz, C. J., Londos, C., . . . Kimmel, A. R. (2002). Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 277(35), 32253-32257. doi:10.1074/jbc.M204410200
- Moller, I. M. (2001). PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 561-591. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.561
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*, 40(5), 325-438. doi:10.1016/s0163-7827(01)00013-3

- Murphy, D. J., Hernández-Pinzón, I., & Patel, K. (2001). Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *Journal of Plant Physiology*, 158(4), 471-478. doi:<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00359>
- Nagaraj, S., Laskowska-Kaszub, K., Dębski, K. J., Wojsiat, J., Dąbrowski, M., Gabryelewicz, T., . . . Wojda, U. (2017). Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget*, 8(10), 16122-16143. doi:10.18632/oncotarget.15109
- Nevins, D. J. (1995). Sugars: their origin in photosynthesis and subsequent biological interconversions. *Am J Clin Nutr*, 61(4 Suppl), 915s-921s. doi:10.1093/ajcn/61.4.915S
- Ng, R., Hussain, N. A., Zhang, Q., Chang, C., Li, H., Fu, Y., . . . Xu, F. (2017). miRNA-32 Drives Brown Fat Thermogenesis and Trans-activates Subcutaneous White Fat Browning in Mice. *Cell Rep*, 19(6), 1229-1246. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.035
- Nigi, L., Grieco, G. E., Ventriglia, G., Brusco, N., Mancarella, F., Formichi, C., . . . Sebastiani, G. (2018). MicroRNAs as Regulators of Insulin Signaling: Research Updates and Potential Therapeutic Perspectives in Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3705. doi:10.3390/ijms19123705
- Nilsson, L. H., & Hultman, E. (1973). Liver glycogen in man--the effect of total starvation or a carbohydrate-poor diet followed by carbohydrate refeeding. *Scand J Clin Lab Invest*, 32(4), 325-330. doi:10.3109/00365517309084355
- Norton L, P. T., Bardsley RG, Ye H, Tsintzas K. (2007). Characterization of GLUT4 and calpain expression in healthy human skeletal muscle during fasting and refeeding. *Acta Physiol (Oxf)*, 189, 233–240.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular cell*, 30(4), 460-471. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>
- Owen OE, M. A., Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF. (1967). Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest*, 46, 1589–1595.
- Park, B. H., Wang, M. Y., Lee, Y., Yu, X., Ravazzola, M., Orci, L., & Unger, R. H. (2006). Combined leptin actions on adipose tissue and hypothalamus are required to deplete adipocyte fat in lean rats: implications for obesity treatment. *J Biol Chem*, 281(52), 40283-40291. doi:10.1074/jbc.M607545200
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., . . . Chakraborty, S. (2017). Interplay between miRNAs and Human Diseases: A Review. *Journal of Cellular Physiology*, 233. doi:10.1002/jcp.25854
- Pellegrini, M., Cioffi, I., Evangelista, A., Ponzio, V., Goitre, I., Ciccone, G., . . . Bo, S. (2020). Effects of time-restricted feeding on body weight and metabolism. A systematic review and meta-analysis. *Rev Endocr Metab Disord*, 21(1), 17-33. doi:10.1007/s11154-019-09524-w
- Pilegaard H, S. B., Neufer PD. (2003). Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes*, 52, 657–662.
- Richard, D., & Baraboi, D. (2004). Circuitries Involved in the Control of Energy Homeostasis and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Treatments in Endocrinology*, 3(5), 269-277. doi:10.2165/00024677-200403050-00001
- Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., . . . Chopra, Atul R. (2016). Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell*, 165(3), 566-579. doi:10.1016/j.cell.2016.02.063

