

Joanna Przybyś

**Rola genu *c-fos* w rozwoju fenotypu otyłości w mysim modelu
z neurospecyficznym i indukowalnym usunięciem genu *Dicer1***

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

PROMOTOR:
dr hab. Witold Konopka

Warszawa, 2024

Podziękowania

Promotorowi dr hab. Witoldowi Konopce za możliwość rozwoju i realizacji własnych ambicji, zaufanie i ciekawy, pełen wyzwań projekt.

Mojej kochanej rodzinie Kamilowi i Idze za siłę napędową do działania, miłość, cierpliwość i wyrozumiałość.

Rodzicom i Rodzeństwu za spokój, miejsce, gdzie można odetchnąć i nieustające wsparcie.

Kolegom i Koleżankom z byłej Pracowni Modeli Zwierzęcych, w szczególności dr Agacie Klejman, za niesamowitą, pełną życzliwości atmosferę i wsparcie merytoryczno-mentalne.

Dr Aliemu Jawaid i zespołowi Pracowni Badań Translacyjnych w Chorobach Neuropsychiatrycznych (TREND) oraz Annie Zajfert i zespołowi Zwierzętarń za pomoc i wyrozumiałość w kontynuacji projektu.

I wszystkim Kolegom i Koleżankom z Instytutu Nenckiego, których pomoc, cenne rady i wskazówki przyczyniły się do powstania tej pracy.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	8
STRESZCZENIE	12
ABSTRACT	14
I WSTĘP	16
1.1 Epidemiologia otyłości	16
1.2 Rola tkanki tłuszczowej w regulacji energetycznej	16
1.2 Homeostaza energetyczna organizmu.....	18
1.3 Sygnalizacja obwodowa regulująca bilans energetyczny	20
1.3.1 Krótkoterminowe sygnały peryferyjne	21
1.3.2 Długoterminowe sygnały sytości.....	23
1.4 Ośrodkowa regulacja mechanizmu głodu i sytości.....	28
1.4.1 Jądro łukowate i system melanokortynowy w regulacji poboru pokarmu	30
1.4.2 Neurony oreksygeniczne	32
1.4.3 Neurony anoreksygeniczne	34
1.4.4 Rola mikroRNA w regulacji metabolicznej	37
1.5 Plastyczność neuronalna w podwzgórzu	40
1.6 Geny wczesnej odpowiedzi komórkowej	48
1.7 Rola genu <i>c-fos</i> w plastyczności neuronalnej	49
1.7.1 Aktywacja genu <i>c-fos</i>	53
1.8 Wybrane metody inżynierii genetycznej stosowane do badań funkcji genów i ich produktów białkowych.....	55
1.8.1 System Cre-loxP.....	56
1.8.2 Technika CRISPR-Cas9.....	58
1.8.3 Wektory wirusowe rAAV	59

II. CELE PRACY	61
III. MATERIAŁY I METODY	63
3.1 Transgeniczne linie zwierząt stosowane w badaniach	63
3.1.1 Genotypowanie zwierząt	66
3.1.2 Przygotowanie zwierząt do wejścia w procedury doświadczalne.....	68
3.1.3 Oswajanie	68
3.1.4 Indukcja mutacji za pomocą tamoksyfenu	68
3.2 Testy oceniające parametry metaboliczne linii Dicer ^{CamKIIαCreERT2}	69
3.2.1 Wpływ wysiłku fizycznego na masę ciała i pobór pokarmu u myszy Dicer cKO – test kołowrotka.....	69
3.2.2 Test tolerancji glukozy	69
3.2.3 Test tolerancji insuliny	70
3.2.4 Analiza parametrów metabolicznych z użyciem klatek metabolicznych	70
3.2.5 Infuzja leptyny przy użyciu pomp osmotycznych	72
3.2.6 Pobranie materiału biologicznego do badań	72
3.2.7 Analiza poziomu leptyny i hormonów tarczycowych	73
3.3 Czasowe pozbawienie pokarmu w celu indukcji genu <i>c-fos</i> w jądrze łukowatym podwzgórza	74
3.4 Przygotowanie preparatów mikroskopowych.....	74
3.4.1 Perfuzyjne utrwalanie tkanek	74
3.4.2 Zamrażanie i uzyskanie skrawków mózgów	75
3.4.3 Detekcja białek metodą barwienia immunohistochemicznego (IHC)	75
3.4.4 Detekcja białek metodą barwienia fluorescencyjnego (IF)	77
3.5 Optogenetyczna stymulacja jądra łukowatego.....	78
3.5.1 Przygotowanie implantu optogenetycznego	79
3.5.2 Implantacja światłowodu	80
3.5.3 Fotostymulacja.....	82

3.6 Technika CRISPR-Cas9 wykorzystana do wyciszenia genu <i>c-fos</i>	82
3.6.1 Projektowanie guideRNA	82
3.6.2 Klonowanie CRISPR-Cas9 guideRNA do wektora pX552-Tom.....	84
3.6.3 Izolacja plazmidowego DNA	87
3.6.4 Produkcja wektorów wirusowych rAAV	87
3.6.5 Izolacja wektorów wirusowych AAV z hodowli komórkowej HEK 293	88
3.6.6 Oznaczanie miana wirusa metodą qPCR.....	91
3.6.7 Transdukcja hodowli neuronalnej wektorami wirusowymi rAAV oraz indukcja ekspresji genu <i>c-fos</i>	93
3.6.8 Izolacja RNA.....	93
3.6.9 Odwrotna transkrypcja	94
3.6.10 Sondy TaqMan	94
3.6.11 Wyciszenie genu <i>c-fos in vivo</i> z użyciem techniki CRISPR/Cas9.....	96
3.7 Analiza statystyczna.....	98
IV WYNIKI.....	99
4.1 Charakterystyka metaboliczna linii Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	99
4.1.1 Wpływ wysiłku fizycznego na masę ciała i pobór pokarmu	99
4.1.2 Test tolerancji glukozy	101
4.1.3. Test tolerancji glukozy w teście kołowrotka u myszy Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	103
4.1.4 Test tolerancji insuliny	104
4.1.5 Analiza parametrów metabolicznych z wykorzystaniem klatek metabolicznych..	106
4.1.6 Wpływ infuzji leptyny na rozwój otyłości u myszy Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	111
4.1.7 Analiza wpływu leptyny na wybrane parametry metaboliczne u myszy Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	113
4.1.8 Analiza hormonów tarczycowych.....	118
4.2 Określenie roli genu <i>c-fos</i> w rozwoju otyłości u myszy Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	120
4.2.1 Analiza ekspresji genu <i>c-fos</i> podczas głodówki u myszy C57Bl/6J	120

4.2.2 Określenie populacji neuronów wykazujących ekspresję genu <i>c-fos</i> podczas głodówki z wykorzystaniem myszy NPY-GFP	121
4.2.3 Optogenetyczna stymulacja jądra łukowatego	124
4.2.4 Analiza ekspresji genu <i>c-fos</i> u myszy Dicer ^{CaMKIIαCreERT2}	127
4.2.5 Walidacja systemu CRISPR-Cas9 <i>in vitro</i> w pierwotnej hodowli hipokampalnej	129
4.2.6 Wyciszenie genu <i>c-fos</i> <i>in vivo</i>	131
V DYSKUSJA	139
5.1 Specyfika promotora kierującego ekspresją rekombinazy Cre w rozwoju fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO	139
5.2 Zależne od płci mechanizmy regulujące metabolizm	141
5.3 Wpływ mutacji na funkcjonowanie neuronów systemu melanokortynowego u myszy Dicer cKO	143
5.3.1 Rola neuronów AgRP/NPY w regulacji homeostazy energetycznej	145
5.3.2 Neurony POMC/CART w zachowaniu bilansu energetycznego	148
5.3.3 Wpływ leptyny na rozwój fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO	149
5.4 Analiza metaboliczna myszy Dicer cKO	155
5.4.1 Ocena metabolizmu glukozy	156
5.4.2 Ocena wydatku energetycznego	157
5.5 MikroRNA w regulacji metabolicznej i plastyczności synaptycznej w podwzgórzu....	160
5.6 Wzorzec ekspresji genu <i>c-fos</i> jako markera neuroplastyczności	164
5.7 Rola genu <i>c-fos</i> w regulacji homeostazy energetycznej	166
5.7.1 Ocena wpływu genu <i>c-fos</i> w kontroli homeostazy energetycznej u myszy Dicer cKO	169
5.8 Wykorzystanie techniki CRISPR/Cas9 do wyciszenia genu <i>c-fos</i>	170
VI PODSUMOWANIE I WNIOSKI	173
VII BIBLIOGRAFIA	174
VIII SUPLEMENT	196

8.1 Źródła finansowania pracy.....	196
8.2 Dorobek naukowy doktorantki	196

Wykaz stosowanych skrótów

- α -MSH** (ang. *α -melanocyte-stimulating hormone*) - hormon stymulujący melanocyty α (melanotropina)
- 3'UTR** (ang. *3' untranslated region*) - region 3' nieulegający translacji
- 3V** (ang. *third ventricle*) - trzecia komora
- 5-HT_{2C}** (ang. *5-hydroxytryptamine receptor*) - receptor dla serotoniny
- ACC** (ang. *acetyl-CoA carboxylase*) - karboksylaza acetylo-CoA
- ACTH** - adrenokortykotropina
- AgRP** (ang. *agouti-related peptide*) - peptyd agouti
- AMPA** - kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
- AMPK** - kinaza białkowa aktywowana 5'-adenozynomonofosforanem
- ANOVA** (ang. *analysis of variance*) - analiza wariancji
- AP** (ang. *area postrema*) - pole najdalsze
- AP-1** (ang. *activator protein-1*) - aktywator białkowy-1
- apoAIV** - apolipoproteina AIV
- AR** (ang. *androgen receptor*) - receptor androgenowy
- ARC** (ang. *arcuate nucleus*) - jądro łukowate
- ASP** (ang. *acetylation-stimulating protein*) - białko stymulujące acetylację
- BAT** (ang. *brown adipose tissue*) - brunatna tkanka tłuszczowa
- BDNF** (ang. *brain derived neurotrophic factor*) - czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego
- BF** (ang. *bright field*) – jasne pole
- BNST** (ang. *bed nucleus of the stria terminalis*) - jądro łożyskowe prążka krańcowego
- CamKII α** (ang. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*) - kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny
- cAMP** (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozymonofosforan
- CART** (ang. *cocaine-amphetamine regulated transcript*) - transkrypt regulowany kokainą - amfetaminą
- Cas** (ang. *CRISPR-associated system*) - białko związane z CRISPR
- CCK** (ang. *cholecystokinin*) - cholecystokinina
- cdNA** (ang. *complementary DNA*) - komplementarne DNA
- CeA, MeA** (ang. *central and medial nuclei of the amygdala*) - jądra centralne i przyśrodkowe ciała migdałowatego
- ChR2** (ang. *channelrhodopsin 2*) - rodopsyna kanałowa
- cKO** (ang. *conditional knock-out*) - warunkowe usunięcie genu
- CLIP** (ang. *corticotropin-like intermediate peptide*) - peptyd pośredni kortykotropinopodobny
- CPT1** (ang. *carnitine palmitoyltransferase 1*) - palmitoilotransferaza karnitynowa 1
- CRE** (ang. *Ca²⁺ response element*) - element odpowiedzi na Ca²⁺
- CREB** (ang. *cAMP response element binding protein*) - czynnik transkrypcyjny wiążący element odpowiedzi na cAMP
- CRISPR/Cas9** (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - regularnie rozmieszczone klastrowane krótkie powtórzenia palindromiczne
- crRNA** (ang. *CRISPR-RNA*)
- CSF** (ang. *cerebrospinal fluid*) - z płyn mózgowo-rdzeniowy

DAB - 3,3'-diaminobenzzydina

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenyloindol

DIO (ang. *diet-induced obese*) - otyłość indukowana dietą

DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – zmodyfikowana pożywka hodowlana

DMH (ang. *dorsomedial hypothalamus*) - jądro grzbietowo-przyśrodkowe

DMV (ang. *dorsal motor nucleus of vagus*) - grzbietowe jądro ruchowe nerwu błędnego

DR (ang. *dietary resistant*) - osobnik oporny na dietę

DREADD (ang. *designer receptors exclusively activated by designer drugs*) - sztuczny receptor aktywowany przez syntetyczny ligand

DSB (ang. *double-strand breaks*) - rozpad obu nici

DT (ang. *diphtheria toxin*) - toksyna błoniczna

DVC (ang. *dorsal vagal complex*) - zespół grzbietowy nerwu błędnego

EE (ang. *energy expenditure*) - wydatek energetyczny

EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*) - wzmocnione białko zielonej fluorescencji

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) - test immunoenzymatyczny

ER (ang. *endoplasmic reticulum*) -retikulum endoplazmatyczne

ER (ang. *estrogen receptor*) - receptor estrogenowy

ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) - kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe

FAS (ang. *fatty acids synthase*) - syntaza kwasów tłuszczowych

FBS (ang. *fetal bovine serum*) - bydlęca surowica płodowa

FFA (ang. *free fatty acids*) - wolne kwasy tłuszczowe

FGF-19 (ang. *fibroblast growth factor-19*) - czynnik wzrostu fibroblastów 19

FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) - transfer energii Förstera

ft3 (ang. *free triiodothyronine*) - wolna frakcja trójiodotyroniny

ft4 (ang. *free thyroxine*) - wolna frakcja tyroksyny (tetrajodotyronina)

GABA (ang. *γ-aminobutyric acid*) - kwas γ-aminomasłowy

Gad (ang. *glutamate decarboxylate*) - dekarboksylaza glutaminianu

GFP (ang. *green fluorescent protein*) - białko zielonej fluorescencji

GHS-R (ang. *growth hormone secretagogue receptor*) - receptor wydzielania hormonu wzrostu

GIP (ang. *glucose-dependent insulintropic enzyme*) - peptyd insulintropowy zależny od glukozy

GLP-1 (ang. *glucagon-like peptide 1*) - glukagonopodobny peptyd 1

GnRH - hormon uwalniający gonadotropinę

GPCR (ang. *G protein coupled receptors*) - receptory związane z białkiem G

gRNA (ang. *guide RNA*) - wiodący RNA

GTT (ang. *glucose tolerance test*) - test tolerancji glukozy

HDR (ang. *homology-directed repair*) - mechanizm rekombinacji homologicznej

HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293*) - ludzkie embrionalne komórki nerki

HFD (ang. *high-fat diet*) - dieta wysokotłuszczowa

hGH PolyA (ang. *human growth hormone polyadenylation signal*) – sygnał poliadenylacji ludzkiego hormonu wzrostu (terminator translacji)

Hprt (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) – fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1

HRP (ang. *horseradish peroxidase*) - peroksydaza chrzanowa

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

IEG (ang. *immediate early genes*) - geny wczesnej odpowiedzi komórkowej

IF - immunofluorescencja

IHC - immunohistochemia

IRS-1 (ang. *insulin receptor substrate 1*) - substrat receptora insuliny 1

ITR (ang. *inverted terminal repeats*) - sekwencje odwróconych powtórzeń końcowych

ITT (ang. *insulin tolerance test*) - test tolerancji insuliny

JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) - N-końcowa kinaza c-Jun

KO (ang. *knock-out*) – usunięcie genu

KI (ang. *knock-in*) – wprowadzenie genu

LEPR (ang. *leptin receptor*) - receptor dla leptyny

LH (ang. *lateral hypothalamus*) - jądro boczne

LTD (ang. *long term depression*) - długotrwałe osłabienie synaptyczne

LTP (ang. *long term potentiation*) - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) - kinaza aktywowana przez mitogeny

MC3R/MC4R (ang. *melanocortin receptor 3/4*) - receptor 3 i 4 dla melanokortyny

ME (ang. *median eminence*) - wyniosłość przysłankowa

mEPSCs (ang. *miniature excitatory postsynaptic currents*) - miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne

miRNA - mikroRNA

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

NE (ang. *norepinephrine*) - noradrenalina

NHEJ (ang. *non-homologous end joining*) - rekombinacja niehomologiczna

NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy

NPY (ang. *neuropeptide Y*) - neuropeptyd Y

NSS (ang. *normal swine serum*) - surowica świńska

NTS (ang. *nucleus of solitary tract*) - jądro pasma samotnego

ORF (ang. *open reading frame*) - otwarta ramka odczytu

OXM - oksyntomodulina

PAG (ang. *periaqueductal grey*) - istota szara okołowodociągowa

PBN (ang. *parabrachial nucleus*) – jądro okółoramieniowe

PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PBST (ang. *phosphate buffered saline TritonX-100*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami z Triton-X

PC1 i PC2 - konwertazy propeptydowe 1 i 2

PEI - polietylenoimina

PFA - paraformaldehyd

PI3K (ang. *phosphoinositide 3 kinase*) - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

PIP2 (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) - bifosforan fosfatydyloinozytolu

PIP3 (ang. *phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate*) - trifosforan fosfatydyloinozytolu

POMC (ang. *pro-opiomelanocortin*) - proopiomelanokortyna

PP (ang. *pancreatic polypeptide*) - polipeptyd trzustkowy

PSD (ang. *postsynaptic density*) - zagęszczenie postsynaptyczne

PTP1B (ang. *protein tyrosine phosphatase 1B*) - fosfataza tyrozynowa 1B

PTZ - pentetrazol / metrazol

PVN (ang. *paraventricular nucleus*) - jądro przykomorowe

PYY - peptyd YY

qPCR (ang. *quantitative PCR*) - ilościowa reakcja PCR

rAAV (ang. *recombinant adeno-associated virus*) - rekombinowane wektory związane z adenowirusami

RER (ang. *respiratory exchange ratio*) - współczynnik wymiany oddechowej

RFP (ang. *red fluorescent protein*) - białko czerwonej fluorescencji

RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) - kompleks wyciszający indukowany RNA

RMR (ang. *resting metabolic rate*) - spoczynkowe tempo metabolizmu

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

SCN (ang. *suprachiasmatic nucleus*) - jądro nadskrzyżowaniowe

SEM (ang. *standard error of the mean*) - błąd standardowy średniej

SIE (ang. *c-sis-inducible element*) – element indukowany c-sis

SMR (ang. *standard metabolic rate*) - standardowe tempo metabolizmu

SOCS3 (ang. *suppressor of cytokine signalling 3*) - supresor sygnalizacji cytokin 3

SRE (ang. *serum response element*) - element odpowiedzi na surowicę

SRF (ang. *serum response factor*) - czynnik odpowiedzi na surowicę

STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription*) - cytozolowy przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji

TAG - triacyloglicerol

TEE (ang. *total energy expenditure*) - całkowity wydatek energetyczny

TIDA/THDA (ang. *tuberoinfundibular /tuberohypophyseal dopaminergic*) - dopaminergiczne neurony tuberolejkowate/tuberoprzsadkowe

tracrRNA (ang. *trans-activating RNA*) – transaktywujące RNA

TxRED - czerwień teksańska

UPC1 (ang. *uncoupling protein 1*) - białko rozprzegające 1

UPR (ang. *unfolded protein response*) - odpowiedź na niezwinęte białko

vGAT (ang. *vesicular GABA transporter*) - pęcherzykowy transporter GABA

vGLUT (ang. *vesicular glutamate transporter*) - pęcherzykowy transporter dla glutaminianu

VMH (ang. *ventromedial hypothalamus*) - jądro brzuszno-boczne

VP (ang. *viral proteins*) - białka wirusa

WAT (ang. *white adipode tissue*) - biała tkanka tłuszczowa

STRESZCZENIE

Homeostaza energetyczna jest fundamentem utrzymania prawidłowej masy ciała i jest koordynowana za pośrednictwem podwzgórza, w szczególności jądra łukowego (ARC) zbudowanego z neuronów odpowiedzialnych za kontrolę apetytu i poboru pokarmu o antagonistycznym działaniu: oreksygenicznym AgRP/NPY, aktywowanych podczas głodu oraz anoreksygenicznym POMC/CART, aktywnych w stanie sytości. Ich aktywacja zależna jest od detekcji obwodowych sygnałów sytości, a także wewnątrzkomórkowo od elementów regulujących ekspresję genów, takich jak m.in. cząsteczki miRNA. Mysia linia Dicer cKO z neurospecyficznym i indukowalnym za pomocą tamoksyfenu usunięciem genu *Dicer1*, kluczowego enzymu w procesie biogenezy cząsteczek miRNA, charakteryzuje się rozwojem hiperfagicznej otyłości. Za rozwój fenotypu otyłości odpowiedzialna jest mutacja w ARC.

Pierwszym celem pracy było określenie głównych parametrów metabolicznych myszy Dicer cKO. Przeprowadzono szereg doświadczeń oceniających stopień zmian metabolicznych badanej linii, w tym metabolizm glukozy, wpływ wysiłku fizycznego na rozwój otyłości, wykorzystano system klatek metabolicznych do oceny istotnych parametrów, a także określono wpływ infuzji leptyny na pobór pokarmu i wzrost masy ciała z użyciem pomp osmotycznych. Wyniki wskazują na zależne od płci przejściowe zmiany w metabolizmie glukozy w okresie maksymalnego tycia. Badania przeprowadzone w klatkach metabolicznych pokazały, że myszy Dicer cKO w okresie hiperfagicznym konsumują więcej pokarmu i wody zarówno w fazie aktywnej, jak i nieaktywnej cyklu okołodobowego, co przekłada się na zmiany w parametrach, takich jak współczynnik wymiany oddechowej. Myszy Dicer cKO ponadto cechuje obniżony wydatek energetyczny. Pokazano również, że modyfikacja w sygnalizacji leptynowej nieznacznie przyczynia się do rozwoju otyłości w badanym modelu.

Usunięcie miRNA może również wpływać na zmiany plastyczne w ARC, dlatego drugim celem pracy było określenie wpływu genu *c-fos* – markera neuroplastyczności, należącego do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (IEG), w rozwoju fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO. Gen *c-fos* odgrywa istotną rolę w indukowaniu zmian plastycznych podczas głodówki. Wykonano analizę ekspresji genu *c-fos* u myszy C57Bl/6J podczas okresowego pozbawienia pokarmu w ARC. Pokazano, że *c-fos* podczas głodówki nie zachowuje się jak IEG, ponieważ jego ekspresja jest stale wzmożona nawet 24 godziny po usunięciu pokarmu, a komórki c-Fos-pozytywne podczas deficytu energetycznego wykazują ko-lokalizację z neuronami AgRP/NPY. Wysunięto zatem hipotezę, że stale napływające peryferyjne sygnały głodu wzmacniają pobudliwość neuronalną w ARC, co uniemożliwia

wyciszenie c-Fos–zależnej odpowiedzi. W celu zbadania tego zjawiska wykorzystano narzędzie optogenetyczne, umożliwiające aktywację neuronów AgRP z ekspresją światłoczułej rodopsyny kanałowej (ChR2) u zwierząt z dostępem *ad libitum* do pokarmu. Pokazano, że fotostymulacja neuronów oreksygeniczných prowadzi do natychmiastowego poboru pokarmu oraz aktywuje ekspresję genu *c-fos*. Jednakże, bez obwodowych sygnałów świadczących o negatywnym bilansie energetycznym, sygnał ulega wyciszeniu w sposób charakterystyczny dla IEG. Wykazano również podwyższony poziom ekspresji genu *c-fos* u myszy Dicer cKO w okresie hiperfagicznym, co sugeruje jego wpływ na fenotyp otyłości. Aby tę rolę określić zastosowano strategię wyciszenia jego ekspresji z użyciem systemu CRISPR/Cas9. Zaprojektowane sekwencje guideRNA wprowadzono do wektorów wirusowych AAV, a następnie do ARC myszy DicerCas9. Nie stwierdzono jednak znaczących różnic w masie ciała i poborze pokarmu u myszy Dicer cKO po podaniu wektorów wyciszających ekspresję genu *c-fos*. Zaobserwowano natomiast, że w wyniku mutacji u myszy Dicer cKO neurony oreksygeniczne tracą responsywność w odpowiedzi na ujemny bilans energetyczny.

