

ABSTRACT

Food is the foundation of the survival pyramid while hunger is the primary drive that motivates the search for and acquisition of nourishment. The brain is the locus of the superior centers involved in the regulation of hunger and satiety. The arcuate nucleus, located in the immediate vicinity of the median eminence in the hypothalamus, is the primary first-order center processing information about the body's energy status. Its composition includes two populations of opposing neurons: AgRP/NPY - stimulating food intake and POMC/CART - responsible for promoting satiety and appetite suppression. Any disturbances within this center and in the communication of the arcuate nucleus with second-order neurons in other centers may lead to changes in eating behavior and the development of metabolic diseases such as obesity.

This dissertation chiefly aims to investigate the involvement of AgRP/NPY neurons in the development of obesity in animals with the neurospecific deletion of the *Dicer1* gene. Dicer is an enzyme the endonucleolytic action of which leads to the production of mature forms of microRNA (miRNA) molecules regulating the translation process. Cells deprived of the *Dicer1* gene lack functional, canonical microRNAs. The research problem required the use of several transgenic mice models. All models were based on the Cre-loxP system, where recombination was induced by Tamoxifen in some and administration of the AAV viral vector regulating the inserted transgene with the AgRP promoter or by using CRISPR/Cas9 technology in others. Analysis and modification of successive transgenic models resulted in high specificity of the introduced change, selectively in AgRP/NPY neurons.

Analysis of the obtained research models evidenced that the system with the induced *Dicer1* deletion in AgRP neurons (AgRPCreERT2Dicerfl/fl) does not allow for conclusions about the involvement of these neurons, due to the insufficient level of recombination in this lineage. The remaining models provided significant information. The model with the inducible loss of microRNA in mature CaMKII α neurons and the simultaneous loss of both *Npy* alleles (NPY-KO/DicerCKO) excluded the involvement of NPY as a key stimulant of food intake. Meanwhile, experiments on Dicerfl/fl mice subjected to intracerebral injections of the AAV-AgRPCre vector into the arcuate nucleus, showed the significant involvement of AgRP neurons in the development of microRNA-dependent obesity. Moreover, they revealed a quantitative relationship between the number of AAV-vector particles introduced determining the number of modified neurons and the increased nutritional requirements leading to increased body weight. Mice expressing Cre and Cas9 in AgRP neurons (AgRPCreCas9) proved to be the

model generating the highest degree of specificity in the targeted modification of *Dicer1* in AgRP neurons. These animals, following intracerebral administration of the AAV-guide2Dicer vector, developed massive obesity associated with severe appetite while also revealing a sex-dependent effect, where only females lacking microRNA in AgRP neurons showed a significant increase in appetite and body weight.

The above observations imply the important role of microRNA in regulating the functions of AgRP/NPY neurons. Selective loss of microRNA in hunger neurons leads to impairment of their functioning, which is manifested by increased appetite and development of obesity. The number of modified hunger neurons determines the magnitude of the effect, indicating there is a subtle balance between the signals of hunger and satiety. Sexual differences in the observed phenotype suggest microRNA plays a role in modulating hormone-dependent pathways.

STRESZCZENIE

Jedzenie jest fundamentem piramidy potrzeb warunkujących przeżycie, a głód-pierwotnym popędem, który motywuje do poszukiwania i zdobywania zasobów pokarmowych. Nadrzędne ośrodki zaangażowane w proces regulacji głodu i sytości zlokalizowane są w mózgu. Podstawowy ośrodek I rzędu, przetwarzający informacje o statusie energetycznym organizmu, znajduje się w podwzgórzu, w bezpośrednim sąsiedztwie wyniosłości pośrodkowej i zwany jest jądrem łukowatym. Składają się na niego m.in. dwie populacje przeciwstawnie działających neuronów: AgRP/NPY- stymulujące pobór pokarmu oraz POMC/CART-odpowiedzialne za promocję sytości i hamowanie apetytu. Wszelkie zaburzenia w obrębie tego ośrodka oraz w komunikacji jądra łukowatego z neuronami II rzędu w innych ośrodkach prowadzić mogą do zmiany zachowań żywieniowych i rozwinięcia chorób o podłożu metabolicznym, takich jak otyłość.

Głównym celem niniejszej rozprawy było sformułowanie odpowiedzi na pytanie o udział neuronów AgRP/NPY w rozwinięciu otyłości u zwierząt z neurospecyficzną delecją genu *Dicer1*. Dicer jest enzymem, którego endonukleolityczne działanie prowadzi do uzyskania dojrzałych form cząsteczek mikroRNA (miRNA), regulujących proces translacji. Komórki pozbawione genu *Dicer1* charakteryzuje jednoczesny brak funkcjonalnych, kanonicznych mikroRNA. Próba odpowiedzi na postawione zagadnienie badawcze wymagała użycia kilku modeli myszy transgenicznych. Wszystkie modele bazowały na systemie Cre-loxP, u części rekombinacja indukowana była Tamoksyfenem, u innych podaniem wektora wirusowego AAV regulującego wprowadzany transgen promotorem AgRP lub zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9. Poprzez analizę i modyfikacje kolejnych modeli transgenicznych możliwe stało się osiągnięcie wysokiej specyficzności wprowadzanej zmiany, selektywnie w neuronach AgRP/NPY.

Analiza adekwatności uzyskanych modeli do badań wykazała, że system z indukowanym usunięciem *Dicer1* w neuronach AgRP (AgRPCreERT2*Dicer1*/fl) nie pozwala na wnioskowanie na temat udziału tych neuronów ze względu na niewystarczający poziom rekombinacji w tej linii. Pozostałe modele dostarczyły istotnych informacji. Model z indukowaną utratą mikroRNA w dojrzałych neuronach CaMKII α oraz jednoczesną utratą obu alleli *Npy* (NPY-KO/*Dicer*CKO) wykluczył udział NPY jako kluczowego czynnika stymulującego pobór pokarmu. Z kolei doświadczenia przeprowadzone na myszach *Dicer1*/fl, poddanych domózgowym iniekcjom z wektorem AAV-AgRPCre do jądra łukowatego

pokazały istotne zaangażowanie neuronów AgRP w rozwój otyłości zależnej od mikroRNA. Ponadto, odsłoniły ilościową zależność między liczbą wprowadzanych cząstek wektora AAV, determinującą liczbę zmodyfikowanych neuronów, a zwiększonym zapotrzebowaniem pokarmowym i rosnącą masą ciała. Modelem, który pozwolił uzyskać najwyższy stopień specyficzności w celowanej modyfikacji *Dicer1* w neuronach AgRP okazały się myszy z ekspresją Cre oraz Cas9 w neuronach AgRP (AgRPCreCas9). Zwierzęta te, po domózgowych podaniach wektora AAV-guide2Dicer, rozwinęły masywną otyłość powiązaną z niepohamowanym apetytem, uwidaczniając efekt zależny od płci. Znaczący wzrost apetytu i masy ciała charakteryzował jedynie samice pozbawione mikroRNA w neuronach AgRP.

Powyższe obserwacje implikują istotną rolę mikroRNA w regulowaniu funkcji neuronów AgRP/NPY. Selektywna utrata mikroRNA w neuronach głodu prowadzi bowiem do upośledzenia ich funkcji, objawiającej się zwiększonym apetytem i rozwinęciem otyłości. Liczba zmodyfikowanych neuronów głodu determinuje wielkość efektu, wskazując na istnienie subtelnej równowagi pomiędzy sygnałami głodu i sytości. Różnice płciowe w obserwowanym fenotypie sugerują rolę mikroRNA w modulowaniu ścieżek hormonozależnych.