- Romijn JA, G. M., Hommes MJ, Endert E, Sauerwein HP. (1990). Decreased glucose oxidation during short-term starvation. *Metabolism*, 39, 525–530.
- Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83-86. doi:10.1038/nature05983
- Rynders, C. A., Thomas, E. A., Zaman, A., Pan, Z., Catenacci, V. A., & Melanson, E. L. (2019). Effectiveness of Intermittent Fasting and Time-Restricted Feeding Compared to Continuous Energy Restriction for Weight Loss. *Nutrients*, 11(10), 2442. doi:10.3390/nu11102442
- Safonova, I., Aubert, J., Negrel, R., & Ailhaud, G. (1997). Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *The Biochemical journal*, 322 (Pt 1)(Pt 1), 235-239. doi:10.1042/bj3220235
- Sakkou, M., Wiedmer, P., Anlag, K., Hamm, A., Seuntjens, E., Ettwiller, L., . . . Treier, M. (2007). A role for brain-specific homeobox factor Bsx in the control of hyperphagia and locomotory behavior. *Cell Metab*, 5(6), 450-463. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.007
- Samuel VT, S. G. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148, 852–871.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubern, M., Huang, Q., Neverova, M., . . . Ricquier, D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem*, 273(51), 34611-34615. doi:10.1074/jbc.273.51.34611
- Sassmann, A., Offermanns, S., & Wettschureck, N. (2010). Tamoxifen-Inducible Cre-Mediated Recombination in Adipocytes. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 48, 618-625. doi:10.1002/dvg.20665
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 270(45), 26746-26749. doi:10.1074/jbc.270.45.26746
- Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol*, 220(2), T25-46. doi:10.1530/joe-13-0398
- Sheldon, E. F. (1924). The so-called hibernating gland in mammals: A form of adipose tissue. *The Anatomical Record*, 28(5), 331-347. doi:10.1002/ar.1090280502
- Shin, C., Nam, J.-W., Farh, K. K.-H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular cell*, 38(6), 789-802. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.005
- Smith, A. M., Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J. (2004). Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J Biol Chem*, 279(50), 51944-51952. doi:10.1074/jbc.M408920200
- Smith, R. E., & Hock, R. J. (1963). Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science*, 140(3563), 199-200. doi:10.1126/science.140.3563.199
- Soeters, M., Serlie, M., Sauerwein, H., Duran, M., Kulik, W., Ackermans, M., . . . Houten, S. (2011). Characterization of D-3-hydroxybutyrylcarnitine (ketocarnitine): An identified ketosis-induced metabolite. *Metabolism: clinical and experimental*, 61, 966-973. doi:10.1016/j.metabol.2011.11.009
- Soeters, M. R., Sauerwein, H. P., Dubbelhuis, P. F., Groener, J. E., Ackermans, M. T., Fliers, E., . . . Serlie, M. J. (2008). Muscle adaptation to short-term fasting in healthy lean humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(7), 2900-2903. doi:10.1210/jc.2008-0250
- Soeters, M. R., Sauerwein, H. P., Duran, M., Wanders, R. J., Ackermans, M. T., Fliers, E., . . . Serlie, M. J. (2009). Muscle acylcarnitines during short-term fasting in lean healthy men. *Clin Sci (Lond)*, 116(7), 585-592. doi:10.1042/cs20080433

- Soeters, M. R., Sauerwein, H. P., Groener, J. E., Aerts, J. M., Ackermans, M. T., Glatz, J. F., . . . Serlie, M. J. (2007). Gender-related differences in the metabolic response to fasting. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(9), 3646-3652. doi:10.1210/jc.2007-0552
- Soeters MR, S. H., Dubbelhuis PF, Groener JE, Ackermans MT, Fliers E, Aerts JM, Serlie MJ. (2008). Muscle adaptation to short-term fasting in healthy lean humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 2900–2903.
- Soeters MR, S. M., Sauerwein HP, Duran M, Ruiter JP, Kulik W, Ackermans MT, Minkler PE, Hoppel CL, Wanders RJ, Houten SM. (2012). Characterization of D-3-hydroxybutyrylcarnitine (ketocarnitine): an identified ketosis-induced metabolite. *Metabolism*, 61, 966–973.
- Soeters, M. R., Soeters, P. B., Schooneman, M. G., Houten, S. M., & Romijn, J. A. (2012). Adaptive reciprocity of lipid and glucose metabolism in human short-term starvation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(12), E1397-1407. doi:10.1152/ajpendo.00397.2012
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., . . . Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818), 307-312. doi:10.1038/35053000
- Stewart, W. K., & Fleming, L. W. (1973). Features of a successful therapeutic fast of 382 days' duration. *Postgraduate medical journal*, 49(569), 203-209. doi:10.1136/pgmj.49.569.203
- Stone, S. J., Levin, M. C., Zhou, P., Han, J., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2009). The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J Biol Chem*, 284(8), 5352-5361. doi:10.1074/jbc.M805768200
- Stout, A. K., Raphael, H. M., Kanterewicz, B. I., Klann, E., & Reynolds, I. J. (1998). Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*, 1(5), 366-373. doi:10.1038/1577
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6. doi:10.18632/oncotarget.3523
- Subramanian, S., & Steer, C. J. (2010). MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), 289-298. doi:https://doi.org/10.1002/jcp.22066
- Sugden MC, H. M. (2006). Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem*, 112, 139–149.
- Sullivan, P. G., Dubé, C., Dorenbos, K., Steward, O., & Baram, T. Z. (2003). Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol*, 53(6), 711-717. doi:10.1002/ana.10543
- Sun, L., Xie, H., Mori, M. A., Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, S. M., . . . Lodish, H. F. (2011). Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol*, 13(8), 958-965. doi:10.1038/ncb2286
- Susaki, Etsuo A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, Tomonobu M., . . . Ueda, Hiroki R. (2014). Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*, 157(3), 726-739. doi:10.1016/j.cell.2014.03.042
- Susulic, V. S., Frederich, R. C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B. B., Harper, M. E., . . . Lowell, B. B. (1995). Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*, 270(49), 29483-29492. doi:10.1074/jbc.270.49.29483
- Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of Molecular Biology*, 339(2), 327-335. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065