Przedstawione wyniki świadczą o istotnej roli miRNA w neuronach ARC w kontroli metabolicznej i utrzymaniu homeostazy energetycznej. Obniżenie poziomu miRNA powoduje szereg zaburzeń prowadzących do hiperfagii i otyłości, a także zmian w funkcjonowaniu obwodów neuronalnych zaangażowanych w kontrolę łaknienia.

ABSTRACT

Energy homeostasis is crucial for maintenance of body weight and is coordinated through the hypothalamus, in particular the arcuate nucleus (ARC) containing the antagonistic neurons responsible for the food intake and appetite control: orexigenic AgRP/NPY, activated during fasting, and anorexigenic POMC/CART, active during satiety. Their activation depends on detection of peripheral satiety signals, as well as intracellularly on gene expression regulated molecules, such as miRNA. The Dicer cKO mice with a neurospecific and tamoxifen-inducible deletion of *Dicer1* gene, the key enzyme in the miRNA biogenesis, is characterized by the development of hyperphagic obesity. A mutation in ARC is responsible for the development of the obesity phenotype.

The first aim of the study was to determine the metabolic parameters of Dicer cKO mice. A series of experiments were performed to assess the metabolic changes in Dicer cKO mice including the glucose metabolism assessment, as well as the effect of physical activity on the development of obesity and changes in metabolic parameters analysed using metabolic cages. The effect of leptin infusion on food intake and body weight gain was also determined using osmotic pumps. The results indicate sex-dependent transient changes in glucose metabolism during the weight gaining phase. Studies conducted in metabolic cages showed that Dicer cKO mice consume more food and water during the hyperphagic period in both the active and inactive phases of the circadian rhythm, which is in a line with the changes in respiratory exchange ratio. Dicer cKO mice also exhibit reduced energy expenditure. It was also shown that modifications in leptin signaling slightly contribute to the development of obesity in Dicer cKO mice.

Deletion of miRNAs may also affect plastic changes in ARC, thus the second aim of the study was to determine the role of the neuroplasticity marker an immediately early gene *c-fos* in the development of the obesity phenomenon in Dicer cKO mice. The *c-fos* plays an important role in the induction of plastic changes during fasting. We performed analysis of *c-fos* expression in C57Bl/6J mice during fasting in ARC. It was shown that *c-fos* does not behave like classical IEG, as its expression is chronically elevated after 24 hours of food removal, and c-FosIR cells show co-localization with AgRP/NPY neurons. Thus, the hypothesis was advanced that constant action of peripheral hunger signals exert neuronal excitability in the

ARC, preventing the silencing of the c-Fos response. To investigate this phenomenon, an optogenetic tool was used to activate AgRP neurons with the photosensitive channelrhodopsin-2 (ChR2) expression in animals with *ad libitum* food access. It has been shown that photostimulation of orexigenic neurons leads to immediate food intake and stimulates *c-fos* expression. However, without peripheral negative energy signals, the *c-fos* expression is silenced like canonical IEG. The *c-fos* expression pattern analysed in ARC of Dicer cKO mice showed the elevated levels of c-Fos protein during the hyperphagic period, implying its role in the development of obesity. To determine the role of *c-fos* in obesity phenotype, the CRISPR/Cas9 system was used to silence its expression. The designed guideRNA sequences were inserted into AAV viral vectors and then injected into ARC of DicerCas9 mice. However, there were no significant differences in body weight and food intake in Dicer cKO mice after administration of viral vectors carrying anty-Fos guideRNAs. Instead, it was observed that mutation in orexigenic neurons in Dicer cKO mice led to lack of responsiveness to negative energy status.

The obtained results demonstrate the important role of miRNAs in ARC neurons in metabolic control and maintenance of energy homeostasis. Downregulation of miRNAs lead to hyperphagia and obesity, as well as changes in the functioning of neuronal circuits involved in appetite control.

I WSTĘP

1.1 Epidemiologia otyłości

Przetrwanie organizmu oraz podstawowe procesy fizjologiczne zapewniające ciągłość trwania gatunku, uzależnione są od dostępności pożywienia. Regulacja apetytu i wydatku energetycznego stanowi niezwykle złożony proces, w którym pod ścisłą kontrolą układu nerwowego bierze udział wiele tkanek i narządów (Lancha i in., 2012). Zachwianie równowagi pomiędzy przyjmowaniem energii i jej użytkowaniem prowadzi do poważnych konsekwencji fizjologicznych i zdrowotnych. Zaburzenia mechanizmów kontroli łaknienia prowadzą do rozwoju jednostek chorobowych związanych z nadmiernym poborem pokarmu, jak nadwaga czy otyłość lub niewystarczającą ilością przyjmowanego pokarmu, leżącą u podstaw rozwoju np. anoreksji, która prowadzi do wyniszczenia organizmu przez niedożywienie (Sternson i Eiselt, 2017). Fundamentem rozwoju nadwagi i otyłości jest zaburzona równowaga energetyczna pomiędzy ilością przyjętych kalorii a wydatkiem energetycznym, co prowadzi do akumulacji tkanki tłuszczowej (González-Muniesa i in., 2017; Martinez, 2000). Problem otyłości dotyczy głównie wysoko rozwinięte społeczeństwa z uwagi na ilość spożywanych wysokokalorycznych produktów bogatych w tłuszcze i cukry, stres oraz brak aktywności fizycznej, spowodowanych siedzącym trybem życia, rozwojem środków komunikacyjnych i szeroko pojętej urbanizacji (Piché i in., b.d.). Alarmujące dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) ukazują skalę rozwoju otyłości na świecie. Szacuje się, że u ponad 603,7 milionów osób zdiagnozowano otyłość, z czego 2/3 przypadków powiązano z chorobami układu sercowo-naczyniowego (CVD, ang. *cardiovascular disease*) (Piché i in., b.d.). Otyłość sprzyja rozwojowi insulinooporności, nietolerancji glukozy, cukrzycy 2 typu, dyslipidemii, niektórych typów raka, otyłości wątroby oraz wielu innych stanów patologicznych, które łącznie określa się mianem zespołu metabolicznego (Eckel i in., 2005; Rui, 2013; Sherling i in., 2017). Rozprzestrzenianie się epidemii otyłości wymusiło potrzebę dogłębnego zrozumienia molekularnych mechanizmów kontrolujących równowagę energetyczną organizmu.

1.2 Rola tkanki tłuszczowej w regulacji energetycznej

Tkanka tłuszczowa pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej. W obrębie tkanki tłuszczowej wyróżniamy subpopulacje komórek różniących się pod względem pełnionych funkcji. Biała tkanka tłuszczowa (WAT, ang. *white adipose tissue*) stanowi główny rezerwuuar zapasów energetycznych w postaci triacylogliceroli (TAG). Oprócz

funkcji magazynującej WAT pełni ważną rolę sekrecyjną, wydzielając adipokiny i mediatory lipidowe, które uczestniczą w procesach odpornościowych, zapalnych, zaburzeniach metabolicznych związanych z rozwojem zespołu metabolicznego (TNF- α , IL-6, wisfatyna, serpiny pochodzące z trzewnej tkanki tłuszczowej) oraz odzwierciedlają stan energetyczny organizmu i stopień otluszczenia organizmu: leptyna, adiponektyna, rezystyna, białko stymulujące acetylację (ASP, ang. *acetylation-stimulating protein*) (Kuda i in., 2018; Lancha i in., 2012). Biała tkanka tłuszczowa charakteryzuje się niezwykle plastycznością, nie tylko z uwagi na wysoki potencjał magazynujący, gwarantujący dynamiczny rozrost, ale z uwagi na liczbę, rodzaj i funkcje komórek w jej obrębie (Kuda i in., 2018). W jej skład wchodzi adipocyty (magazynujące TAG), preadipocyty (komórki prekursorowe), fibroblasty, komórki podścieliska i praktycznie całe spektrum komórek układu odpornościowego (Algire i in., 2013; Kuda i in., 2018). Nadmierne nagromadzenie tłuszczów w postaci TAG, powoduje rozrost komórki, zmniejszając jej potencjał magazynujący, powodując uwolnienie wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu do obiegu. Patologiczny rozrost tkanki tłuszczowej powoduje zmianę w wielkości (hipertrofii) i funkcji adipocytów. Hiperplazja (wzrost liczby komórek tłuszczowych) towarzysząca otyłości wynika z przekształcenia preadipocytów w dojrzałe komórki tłuszczowe. Komórki prekursorowe, ze względu na potencjał przekształcenia w różnego typu komórki, w tym w dojrzałe adipocyty, stanowią ważną subpopulację komórek w utrzymaniu właściwej homeostazy energetycznej (Algire i in., 2013).

Przyczyną narastających problemów metabolicznych związanych z otyłością jest akumulacja trzewnej tkanki tłuszczowej (VAT, ang. *visceral adipose tissue*), której towarzyszy otluszczenie narządów, takich jak serce, wątroba, nerki, trzustka, w których fizjologicznie tkanka tłuszczowa nie występuje, tzw. ektopowe rozmieszczenie tkanki tłuszczowej (Stefan i in., 2019). Cechą WAT jest brak termogeniny / białka rozprzegającego 1 (UPC1, ang. *uncoupling protein 1*), kluczowego składnika uczestniczącego w produkcji ciepła, którego obecność jest charakterystyczna dla brunatnej (BAT, ang. *brown adipose tissue*) i beżowej tkanki tłuszczowej. Brunatna i beżowa tkanka tłuszczowa generują ciepło w odpowiedzi na stymulację β -adrenergiczną. Proces termogenezy zachodzi w licznych mitochondriach, od których obie tkanki zawdzięczają charakterystyczną barwę (Ikeda i Yamada, 2020). Termogeneza w BAT jest aktywowana przez ekspozycję na niską temperaturę (termogeneza indukowana zimnem), by zapewnić homeostazę termiczną w odpowiedzi na wysokoenergetyczny posiłek (termogeneza indukowana dietą), jako część złożonego mechanizmu zapewniającego utrzymanie stałej temperatury ciała (Kuda i in., 2018).

1.2 Homeostaza energetyczna organizmu

W procesie ewolucji wykształciły się mechanizmy kontrolujące status energetyczny organizmu w odpowiedzi na niedostateczny pobór substancji odżywczych, ale również ich nadmiar. Już sam widok, zapach, smak pokarmu, uruchamiają ścieżki aktywujące układ nagrody w mózgu, który moduluje zachowanie organizmu promujące poszukiwanie i konsumpcję pokarmu. Po spożyciu pokarmu, sygnały z tkanek i organów peryferyjnych, wywołują uczucie sytości i zaprzestanie jedzenia (Rui, 2013). W warunkach fizjologicznych masa ciała organizmu jest ustanowiona na relatywnie stałym poziomie, w którym pobór energii jest dopasowany do istniejącego zapotrzebowania energetycznego. W literaturze istnieją hipotezy dotyczące nadrzędnego czynnika regulującego łaknienie. Jedną z nich jest hipoteza glukostatyczna, która opiera się na zmianach stężenia glukozy we krwi, jako głównego czynnika regulującego pobór pokarmu. Hipoteza lipostatyczna, natomiast – na zmianie stężenia kwasów tłuszczowych w obiegu (Chaput i Tremblay, b.d.; Levitsky i in., 2022). W toku ewolucji organizm wytworzył mechanizmy regulujące stałą dostępność glukozy, będącą głównym substratem energetycznym dla pracy mózgu. Utrzymanie homeostazy glukozy na stałym poziomie jest możliwe dzięki zintegrowanemu działaniu wielu narządów, wydzielających hormony takie jak glukagon, insulina, wydzielane przez komórki α i β trzustki, których sekrecja jest z kolei modulowana poprzez hormony nabłonka jelit, takie jak glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1, ang. *glucagon-like peptide 1*), peptyd insulinotropowy zależny od glukozy (GIP, ang. *glucose-dependent insulinotropic enzyme*) oraz hormony wydzielane przez korę nadnerczy i przysadkę mózgową (epinefryna, kortyzol, hormon wzrostu) (Aronoff i in., 2004; Han i in., 2016). Wykorzystanie TAG jako źródła energii wymaga aktywacji przez lipazy, kontrolowane hormonalnie przez glukagon i adrenalinę. Dobbowe zapotrzebowanie energetyczne człowieka waha się w granicach 1600 - 6000 kcal, w zależności od poziomu aktywności fizycznej (Berg i in., 2018). Pobrana energia wykorzystywana jest do zapewniania podstawowych przemian metabolicznych, utrzymania stałej temperatury ciała (termogenezy) i wysiłku fizycznego (Rui, 2013). Nadwyżka energetyczna uruchamia syntezę glikogenu w wątrobie i mięśniach oraz kwasów tłuszczowych w postaci TAG w cytoplazmie komórek tłuszczowych. Zapasy energetyczne są uruchamiane podczas spoczynku i w okresie głodu. W warunkach długotrwałej głodówki, skutkującej deficytem glukozy w krwiobiegu, do zapewnienia potrzeb metabolicznych mózg wykorzystuje ciała ketonowe (acetoctan i D-3-hydroksymaślan), syntetyzowane w wątrobie w procesie oksydacji kwasów tłuszczowych (β -oksydacji) (Berg i in., 2018). Przeżycie organizmu podczas głodówki zależy więc od rezerw

triacylogliceroli. Po ich wyczerpaniu jedyny substrat energetyczny stanowią białka, których rozpad prowadzi do zaniku pracy narządów i śmierci organizmu (Martinez i Ortiz, 2017).

Organizm dąży do zachowania stałej masy ciała i reguluje ją m.in. poprzez wzrost lub spadek wydatku energetycznego (Keesey i Powley, 2008). Wydatek energetyczny (EE, ang. *energy expenditure*) jest kontrolowany przez podwzgórze. Na wydatek energetyczny składa się kilka elementów:

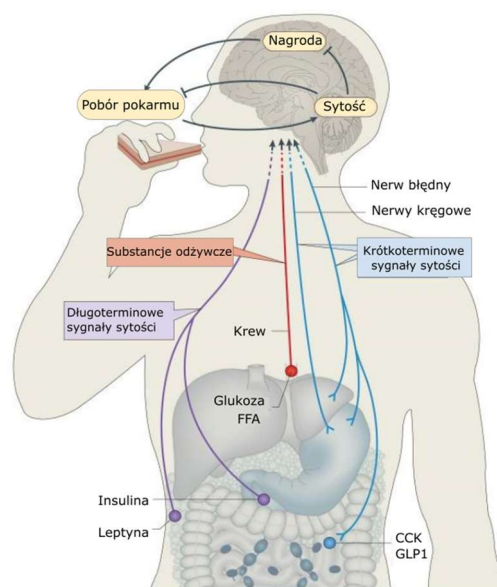
- Spoczynkowe tempo metabolizmu (RMR, ang. *resting metabolic rate*) jest to minimalny wydatek niezbędny do podtrzymania funkcji życiowych i trawienia posiłku w spoczynku, w warunkach termoneutralnych i stanowi 70% całkowitego EE (Tran i in., 2022). RMR jest pozytywnie skorelowane z masą beztłuszczową. Kompozycja organizmu, masa tłuszczowa, wiek, płeć wzrost i czynniki hormonalne wywierają wpływ na RMR (Zurlo i in., 1990). RMR stanowi sumę standardowego tempa metabolizmu (SMR, ang. *standard metabolic rate*; mierzony po 12h głodówce i pokazuje minimalne energetyczne koszty utrzymania życia) oraz efektu termicznego posiłku, wynikającego z trawienia, wchłaniania i magazynowania przyjętych składników odżywczych po pojedynczym posiłku.
- Wydatek energetyczny związany z aktywnością fizyczną (~20% całkowitego EE), w którego skład wchodzi termogeneza niezwiązana z aktywnością fizyczną (ciepło generowane przez spontaniczną aktywność) oraz termogeneza w wyniku aktywności fizycznej w mięśniach szkieletowych.
- Adaptacyjna termogeneza (10% EE) zachodząca w brunatnej tkance tłuszczowej jest uruchamiana w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Podzielona została na: termogenezę indukowaną dietą (ang. *diet-induced thermogenesis*), w wyniku nadwyżki kalorycznej posiłku i termogenezę indukowaną zimnem (ang. *cold-induced thermogenesis*), złożoną z termogenezy związanej z dreszczami (ST, ang. *shivering thermogenesis*) i termogenezy bez dreszczy (NST, ang. *nonshivering thermogenesis*) (Tran i in., 2022).

Badania przeprowadzone zarówno na ludziach, jak i z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych pokazały, że restrykcje kaloryczne i redukcja masy ciała skutkują spadkiem wydatku energetycznego o 15-20%. Przyczyną tego zjawiska jest obniżenie stężenia hormonów tarczycy w krwiobiegu, co powoduje spowolnienie tempa metabolizmu i wzrost wydajności pracy mięśni szkieletowych. W ten sposób organizm kompensuje utratę wagi i promuje powrót do wyjściowej masy ciała (E. Ravussin i in., 1988; Y. Ravussin i in., 2014; Rosenbaum i in.,

2005). W odpowiedzi na nadwyżkę energetyczną, organizm redukuje zapotrzebowanie kaloryczne poprzez obniżenie apetytu, wzrost wydatku energetycznego, a także wzrost termogenezy (Y. Ravussin i in., 2014; Rui, 2013). Otyłe gryzonie nadmiernie karmione przez sondę dożołądkową, po zaprzestaniu doświadczenia, wykazywały zmniejszony pobór pokarmu, połączony ze wzrostem wydatku energetycznego do momentu powrotu do wagi wyjściowej (Y. Ravussin i in., 2014).

1.3 Sygnalizacja obwodowa regulująca bilans energetyczny

Kontrola masy ciała jest determinowana poprzez współoddziaływanie czynników genetycznych, środowiskowych i psychospołecznych, które podlegają integralnej regulacji na poziomie układu nerwowego i endokrynnego, poprzez wydzielanie odpowiednich hormonów i neuropeptydów, kontrolujących pobór energii, wydatek energetyczny i dystrybucję tłuszczu (González-Muniesa i in., 2017). Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) stale modyfikuje parametry metaboliczne (takie jak glikemia, poziom wolnych kwasów tłuszczowych) i wydzielanie hormonów (insulina, leptyna, grelina, cholecystokinina, PYY, GLP-1), wywołując odpowiedź adaptacyjną organizmu w postaci regulacji poboru pokarmu lub modulowaniu homeostazy glukozy i wydatku energetycznego za pośrednictwem autonomicznego układu nerwowego (Derghal i in., 2017). Mózg, a w szczególności podwzgórze, odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy energetycznej poprzez oddziaływanie z sygnałami peryferyjnymi, zarówno krótko-, jak i długotrwałymi, umożliwiającymi ocenę statusu energetycznego organizmu. Konsumpcja pokarmów połączona z mechanicznym rozszerzeniem ścian żołądka powoduje sekrecję krótkoterminowych sygnałów wywołujących poczucie sytości. Peptydy te redukcją pobór pokarmu poprzez zahamowanie sygnalizacji oreksygeniczej (wzmacniającej poczucie głodu) w podwzgórzu, wzmacniając sygnalizację anoreksygeniczną (hamującą głód) (Sam i in., 2012).



Rycina 1.1 Regulacja homeostazy energetycznej. OUN integruje sygnały długoterminowe (insulina, leptyna) i krótkoterminowe (substancje odżywcze i sygnały z układu pokarmowego) i reguluje pobór pokarmu i wydatek energetyczny w sposób, który zapewnia stabilne rezerwy tłuszczu. Pozytywny bilans energetyczny wytworzony przez nadmierne jedzenie hamuje układ nagrody, zwiększając poczucie sytości po posiłku i redukując pobór pokarmu. W odpowiedzi na deprywację pokarmową, OUN angażuje odpowiedzi adaptacyjne, których zadaniem jest zwiększenie aktywności układu nagrody wynikającej ze spożycia pokarmu i obniżenie odpowiedzi na sygnały peryferyjne, w celu zwiększenia konsumpcji pokarmu do momentu uzupełnienia rezerw energetycznych (FFA, ang. *free fatty acids*; CCK, ang. *cholecystokinin*; GLP1, ang. *glukagon-like peptide 1*) (na podstawie Morton i in., 2015).

1.3.1 Krótkoterminowe sygnały peryferyjne

Znanych jest ok. 20 polipeptydów, wydzielanych przez komórki nabłonka jelit, które pełnią funkcję hormonów sytości, do których m.in. należą cholecystokina (CCK, ang. *cholecystokinin*), GLP-1 (ang. *glucagon-like peptide 1*) i GIP (ang. *glucose-dependent insulintropic polypeptide*), oksyntomodulina (OXM), peptyd YY (PYY), czynnik wzrostu fibroblastów 19 (FGF-19, ang. *fibroblast growth factor-19*), czy składnik chylomikronów apolipoproteina AIV (apoAIV) (Lo i in., 2012). Hormony sytości dodatkowo zwiększają wydatek energetyczny (Scott i in., 2013). Wyspecjalizowane komórki I jelita cienkiego w odpowiedzi na posiłek uwalniają cholecystokininę, wywołującą poczucie sytości (Lancha i in., 2012; Rui, 2013). Receptory CCK są sprzężone z białkiem G i zlokalizowane w neuronach obwodowych, gdzie za pośrednictwem transmisji glutamatergicznej przekazują informacje do mózgu. Hormony modulujące homeostazę glukozy, GLP-1 i GIP są uwalniane przez komórki L jelita (Aronoff i in., 2004). GLP-1 aktywuje ośrodki odpowiedzialne za sytość oraz wzmacnia indukowane przez wysokie stężenie glukozy uwolnienie insuliny z komórek β trzustki, a także hamuje wydzielanie glukagonu (Berg i in., 2018). Oksyntomodulina (OXM) jest również wydzielana przez komórki L części dystalnej jelit (Rui, 2013), działając przez receptor dla

GLP-1. OXM redukuje łaknienie i ilość spożywanych pokarmów, a także wpływa na zmniejszenie masy ciała u osób otyłych oraz zwiększa wydatek energetyczny. Badania pokazują, że zmniejszenie apetytu częściowo uwarunkowane jest hamowaniem sekrecji greliny oraz zmniejszeniem spożycia pokarmu przez osoby otyłe po infuzji dwóch peptydów OXM i PYY, co wskazuje na addytywny efekt działania obu hormonów (Cohen i in., 2003). Peptyd YY (PYY) jest syntetyzowany i uwalniany z wyspecjalizowanych komórek L, zlokalizowanych w dwunastnicy, w dystalnej części jelita cienkiego i w jelicie grubym. Budową przypomina NPY (ang. *neuropeptide Y*), peptyd biorący udział w sygnalizacji oreksygeniczej w podwzgórzu i polipeptyd trzustkowy. Jego wydzielanie jest proporcjonalne do kaloryczności spożytego pokarmu. PYY hamuje apetyt po spożyciu pokarmu poprzez hamowanie perystaltyki jelit. Uwalnianie PYY jest kontrolowane przez ośrodki pokarmowe w podwzgórzu, które odbierają sygnały indukowane przez zakończenia wstępujące (afferentne) włókien nerwu błędnego, pod wpływem bodźców pokarmowych. Zwiększone uwalnianie PYY powoduje obniżenie stężenia greliny. Niższe stężenie PYY obserwuje się również w surowicy u osób z otyłością. Dożylnie podanie PYY powoduje zahamowanie apetytu oraz zmniejszenie wartości kalorycznej spożytego pokarmu przez 24 godziny zarówno u osób otyłych, jak i z prawidłową masą ciała (Batterham i in., 2003).

