

Mgr Bartosz Zglinicki

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

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 posttranskrypcyjny regulacyjny 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 *DicerAdipoqCreERT2*. 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, miR199a-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 transgenicznych. 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. Równoległe do doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych, prowadzono badania na zwierzętach typu dzikiego, u których wprowadzono czynniki indukujące zmiany metaboliczne, wymierzone w obydwie 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 głodówka 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 głodówce 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.