- Terragni, L., Garnweidner, L. M., Pettersen, K. S., & Mosdøl, A. (2014). Migration as a turning point in food habits: the early phase of dietary acculturation among women from South Asian, African, and Middle Eastern Countries living in Norway. *Ecol Food Nutr*, 53(3), 273-291. doi:10.1080/03670244.2013.817402
- Teshima, Y., Akao, M., Jones Steven, P., & Marbán, E. (2003). Uncoupling Protein-2 Overexpression Inhibits Mitochondrial Death Pathway in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 93(3), 192-200. doi:10.1161/01.RES.0000085581.60197.4D
- Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(7), 1147-1156. doi:10.1016/0092-8674(94)90006-x
- Townsend, K. L., & Tseng, Y.-H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(4), 168-177. doi:10.1016/j.tem.2013.12.004
- Tran, T. T., & Kahn, C. R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 6(4), 195-213. doi:10.1038/nrendo.2010.20
- Trayhurn, P., & Beattie, J. (2001). Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 329-339. doi:10.1079/PNS200194
- Tsintzas, K., Jewell, K., Kamran, M., Laithwaite, D., Boonsong, T., Littlewood, J., . . . Bennett, A. (2006). Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. *J Physiol*, 575(Pt 1), 291-303. doi:10.1113/jphysiol.2006.109892
- van der Crabben SN, A. G., Ackermans MT, Endert E, Romijn JA, Sauerwein HP. (2008). Prolonged fasting induces peripheral insulin resistance, which is not ameliorated by high-dose salicylate. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 638-641.
- van Herpen NA, S.-H. V. (2008). Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*, 94, 231-241.
- Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105-1118. doi:10.1016/j.cell.2007.01.038
- Vendelbo MH, C. B., Treebak JT, Møller L, Krusenstjerna-Hafstrøm T, Madsen M, Nielsen TS, Stødkilde-Jørgensen H, Pedersen SB, Jørgensen JO, Goodyear LJ, Wojtaszewski JF, Møller N, Jessen N. (2012). Insulin resistance after a 72-h fast is associated with impaired AS160 phosphorylation and accumulation of lipid and glycogen in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, E190-E200.
- Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (1995). PUMPing plants. *Nature*, 375(6526), 24-24. doi:10.1038/375024a0
- Vinnikov, I. A., Hajdukiewicz, K., Reymann, J., Beneke, J., Czajkowski, R., Roth, L. C., . . . Konopka, W. (2014). Hypothalamic miR-103 protects from hyperphagic obesity in mice. *J Neurosci*, 34(32), 10659-10674. doi:10.1523/jneurosci.4251-13.2014
- Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 459-466. doi:10.1016/j.bbalip.2008.10.009
- Wang, J., Chen, J., & Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*, 231(1), 25-30. doi:10.1002/jcp.25056
- Webber J, S. E., Parkin H, Macdonald IA. (1994). Metabolic effects of acute hyperketonaemia in man before and during an hyperinsulinaemic euglycaemic clamp. *Clin Sci (Lond)*, 86, 677-687.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808. doi:10.1172/jci19246

- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
- Wolfe, R. R., Peters, E. J., Klein, S., Holland, O. B., Rosenblatt, J., & Gary, H., Jr. (1987). Effect of short-term fasting on lipolytic responsiveness in normal and obese human subjects. *Am J Physiol*, 252(2 Pt 1), E189-196. doi:10.1152/ajpendo.1987.252.2.E189
- Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., & Bickel, P. E. (2005). S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem*, 280(19), 19146-19155. doi:10.1074/jbc.M500978200
- Xiaolong, G., Zhichun, Z., Ting, Z., Ching, L., Yumeng, W., Xinxin, X., . . . Li, X. (2019). cAMP-MicroRNA-203-IFN γ Network Regulates Subcutaneous White Fat Browning and Glucose Tolerance. *Molecular metabolism*, 28. doi:10.1016/j.molmet.2019.07.002
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., . . . Steitz, Joan A. (2013). Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors that Generate a Single MicroRNA. *Cell*, 155(7), 1568-1580. doi:10.1016/j.cell.2013.11.027
- Yamamoto, K., & Kawasaki, N. (2010). Detection of weak-binding sugar activity using membrane-based carbohydrates. *Methods Enzymol*, 478, 233-240. doi:10.1016/s0076-6879(10)78011-3
- Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., . . . Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15163-15168. doi:10.1073/pnas.1006432107
- Ye, R., Wang, Q. A., Tao, C., Vishvanath, L., Shao, M., McDonald, J. G., . . . Scherer, P. E. (2015). Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: Inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. *Molecular metabolism*, 4(11), 771-778. doi:10.1016/j.molmet.2015.08.004
- Zhang, Y., Guo, K. Y., Diaz, P. A., Heo, M., & Leibel, R. L. (2002). Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(1), R226-234. doi:10.1152/ajpregu.00392.2001
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. doi:10.1038/372425a0
- Zihlman, A. L., & Bolter, D. R. (2015). Body composition in *Pan paniscus* compared with *Homo sapiens* has implications for changes during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201505071. doi:10.1073/pnas.1505071112