Krótkoterminowym hormonem o działaniu przeciwnym do hormonów opisanych powyżej, czyli stymulującym pobór pokarmu jest grelina, wydzielana przez komórki okładzinowe (oksyntyczne) znajdujące się w trzonie i dnie żołądka. Grelina wiąże się z receptorem wydzielania hormonu wzrostu (GHS-R, ang. *growth hormone secretagogue receptor*), będącym receptorem o siedmiu domenach transbłonowych (7TM, ang. *7 transmembrane*), związanym z białkiem G zlokalizowanym w wielu miejscach w układzie nerwowym z najwyższą ekspresją w przednim płacie przysadki, jądrze łukowatym podwzgórza, hipokampie, istocie czarnej zbitej (SNpc, ang. *substantia nigra pars compacta*), brzusznej części nakrywki śródmózgowia (VTA, ang. *ventral tegmental area*), ale również w narządach peryferyjnych: wyspach trzustkowych, nadnerczach, sercu i tarczycy. Grelina stymuluje lipogenezę, co zwiększa poziom tłuszczu, reguluje metabolizm glukozy i cykl okołodobowy oraz zwiększa perystaltykę jelit (Poher i in., 2018). Systemowe podanie greliny powoduje wzrost poboru pokarmu, spadek wydatku energetycznego i wzrost masy ciała (Nakazato i in., 2001; Tschöp i in., 2000).

1.3.2 Długoterminowe sygnały sytości

Długoterminowe sygnały sytości w odróżnieniu od krótkotrwałej sygnalizacji, informują o zasobach energetycznych organizmu. Sygnały te pochodzą głównie z trzustki oraz z tkanki tłuszczowej (Morton i in., 2015).

Czynniki sygnałowe pochodzące z trzustki

Główną funkcją fizjologiczną trzustki jest wydzielanie hormonów utrzymujących homeostazę glukozy. W zależności od stężenia glukozy we krwi, poprzez uwalnianie insuliny i glukagonu, reguluje wychwyt glukozy przez tkanki. Trzustka wydzielą także polipeptyd trzustkowy (PP, ang. *pancreatic polypeptide*) oraz amylinę, które również biorą udział w regulacji bilansu energetycznego (Lancha i in., 2012).

Insulina jest wydzielana przez komórki β trzustki i jej bazowy poziom jest plejotropowym sygnałem o działaniu długoterminowym, informującym o dostępności węglowodanów (Schwartz i Porte, 2005). Insulina hamuje pobór pokarmu poprzez bezpośrednie oddziaływanie na różne populacje neuronów w jądrze łukowatym. Zwierzęta pozbawione receptorów insulinowych w mózgu wykazują wzmożoną konsumpcję pokarmu i otyłość (Brüning i in., 2000). Insulina hamuje sekrecję glukagonu z komórek α trzustki. Niektóre komórki, takie jak adipocyty, kardiomiocyty, komórki mięśni szkieletowych, charakteryzują się obecnością transportera glukozy typu 4 (GLUT-4), który jest całkowicie zależny od obecności insuliny (Yaribeygi i in., 2019a).

Działanie wewnątrzkomórkowe insuliny inicjowane jest poprzez przyłączenie insuliny do receptora w błonie komórek docelowych powodując aktywację receptora (fosforylację) i przyłączenie substratów receptora insuliny 1 (IRS-1, ang. *insulin receptor substrate 1*). Następnie kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide 3 kinase*) wiąże się z IRS-1 i przekształca bifosforan inozytolu (PIP₂, ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) obecny w błonie w trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₃, ang. *phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate*). PIP₃ aktywuje kinazę białkową PDK1, która fosforyluje kinazę Akt. Białko Akt, niezwiązane z błoną, przemieszczając się w obrębie komórki fosforyluje białka kontrolujące przemieszczanie GLUT4 na powierzchnię komórki, a także aktywuje enzymy stymulujące syntezę glikogenu (Thorn i in., 2013). Niedostateczne wydzielanie insuliny lub zaburzenie wychwyty glukozy przez komórki zależne od insuliny, powoduje niemożność wykorzystania glukozy jako źródła energii i hiperglikemię. Towarzyszące otyłości obniżenie wrażliwości

tkanek na insulinę (insulinooporność), jest zaburzeniem metabolicznym prowadzącym do rozwoju cukrzycy 2 typu (Yaribeygi i in., 2019a).

Insulina syntetyzowana jest w postaci proinsuliny w komórkach β trzustki, a następnie jest poddana obróbce w retikulum endoplazmatycznym (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) i pakowana do pęcherzyków wydzielniczych. Wzrost stężenia glukozy we krwi powoduje transport glukozy za pośrednictwem GLUT2 do komórek β , w wyniku czego dochodzi do syntezy ATP, napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki, co powoduje fuzję pęcherzyków wydzielniczych z błoną i sekrecję insuliny do krwiobiegu. Długotrwała nadwyżka energetyczna może przyczynić się do powstania insulinooporności w komórkach zależnych od insuliny, wzmożonej syntezy proinsuliny w ER w komórkach β , co powoduje sytuację określaną jako stres ER i uruchomienie ścieżki ratunkowej zwanej odpowiedzią na niezwinęte białka (UPR, ang. *unfolded protein response*). Szlak UPR hamuje syntezę białka, błędnie zwinęte białka zostają usuwane z ER i degradowane w proteasomach. Jeśli stres ER nie zostanie wyciszony, komórki β uruchamiają ścieżkę programowanej śmierci, doprowadzając do pełnoobjawowej cukrzycy 2 typu (Berg i in., 2018; Yaribeygi i in., 2019b). Insulina pełni ważną funkcję w adipocytach w szczególności u osób otyłych. Jej rola polega na stymulacji aktywności lipazy lipoproteinowej w komórkach tłuszczowych, co prowadzi do wychwytu kwasów tłuszczowych z lipoprotein obecnych w krwiobiegu. Insulina indukuje magazynowanie TAG poprzez kilka mechanizmów, z których można wyróżnić: różnicowanie preadipocytów w dojrzałe komórki tłuszczowe, stymulację lipogenezy poprzez regulację genów promujących syntezę kwasów tłuszczowych w komórkach tłuszczowych i wątrobie, uruchomienie transportu glukozy w kierunku magazynowania tłuszczów i syntezy triglicerydów oraz zahamowanie lipolizy (Kahn i Flier, 2000).

Czynniki sygnałowe pochodzące z tkanki tłuszczowej

Już ponad 50 lat temu zaproponowano hipotezę regulacji poboru pokarmu w zależności od krążących czynników sygnałowych wydzielanych przez tkankę tłuszczową, proporcjonalnie do jej masy (Kennedy, 1953). Do najistotniejszych adipokin należą leptyna, adiponektyna czy rezystyna (Lancha i in., 2012).

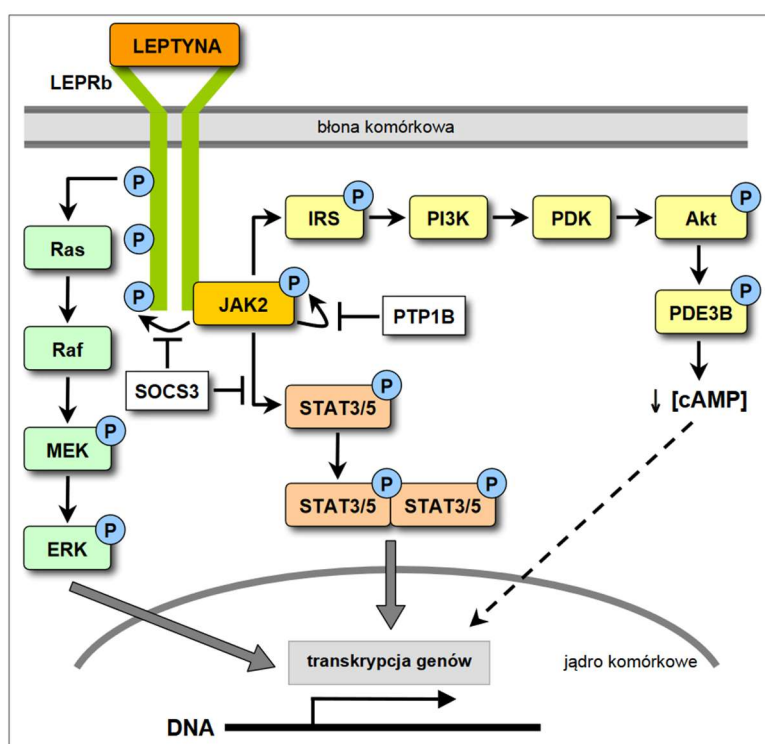
Leptyna jest nazywana „hormonem sytości” i pełni rolę w długoterminowej sygnalizacji (Friedman, 2014). Syntetyzowana jest głównie w WAT oraz w mniejszych ilościach przez inne narządy (mózg, żołądek, łożysko). Synteza leptyny jest regulowana między innymi przez stan odżywienia, insulinę, glukokortykoidy, katecholaminy, ekspozycję na zimno i hormon wzrostu (Ahima i Flier, 2000). Sekrecja leptyny jest zależna od cyklu okołodobowego. Największe

stężenie w obiegu osiąga w godzinach nocnych (00:00 – 04:00), co stanowi 30-40% wyższą wartość niż stężenie mierzone w godzinach porannych (08:00-12:00) (Sinha i in., 1996). Stężenie leptyny w obiegu zależy od zmagazynowanych rezerw energetycznych w postaci TAG w adipocytach (Schwartz i Porte, 2005). Stężenie leptyny wzrasta po spożyciu posiłku i stanowi sygnał o pozytywnym bilansie energetycznym, odbieranym przez receptory w podwzgórzu. Krążące sygnały, takie jak insulina, regulują leptynę posttranskrypcyjnie (M.-J. Lee i in., 2007). Leptyna stymuluje neurony odpowiedzialne za poczucie sytości i wzmacnia ich anoreksygeniczne działanie, natomiast hamuje aktywność neuronów oreksygenicznych (Flak i Myers, 2016). Za pośrednictwem układu współczulnego, leptyna bierze udział w regulacji metabolizmu energetycznego, poprzez obniżenie poboru pokarmu, wzrost wydatku energetycznego, regulację termogenezy i reprodukcji (Pico i in., 2011). Zaburzenie funkcji leptyny np. w wyniku uszkodzenia jej genu, niesie ze sobą poważne fizjologiczne konsekwencje: wzrost konsumpcji pokarmu, zmniejszenie poczucia sytości, zmiany w układzie autonomicznym i endokrynnym powodujące zmniejszenie wykorzystania energii. Niski poziom leptyny, wynikający np. ze skrajnego wychudzenia jak w przypadku jadłowstrętu psychicznego (Anorexia nervosa), przyczynia się do zahamowania wzrostu, reprodukcji i obniżenia tempa metabolizmu, poprzez osłabienie działania układu współczulnego i funkcji tarczycy. Obniżenie stężenia leptyny w obiegu powoduje wzrost syntezy glukozy w wątrobie oraz spadek wychwyty glukozy przez tkanki obwodowe, ze względu na oszczędzanie „paliwa energetycznego” dla mózgu. Niedobór leptyny prowadzi również do zmian behawioralnych – wzroście motywacji do poszukiwania pokarmu, czy zwiększeniu zachowań ryzykownych (Flak i Myers, 2016). W niektórych przypadkach otyłość może być wynikiem zaburzeń w ścieżce leptynowej (nieprawidłowym wydzielaniu leptyny lub niemożności wychwyty przez jej receptory), co potwierdzono w mysich modelach otyłości z recesywną autosomalną mutacją w genie kodującym leptynę *ob/ob* (ang. *obese*) oraz genie kodującym receptor leptynowy w mysim modelu *db/db* (ang. *diabetes*) i w modelu szczurzym *fa/fa* (ang. *fatty*) (de Luca i in., 2005; Frühbeck i Gómez-Ambrosi, 2001). U osób otyłych, ze względu na wysoką zawartość tkanki tłuszczowej, a tym samym nadmiar leptyny w obiegu, obserwuje się obniżenie wrażliwości na leptynę, określane jako leptynooporność (Flak i Myers, 2016). Sygnalizacja leptynowa została ewolucyjnie „zaprojektowana”, aby wykrywać deficyt leptyny w obiegu, raczej niż jej nadmiar, co sugeruje istnienie pewnego progu, powyżej którego efekt leptyny nie jest obserwowany lub jest minimalny (Y. Ravussin i in., 2014). Leptyna, oprócz bezpośredniego oddziaływania z neuronami podwzgórza, działa na tkanki obwodowe (Triantafyllou i in., 2016). Mechanizm regulacji ekspresji genu kodującego leptynę nie został

dokładnie poznany, ale uważa się, że wzrost stężenia leptyny jest kontrolowany m. in. przez insulinę, poprzez wspólne ścieżki sygnałowe, a także przez glukozę oraz glikokortykosteroidy. Glukagon i katecholaminy z kolei, wykazują działanie przeciwstawne, zmniejszając ilość mRNA leptyny poprzez wzrost stężenia cAMP. Regulacja procesu termogenezy w BAT jest również kontrolowana przez leptynę za pośrednictwem współczulnego układu nerwowego. Badania na modelach zwierzęcych pokazały obniżenie biosyntezy leptyny po aktywacji współczulnego układu nerwowego za pomocą niskiej temperatury. Myszy *ob/ob* wykazują niższą temperaturę ciała o 1-2°C w porównaniu z myszami kontrolnymi i nie przeżywają ekspozycji na mróz (Rezai-Zadeh i Münzberg, 2013; Trayhurn i in., 1976).

Wewnątrzkomórkowo leptyna wywiera swój efekt poprzez oddziaływanie z receptorem leptynowym w błonie komórkowej komórki docelowej. Receptor leptyny (LEPR) jest zaliczany do rodziny cytokin klasy I. Znanych jest 5 izoform tego receptora (LEPRa-e), z którego najistotniejszą rolę pełni długa postać receptora LEPRb, aktywująca ścieżkę JAK→STAT3. Modele zwierzęce, w których brak jest tej formy receptora (myszy *db/db*, szczury *fa/fa*) charakteryzuje otyłość, hiperfagia i obniżony wydatek energetyczny (de Luca i in., 2005). Ścieżka sygnałowa JAK→STAT3 bierze udział w utrzymaniu homeostazy energetycznej. Po przyłączeniu leptyny do receptora, następuje autofosforylacja kinazy tyrozynowej Janus 2 (JAK2), która fosforyluje reszty tyrozynowe receptora od strony cytozolowej oraz białko STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription*) - cytozolowy przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji (Roman i in., 2010). Ufosforylowana domena wewnątrzkomórkowa receptora przylacza białko SH2B1, którego delecja powoduje oporność na leptynę, hiperfagię i otyłość. Fosforylacji mogą ulec również inne białka z rodziny STAT np. STAT1 lub STAT 5, które po dimeryzacji, przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie po przyłączeniu do rejonu promotorowego, biorą udział w regulacji transkrypcji genów. Delecja STAT3 w podwzgórzu skutkuje otyłością oraz rozwojem objawów zespołu metabolicznego (H. Liu i in., 2021). Leptyna aktywuje także kilka innych ważnych ścieżek sygnałowych. Jedną z nich jest ścieżka PI3K (kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa) → PKB/Akt (kinaza białkowa B/Akt) → PDE3B (fosfodiesteraza 3B), która odgrywa ważną rolę w regulacji poboru pokarmu i homeostazy glukozy (Niswender i in., 2001) w podwzgórzu. Pokazano, że otyłość wywołana dietą u myszy, powoduje spadek wrażliwości neuronów na leptynę, wynikający z zablokowania ścieżki z udziałem PI3K (Metlakunta i in., 2008). Natomiast badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że zahamowanie w podwzgórzu aktywności PDE3B powoduje obniżenie stężenia cAMP, niwelując anoreksygeniczne właściwości leptyny, co w efekcie prowadzi do wzmożonego poboru pokarmu (Zhao i in., 2002). Leptyna aktywuje

również szlak sygnałowy Ras→Raf→MAPK, w skład którego wchodzi kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERK, ang. *extracellular signal-regulated kinase*), należące do rodziny kinaz aktywowanych przez mitogeny (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*) (H. Liu i in., 2021). Połączenie cząsteczki leptyny z receptorem wpływa również na fosforylację kinazy p38 MAPK, co prowadzi do nasilenia β -oksydacji, a także N-końcowej kinazy c-Jun (JNK, ang. *c-Jun N-terminal kinase*) (Shen i in., 2005). Dodatkowe ścieżki sygnałowe leptyny działające obwodowo wykorzystują kinazę białkową aktywowaną 5'-adenozynomonofosforanem (AMPK), która stanowi potencjalną ścieżkę regulującą funkcję komórek β trzustki i sekrecję insuliny (P.-C. Chen i in., 2013) oraz ścieżka kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) - szlak, który aktywuje proliferację komórek jelitowych (Fazolini i in., 2015). Do negatywnych regulatorów ścieżki sygnałowej leptyny zaliczamy supresor sygnalizacji cytokin 3 (SOCS3, ang. *suppressor of cytokine signalling 3*), który hamuje fosforylację wewnątrzkomórkowej cząsteczki receptora leptynowego na zasadzie sprzężenia zwrotnego oraz fosfatazę tyrozynową 1B (PTP1B, ang. *protein tyrosine phosphatase 1B*), która obniża poziom fosforylacji JAK2 oraz blokuje transkrypcję genu kodującego SOCS2 indukowaną przez leptynę (H. Liu i in., 2021).



Rycina 1.3 Ścieżki sygnałowe leptyny uczestniczące w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów (Gogga i in., 2011).

Za pośrednictwem opisanych powyżej ścieżek sygnałowych, leptyna odgrywa ważną rolę jako czynnik anoreksygeniczny w długoterminowej regulacji poboru pokarmu oraz kontroluje ekspresję białek kluczowych w przemianach lipidów i węglowodanów (Gogga i in., 2011). Leptyna zwiększa wrażliwości tkanek na insulinę i wpływa na poprawę tolerancji glukozy (wzrost intensywności glikolizy) (Berti i in., 1997). Mechanizm zwiększonego poboru glukozy przez mięśnie szkieletowe pod wpływem leptyny, można wytłumaczyć za pośrednictwem aktywacji wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej poprzez fosforylację kinazy Akt oraz PI3K, co prowadzi do przemieszczenia transportera glukozy GLUT4 do błony komórkowej (Thorn i in., 2013).

Obwodowo, leptyna hamuje syntezę TAG w wątrobie, tkance tłuszczowej i mięśniach szkieletowych, co obniża ilość zmagazynowanych w nich lipidów. Stymulacja odpowiednich neuronów podwzgórza za pomocą leptyny powoduje wzrost uwalniania katecholamin, adrenaliny i noradrenaliny, które poprzez receptory β -adrenergiczne w adipocytach, zwiększają fosforylację CREB (ang. *cAMP-response element binding protein*) - czynnika transkrypcyjnego wiążącego się z elementem odpowiedzi na cAMP, który reguluje ekspresję genów zaangażowanych w hydrolizę TAG i utlenianie kwasów tłuszczowych (Park i in., 2006). Leptyna stymuluje hydrolizę TAG w tkance tłuszczowej poprzez zwiększenie ekspresji genu kodującego lipazę zależną od hormonów (HSL, ang. *hormone-sensitive lipase*), a także powoduje wzrost oksydacji kwasów tłuszczowych zarówno w adipocytach, jak i mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym, poprzez wzrost ekspresji genów m. in. palmitoilotransferazy karnitynowej 1 (CPT1, ang. *carnitine palmitoyltransferase 1*) (Akasaka i in., 2009). W adipocytach, leptyna zmniejsza ekspresję głównych enzymów szlaku biosyntezy lipidów: syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, ang. *fatty acids synthase*) i karboksylazy acetylo-CoA (ACC, ang. *acetyl-CoA carboxylase*) (Park i in., 2006).

1.4 Ośrodkowa regulacja mechanizmu głodu i sytości

Konsumpcja pokarmu powoduje stymulację włókien wstępujących nerwu błędnego poprzez mechanoreceptory wrażliwe na rozszerzanie ścian żołądka oraz receptory odbierające sygnały krótkoterminowe (CCK, PYY, GLP1, PP). Informacja jest przekazywana za pośrednictwem połączenia monosynaptycznego poprzez transmisję glutamatergiczną z jądrem pasma samotnego (NTS, ang. *nucleus of solitary tract*) w tyłomózgowiu. Tyłomózgowie stanowi anatomiczną drogę łączącą przodomózgowie z resztą ciała. Krótkotrwałe sygnały sytości są przetwarzane w tym obszarze, w szczególności w zespole grzbietowym nerwu błędnego (DVC, ang. *dorsal vagal complex*), w którego skład wchodzi wspomniane jądro

pasma samotnego, pole najdalsze (AP, ang. *area postrema*) i grzbietowe jądro ruchowe nerwu błędnego (DMV, ang. *dorsal motor nucleus of vagus*). Nieszczelna bariera krew-mózg w tym rejonie, powoduje bezpośrednią ekspozycję neuronów na sygnały peryferyjne takie jak stężenie glukozy, poziom kwasów tłuszczowych, hormonów sytości i cytokin, pochodzących z przewodu pokarmowego, komórek α i β trzustki, komórek tłuszczowych, mięśni i nerek (Lancha et al., 2012; Rui, 2013). Ponadto NTS odbiera zstępujące projekcje z podwzgórza oraz struktur układu korowo-limbicznego. Lokalizacja anatomiczna pozwala NTS pełnić funkcję łącznikową pomiędzy przodo- i tyłomózgowiem oraz pełnić funkcje w kontroli stanów głodu i sytości.

Głównym rejonem mózgu odpowiedzialnym za homeostazę energetyczną jest podwzgórze (Jais i Brüning, 2022), zbudowane z wielu wzajemnie ze sobą połączonych jąder. W jego skład wchodzi jądro łukowate (ARC, ang. *arcuate nucleus*), które odgrywa szczególnie istotną rolę w regulacji energetycznej, jądro brzuszno-boczne (VMH, ang. *ventromedial hypothalamus*), jądro grzbietowo-przyśrodkowe (DMH, ang. *dorsomedial hypothalamus*), jądro przykomorowe (PVN, ang. *paraventricular nucleus*), jądro boczne (LH, ang. *lateral hypothalamus*). Jądra podwzgórza posiadają wzajemne połączenia synaptyczne, które regulują autonomiczną i behawioralną odpowiedź w zależności od statusu energetycznego (Rui, 2013). Obwody podwzgórza regulujące bilans energetyczny są niezwykle plastyczne i rozwijają się w odpowiedzi na sygnały odżywcze i hormonalne (Padilla i in., 2010). Wczesne kierunki badań dążące do scharakteryzowania sposobu w jaki podwzgórze kontroluje bilans energetyczny, opierały się na badaniach unikatowej roli poszczególnych jąder podwzgórza w regulacji łaknienia (Klockars i in., 2019). W latach 60-tych XX wieku pokazano, że abłacja VMH prowadzi do nadmiernego poboru pokarmu i wzrostu masy ciała, natomiast przeciwnie, zniszczenie jądra LH powoduje hipofagię i utratę masy ciała u gryzoni (Mayer i Thomas, 1967). W kolejnych badaniach pokazano, że uszkodzenie PVN oraz szlaków łączących podwzgórze z pniem mózgu, powoduje nadmierny apetyt i wzrost wagi u zwierząt laboratoryjnych (Kirchgessner i Sclafani, 1988). W konsekwencji poszczególne jądra często określane były jako „centra” sytości lub głodu. Jednakże, wraz z rozwojem metod umożliwiających identyfikację cytoarchitektury molekularnej mózgu, możliwość pomiaru i modyfikacji ekspresji genów miejscowo-specyficznych oraz metod umożliwiających selektywną manipulację określonych podtypów receptorów, stało się jasne, że podział na „centra sytości i głodu” stanowi zbyt duże uproszczenie. Zaproponowano zatem określenie, że regulacja poboru pokarmu kształtuje się poprzez kombinację sygnałów nerwowych i chemicznych zintegrowanych za pomocą

wzajemnie skomunikowanej sieci regionów podwzgórza, rejonami poza jego obrębem oraz (bezpośrednio lub pośrednio) z tkankami peryferyjnymi (Klockars i in., 2019).

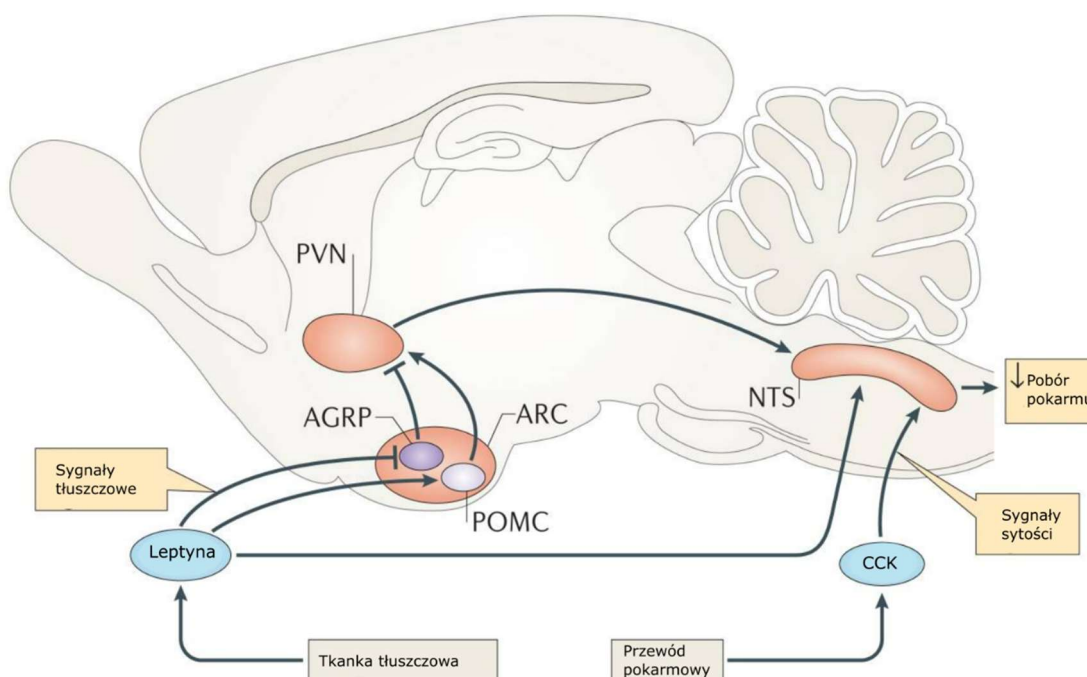
1.4.1 Jądro łukowate i system melanokortynowy w regulacji poboru pokarmu

Jądro łukowate (ARC) pełni nadrzędną rolę w kontroli metabolicznej, m.in. dzięki dogodnej lokalizacji anatomicznej, która umożliwia bezpośredni odbiór sygnałów peryferyjnych. ARC leży w sąsiedztwie wyniosłości przyśrodkowej (ME, ang. *median eminence*) i trzeciej komory mózgu (3V, ang. *third ventricle*) (Campbell i in., 2017). ME charakteryzuje się specyficzną waskularyzacją, za pośrednictwem której dochodzi do rozszczelnienia bariery krew-mózg i bezpośredniego kontaktu z sygnałami obwodowymi. Tanacyty, komórki wyściełające jamę trzeciej komory, kontaktują się z płynem mózgowo-rdzeniowym (CSF, ang. *cerebrospinal fluid*) i przekazują informacje dotyczącą stanu energetycznego do ARC (Lieu i in., 2020). Analiza transkryptomyczna z wykorzystaniem techniki Drop-seq wykazała 50 typów komórek zlokalizowanych w obrębie ARC i ME zawartych w klastrach i podklastrach, których klasyfikację oparto na ekspresji odpowiednich markerów charakterystycznych dla neuronów, ependymocytów i tanacytów, komórek linii oligodendrocytów, komórek prekursorowych oligodendrocytów/komórek NG2, makrofagów, komórek śródbłonna, komórek ściennych i astrocytów. Ta niezwykła heterogenność znajduje odzwierciedlenie w funkcjach pełnionych przez poszczególne typy i podtypy komórek. W obrębie ARC/ME można wyróżnić przynajmniej kilka typów neuronów o odmiennych funkcjach, w tym dwie populacje neuroendokrynne. Pierwsza kontroluje uwalnianie przysadkowego hormonu wzrostu (GHRH, ang. *growth hormone releasing hormone*), natomiast druga przez dopaminergiczne neurony TIDA/THDA (ang. *tuberoinfundibular/tuberohypophyseal dopaminergic*), uwalnia prolaktynę. Kolejne populacje neuronów w ARC/ME to neurony KND, wykazujące ekspresję kisseptyny/ neurokininy B/ dynorfiny, kontrolujące płodność oraz neurony SST (ang. *somatostatin*), których funkcja jest stosunkowo słabo poznana (Campbell i in., 2017). W ARC/ME istnieją również inne funkcjonalne typy neuronów, do których można zaliczyć GABAergiczną populację zaangażowaną w termogenezę, wykrytą u transgenicznym myszy RIP-Cre z ekspresją Cre kierowaną przez szczurzy promotor insuliny II (ang. *rat insulin-2 promoter*) (Kong i in., 2012) oraz GABAergiczną populację zależną od leptyny (odrębną od AgRP) (Garfield i in., 2016). Szczególnie istotną rolę w regulacji bilansu energetycznego, koordynacji apetytu i poboru pokarmu, pełnią dwie populacje neuronów, wykazujące przeciwstawne funkcje. Wśród nich wyróżnić można neurony oreksygeniczne syntetyzujące peptyd agouti-podobny (AgRP, ang.

agouti-related peptide) i neuropeptyd Y (NPY, ang. *neuropeptide Y*) oraz neurony anoreksygeniczne syntetyzujące POMC (ang. *pro-opiomelanocortin*) i CART (ang. *cocaine-amphetamine related transcript*) (Campbell i in., 2017). Pomimo, iż obie populacje neuronów w dorosłym życiu wykazują antagonistyczne właściwości, w rozwoju ontogenetycznym 25% neuronów wykazujących ekspresję NPY wywodzi się z linii prekursorowej neuronów POMC, co może mieć wpływ na właściwości tych neuronów w regulacji masy ciała i homeostazy energetycznej (Padilla i in., 2010). Obie populacje neuronów (AgRP/NPY oraz POMC/CART) modulują aktywność postsynaptyczną neuronów wykazujących ekspresję receptora melanokortyny 4 (MC4R, ang. *melanocortin 4 receptor*), znajdujących się w szczególności w PVN (Balthasar i in., 2005; Jais i Brüning, 2022), ale obecne są również w innych obszarach centralnego oraz obwodowego układu nerwowego i w komórkach L jelita. MC4R jest receptorem związanym z białkiem G o 7 domenach transbłonowych (Balthasar et al., 2005). Prohormon POMC rozpada się m.in. do hormonu stymulującego melanocyty α (α -MSH, ang. *α -melanocyte-stimulating hormone*), który następnie łączy się z receptorami MC3R i MC4R obecnymi na neuronach podwzgórza (PVN) czy DVC. Aktywacja receptora MC4R za pośrednictwem α -MSH powoduje obniżenie poboru pokarmu, wzrost wydatku energetycznego oraz regulację homeostazy glukozy (Rossi i in., 2011). Mutacje w POMC, MC3R lub MC4R powodują wczesny rozwój masywnej otyłości u ludzi, co potwierdza rolę układu melanokortynowego w regulacji homeostazy energetycznej (Krude i in., 1998). Receptor MC4R pełni kluczową rolę w zapobieganiu otyłości, co zostało potwierdzone zarówno u ludzi, u których doszło do spontanicznej mutacji oraz w modelach zwierzęcych typu knock-out (MC4R KO). Brak tego receptora powoduje wzrost poboru pokarmu i spadek wydatku energetycznego, co skutkuje otyłością (Balthasar et al., 2005; Huszar et al., 1997). Przywrócenie MC4R w PVN oraz subpopulacji neuronów w obrębie ciała migdałowatego u zwierząt z usuniętym receptorem MC4R, blokuje przejadanie się, natomiast nie ma wpływu na wydatek energetyczny (Balthasar i in., 2005). Pokazano również, że chemogenetyczna aktywacja neuronów MC4R w PVN redukuje pobór pokarmu po głodówce, tym samym potwierdzając rolę neuronów MC4R w regulacji sytości (Campbell i in., 2017). Tak więc, PVN jest strukturą II-rzędu kontrolującą łaknienie, podczas gdy wydatek energetyczny jest regulowany przez MC4R w innych obszarach mózgu, co świadczy o istnieniu odmiennych funkcji sieci neuronalnej POMC w kontroli metabolizmu energetycznego (Zhan, 2018).

Neurony ARC ponadto wysyłają projekcje w obrębie podwzgórza (PVN, DMV, VMH, LH) oraz do innych ośrodków mózgowia, m.in. do NTS, jądra łożyskowego prążka krańcowego (BNST, ang. *bed nucleus of the stria terminalis*), jądra centralnego i przysiodkowego ciała

migdałowatego (CeA, MeA, ang. *central and medial nuclei of the amygdala*), jądra okołoramieniowego bocznego (LPBN, ang. *lateral parabrachial nucleus*), istoty szarej okołowodociągowej (PAG, ang. *periaqueductal grey*), strukturach, biorących udział w modyfikacji zachowania i motywacji w zależności od potrzeb energetycznych organizmu (Lieu i in., 2020).



Rycina 1.5 Uproszczony schemat centralnej kontroli łaknienia poprzez integrację sygnałów peryferyjnych. Długoterminowe sygnały sytości takie jak leptyna czy insulina są odbierane przez receptory w neuronach ARC, które następnie angażują neurony II-rzędu prowadząc do zmian w zachowaniach żywieniowych, natomiast krótkoterminowe sygnały sytości z przewodu pokarmowego poprzez włókna wstępujące nerwu błędnego są integrowane w rdzeniu przedłużonym (na podstawie Morton i in., 2015).

1.4.2 Neurony oreksygeniczne

Neurony oreksygeniczne (AgRP/NPY) są neuronami GABAergicznymi, czyli oprócz neuropeptydów, od których pochodzi ich nazwa wydzielają również hamujący neuroprzekaźnik kwas γ -aminomasłowy (GABA, ang. γ -aminobutyric acid), który dodatkowo wycisza aktywność neuronów POMC i struktur odpowiedzialnych za odczuwanie sytości (Padilla i in., 2016). AgRP jest opisywany jako endogenne antagonistę lub odwrotny agonistę receptora melanokortynowego 3 i 4 (Atasoy i in., 2012; Derghal i in., 2017; Ollmann i in., 1997). Neurony AgRP/NPY są aktywowane przez krążące sygnały wykrywające deficyt energetyczny, w tym grelinę (Atasoy i in., 2012). Grelina aktywuje swój receptor na neuronach oreksygenicznym i uruchamia szlak zależny od kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *5'AMP-*

activated protein kinase) na presynaptycznych neuronach glutamatergicznych (Y. Yang i in., 2011). Deficyt energetyczny powoduje wzrost pobudliwości neuronalnej w neuronach AgRP/NPY, natomiast sam widok pokarmu (inicjacja konsumpcji) natychmiast wycisza tę pobudliwość (Aponte et al., 2011). Badania z wykorzystaniem optogenetyki, wykorzystującej aktywowany światłem niebieskim kanał wapniowy – rodopsynę kanałową (ChR2, ang. *channelrhodopsin 2*), pokazały, że stymulacja neuronów AgRP w ARC, powoduje natychmiastowy pobór pokarmu u najedzonych myszy, tym większy, im więcej neuronów zostanie pobudzonych podczas stymulacji (Aponte i in., 2011). Neurony AgRP/NPY występują w części przysiódkowej ARC w bezpośrednim sąsiedztwie ME oraz trzeciej komory (3V). Ekspresja AgRP w mózgu jest ściśle ograniczona do ARC i ME (Ollmann i in., 1997; Wortley i in., 2005), natomiast NPY jest obecny w wielu miejscach w OUN: podwzgórz, hipokampie, korze, pniu mózgu, mózdzku oraz w neuronach zazwojowych układu współczulnego, gdzie jest magazynowany i wydzielany wraz z noradrenaliną (NE, ang. *norepinephrine*) (W. Chen i in., 2020). NPY jest silnym czynnikiem stymulującym jedzenie, działającym na receptory Y1R i Y5R, związane z białkiem G w podwzgórz i blokującym neurony CART w ARC (Klockars i in., 2019). W podwzgórz otyłych i głodzonych szczurów, poziom NPY jest podwyższony i skorelowany z poborem pokarmu. Co więcej, pobór pokarmu związany z intensywnym wysiłkiem fizycznym wymaga aktywacji neuronów NPY w ARC (ARC^{NPY}) (W. Chen i in., 2020). Ablacja neuronów AgRP u dorosłych osobników przy użyciu toksyny błonicznej (DT, ang. *diphtheria toxin*), powoduje zahamowanie konsumpcji pokarmu i głodzenie, podczas gdy usunięcie neuronów AgRP u młodych osobników, powoduje zaledwie niewielką zmianę w poborze pokarmu. Wynik tego eksperymentu wskazuje na szerokie okno plastyczności, w którym jest możliwa kompensacja uzupełniająca skutki braku danego typu neuronów i ich neuropeptydu. Kompensacja jest zatem możliwa, jeśli do usunięcia dochodzi na wczesnym etapie rozwoju, gdzie tworzą się połączenia, a mózg wykazuje największą plastyczność (Luquet i in., 2005). Głodzenie wywołane ablacją neuronów AgRP w dorosłym życiu wynika z zaniku sygnalizacji GABAergiczej do jądra okołoramieniowego (PBN, *parabrachial nucleus*) (Q. Wu i in., 2009). Głodzenie jest również wywołane hiperaktywnością PBN. Jest to bowiem kluczowe jądro odbierające sygnał z nerwu błędnego z NTS, by zahamować pobór pokarmu (Q. Wu i in., 2012). Wiele jąder mózgu rozdystrybuowanych w różnych obszarach, wysyła projekcje do neuronów AgRP/NPY, lecz nie tak licznie jak to ma miejsce w przypadku neuronów POMC. Neurony POMC otrzymują połączenia presynaptyczne z ponad 50 obszarów mózgu, z czego 35 unerwia również neurony AgRP/NPY. Szacunkowo ~70% neuronów oreksygeniczných w ARC otrzymuje sygnały z jąder w obrębie podwzgórza (D. Wang i in.,

2015). Mapowanie funkcjonalnych połączeń neuronalnych z wykorzystaniem ChR2 oraz wektorów wirusowych rAAV (ang. *recombinant adeno-associated virus*), wykazały istnienie połączeń monosynaptycznych pomiędzy neuronami AgRP i POMC w ARC. Selektywna fotostymulacja neuronów ARC^{AgRP} powoduje silne zahamowanie aktywności neuronów ARC^{POMC}. Połączenie to, jest blokowane za pomocą pikrotoksyny (PTX) – antagonisty receptora GABA_A, pokazując że transmisja synaptyczna i zahamowanie POMC wymaga obecności GABA (Aponte i in., 2011).

1.4.3 Neurony anoreksygeniczne

Neurony anoreksygeniczne (POMC/CART) są stymulowane przez sygnały hormonalne oraz peryferyjne informujące o dostępności substancji odżywczych, takie jak leptyna, glukoza, GLP1 czy insulina, co prowadzi do spadku poboru pokarmu oraz zahamowania aktywności sąsiadujących neuronów oreksygenicznych. Pokazano, że delecja SOCS-3, negatywnego regulatora działania leptyny w neuronach POMC, wpływa na poprawę homeostazy glukozy i wrażliwość na insulinę oraz oporność na dietę wysokotłuszczową (HFD, ang. *high-fat diet*) (Kievit i in., 2006). Ponadto leptyna jest niezbędna do prawidłowego rozwoju neuronów POMC. Jednoczesne zaburzenie receptorów insuliny i leptyny w neuronach POMC u myszy, powoduje oporność na insulinę (J. W. Hill i in., 2010), co wskazuje na główną rolę neuronów POMC w integracji długoterminowych sygnałów obwodowych odzwierciedlających stan energetyczny organizmu. Neurony POMC wydzielają wspomniany α -MSH, który aktywuje receptor melanokortynowy 3 (MC3R) i 4 (MC4R) redukując pobór pokarmu i stymulując metabolizm. Gen *Pomc* koduje miejscowo specyficzny prekursor peptydowy, który oprócz α -MSH daje początek również innym peptydom, w tym β -, γ -MSH, ACTH (adrenokortykotropinie), CLIP (ang. *corticotropin-like intermediate peptide*), a także endogennemu opioidowi β -endorfinie, γ -lipotropinie i met-enkefalinie. Wymienione peptydy są upakowywane w pęcherzyki i uwalniane, by kontrolować szereg procesów biologicznych, włączając metabolizm energetyczny, pigmentację, funkcje kory nadnerczy, zachowania seksualne, układ nagrody i odporność. Warto nadmienić, iż gen *Pomc* ulega ekspresji zarówno w mózgu, jak i narządach peryferyjnych (Zhan, 2018). W kontroli metabolicznej biorą udział głównie dwa produkty genu *Pomc*: α -MSH i ACTH (Luquet i in., 2005). Podanie dokomorowe zarówno α -MSH, jak i ACTH powoduje zahamowanie poboru pokarmu i wzrost wydatku energetycznego u gryzoni laboratoryjnych (Poggioli i in., 1986). Pomimo, że ekspresja *Pomc* w trakcie rozwoju jest tymczasowo włączana w wielu rejonach mózgu, w dorosłym życiu jest

ściśle ograniczona do ARC w podwzgórzu i NTS w tyłomózgowiu (Aponte i in., 2011). Myszy z globalną ablacją neuronów POMC wykazują progresywną otyłość w dorosłym życiu, przejawiającą się poprzez przejadanie się i zwiększony przyrost masy ciała, podobnie do mutantów POMC typu knock-out (A. W. Xu i in., 2005). Ablacja neuronów POMC w podwzgórzu zwiększa pobór pokarmu, obniża wydatek energetyczny i powoduje szerokie spektrum metabolicznych i endokrynnych zaburzeń związanych z otyłością (Zhan i in., 2013). Neurony POMC mogą być aktywowane w ciągu sekund po detekcji sensorycznej pokarmu. Aktywność ta utrzymuje się także podczas konsumpcji (Zhan, 2018). Rozwój optogenetyki oraz technologii DREADD (ang. *designer receptors exclusively activated by designer drugs*) umożliwił selektywną manipulację neuronów POMC i poznanie roli neuronów POMC zlokalizowanych w ARC (ARC^{POMC}) w zachowaniach żywieniowych. Nagłe zahamowanie aktywności neuronalnej neuronów POMC nie wpływa istotnie na pobór pokarmu, podczas gdy chroniczna supresja redukuje przyjmowanie pokarmu i powoduje spadek wagi. Stymulacja neuronów POMC z wykorzystaniem optogenetyki wykazała obniżony pobór pokarmu, jednakże uzyskany efekt zaobserwowano po 24h ciągłej stymulacji, ukazując inną niż w przypadku stymulacji neuronów AgRP/NPY, kinetykę aktywacji neuronów zaangażowanych w poczucie sytości (Aponte i in., 2011). Podobne wyniki otrzymano przy użyciu DREADD, gdzie pokazano, że chroniczne, a nie krótkotrwałe zablokowanie ARC^{POMC} wywołuje hiperfagię (Krude i in., 1998). Populacja neuronów POMC w NTS (NTS^{POMC}) poprzez włókna aferentne nerwu błędnego przekazuje informacje z tkanek trzewnych do mózgu. Neurony NTS^{POMC} są aktywowane przez CCK oraz inne krótkotrwałe sygnały sytości po spożyciu posiłku. W działaniu aktywacyjnym CCK na neurony NTS^{POMC} pośredniczy wzrost pobudzenia nerwu błędnego. Bezpośrednia aktywacja NTS^{POMC} obniża liczbę posiłków i ich wielkość, i ostatecznie zahamowuje jedzenie. Jednakże w odróżnieniu do ARC^{POMC}, ablacja NTS^{POMC} nie wpływa na pobór pokarmu, masę i skład ciała, ani metabolizm lipidów i cukrów (Zhan i in., 2013). Zatem podwzgórzowa populacja bierze udział w długoterminowej regulacji poboru pokarmu i bilansu energetycznego poprzez integracje długoterminowych sygnałów sytości, natomiast populacja NTS^{POMC} otrzymuje i przetwarza krótkoterminowe sygnały sytości (Zhan, 2018). Neurony POMC stanowią heterogenenną populację. Podział na subpopulacje sklasyfikowano na podstawie wydzielanych neuroprzekaźników z użyciem hybrydyzacji *in situ*. Stwierdzono obecność mRNA zarówno dla enzymów odpowiedzialnych za syntezę pobudzającego neurotransmitera glutaminianu (vGLUT ang. *vesicular glutamate transporters*), jak i dla hamującego neuroprzekaźnika GABA (Gad65 i Gad67, ang. *glutamic acid decarboxylase*) oraz na bardzo niewielkim poziomie (<1% neuronów POMC) dla

transportera GABA (vGAT, ang. *vesicular GABA transporter*). Pokazano, że ~40% neuronów POMC wykazuje fenotyp GABAergiczny (ekspresja GABA, Gad65 i Gad67), 7% populacji neuronów POMC wykazuje fenotyp glutamatergiczny (ekspresja vGLUT2) w szczególności w rostralnej części ARC, natomiast połowa neuronów z ekspresją vGLUT2, wykazuje również ekspresję Gad65, sugerując podwójną naturę tej niewielkiej subpopulacji neuronów POMC i wydzielanie zarówno hamujących, jak i pobudzających neuroprzekaźników (Jarvie i Hentges, 2012). Heterogeny charakter neuronów POMC może być również definiowany na podstawie ekspresji receptorów na ich powierzchni. Neurony POMC posiadają liczne receptory, włączając receptory dla leptyny, insuliny, serotoniny 2C (5-HT_{2c}R), GLP1 (GLP1R), czy NPY. Neurony POMC wykazujące ekspresję receptora 5-HT_{2c}R różnią się od tych z ekspresją receptorów leptyny (Sohn i in., 2011). Natomiast neurony POMC z receptorami dla leptyny są różne od tych z receptorami dla insuliny (Williams et al., 2010). Zaledwie 12% neuronów POMC wykazuje ekspresję receptora dla leptyny, a mniej niż 10% dla receptora dla GLP1 (Campbell i in., 2017). Przytoczone przykłady pokazują, że podwzgórzowe neurony POMC można podzielić na liczne podgrupy na podstawie profilu ekspresji poszczególnych receptorów GPCR (ang. *G protein coupled receptor*), co odzwierciedla ich funkcje i odmienną odpowiedź na zmianę stanu odżywienia. Przykładem może być stan głodówki, gdzie dziesiątki genów ulega znaczącej zmianie ekspresji, lecz zmiana dotyczy wyłącznie określonych podtypów neuronów POMC (Campbell i in., 2017). Aktywność i pobudliwość neuronów POMC jest nie tylko regulowana przez liczne peptydy obwodowe, lecz również poprzez unerwienie presynaptyczne włókien aferentnych. Neurony POMC zlokalizowane w ARC (ARC^{POMC}) są liczniej unerwiane niż neurony AgRP/NPY i otrzymują sygnały z 52 obszarów mózgu rozmieszczonych w różnych rejonach w tym korze, przegrodzie, prążkowiu, ciele migdałowatym, wzgórz, podwzgórz, hipokampie, śródmózgowiu, moście i rdzeniu. W przeciwieństwie do neuronów ARC^{POMC}, neurony NTS^{POMC} odbierają sygnały głównie z mostu i rdzenia (~80%) (D. Wang i in., 2015).

Neurony vGLUT2 (ang. *vesicular glutamate transporter 2*) stanowią odrębną populację pobudzających glutamatergicznych neuronów w ARC, które aktywują neurony POMC. Ta populacja neuronów charakteryzuje się unikalną dystrybucją (w dystalnej części ARC), fizjologią komórkową i odpowiedzią na działanie neuropeptydów zaangażowanych w regulację homeostazy energetycznej. W obecności leptyny wykazują wzrost ufosforylowanej cząsteczki STAT3. Ponadto, wykazują pobudzenie elektrofizjologiczne w odpowiedzi na obecność anorektycznego neuromodulatora – CCK, natomiast oreksygeniczne neuropeptydy, takie jak

NPY, met-enkefalina, dynorfina i dopamina, powodują zahamowanie ich aktywności neuronalnej (van den Pol i in., 2019).

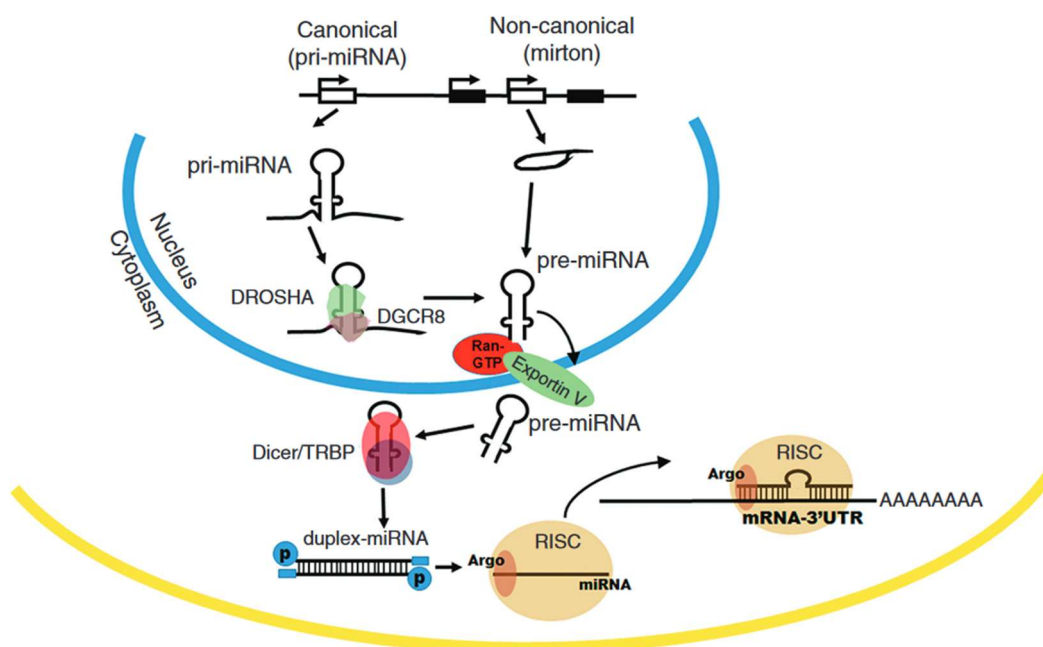
1.4.4 Rola mikroRNA w regulacji metabolicznej

Mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacja histonów czy cząsteczki mikroRNA (miRNA), zostały zaproponowane jako regulatory systemu melanokortynowego, które modulują ekspresję genów poprzez oddziaływanie ze środowiskiem zewnętrznym (dieta, aktywność fizyczna) oraz z czynnikami wewnętrznymi (hormony, czynniki genetyczne). Zmiany w ekspresji genów poprzez mechanizmy epigenetyczne są odwracalne, lecz mogą być także dziedziczone (Derghal i in., 2017; González-Muniesa i in., 2017). Ekspresja genów może być kontrolowana na etapie transkrypcji lub potranskrypcyjnie za pomocą miRNA. Cząsteczki miRNA biorą udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych włączając proliferację, apoptozę, rozwój układu nerwowego, różnicowanie tkankowe, a także w wielu patologicznych procesach związanych m.in. z rozwojem raka (Bartel, 2004).

Cząsteczki mikroRNA są to małe niekodujące cząsteczki RNA o średniej długości ~22 nukleotydów, które odgrywają ważną rolę regulacyjną, obniżającą ekspresję genów poprzez wiązanie z rejonem 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) docelowych transkryptów (Ha i Kim, 2014). Wiązanie to następuje w rejonie rdzeniowym cząsteczki miRNA (ang. *seed*), w którego skład wchodzi 8 nukleotydów częściowo lub całkowicie komplementarnych z docelowym transkryptem. Pojedyncza cząsteczka miRNA może potencjalnie wiązać się z ponad 100 docelowych mRNA, a także wiele cząsteczek miRNA może działać synergistycznie w regulacji ekspresji tego samego transkryptu (Selbach i in., 2008). Dodatkowo, cząsteczki miRNA różnych rodzin o podobnym rejonie *seed* (ang. „*seed family*”) mogą ze sobą „współpracować” w wyciszaniu tego samego genu lub zestawów genów pełniących podobne funkcje. Opisano wiele badań nad rolą poszczególnych cząsteczek miRNA, których usunięcie nie dawało oczekiwanego fenotypu lub efekt był nieznaczny. Można to uzasadnić powstaniem efektu kompensacyjnego wynikającego z eliminacji konkretnej cząsteczki miRNA na wczesnym etapie rozwoju. Cząsteczki miRNA wydają się pełnić zatem funkcje molekularnego systemu buforowego, którego rolą jest zapobieganie niepożądanym fluktuacjom w poziomach białek (Ebert i Sharp, 2012).

Większość cząsteczek miRNA powstaje na tzw. ścieżce kanonicznej i jest procesowana do prekursorowego miRNA (pre-miRNA) w jądrze komórkowym przez kompleks

mikroprocesora, w skład którego wchodzi m.in. rybonukleaza III Drosha (Denli i in., 2004), a następnie w cytoplazmie ulega dalszej obróbce za pomocą RNazy III – Dicer, do dojrzałego dupleksu miRNA. Dupleks miRNA składa się z nici sensownej 5p oraz nici antysensownej 3p. Jedna z nici wchodzi w interakcję z białkiem Argonaute, które jest głównym białkiem kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) (Khvorova i in., 2003). Kompleks RISC z wyselekcjonowanym miRNA – miRISC (ang. *miRNA-induced silencing complex*) na zasadzie komplementarności, przyłącza się najczęściej do rejonu 3'UTR docelowego mRNA w miejscu MRE (ang. *miRNA response elements*), za pośrednictwem 8-nukleotydu rejonu „seed” w cząsteczce mikroRNA. (Jo i in., 2015) i bierze udział w procesie interferencji RNA, której celem jest wyciszenie translacji lub w rzadkich przypadkach całkowitej komplementarności, degradacji nici matrycowej (Kawamata i Tomari, 2010).

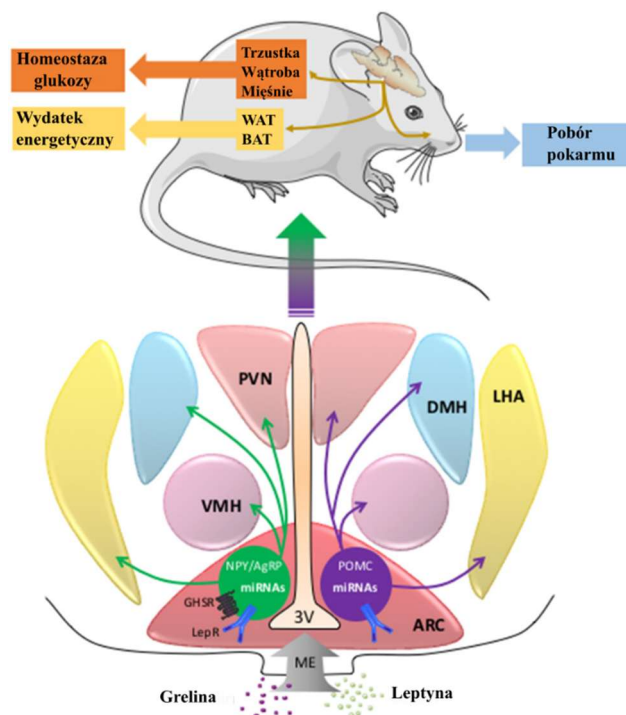


Rycina 1.6. Schemat biosyntezy mikroRNA. W ścieżce kanonicznej, pierwotny transkrypt (pri-miRNA) ulega obróbce w jądrze za pomocą mikroprocesora Drosha/DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region 8*) do prekursorowego miRNA (pre-miRNA). W ścieżce niekanonicznej, mirtrony, czyli miRNA powstałe z intronów danego genu, są generowane na drodze splicingu do pre-miRNA. Następnie prekursorowe miRNA transportowane jest do cytoplazmy (przez kompleks EksportynyV/RanGTP, gdzie ulega dalszemu procesowaniu przy udziale kompleksu, w którego skład wchodzi endorybonukleaza III Dicer wraz z TRBP (ang. *transactivation response RNA-binding protein*) do dojrzałego dupleksu o długości ok. 22 nukleotydów. Jedna z nici jest następnie rekrutowana przez białko Agronaute (Ago, Agro), które wchodzi w skład kompleksu RISC wyciszającego translację poprzez mechanizm interferencji RNA (Díaz i in., 2014).

Defekt w procesach biogenezy i funkcji miRNA wpływa na rozwój zaburzeń metabolicznych. Przykładowo, miR-14, miR-278 i let-7 są zaangażowane w metabolizm

lipidów i glukozy (Krützfeldt i Stoffel, 2006). Rolę w kontroli metabolizmu lipidów przypisuje się cząsteczkom miR-122, miR-33, miR-106, miR-758, miR-26, miR-370, miR-378/378*, let-7, miR-27, miR-143, miR34a i miR-335. Przykładowo cząsteczka miR-122 bierze udział w regulacji syntezy cholesterolu i sekrecji lipoprotein w wątrobie (Fernández-Hernando i in., 2013). Cząsteczka miR-33 jest zaangażowana w homeostazę cholesterolu i oksydację kwasów tłuszczowych. Cząsteczki miR-33a i miR-33b kontrolują ekspresję *SREBP1* i 2 (ang. *sterol response binding protein*), *Ampka* i *Sirtuiny 6* (*Sirt6*) zaangażowanych w regulację lipidów i metabolizmu glukozy. Substrat receptora insulinowego 2 (IRS2), białko adaptorowe kontrolujące sygnalizację insulinową w wątrobie, również jest regulowane przez miR-33, co wywiera efekt na kaskadę kontrolowaną przez IRS2, włączając fosforylację PKB (ang. *protein kinase B*) (zwaną także kinazą AKT) i lokalizację cytoplazmatyczną FoxO1 (Dávalos i in., 2011), co wpływa na ekspresję genów kodujących neuropeptydy zaangażowane w kontrolę łaknienia. Ponadto, cząsteczka miR-33 odgrywa kluczową rolę w regulacji neuronów oreksygenicznych i jej selektywne usunięcie z neuronów AgRP powoduje wzrost poziomu transkryptów *Agrp*, zwiększenie poboru pokarmu, otyłość i zaburzenia metaboliczne (w tym metabolizmu glukozy), zaburzenia biogenezy mitochondriów i oksydacji kwasów tłuszczowych (Price i in., 2024).

Ponadto, cząsteczki miRNA pełnią ważne funkcje w rozwoju układu nerwowego oraz plastyczności synaptycznej (Díaz i in., 2014). Podczas wczesnego rozwoju postnatalnego w podwzgórzu można zaobserwować liczne zmiany na poziomie transkryptów wielu cząsteczek miRNA, zwłaszcza w obrębie ARC i ME (Doubi-Kadmiri i in., 2016). Zmiany te mogą z kolei przekładać się na detekcję krążących sygnałów peryferyjnych oraz hormonów za pośrednictwem systemu melanokortynowego, co w następstwie, poprzez ścieżki zstępujące (eferentne), może modulować funkcje fizjologiczne wątroby, trzustki czy tkanki tłuszczowej (Rycina 1.7).



Rycina 1.7. MikroRNA w neuronach POMC i AgRP/NPY i centralna regulacja bilansu energetycznego. Neurony systemu melanokortynowego integrują sygnały peryferyjne (leptyna, grelina), które modulują ekspresję genów *Pomc*, *Agrp/Npy* oraz mikroRNA. System melanokortynowy wywołuje odpowiedź adaptacyjną organizmu w wyniku czego dochodzi do regulacji poboru pokarmu, homeostazy glukozy czy wydatku energetycznego. AgRP (ang. *agouti related peptide*); ARC (ang. *arcuate nucleus*); BAT (ang. *brown adipose tissue*); DMH (ang. *dorsomedial hypothalamus*; LepRb (ang. *leptin receptor type b*); LHA (ang. *lateral hypothalamus area*); ME (ang. *median eminence*) miRNA (mikroRNA); NPY (ang. *neuropeptide Y*); GHSR (ang. *ghrelin receptor*); POMC (ang. *pro-opiomelanocortin*); PVN (ang. *paraventricular nucleus*); VMH (ang. *ventromedial hypothalamus*); WAT (ang. *white adipose tissue*); 3V (ang. *third ventricle*) (na podstawie Derghal i in., 2017)

1.5 Plastyczność neuronalna w podwzgórzu

Plastyczność neuronalna stanowi jedną z podstawowych cech układu nerwowego określającą zdolność tkanki nerwowej do przebudowy (rearanżacji) sieci neuronalnych, co umożliwia adaptację, zmienność, naprawę, a także procesy uczenia się i formowania engramów pamięciowych (Kossut, 2019). Neuroplastyczność określa więc zdolność do funkcjonalnych i strukturalnych zmian w połączeniach neuronalnych pod wpływem docierających bodźców oraz odnosi się do właściwości neuronów wykazujących krótko- oraz długotrwałe zmiany fenotypowe w odpowiedzi na zmienne warunki. Stres, neurodegeneracja, czy też zmiany behawioralne wywołane przyjmowaniem leków, przyczyniają się do długoterminowych zmian w chemii neuronów, co prowadzi do zmian w produkcji neuropeptydów i białek receptorowych. Procesy te wymagają przeprogramowania ekspresji genów i syntezy białek *de novo* (Pérez-Cadahía i in., 2011). Zmiany strukturalne, określane jako plastyczność synaptyczna, odnoszą się do zmian w przewodnictwie synaptycznym neuronów, spowodowane przekształceniami

samych synaps lub reorganizacji ich liczby (Nikolaev, 1997). Plastyczność synaptyczna odnosi się od zależnej od aktywności modyfikacji siły lub skuteczności transmisji synaptycznej w istniejących wcześniej synapsach (Citri i Malenka, 2008). Zmiana siły synapsy określa plastyczność na poziomie funkcjonalnym, której celem jest selektywna stabilizacja istniejących aktywnych połączeń synaptycznych (Bernardinelli i in., 2014). Prowadzi to do zmian struktury synaps, kolców dendrytycznych (Bosch i Hayashi, 2012), synaptogenezy i modyfikacji aksonów (Kossut, 2019). Poza zmianami strukturalnymi synaps, długotrwała plastyczność synaptyczna obejmuje również zmianę ekspresji genów zachodzącą pod wpływem aktywacji pewnych ścieżek sygnałowych i powiązanych z nimi czynników transkrypcyjnych. Kontrola ekspresji genów umożliwia czasową i przestrzenną regulację syntezy białek koniecznych do modyfikacji struktury synaps i/lub utrzymania tych zmian (Kaczmarek, 2000).

Mechanizmami leżącymi u podstaw plastyczności synaptycznej, udokumentowanym po raz pierwszy w polu CA1 neuronów piramidalnych formacji hipokampa, są zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. *long term potentiation*) i długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD, and *long term depression*). Zarówno LTP jak i LTD są zależne od obecności receptorów dla neuroprzekaźnika glutaminianu NMDA i AMPA na neuronach postsynaptycznych (Bear i Malenka, 1994; Lohmann i Kessels, 2014). Receptory NMDA i AMPA stanowią więc ważny element molekularnej maszyny transmisji synaptycznej, bowiem przekształcają sygnały chemiczne na zmiany polaryzacji błony. Ich liczba i funkcjonalność mogą zwiększać się lub zmniejszać, wzmacniając lub osłabiając tym samym funkcje synaptyczne (Citri i Malenka, 2008).

Zmienne i nieprzewidywalne warunki środowiskowe wymuszają szybką adaptację w obwodach neuronalnych zaangażowanych w regulację metabolizmu energetycznego. Podwzgórze wykazuje wysoki stopień plastyczności, co umożliwia przystosowanie się do zmian środowiskowych poprzez reakcję na odpowiednie sygnały peryferyjne, które indukują zmiany organizacyjne w tychże obwodach. (Horvath i Gao, 2005). Za przykład mogą posłużyć silne modulatory systemu melanokortynowego leptyna, insulina czy grelina. Leptyna w sposób zarówno pre- jak i postsynaptyczny wzmacnia wyładowania neuronów POMC. Obniża natomiast częstotliwość wyładowań neuronów AgRP/NPY. Leptyna powoduje hiperpolaryzację neuronów AgRP/NPY, co w konsekwencji prowadzi do redukcji wypływu GABA i jego hamującego wpływu na neurony POMC (van den Top i in., 2004). Hamujący mechanizm działania leptyny na neurony AgRP/NPY opiera się na aktywacji kanałów potasowych wrażliwych na ATP (Spanswick i in., 1997). Insulina, podobnie jak leptyna, hiperpolaryzuje neurony podwzgórza poprzez aktywację kanałów potasowych wrażliwych na

ATP. Odwrotne działanie wykazuje grelina, która wzmacnia aktywność neuronów AgRP/NPY, obniża natomiast częstotliwość wyładowań na neuronach POMC (Cowley i in., 2003). Grelina niebezpośrednio obniża aktywność neuronów POMC, lecz działa poprzez aktywację neuronów AgRP/NPY, które następnie uwalniają hamujący neuroprzekaźnik GABA, wyciszający aktywność sąsiadujących neuronów POMC (Tong i in., 2008).

Aktywność neuronów podwzgórza, a zwłaszcza neuronów zlokalizowanych w ARC, jest ponadto modulowana w odpowiedzi na fluktuacje w poziomach „paliwa energetycznego” glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych (Lam i in., 2005; Oomura i Yoshimatsu, 1984). Neurony POMC są aktywowane w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy, natomiast neurony AgRP/NPY wykazują zwiększoną aktywność, gdy poziom glukozy maleje (Fioramonti i in., 2007). „Paliwem energetycznym” dla neuronów AgRP/NPY są wolne kwasy tłuszczowe. Wykorzystanie dwóch różnych substratów energetycznych, glukozy dla neuronów POMC i wolnych kwasów tłuszczowych dla neuronów AgRP/NPY, pokazuje jak istotne dla aktywności neuronów podwzgórza są procesy glikolizy i utleniania kwasów tłuszczowych (Andrews i in., 2008; Horvath i in., 2009).

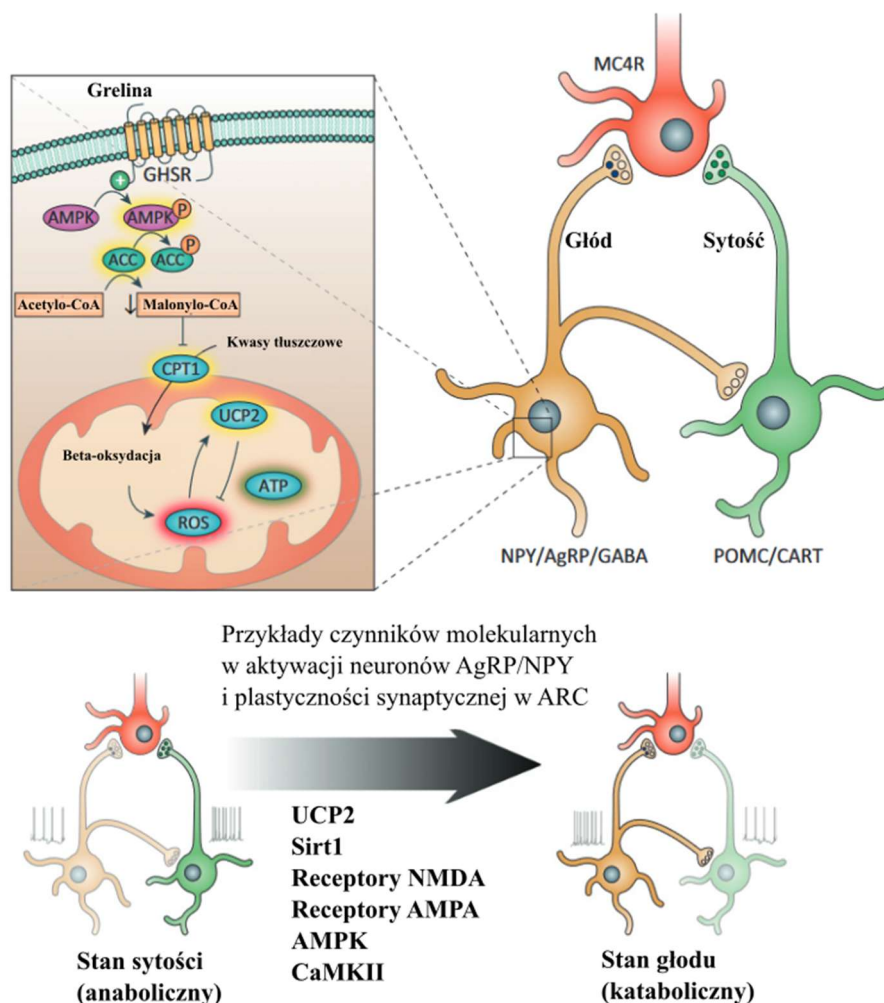
Istnieją specjalne mechanizmy umożliwiające komórkom monitorowanie dostępności substratów energetycznych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Jednym z nich jest wzrost aktywności kinazy adenozynomonofosforanu, AMP (AMPK) w odpowiedzi na spadek stosunku AMP do ATP. Aktywacja kinazy AMP generuje odpowiedzi komórkowe mające na celu wzrost poziomu ATP, włączając wzrost syntezy i wychwytu glukozy oraz kwasów tłuszczowych przez komórki. Niedostateczna ilość substratów energetycznych podczas głodówki powoduje więc wzrost aktywności AMPK (K. Lee i in., 2005). Myszy, którym usunięto podjednostkę AMPK α 2 w neuronach POMC rozwijają otyłość, podczas gdy taka mutacja wywołana w neuronach AgRP/NPY powoduje zależny od wieku szczupły fenotyp (Claret i in., 2007).

Wrażliwość komórek podwzgórza na obecność wolnych kwasów tłuszczowych jest również oparta o mechanizm zależny od kinazy AMP (Lam i in., 2005). Wolne kwasy tłuszczowe dyfundują do neuronów podwzgórza, gdzie są następnie estryfikowane i przenoszone do mitochondriów w celu utlenienia, co ostatecznie skutkuje zwiększonym łaknieniem. Transfer zestryfikowanych kwasów tłuszczowych do mitochondriów jest zależny od palmitoilotransferazy karnitynowej-1 i 2 (CPT1 i CPT2, ang. *carnitine palmitoyltransferase*) (Lam i in., 2005). Zahamowanie aktywności podwzgórzowego CPT1 obniża pobór pokarmu i wytwarzanie endogennej glukozy (Obici i in., 2003). Ponadto, malonylo-CoA, którego aktywność wzrasta w wyniku spalania glukozy, obniża aktywność CPT1, a co za tym idzie,

utlenianie kwasów tłuszczowych (Lam i in., 2005). Dodatkowo, badania na myszach CPT1c-KO karmionych dietą zwykłą (ang. *chow*) pokazują, że myszy CPT1c-KO wykazują obniżony pobór pokarmu i niższą masę ciała. Myszy te karmione dietą wysokotłuszczową, są bardziej podatne na otyłość, pomimo że nie wykazują zmian w poborze pokarmu, mają obniżony wydatek energetyczny. Może to wskazywać na istotną rolę CPT1 w regulacji wydatku energetycznego (Wolfgang i in., 2006).

Sygnały peryferyjne również modulują aktywność AMPK. Leptyna i grelina odpowiednio obniża i zwiększa aktywność kinazy AMP (Andrews i in., 2008). Grelina indukuje wzrost wyładowań neuronów AgRP/NPY poprzez receptor GHSR, który z kolei aktywuje kinazę AMP, powodując supresję karboksylazy acetylo-CoA (ACC) i eliminację hamującego efektu malonylo-CoA na aktywność CPT1. Aktywacja CPT1 zwiększa wejście długich kwasów tłuszczowych do macierzy mitochondrialnej, które następnie zostają utleniane w procesie β -oksydacji (Andrews i in., 2008). Również mitochondrialne białko rozprzegające UCP2 (ang. *uncoupling protein 2*) obecne na zakończeniach aksonów w komórkach zaangażowanych w homeostazę energetyczną, wpływa na efektywność procesów metabolicznych, autonomicznych i endokrynnych zachodzących w komórkach podwzgórza. UCP2 jest zaangażowane w lokalną produkcję ciepła, wpływając tym samym na wydatek energetyczny, a także wzmacnia neurotransmisję i przebudowę synaptyczną (Andrews i in., 2005; Horvath, Warden, i in., 1999). Neurony c-Fos-pozytywne po manipulacjach takich jak głodówka lub ekspozycja na zimno, wykazują masywne unerwienie przez zakończenia aksonów zawierające UCP2 (Horvath, Warden, i in., 1999). Wzmocniona aktywność UCP2 w mitochondriach zlokalizowanych na zakończeniach aksonów neuronów wykorzystuje gradient protonowy do produkcji ciepła, przez co powoduje czasowe obniżenie poziomu ATP i stanowi sygnał do proliferacji mitochondriów, co ostatecznie prowadzi do zwiększonej lokalnej produkcji ATP. UCP2 wykazuje również działanie neuroprotektoryjne, bowiem obniża powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i wspomaga wypływ jonów Ca^{2+} . Mitochondria stanowią ważny bufor dla wtórnego przekaźnika jakim są jony Ca^{2+} , które pełnią istotną funkcję w transporcie pęcherzyków, fuzji, uwalnianiu i recyklingu, stąd regulacja presynaptycznego stężenia wapnia przez UCP2 będzie bezpośrednio wpływać na neurotransmisję. Zdolność UCP2 do regulowania potencjału błony mitochondrialnej leży zatem u podstaw zdolności do regulowania neuronalnej homeostazy wapnia (Andrews i in., 2005). UCP2 jest zaangażowany w plastyczność synaptyczną w systemie malanokortynowym, a szczególnie w zmianach komórkowych zachodzących w neuronach AgRP/NPY w odpowiedzi na grelinę i/lub deprywację pokarmową. Poziom greliny oraz kwasów tłuszczowych w obiegu wzrasta podczas głodówki (w stanie

negatywnego bilansu energetycznego) (Andrews i in., 2008) oraz indukując zmiany plastyczne w systemie melanokortynowym (Diano i in., 2006). Pokazano, że krótkotrwała deprywacja pokarmowa indukuje zmiany plastyczne w neuronach podwzgórza, promuje powstanie nowych synaps pobudzających i prądów synaptycznych na neuronach hypokretynowych (oreksynowych) w LH. Zmiany te ulegają cofnięciu po podaniu pokarmu lub leptyny (Horvath i Gao, 2005). Grelina silnie indukuje zmiany plastyczne nie tylko w podwzgórzu, ale również w innych rejonach mózgu, w tym w hipokampie, gdzie wywiera silny efekt na powstanie nowych synaps, powstanie i propagację LTP, wzmacnia proces uczenia się, konsolidację pamięci oraz reguluje zależny od hipokampa behavior (Abizaid i in., 2006; Diano i in., 2006).



Rycina 1.8 Czynniki molekularne i biochemiczne zaangażowane w aktywność neuronów AgRP/NPY i plastyczność synaptyczną. Aktywacja neuronów AgRP/ NPY w ARC jest odpowiedzialna za pobór pokarmu. Negatywny bilans energetyczny (np. w stanie głodu) prowadzi do wzrostu poziomu greliny w obiegu, która przez receptory GHSR na neuronach AgRP/NPY indukuje łaknienie. Sygnalizacja grelinowa prowadzi do fosforylacji AMPK, która fosforyluje ACC obniżając jej enzymatyczną aktywność. Skutkuje to spadkiem malonylo-CoA, co prowadzi do uwolnienia CPT1 i transportu kwasów tłuszczowych do macierzy mitochondrialnej. Utlenianie kwasów tłuszczowych powoduje syntezę ATP i ROS. Energia z ATP

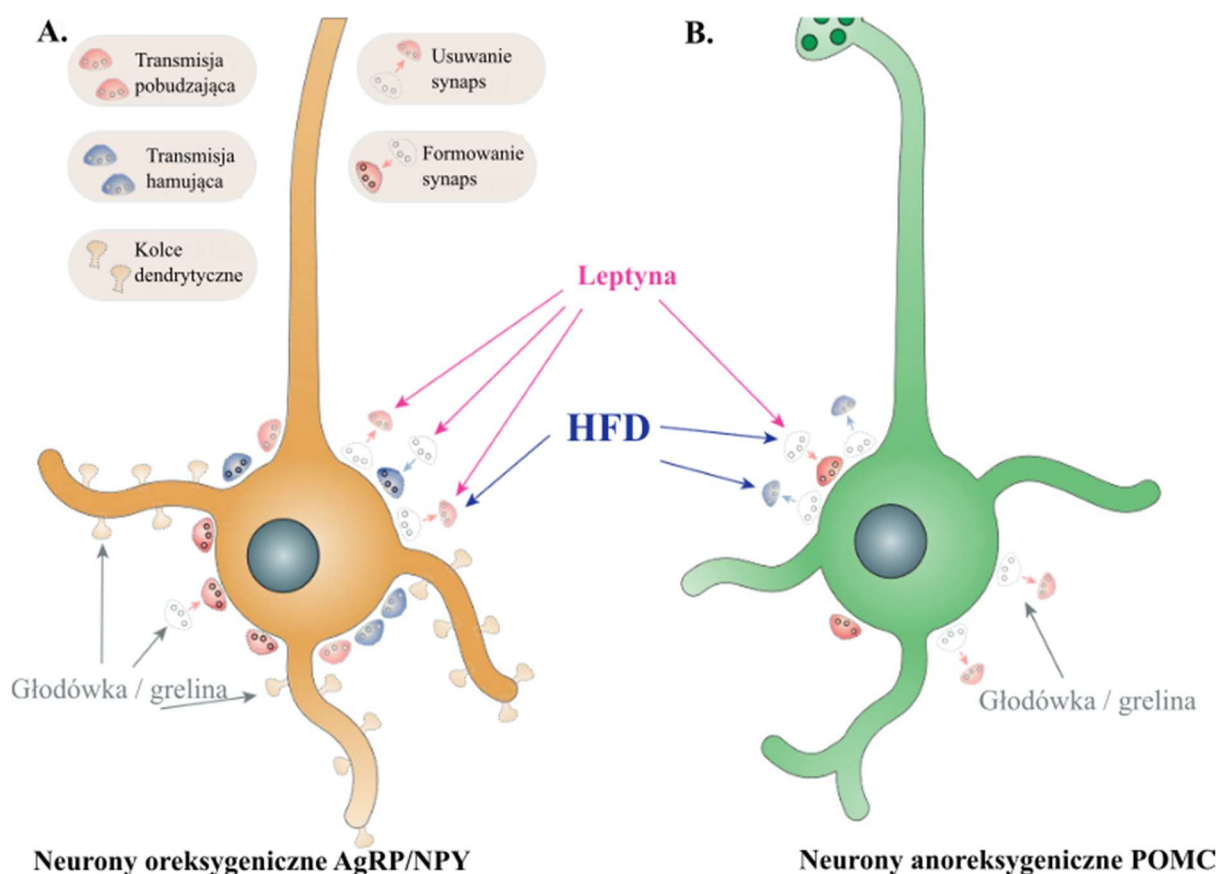
wykorzystywana jest na pokrycie zapotrzebowania energetycznego neuronów na podtrzymanie ich aktywność podczas negatywnego statusu energetycznego. ROS zwiększa aktywność UCP2, które na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego redukuje poziom ROS w komórce. Pętla ta umożliwia właściwą i ciągłą aktywację neuronów AgRP/NPY w okresach niedoboru pożywienia. Podczas głodówki aktywność neuronów AgRP/NPY wpływa na zmiany w ekspresji czynników odpowiedzialnych za zmiany pobudliwości i plastyczności synaptycznej w neuronach ARC. Skróty: ACC (ang. *acetyl-CoA carboxylase*); AMPK (ang. *AMP kinase*); CART (ang. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*); CoA (ang. *co-enzyme A*); GHSR (ang. *growth hormone secretagog receptor*); CPT1 (ang. *carnitine-dependent acyltransferase 1*); MC4R (ang. *melanocortin receptor 4*); NPY (ang. *neuropeptide Y*); ROS (ang. *reactive oxygen species*); Sirt1 (ang. *sirtuin 1*); UCP2 (ang. *uncoupling protein 2*) (na podstawie Dietrich i Horvath, 2013).

Badania pobudzającej transmisji glutamatergicznej w neuronach ARC AgRP oraz POMC z użyciem transgenicznym modeli, gdzie usunięto *Grin1*, gen kodujący podjednostkę NR1 receptora NMDA pokazują, że plastyczność kontrolowana poprzez receptory NMDA, odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności neuronów AgRP/NPY, lecz nie wpływa na neurony POMC. Myszy pozbawione tego receptora na neuronach AgRP/NPY wykazują redukcję masy ciała, obniżenie ilości tkanki tłuszczowej, zmniejszenie konsumpcji pokarmu oraz zmniejszenie poboru pokarmu podczas dokarmienia po okresowej głodówce (ang. *refeeding*). Pokazano, że usunięcie receptorów NMDA w neuronach AgRP/NPY, które są bogate w kolce dendrytyczne, powoduje redukcję liczby kolców o ~50% i zmianę ich morfologii. Neurony POMC natomiast, są praktycznie pozbawione kolców dendrytycznych. 24-godzinna głodówka zwiększa liczbę kolców dendrytycznych na neuronach AgRP/NPY o 67%, lecz u zwierząt z usuniętym receptorem NMDA w neuronach AgRP tego wzrostu nie zaobserwowano. Odkrycie to, sugeruje, że proces tworzenia kolców dendrytycznych, wymaga obecności receptorów NMDA i odgrywa ważną rolę w aktywacji neuronów AgRP/NPY podczas głodówki. Sprawdzono również efekt głodówki na parametry elektrofizjologiczne neuronów AgRP/NPY w celu określenia czy wzrost liczby kolców dendrytycznych przekłada się na zwiększenie transmisji synaptycznej i pobudliwość neuronalną (właściwości zależne od receptorów NMDA). Pokazano, że głodówka podwaja częstotliwość spontanicznych i miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (sEPSCs, ang. *spontaneous excitatory postsynaptic currents*; mEPSCs, ang. *miniature EPSCs*) izolowanych z receptorów AMPA, bez wpływu na amplitudę (T. Liu i in., 2012) oraz depolaryzuje i zwiększa pobudliwość neuronów AgRP/NPY. Aktywacja neuronów AgRP/NPY podczas głodu jest więc związana ze zwiększoną częstotliwością postsynaptycznych prądów pobudzających. Aktywowane głodówką mEPSC jest zależne od presynaptycznego uwalniania wapnia ze źródeł wewnętrznych za pośrednictwem rianodyny, a nie z kanałów wapniowych bramkowanych napięciem (Y. Yang i in., 2011). Głodówka zwiększa także ilość transkryptów mRNA genów kodujących *Agrp* i *Npy* i zmniejsza ekspresję genu *Pomc*. Jednakże u zwierząt z usuniętym

receptorem NMDA w neuronach AgRP/NPY wzrost transkryptów AgRP i NPY po głodówce jest istotnie obniżony, a u myszy bez receptorów NMDA w neuronach POMC tego efektu nie stwierdzono. Reasumując, aktywacja neuronów AgRP/NPY poprzez głodówkę (ale nie zahamowanie neuronów POMC aktywowane głodówką), jest zależne od obecności receptorów NMDA (T. Liu i in., 2012). Ponadto stwierdzono, że głodówka indukuje wzrost poziomu białka c-Fos w neuronach AgRP/NPY, lecz u zwierząt pozbawionych NMDA jest on również istotnie mniejszy. Dokarmienie zwierząt po okresie głodówki powoduje powrót do parametrów wyjściowych po upływie 3 dni (T. Liu i in., 2012). Podobne zmiany synaptyczne obserwowane podczas głodówki indukuje grelina. Zwiększona częstotliwość mEPSC jest w tym przypadku zależna od sygnalizacji AMPK doprowadzając do uwolnienia glutaminianu. W badaniach *in vitro* pokazano, że grelina aktywuje AMPK za pośrednictwem zależnej od wapnia/kalmoduliny kinazy białkowej (CaMK) co wpływa na utrzymującą się godzinami plastyczność synaptyczną (Y. Yang i in., 2011). Zwiększona transmisja synaptyczna jest wyciszana przez leptynę poprzez mechanizm zależny od opioidów. Opioidy pochodzące z POMC (prawdopodobne β -endorfina), odwracają zależny od AMPK wzmożony wpływ transmisji pobudzającej na neurony AgRP/NPY. Mechanizm presynaptycznej aktywacji neuronów AgRP/NPY poprzez głodówkę/grelinę zależny od AMPK jest kluczowy w indukcji zmian adaptacyjnych podczas negatywnego bilansu energetycznego (Y. Yang i in., 2011).

Zmiany plastyczne w neuronach podwzgórza mogą być również indukowane w odpowiedzi na pozytywny bilans energetyczny. U zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową HFD (ang. *high-fat diet*), zauważono wzmożone przyjmowanie pokarmu i przejadanie się przez pierwszy tydzień po wprowadzeniu karmy HFD w porównaniu do myszy karmionych standardową dietą chow. Następnie zwierzęta HFD ustanawiały sobie ilość pokarmu, która odpowiadała ilości przyjętych kalorii przez grupę kontrolną (Horvath i in., 2010). Pomimo, że w obu grupach kaloryczność pokarmu była podobna, zwierzęta HFD rozwinęły otyłość spowodowaną akumulacją tłuszczu zawartego w pożywieniu (DIO, ang. *diet induced obese*). Jednakże, wśród zwierząt można wyróżnić pewną populację osobników, które otyłości nie rozwijają lub rozwijają ją w niewielkim stopniu bez względu na dietę. Zwierzęta te określane są jako odporne na dietę (DR, ang. *dietary resistant*). Obie grupy zwierząt wykazują różnice w organizacji synaptycznej neuronów POMC. Przyjmuje się, że wzmożony napływ prądów hamujących na ciała komórek neuronów POMC jest czynnikiem predykcyjnym w podatności na otyłość indukowaną dietą. Badania nad długofalowym spożyciem HFD (powyżej 3 miesięcy) ujawniły zmiany w przebudowie synaptycznej zarówno neuronów POMC jak i AgRP/NPY. Ekspozycja na HFD powoduje wzrost liczby synaps na neuronach

POMC, zarówno u zwierząt DR i DIO oraz prowadzi do spadku napływu prądów synaptycznych docierających do ciał komórek neuronów POMC. Jednocześnie zaobserwowano wzrost wypustek astrocytarnych otaczających neurony POMC (Horvath i in., 2010). Spadek napływu prądów synaptycznych prawdopodobnie jest wynikiem obniżenia przekąźnictwa hamującego w neuronach POMC, a nie zmian w transmisji pobudzającej. Sąsiadujące neurony AgRP/NPY myszy karmionych dietą wysokotłuszczową wykazują obniżone przekąźnictwo pobudzające bez zmian w transmisji hamującej. Efektem żywienia wysokotłuszczowego są zmiany ustawienia wartości układu melanokortyny w ARC w stronę aktywacji neuronów POMC, przy jednoczesnym zmniejszeniu pobudliwości neuronów AgRP/NPY (Horvath i in., 2010).



Rycina 1.9 Zmiany synaptyczne zachodzące w systemie melanokortynowym w ARC w odpowiedzi na bodźce hormonalne i metaboliczne. **(A)** Wzrost aktywności neuronów oreksygeniczných AgRP/NPY w stanie negatywnego bilansu energetycznego uwalniającemu grelinę powoduje formowanie synaps pobudzających na neuronach AgRP/NPY, a jednocześnie obniża liczbę synaps pobudzających na neuronach POMC. Jednocześnie głód/grelina powoduje wzrost liczby kolców dendrytycznych na neuronach AgRP/NPY poprzez mechanizm zależny od receptorów NMDA (T. Liu i in., 2012); **(B)** Aktywacja neuronów POMC w stanie pozytywnego bilansu energetycznego lub w wyniku przyjmowania diety wysokotłuszczowej (HFD) i wzrostu stężenia leptyny i insuliny w obiegu powoduje obniżenie transmisji pobudzającej na neuronach AgRP/NPY oraz transmisji hamującej na neuronach POMC. Dieta wysokotłuszczowa dodatkowo sprzyja powstawaniu synaps pobudzających na ciałach komórek neuronów POMC. Leptyna wykazuje podobne działanie do HFD to znaczy wzmacnia transmisję pobudzającą na neuronach POMC, a także wzmacnia transmisję hamującą na neuronach AgRP/NPY (na podstawie Dietrich i Horvath, 2013).

1.6 Geny wczesnej odpowiedzi komórkowej

Docierające ze środowiska informacje sensoryczne w sposób ciągły przyczyniają się do rozwoju układu nerwowego na poziomie synaptycznym i poszczególnych obwodów neuronalnych. Odpowiedź neuronalna na bodziec może być zakwalifikowana jako wczesna i późna (Citri i Malenka, 2008). Wczesna odpowiedź występuje natychmiast po zadziałaniu bodźca i trwa od milisekund do minut. Wymaga ona interakcji pomiędzy czynnikiem (bodźcem) a powierzchnią komórki, co aktywuje wtórny system przekazywania, aktywujący kinazy i/lub fosfatazy białkowe, których zadaniem jest fosforylacja i/lub defosforylacja odpowiednich białek niezbędnych do wyegzekwowania stosownej odpowiedzi neuronalnej. Późna odpowiedź generowana jest w przedziale czasowym od kilku godzin do wielu dni od zadziałania bodźca, a może mieć również charakter stały. Istotną cechą późnej odpowiedzi jest zmiana ekspresji genów, co leży u podstaw wielu procesów w tym uczenia się, formowania engramów pamięciowych, tolerancji na leki czy sensytyzacji (Hughes i Dragunow, 1995). W efekcie sensorycznej aktywacji neuronalnej, dochodzi do uwolnienia neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych, depolaryzacji błony postsynaptycznej i wzroście stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, co stanowi potężny sygnał aktywujący program ekspresji genów w jądrze komórkowym (West i Greenberg, 2011). Ekspresja genów efektorowych może być zwiększona (ang. *upregulation*) lub obniżona (ang. *downregulation*), przy czym istnieją geny indukowane natychmiast, określane jako geny wczesnej odpowiedzi komórkowej (IEG, ang. *immediate early genes*) oraz geny z opóźnioną ekspresją (Pérez-Cadahía i in., 2011). Geny wczesnej odpowiedzi stanowią klasę genów, które ulegają nagłej i tymczasowej indukcji w odpowiedzi na szereg różnych czynników. Indukcja zachodzi w przeciągu minut i nie wymaga syntezy białka *de novo*. Jedną z cech charakterystycznych IEG jest więc to, że ich ekspresja nie może być zahamowana za pomocą inhibitorów syntezy białka. Okres półtrwania mRNA tych IEG jest również bardzo krótki (w przypadku genu *c-fos* to ok. 10-15 minut) (Sheng i Greenberg, 1990). Regulowana ekspresja IEG wydaje się spełniać kluczową rolę dla komórki, ponieważ produkty IEG regulują aktywność genów docelowych. Mutacja niektórych IEG, podobnie jak ich wirusowych krewnych, może natomiast powodować transformację komórkową (Lanahan i Worley, 1998). IEG są zaangażowane w przekształcenie krótkotrwałych bodźców na długoterminowe zmiany w fenotypie komórkowym poprzez regulację ekspresji genów (Lerea, 1997). IEG zazwyczaj funkcjonują jako część sieci białek ulegających konstytutywnej ekspresji. Stanowią część hierarchicznego programu regulującego długoterminowe odpowiedzi komórkowe (Lanahan i Worley, 1998). IEG kodują szeroką gamę

funkcjonalnie różnych produktów, do których można zaliczyć białka sekrecyjne (np. cytokiny i chemoatraktanty), enzymy cytoplazmatyczne (fosfataza 3CH134/MKP-1/Erp i cyklooksygenaza COX-2), zależne od ligandu czynniki transkrypcyjne (NGFIB/Nur77/N10, Zif268, Egr3) oraz indukowalne czynniki transkrypcyjne (Jun, Fos, Myc, NGFI-C, SRF). Sklonowano bibliotekę genów szybkiej odpowiedzi neuronalnej, składającą się z ponad 500 genów, w tym niektórych już scharakteryzowanych IEG i genów kodujących indukowalne czynniki transkrypcyjne (Nedivi i in., 1993). Czynniki transkrypcyjne stanowią białka, które regulują ekspresję genów poprzez wiązanie ze specyficzną sekwencją regulatorową (X. He i Rosenfeld, 1991).

Bodźce zewnątrzkomórkowe wywołują natychmiastową transkrypcję szeregu IEG takich jak *c-fos*, *Egr1/Zif268*, *Arc/Arg3.1* i *Homer1a* (Herdegen i Leah, 1998). Spośród wielu znanych i dobrze scharakteryzowanych IEG, *c-fos* odgrywa szczególną rolę w badaniach związanych z neuroplastycznością (opisaną dokładniej w następnym rozdziale). *Egr1* jest podobny do genu *c-fos* jako czynnik transkrypcyjny, jednakże jego podstawowy poziom ekspresji jest znacząco wyższy (Veyrac i in., 2014). *Arc* (ang. *activity regulated cytoskeletal-associated protein*) natomiast nie jest czynnikiem transkrypcyjnym. Jego mRNA transportowane jest do dendrytów, gdzie dochodzi do lokalnej syntezy białka i jego umiejscowienia w zagęszczeniu postsynaptycznych (PSD, ang. *postsynaptic density*), gdzie aktywnie uczestniczy w plastyczności synaptycznej („efektorowe” IEG) (Shepherd i Bear, 2011). Ekspresja genu *Arc* jest ponadto ograniczona do rejonów telencefalicznych i nie jest obecna w neuronach neurosekrecyjnych podwzgórza w warunkach podstawowych, ani w odpowiedzi na bodźce stresowe (Ons i in., 2004). *Homer1a* wykazuje podobieństwo do *Arc* w lokalizacji i funkcji, natomiast wykazuje wolniejszą ekspresję w porównaniu do *Arc* (Vazdarjanova i in., 2002).

1.7 Rola genu *c-fos* w plastyczności neuronalnej

Gen *c-fos* jest indukowalnym genem wczesnej odpowiedzi komórkowej, kodującym jądrowe białko protoonkogennego czynnika transkrypcyjnego lub trzeciego przekaźnika zaangażowanego w sprzęganie sygnałów zewnątrzkomórkowych i pośrednictwo w długoterminowych zmianach fenotypu komórki (Kaczmarek, 1993, 1994; Kovács, 1998; Sagar i in., 1987; Van Beveren i in., 1983). Stanowi on bezpośredni łącznik pomiędzy pobudzeniem neuronalnym a zmianą ekspresji genów docelowych w procesach zarówno fizjologicznych, jak plastyczność neuronalna, jak i patologicznych np. w przebiegu padaczki, czy innych chorobach neurodegeneracyjnych (Herrera i Robertson, 1996; Lu i in., 1998;

Morgan i Curran, 1991). Protoonkogen *c-fos* został po raz pierwszy opisany jako gen odpowiedzialny za wywoływanie nowotworu kości przez mysi wirus mięsaka Finkela-Biskisa-Jenkinsa (Curran i in., 1982). Gen *c-fos* jest więc komórkowym homologiem (*c-fos*, ang. *cellular*) wirusowego genu osteosarkomy (*v-Fos*, ang. *viral*) (Distel i Spiegelman, 1990). Jest obecny w różnych organizmach m.in. człowieka, szczura czy myszy, gdzie jest zaangażowany w wielu procesach, w tym proliferacji, różnicowaniu, przeżywalności, apoptozie, kontroli cyklu komórkowego, regulacji wzrostu, osteoklastogenezy, hematopoezy, aktywacji i pobudliwości neuronalnej, a także podczas uszkodzeń i procesów naprawczych, natomiast rozregulowanie jego ekspresji może prowadzić do transformacji nowotworowej (Brown i in., 1998; Kaczmarek i Kamińska, 1989; Preston i in., 1996; Raivich i Behrens, 2006; Velazquez i in., 2015; J. Zhang i in., 2002). Myszy pozbawione genu *c-fos* wykazują obniżoną przeżywalność (~40%), a u osobników, które przeżywają dochodzi do licznych zaburzeń rozwojowych, w tym opóźnienia wzrostu, ciężkiej osteopetrozy, opóźnionej gametogenezy lub jej braku oraz zmienionej hematopoezy. Ponadto zwierzęta mają obniżoną masę ciała o ~40-60% oraz mniejsze mózgi. Zmiany obserwowalne są również w zachowaniu zwierząt i dotyczą zaburzeń uczenia się, hiperaktywności czy nieprawidłowych zachowań seksualnych (Velazquez i in., 2015). Gen *c-fos* ma w przybliżeniu ok. 4 kb długości i jest zorganizowany w 4 egzonach kodujących unikalne mRNA przekładające się na białko o wielkości 55 kDa. Białko c-Fos funkcjonuje jako czynnik o działaniu transaktywacyjnym bądź transrepresyjnym. c-Fos należy do rodziny białek Fos, która zawierają jeszcze kilku innych członków: FosB, ΔFosB, Fra1 i Fra2 (ang. *Fos related antigen*) (Van Beveren i in., 1983). Białka z rodziny Fos dzięki domenie suwaka leucynowego tworzą heterodimer z białkami z rodziny Jun, do których należy cJun, JunB, JunD, tworząc czynnik transkrypcyjny AP-1 (aktywator białkowy-1, ang. *activator protein-1*) (Hughes i Dragunow, 1995). AP-1 może zawierać różne warianty białek z wymienionych rodzin, np. JunB/c-Fos. AP-1 może tworzyć homodimer z białkami z rodziny Jun, natomiast białka z rodziny Fos nie tworzą ze sobą dimerów i dimeryzują jedynie z białkami z rodziny Jun. AP-1, w zależności od składu, może indukować lub hamować ekspresję genu docelowego, np. c-Fos/c-Jun wywierają stymulujący efekt na ekspresję genu docelowego, podczas gdy kompleks c-Fos/JunB wykazuje działanie hamujące. Kompleksy c-Fos/JunD i FosB/JunD mają natomiast najwyższą aktywność transaktywacyjną i wiążącą DNA *in vitro*. Budowa kompleksu AP-1 wpływa na fenotyp komórki i zmiany programu genetycznego, gdzie może dojść albo do pobudzenia, albo do osłabienia transmisji neuronalnej (Sheng i Greenberg, 1990). Kompleksy AP-1 typu Jun/Fos wiążą się głównie do swoistej sekwencji TGA(C/G)TCA, nazywaną miejscem wiązania AP-1 lub TRE (element odpowiedzi 12-

Otetradekanoiloforbolu 13-octan [TPA]), w wielu promotorach genów i enhancerach, by regulować transkrypcję genów. Na wiązanie mają wpływ sekwencje flankujące TRE i może być regulowane przez specyficzne tkankowo elementy represyjne (Kovács, 1998; Moratalla i in., 1996; Morgan i Curran, 1991; Rylski, 2004). Członkowie rodzin Fos i Jun są dodatkowo modyfikowani posttranskrypcyjnie przez fosforylację poprzez kinazę regulującą Fos (ang. *Fos-regulatory kinase*) oraz N-kończową kinazę c-Jun (JNK, ang. *c-Jun N-terminal kinase*) zwaną również kinazą białkową aktywowaną stresem (SAPK, ang. *stress-activated protein kinase*), co wpływa na ich zdolność wiązania DNA (X. Xu i in., 1997). Oprócz fosforylacji c-Fos ulega innym modyfikacjom posttranskrypcyjnym w tym acetylacji, glikozylacji, (poli)ADP-rybozylacji i ubikwitynacji (Cruz-Mendoza i in., 2022; Lara Aparicio i in., 2022; Müller i in., 1987; Reason i in., 1992).

Powszechnie przyjmuje się, że indukcja genu *c-fos* odzwierciedla aktywność funkcjonalną neuronów, a czynnik transkrypcyjny AP-1 jest zaangażowany w regulację ekspresji genów docelowych (Kovács, 2008). Stwierdzono, że zaburzenia w ekspresji *c-fos* powoduje rozregulowanie licznych genów związanych z plastycznością, w tym postsynaptycznych białek rusztowania, składników kanałów jonowych, receptorów i cząsteczek sygnalizacyjnych (Jaworski i in., 2018). Gen *c-fos* wykazuje kilka specyficznych cech, które czynią go dogodnym narzędziem do badań nad plastycznością neuronalną. Po pierwsze wykazuje **niski, stały poziom podstawowej ekspresji**. Jednakże, w niektórych strukturach mózgu c-Fos wykazuje podwyższoną podstawową aktywność, np. w niektórych jądrach ciała migdałowatego, jądrze nadskrzyżowaniowym (ang. *suprachiasmatic nucleus*) czy rejonie środkowym wzgórza (Duncan i in., 1996; Hoffman i Murphy, 2000). Drugą ważną cechą jest **indukcyjność** w odpowiedzi na stymulację różnymi czynnikami. Ostre bodźce stresowe, takie jak unieruchomienie czy drgawki indukują ekspresję genu *c-fos* w różnych rejonach mózgu (Kovács, 1998; Morgan i Curran, 1991). Kinetyka odpowiedzi c-Fos–zależnej na ostry bodziec jest tymczasowa, przy czym transkrypt mRNA pojawia się już po 15 minutach z maksymalnym poziomem po 30 minutach, a produkt białkowy po upływie 90-120 minut od zadziałania bodźca (Chaudhuri i in., 2000; Kaczmarek i in., 1988). Warto dodać, że istnieją przykłady długotrwałej aktywacji plastyczności neuronalnej (powyżej kilku godzin), powiązanej z wzmożoną ekspresją genu *c-fos* i innych komponentów czynnika transkrypcyjnego AP1, np. podczas wywoływania drgawek rozniecanych (kindling) (Dragunow i Robertson, 1987). Aktywność neuronalna zainicjowana kwasem glutaminowym, powoduje szybką i tymczasową ekspresję genu *c-fos* (Kaczmarek i in., 1988; Szekely i in., 1987). Badania *in vivo* pokazują, że zwiększona aktywacja neuronalna, np. podczas

wywoływania drgawek (LTP), stymulacji sensorycznej lub podczas treningu behawioralnego, powoduje wzrost ekspresji genu *c-fos* w mózgu (Kaczmarek, 2000). Tak więc, uczenie się i LTP – zjawisko powiązane z tworzeniem engramu pamięciowego, indukują ekspresję genu *c-fos* (Nikolaev i in., 1991; Tonegawa i in., 2015). Co ważne, wzrost ekspresji *c-fos* następuje w trakcie nabywania nowych umiejętności, ale nie kiedy zwierzę wykonuje już wyuczone zadanie, lub gdy podczas wykonywania znanych czynności pojawia się element nowości (ang. *novelty*). Białko c-Fos syntetyzowane jest w neuronach tylko, gdy dany neuron jest stymulowany w warunkach podatnych na plastyczność synaptyczną (Bertaina-Anglade i in., 2000; Nikolaev i in., 1992). Za przykład może posłużyć eksperyment behawioralny, w którym pokazano, że mysz, która miała nauczyć się rozróżniania dźwięków o różnych częstotliwościach, nie potrafiła wykonać zadania, gdy zablokowano syntezę białka c-Fos w badanych strukturach mózgu przy użyciu siRNA (de Hoz i in., 2018).

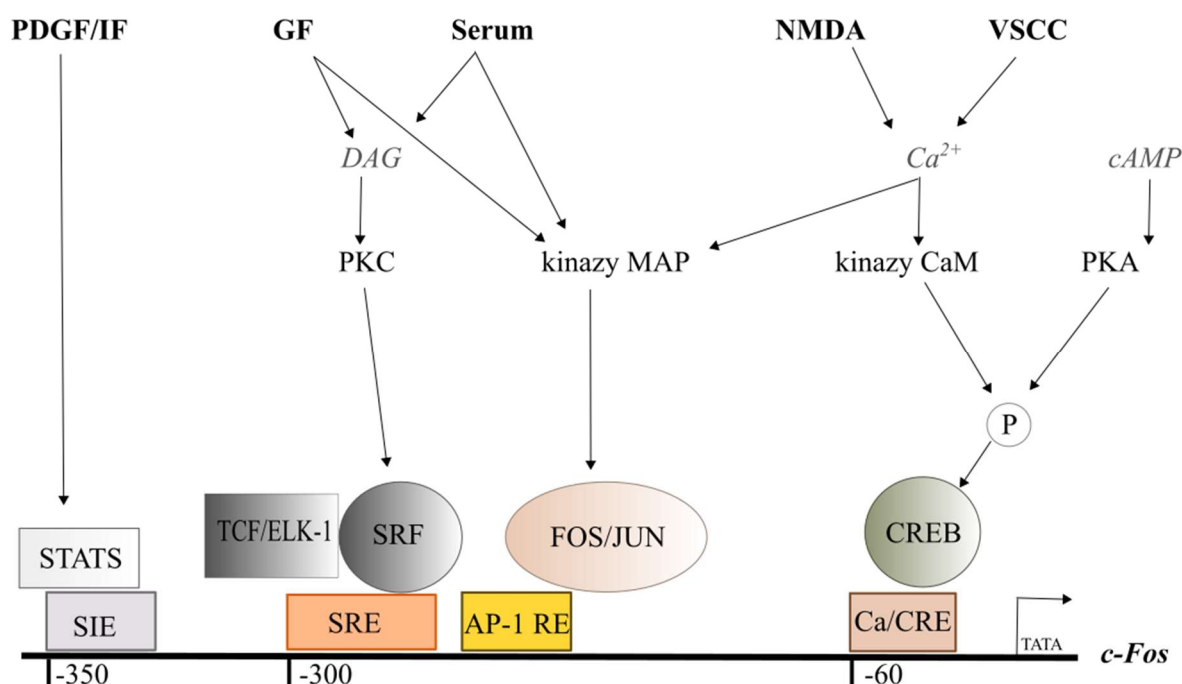
Gen *c-fos* jest więc indukowalnym genem wczesnej odpowiedzi komórkowej, kodującym czynnik transkrypcyjny lub trzeci przekaźnik – zaangażowany w sprzężanie transkrypcji genów pod wpływem danego bodźca i pośrednictwo sygnałów zewnątrzkomórkowych w długoterminowych zmianach w fenotypie komórkowym (Kaczmarek, 1993, 1994; Kovács, 1998; Sagar i in., 1987; Van Beveren i in., 1983). Wpływ na fenotyp komórki polega na zmianie programu genetycznego komórki poprzez zmianę ekspresji genów w odpowiedzi na zadany bodziec. Celem tej aktywacji jest zmiana siły połączeń pomiędzy neuronami, które może mieć działanie dwukierunkowe. Połączenie może ulec wzmocnieniu bądź osłabieniu (Citri i Malenka, 2008). Za zmianę siły połączeń, rearanżację sieci neuronalnej mają wpływ różne geny, m.in. enzymy macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak MMP9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*), które umożliwiają modyfikację strukturalną danego obwodu, poprzez cięcie białek stabilizujących synapsę, dzięki czemu dochodzi do zmiany morfologii kolców dendrytycznych i wprowadzenie dodatkowych receptorów na powierzchnię błony, co wzmacnia przewodnictwo synaptyczne (Konopacki i in., 2007; Konopka i in., 2011; Michaluk i Kaczmarek, 2007). MMP9 jest aktywowana przez czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain derived neurotrophic factor*) w sposób zależny od genu *c-fos* (Kuzniewska i in., 2013). *c-fos* jest zatem dogodnym markerem neuroplastyczności, który jest uważany za jeden z najbardziej użytecznych funkcjonalnych narzędzi do mapowania anatomicznego poszczególnych neuronów i obwodów neuronalnych aktywowanych w odpowiedzi na szeroką gamę bodźców zewnętrznych (Greenberg i Ziff, 1984).

1.7.1 Aktywacja genu *c-fos*

Transkrypcja genu *c-fos* jest indukowana m. in. poprzez depolaryzację błony, czynniki neurotroficzne, neuroprzekaźniki oraz w odpowiedzi na napływ i wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórce (Curran i Morgan, 1995; Karin i in., 1997; Sheng i Greenberg, 1990). Napływ zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} indukujący ekspresję genu *c-fos* jest wynikiem aktywacji receptorów NMDA, AMPA i receptorów metabotropowych dla glutaminianu, jak również aktywacji bramkowanych napięciem kanałów Ca^{2+} typu L i niespecyficznych kanałów jonowych typu TRP (ang. *transient receptor potential channels*), przepuszczalnych dla jonów Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} (Chung, 2015; Lerea, 1997; Rajadhyaksha i in., 1999; Rubil i in., 2016; Vaccarino i in., 1992; L. Yang i in., 2004). Udział poszczególnych receptorów w indukcji transkrypcji *c-fos* badano poprzez podawanie swoistych agonistów i/lub antagonistów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. I tak, ekspresja genu *c-fos* zależna od receptorów dla pobudzającego neuroprzekaźnika glutaminianu – receptorów NMDA jest całkowicie blokowana poprzez podanie ich antagonistów APV (kwasu amino-5-fosfonowalerianowego), CPP i PCP. Równocześnie zauważono, że zahamowaniu ulega ekspresja genów wchodzących w skład AP-1 *c-jun*, *junB* czy *zif268* (Szekely i in., 1987). Dodatkowo, w badaniach *in vitro* pokazano, że podanie antagonisty pozostałych receptorów dla glutaminianu nie-NMDA – CNQX, nie wpływa znacząco na ekspresję genów *c-fos* i *c-Jun* (Bading i in., 1995). Badania *in vivo* z kolei pokazują, że podanie szczurom agonisty receptorów dla glutaminianu – kainianu, powoduje masywne drgawki i neurodegenerację, którym towarzyszy wzrost ekspresji genu *c-fos* (Sonnenberg i in., 1989). W modelach doświadczalnych padaczek w tym modelu po podaniu pentetrazolu (PTZ, metrazol), będącego antagonistą receptorów GABA_A , dochodzi do wzrostu mRNA i białka c-Fos (Morgan i Curran, 1991). Również stymulacja receptorów β -adrenergicznych (Barka i Gubits, 1986) oraz liczne zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne, np. cytokiny, czynniki wzrostu, ligandy dla receptorów sprzężonych z białkiem G i receptorowych kinaz tyrozynowych, uruchamiają transkrypcję genu *c-fos* (C. S. Hill i Treisman, 1995). Związki te aktywują współzależne ścieżki transdukcji sygnału (wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów) z udziałem kinaz: kinazy białkowej A (PKA), kinazy białkowej C (PKC), kinazy II zależnej od wapnia i kalmoduliny (CaMKII) czy kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (MAP) (Dalhäuser, 2022). Stymulacja komórek zewnątrzkomórkowymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi aktywuje kinazy, które w odpowiedzi na dany bodziec fosforylują czynniki transkrypcyjne, które następnie wiążą się z odpowiednimi miejscami regulatowymi w proksymalnym promotorze genu *c-fos* i wpływają na jego

ekspresję. Region regulatorowy genu *c-fos* zawiera kilka ważnych elementów: Ca^{2+} /CRE, SRE, SIE i AP1, które modulują jego ekspresję w odpowiedzi na różne bodźce (Rycina 1.10) (Ghosh i in., 1994). Wzrost cAMP w neuronach indukuje ekspresję genu *c-fos* przez miejsce CRE (ang. *Ca²⁺ response element*) w pozycji -60 promotora. Aktywacja transkrypcji jest zainicjowana fosforylacją czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cAMP response element binding protein*) przez kinazę PKA. Kinaza CaMK I i II również fosforyluje czynnik CREB (Ser133) w ten sposób przekazuje sygnał zmian w wewnątrzkomórkowym poziomie Ca^{2+} przez to samo miejsce na promotorze (Sheng i in., 1991; Sheng i Greenberg, 1990). Gen *c-fos* posiada dwa odrębne miejsca wykrywające wapń pochodzący z różnych źródeł. Napływ wapnia przez kanały wapniowe typu L lub zależne od napięcia kanały wapniowe VSCC indukuje fosforylację czynnika CREB przez kinazę CaM i jego ekspresję przez miejsce CRE, natomiast Ca^{2+} pochodzący z napływu przez receptory NMDA aktywuje transdukcję sygnału przez kaskadę kinaz MAP i reguluje ekspresję przez miejsce SRE. CRE i SRE mogą reagować na rozdzielone przestrzennie źródła wapnia: wzrost stężenia wapnia w jądrze reguluje ekspresję przez CRE, a cytoplazmatyczny wzrost stężenia wapnia aktywuje ekspresję przez SRE. Tak więc bodziec synaptyczny, który zwiększa pulę wapnia w cytozolu lub w jądrze, może regulować różne programy ekspresji genów (Ghosh i in., 1994; Ginty i Greenberg, 1993). CREB/CRE ponadto pośredniczy w odpowiedziach neurotrofin poprzez mechanizm zależny od CaMK. Surowica, czynniki wzrostu, UV, oksydanty i antyoksydanty, a także wiele innych czynników indukuje ekspresję genu *c-fos* przez miejsce SRE (ang. *serum response element*) zlokalizowane w pozycji -299 od startu transkrypcji. SRE wiąże czynnik SRF (ang. *serum response factor*) i kompleks TCF (ang. *ternary complex factor*) zawierający Elk1 lub SAP1 lub MLK 1/2, fosforylowane przez kaskadę kinaz Ras/MAPK (ERK1/2) lub kinazę PKC (C. S. Hill i Treisman, 1995; Janknecht, 1995). Kinazy białkowe reagujące na bodziec działają jako przekaźniki sygnału, które łączą stymulację komórek ze wzrostem transkrypcji genu *c-fos*. W szczególności kinazy białkowe aktywowane mitogenami (kinazy MAP) są aktywowane przez liczne cząsteczki sygnałowe. Kinaza MAP, ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated protein kinases*), JNK (ang. *c-Jun N-terminal protein kinase*), p38 stanowią grupę strukturalnie pokrewnych kinaz białkowych, które są częścią kaskady kinaz MAP, z których każda jest aktywowana przez różne sygnały, co wskazuje, że szeroki zakres bodźców jest zintegrowany ze szlakami sygnałowymi kinazy MAP. Białka STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) regulują ekspresję genu *c-fos* wiążąc się z elementem SIE (ang. *c-sis-inducible*) (Dalhäuser, 2022). Istnieje również miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego AP-1 w proksymalnym promotorze *c-fos* odpowiedzialny za autoregulację, czyli wzrost poziomu

produktu białkowego obniża ekspresję własnego genu na poziomie transkrypcji (Tsurumi i in., 1995).



Rycina 1.10 Główne miejsca regulatorowe flankujące gen *c-fos* w kierunku 5' od startu transkrypcji: element odpowiedzi na wapń-cAMP (Ca/CRE, ang. *calcium/cAMP response element*) w pozycji -60, miejsce wiązania AP-1 (ang. *AP-1 response element*), element odpowiedzi na surowicę (SRE, ang. *serum response element*) w pozycji -300, element indukowany sis (SIE, ang. *sis inducible element*) w pozycji -350. Białko CREB (ang. *cAMP - response element binding protein*), czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF, ang. *serum response factor*), trójskładniowy czynnik złożony (TCF/Elk-1, ang. *the ternary complex factor /Elk1*) stanowią cele różnych systemów transdukcji sygnałów takich jak kinaza białkowa A i C (PK, ang. *protein kinase*), kinazy zależne od wapnia i kalmoduliny (CaM, ang. *calcium/calmodulin dependent kinases*), kinazy aktywowane mitogenami (MAP, ang. *mitogen activated kinases*). Pozostałe skróty: płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*), interferony (IF), czynniki wzrostu (GF, ang. *growth factors*), napięciowzależne kanały wapniowe (VSCC, ang. *voltage-sensitive calcium channel*), STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) (na podstawie Cruz-Mendoza et al., 2022; Kovács, 1998).

1.8 Wybrane metody inżynierii genetycznej stosowane do badań funkcji genów i ich produktów białkowych

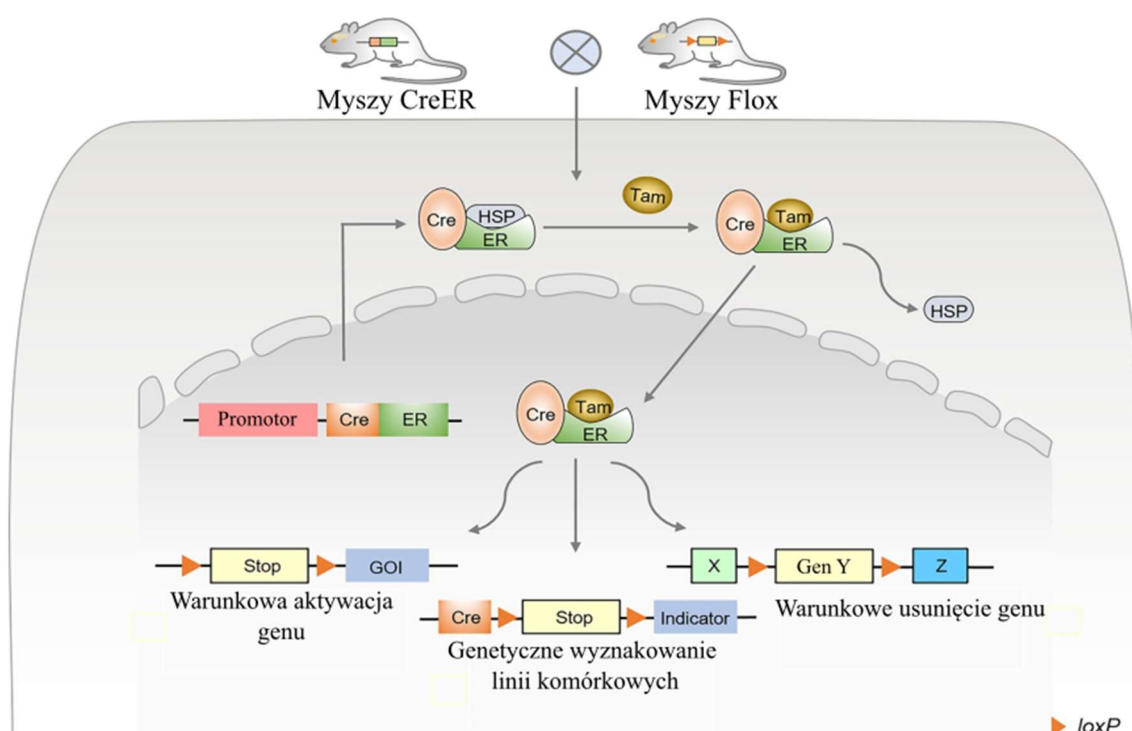
Nowoczesne metody inżynierii genetycznej umożliwiają określenie funkcji wybranych genów/białek w komórce. W niniejszej rozprawie wykorzystano szereg narzędzi z zakresu transgenezy i inżynierii genetycznej do selektywnej modyfikacji aktywności poszczególnych neuronów, ze szczególnym uwzględnieniem populacji neuronów obecnych w jądrze łukowatym podwzgórza. Pracę wykonano w oparciu o unikatowe modyfikacje genetyczne obecne w mysich liniach transgenicznym opisanych w rozdziale „Materiały i metody”, połączone z lokalną transgenezą z wykorzystaniem techniki CRISPR-Cas9 oraz wektorów

wirusowych jako nośników, umożliwiających dodatkowe manipulacje genetyczne w badanych strukturach.

1.8.1 System Cre-loxP

System Cre-loxP jest przykładem celowanej transgenezy, umożliwiającym tkankowo-specyficzną rekombinację genetyczną. System wymaga obecności dwóch komponentów, genu Cre dla rekombinazy cyklizacyjnej (ang. *cyclization recombinase*) z bakteriofaga P1, który koduje białko o masie 38 kDa odpowiedzialne za rekombinację wewnątrzcząsteczkową (wycięcie lub odwrócenie) lub międzycząsteczkową (integracyjną) fragmentu genu znajdującego się pomiędzy miejscami loxP, które stanowią drugi element systemu (Sauer, 1993). Miejsca loxP (ang. *locus of X-over P1*), rozpoznawane przez rekombinazę Cre, tworzą 34-nukleotydowe sekwencje, zbudowane z dwóch 13-nukleotydowych odwróconych powtórzeń oddzielonych przez 8-nukleotydowy asymetryczny region rdzeniowy. Jedna cząsteczka Cre wiąże się w miejscu odwróconego powtórzenia lub dwie cząsteczki Cre ustawiają się w jednym miejscu loxP. Rekombinacja następuje w 8-nukleotydowym asymetrycznym rejonie rdzeniowym, i to on odpowiada za kierunkowość miejsca loxP. Dwa miejsca loxP w odwrotnej orientacji odwracają oflankowany fragment genu, natomiast oba miejsca w tej samej orientacji powodują wycięcie fragmentu, pozostawiając jedno miejsce loxP. Cre-loxP jako dwuskładnikowy system wymaga obecności dwóch osobnych linii transgeniczných. Pierwsza, jest nośnikiem rekombinazy Cre (ang. *Cre-driver*) pod promotorem o znanym wzorcu czasowej i przestrzennej ekspresji. Druga linia, zwana reporterową, może być zaprojektowana np. w ten sposób, że ekspresja Cre-zależnego transgenu jest kierowana przez silny, powszechny promotor i zawiera kasetę STOP oflankowaną miejscami loxP o tej samej orientacji, zwanych jako floxed stop lub LSL (lox-stop-lox). Kasetę STOP stanowi krótka sekwencja zawierająca kilka kodonów stop, zapobiegających transkrypcji, a tym samym syntezie białka. Jeśli w danych komórkach jest obecne Cre, dochodzi do rekombinacji pomiędzy miejscami loxP i wycięcia kasety STOP, umożliwiając ekspresję danego genu. Jeśli Cre jest produkowane wyłącznie w neuronach, to modyfikacja będzie ograniczona do tkanki nerwowej (Urban i Rossier, 2012). System Cre-loxP może mieć zarówno charakter stały, tj. rekombinacja zachodzi od początku w trakcie rozwoju, w zależności od aktywności użytego promotora, bądź warunkowy, zależny od podania określonego związku, aktywującego mutację. Mutacja warunkowa (ang. *conditional*) stanowi dodatkowe udoskonalenie systemu i posiada bezsprzeczną zaletę jaką jest indukowalność czasowo-przestrzenna (Feil i in., 2009). Włączanie

mutacji w życiu dorosłym umożliwia prawidłowy rozwój, nie zaburza naturalnych procesów kontrolowanych przez dany gen i redukuje powstawanie mechanizmów kompensacyjnych, które mogą pojawić się by zniwelować skutki utraty genu, zwłaszcza w wysoce plastycznym mózgu rozwijającego się organizmu. Za przykład może posłużyć system indukowany syntetycznym steroidem – tamoksyfenem (lub jego metabolitem 4-hydroksytamoksyfenem, 4-OHT), który opiera się na modyfikacji rekombinazy Cre poprzez fuzję z receptorem estrogenowym zawierającym zmutowaną domenę wiążącą ligand (ER-LBD, ang. *estrogen receptor ligand binding domain*), ale nie endogenny hormon. Tak zmodyfikowana rekombinaza zwana CreER, w nieaktywnej formie związanej z białkiem szoku cieplnego 90 (HSP90, ang. *heat shock protein 90*), jest obecna w cytoplazmie. Po podaniu tamoksyfenu następuje oddysocjowanie HSP90 i translokacja CreER do jądra, gdzie może wejść w interakcje z miejscami loxP i aktywować mutacje. Modyfikacja systemu CreER zwana CreERT2 jest 10-krotnie bardziej wrażliwa na 4-OHT *in vivo* (Feil i in., 2009; Kim i in., 2018).



Rycina 1.11 Schemat działania miejscowo specyficznej rekombinacji genetycznej za pośrednictwem systemu Cre-loxP, powstały z połączenia linii transgenicznej z rekombinazą CreER kierowaną przez tkankowo/komórkowo-specyficzny promotor i linii zawierającej oflankowany miejscami loxP (Flox) gen ulegający mutacji (GOI, ang. *gene of interest*). Podanie tamoksyfenu (Tam) powoduje fuzję związku z receptorem estrogenowym (ER) i oddysocjowanie białka HSP, co prowadzi do translokacji CreER do jądra komórkowego i aktywacji mutacji. W zależności od specyfiki linii transgenicznej, Cre może prowadzić do aktywacji ekspresji genu (poprzez wycięcie kasety STOP) lub warunkowego usunięcia/odwrócenia fragmentu genu. System można wykorzystać również do śledzenia losów komórek poprzez wycięcie LSL i wyznakowanie komórek białkiem fluorescencyjnym (na podstawie T. Wang i in., 2023).

1.8.2 Technika CRISPR-Cas9

System CRISPR-Cas9 to nowoczesna i obecnie najbardziej wykorzystywana metoda edycji genomu (Heidenreich i Zhang, 2016). Metoda CRISPR (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) wykorzystuje białka Cas9 (ang. *CRISPR associated proteins 9*) o aktywności helikazy oraz nukleazy, których zadaniem jest cięcie DNA. Technika ta została odkryta u bakterii, gdzie jest formą pamięci immunologicznej po przebytej infekcji fagami lub wirusami (Ishino i in., 2018). Pocięte fragmenty kwasów nukleinowych, zwane jako rejony łącznikowe (ang. *spacers*) są wprowadzane do bakteryjnego DNA pomiędzy powtórzenia CRISPR. Rejony łącznikowe są wykorzystywane do rozpoznawania i wyciszania egzogennych elementów genetycznych w sposób analogiczny do mechanizmu interferencji RNA (RNAi) w komórkach eukariotycznych. W skład *locus* CRISPR wchodzi 14 powtórzeń (DRS, ang. *direct repeats*), zbudowanych z 29 nukleotydów oddzielonych sekwencjami łącznikowymi (ang. *spacers*) (Barrangou i Marraffini, 2014; Ishino i in., 2018). W skład białka Cas9 wchodzi min. dwie domeny nukleazowe: HNH i RuvC. Każda domena odpowiada za trawienie jednej nici DNA (Ran i in., 2013). Wprowadzenie celowanych zmian w zdefiniowanym miejscu genomu wymaga dostarczenia komórce genów kodujących białko Cas9 oraz krótkie, wiodące cząsteczki RNA tzw. sgRNA (ang. *single guideRNA*) skierowane przeciwko konkretnej sekwencji. Za syntezę guideRNA w komórkach eukariotycznych odpowiada endogenna polimeraza RNA III. Cząsteczka guideRNA powstaje na skutek połączenia tracrRNA (ang. *trans-activating CRISPR RNA*) oraz crRNA (ang. *CRISPR RNA*) (Cong i in., 2013). Kompleks powstały z połączenia białka Cas9 oraz guideRNA, pełni funkcję nożyczek molekularnych. Kompleks Cas9-sgRNA przeszukuje genom w celu odnalezienia sekwencji komplementarnej do crRNA. Gdy kompleks natrafi na komplementarny fragment, dochodzi do precyzyjnego cięcia DNA. Miejsce cięcia zależne jest od obecności sekwencji PAM (ang. *protospacer adjacent motif*) 5'-NGG-3', która powinna znajdować się bezpośrednio za poszukiwanym fragmentem (Cong i in., 2013). Powstałe cięcia, tzw. DSB (ang. *double-strand breaks*), uruchamiają dwa możliwe mechanizmy naprawcze. Pierwszym z nich jest mechanizm rekombinacji homologicznej (HDR, ang. *homology-directed repair*), który umożliwia wprowadzenie zmodyfikowanego fragmentu genu zawierającego ramiona homologiczne do miejsca DSB (KI, ang. *knock-in*). Drugim mechanizmem jest proces rekombinacji niehomologicznej (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*), który polega na naprawie powstałego pęknięcia poprzez połączenie końców DSB przez enzym o właściwościach ligazy. Wskutek naprawy NHEJ powstają mutacje typu indel: insercja lub

delecja, powodująca zmianę ramki odczytu, w rezultacie dochodzi do wyciszenia genu (KO, ang. *knock-out*) (Czarnek i Bereta, 2016; Xue i Greene, 2021).

1.8.3 Wektory wirusowe rAAV

Wektory wirusowe stanowią dogodny nośnik umożliwiający wprowadzenie materiału genetycznego do wybranej tkanki, np. mózgowej. Połączenie strategii wykorzystującej wektory wirusowe z odpowiednimi liniami zwierząt transgenicznych umożliwia bardzo precyzyjne manipulacje genetyczne. Wykorzystanie wektorów wirusowych jako nośników posiada kilka ważnych zalet: 1) zapewnia stosunkowo szybką i łatwą implementację, 2) wysoką ekspresję transgenu w zainfekowanych komórkach oraz 3) modyfikacje genetyczne w gatunkach, gdzie transgeneza jest trudna do przeprowadzenia. Strategie wirusowe bazują na kilku rodzajach wirusów w tym retrowirusów (np. wektory lentiwirusowe), adenowirusów, wirusów związanych z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated viruses*) czy herpeswirusów (Urban i Rossier, 2012).

AAV należą do małych (średnica 25nm), bezotczkowych, jednoniciowych DNA parwowirusów. AAV należą do dependowirusów, które wymagają obecności adenowirusa lub HSV, jako wirusa pomocniczego do wejścia w fazę lityczną. Bez wirusa pomocniczego, AAV typu dzikiego, wchodzi w fazę latencji poprzez integrację z chromosomem 19 (Urban i Rossier, 2012). Genom AAV posiada ~ 4.7kb i zawiera dwie otwarte ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*): region *rep* i region *cap*. Region *rep* koduje białka związane z replikacją wirusa, natomiast *cap* koduje trzy białka (VP1, VP2 i VP3), które łącznie tworzą kapsyd wirusa. Sekwencje odwróconych powtórzeń końcowych - ITR (ang. *inverted terminal repeats*) otaczają genom wirusowy i są wymagane do prawidłowego pakowania DNA w kapsydy (McLaughlin i in., 1988). Rekombinowane wektory wirusowe AAV (rAAV) są zaprojektowane w ten sposób, że rejony kodujące zostają zamienione przez transgen wielkości ~ 5kb, oflankowany sekwencjami ITR (Schultz i Chamberlain, 2008). Wektory rAAV są składane poprzez ko-transfekcję dwóch plazmidów do komórek HEK293 (ang. *Human Embryonic Kidney 293*) - ludzkiej linii uzyskanej z komórek embrionalnych nerki, w których dochodzi do składania cząsteczek wirusowych, dzięki stabilnej ekspresji genów E1A, E1B. Pierwszy plazmid koduje transgen oflankowany sekwencjami ITR. Drugi jest nośnikiem genów *rep* i *cap*. Odpowiedni serotyp rAAV definiuje tropizm tkankowy (Davidson i in., 2000; Taymans i in., 2007). Serotypy różnią się sekwencją aminokwasową kodującą kapsyd. Różnice w sekwencji poszczególnych serotypów wpływają na proces endocytozy cząstek AAV, oparty o interakcje białek kapsydu z receptorami na powierzchni komórek. Opisano 12 serotypów rAAV, jednakże

większość badań przeprowadzono w oparciu o serotyp AAV2. W badaniach OUN serotypy 1, 2, 4, 5, 6, 7 i 8 wykazują efektywną transdukcję neuronów w różnych regionach mózgu (Davidson i in., 2000; Salegio i in., 2013; Taymans i in., 2007). Dzięki wysokiej homologii pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi różnych serotypów i wiedzy na temat struktury krystalicznej AAV2, stało się możliwe stworzenie osłonki wirionu z podjednostek kapsydu pochodzących z różnych serotypów. Tak więc modyfikacja białek kapsydu umożliwia ograniczenie albo rozszerzenie powinowactwa tkankowego poprzez zastosowanie kombinacji serotypów np. rAAV1/2 (Taymans i in., 2007; Urban i Rossier, 2012). Serotyp rAAV dodatkowo determinuje kierunek transportu cząsteczek wirusowych. Pokazano, że w typie 2 (AAV2) dominuje anterogradny kierunek, podczas gdy użycie serotypu AAV6 posiada niemal wyłącznie retogradny charakter (Salegio i in., 2013). Zatem wykorzystanie mieszanego fenotypu może wpływać na proces rozchodzenia się cząsteczek wirusowych w strukturach mózgu. Wykorzystanie wektorów AAV jest bezpieczne, pozbawione immunogennych białek wirusowych i zapewnia efektywną ekspresję w komórkach dzielących i niedzielących się (Samulski i in., 1989). Wektory AAV zapewniają nietoksyczną transdukcję komórek, nie powodują zmian patologicznych i glejozy w miejscu iniekcji (Chamberlin i in., 1998; Klein i in., 1998). Podanie wektorów rAAV umożliwia komórkowo-zależną ekspresję transgenu oraz wprowadzenie narzędzi molekularnych pozwalających na mapowanie, monitorowanie i manipulację obwodów neuronalnych (Betley i Sternson, 2011).

II. CELE PRACY

Pierwotnie linia transgeniczna $Dicer^{CamKII\alpha CreERT2}$, na której oparto badania zawarte w niniejszej rozprawie, została stworzona do badań nad rolą miRNA w neuroplastyczności. Ze względu na to, że cząsteczki miRNA pełnią istotne funkcje rozwojowe, utworzono indukowalny model usunięcia dojrzałych cząsteczek miRNA w neuronach z ekspresją $CaMKII\alpha$ – kluczowego składnika plastyczności neuronalnej (Fiorenza i Barco, 2016). Niespodziewanie odkryto, że mutacja wpływa również na metabolizm zwierząt, gdyż zwierzęta rozwijają hiperfagię i otyłość. Do tej pory wykonano wiele badań, które pozwoliły ustalić strukturę – jądro łukowate (ARC) oraz poszczególne cząsteczki miRNA odpowiedzialne za fenotyp otyłości w modelu $Dicer^{CamKII\alpha CreERT2}$ (Vinnikov i in., 2014). Wykonano również analizę transkryptomiczną niezbędną do ustalenia procesów i ścieżek sygnalizacyjnych dotkniętych mutacją oraz pokazano, że metabolizm zwierząt ulega rozregulowaniu (Mang i in., 2015). Dotychczasowe badania poczyniły znaczący krok w kierunku określenia mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowany fenotyp, lecz w dalszym ciągu nie został on w pełni wyjaśniony. Aby określić wpływ usunięcia miRNA w mózgu na zaburzenia homeostazy energetycznej i rozwój chorób związanych z otyłością, w niniejszej pracy doktorskiej postawiono dwa główne cele.

Pierwszym celem była **charakterystyka zmian metabolicznych zachodzących podczas mutacji w linii Dicer cKO**, w której zawarto kilka celów szczegółowych:

- a) Określenie zmian w metabolizmie glukozy i insuliny w fazie tycia oraz po okresie przejściowej otyłości, a także ocena stopnia tych zmian z rozróżnieniem na płeć zwierząt.
- b) Sprawdzenie prewencyjnego efektu wysiłku fizycznego na rozwój otyłości oraz ocena wpływu aktywności fizycznej na metabolizm glukozy w badanej linii.
- c) Analiza różnic w wybranych parametrach metabolicznych u myszy Dicer cKO w okresie maksymalnego tycia z wykorzystaniem klatek metabolicznych.
- d) Określenie, czy wzrost konsumpcji pokarmu i masy ciała u myszy Dicer cKO wynika z zaburzeń w ścieżce leptynowej.

W kolejnym etapie pracy poddano ocenie wpływ mutacji na zmiany plastyczne w podwzgórzu u myszy Dicer cKO. Badania wykonano w oparciu o doniesienia dotyczące

wzrostu ekspresji genu *c-fos* – markera neuroplastyczności w ARC podczas głodówki. Drugim celem pracy było **określenie wpływu usunięcia miRNA w neuronach podwzgórza na c-Fos–zależną plastyczność neuronalną, regulującą mechanizm łaknienia w ARC**. Aby ocenić wpływ genu *c-fos* w rozwoju fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO, wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- a) Analiza indukcji genu *c-fos* podczas głodówki i określenie populacji neuronalnej, w której dochodzi do zmian w jego ekspresji zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i w badanej linii.
- b) Optogenetyczna aktywacja neuronów oreksygeniczných w ARC u najedzonych zwierząt i ocena poziomu białka c-Fos po stymulacji.
- c) Określenie wpływu wyciszenia genu *c-fos* z wykorzystaniem techniki CRISPR/Cas9 na rozwój hiperfagii i otyłości u myszy Dicer cKO.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1 Transgeniczne linie zwierząt stosowane w badaniach

Część doświadczalna została zatwierdzona przez I Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie i procedowana we wnioskach o numerach: 232/2016 „Analiza sieci neuronalnych zaangażowanych w kontrolę łaknienia – optogenetyczna stymulacja jądra łukowego oraz analiza wpływu ograniczenia pożywienia na poziom białka c-Fos” z późniejszym aneksem 540/2018, 245/2017 „Rola cząsteczek miRNA w regulacji pobierania pokarmu”, 751/2018 „Analiza zmian metabolicznych związanych z otyłością w mysim modelu *Dicer*^{CamKIIαCreERT2}”.

Badania przeprowadzono na zwierzętach szczepu C57Bl/6J, które są jednym z najczęściej stosowanych szczepów mysich do badań *in vivo*, ze względu na dobrze udokumentowane opisy parametrów behawioralnych i metabolicznych. Linie zwierząt transgenicznych opisane w niniejszej pracy, zostały odpowiednio scharakteryzowane i zapewniają stabilną ekspresję wprowadzonych genów w badanych strukturach, umożliwiając lepszą standaryzację badań, co skutkuje otrzymaniem bardziej wiarygodnych i powtarzalnych wyników.

Badania przeprowadzono na następujących mysich liniach transgenicznych:

Linia *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2}

Myszy transgeniczne *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2} (*Dicer* cKO) uzyskano poprzez kojarzenie myszy z dwóch linii transgenicznych: linii ***Dicer*^{flx/flx}** (*Dicer*^{fl/fl}), wytworzonej w pracowni Matthiasa Merkenschlagera w Imperial College London (Wielka Brytania) (Cobb et al., 2005) oraz linii ***CaMKIIα*^{CreERT2}**, stworzonej metodą celowanej transgenezy w komórkach macierzystych w laboratorium Gunthera Schutza w German Cancer Research Center (DKFZ) w Heidelbergu (Niemcy) (Erdmann i in., 2007). W pierwszej linii fragment genu *Dicer1* obejmujący ekson 20-21, został oflankowany krótkimi sekwencjami loxP rozpoznawanymi i wycinanymi przez rekombinazę Cre. Wycinany fragment genu koduje domenę endorybonukleazy III, która pełni kluczową rolę w biosyntezie mikroRNA. Druga linia transgeniczna opiera się na indukowalnej, tkankowo-specyficznej ekspresji rekombinazy Cre pod mysim promotorem *CamKIIα* (ang. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*), charakterystycznym dla neuronów przodomózgowia. Indukowalny system polega na fuzji rekombinazy Cre ze zmodyfikowaną formą ludzkiego receptora estrogenowego (ERT2), wykazującego wysokie powinowactwo do

analogu estrogenu - tamoksyfenu. Podanie tego związku aktywuje receptor i powoduje translokację rekombinazy Cre do jądra komórkowego i wycięcie fragmentu oflankowanego przez sekwencje loxP. Opisywana, podwójnie transgeniczna linia stanowi indukowalny, oparty na systemie Cre-loxP model usunięcia genu *Dicer1* w neuronach przodomózgowia. Zwierzęta bez indukcji mutacji nie wykazują zmienionego fenotypu. Linia Dicer cKO została wykorzystana w celu określenia parametrów metabolicznych w fazie okresowej otyłości związanej z hiperfagią.

Linia CRISPR-Cas9-EGFP^{CaMKIIαCreERT2}

Mysia linia CRISPR-Cas9-EGFP (B6;129-Gt(Rosa)26Sor^{tm1}(CAG-Cas9,-EGFP)^{Fvzh}/J) została wytworzona w laboratorium Fenga Zhang w Massachusetts Institute of Technology (USA) i udostępniona The Jackson Laboratory. Mutacja zlokalizowana jest w *locus* Rosa26 i polega na insercji zmodyfikowanego fragmentu genu w zdefiniowane miejsce (mutacja typu „knock-in”). Wprowadzony fragment zawiera oflankowaną sekwencjami loxP kasetę STOP oraz gen kodujący białko Cas9 i białko fluorescencyjne EGFP pod promotorem CAG (ang. *chicken beta-actin/rabbit beta-globin hybrid promoter*) (Rosa26-LSL-Cas9-EGFP). Kasetę STOP zapobiega ekspresji Cas9 i EGFP. Ekspresja Cas9-EGFP jest Cre-zależna, tzn. aby doszło do jej aktywacji, należy usunąć kasetę STOP poprzez krzyżowanie z linią niosącą tkankowo-specyficzną rekombinazę Cre. Ekspresja Cas9-EGFP jest więc ograniczona do tkanek, w których dochodzi do ekspresji Cre. W niniejszej pracy homozygotyczne osobniki względem Cas9 skrzyżowano z indukowalną linią CaMKIIαCreERT2, otrzymując ekspresję Cas9-EGFP w neuronach przodomózgowia po podaniu tamoksyfenu. Tę podwójnie transgeniczną linię zastosowano do sprawdzenia roli genu *c-fos* w kontroli pobierania pokarmu. W tym celu zaprojektowano specyficzne sgRNA (ang. *single guide RNA*) do wyciszenia genu *c-fos* i wprowadzono konstrukt do wektora wirusowego, który miejscowo podano zwierzęciu. Linia CRISPR-Cas9-EGFP dostała również skrzyżowana z podwójnie transgeniczną linią Dicer^{CaMKIIαCreERT2}, skutkując otrzymaniem myszy **Dicer::Cas9-EGFP^{CaMKIIαCreERT2}** (w skrócie DicerCas9), u której po podaniu tamoksyfenu w neuronach przodomózgowia pod promotorem CaMKIIα dochodzi do jednoczesnego usunięcia genu *Dicer1* oraz syntezy białka Cas9-EGFP. Linia DicerCas9 została uzyskana, w celu określenia roli genu *c-fos* w rozwoju otyłości u myszy Dicer cKO.

Linia NPY-GFP

Myszy NPY-GFP stworzono w pracowni Bradforda B. Lowella w Beth Israel Deaconess Medical Center (Harvard, USA) i zakupiona z The Jackson Laboratory (Jax #006417;Tg(Npy-

hrGFP)1Lowl). Mutacja opiera się na wprowadzeniu genu białka zielonej fluorescencji (GFP) pod promotor NPY znajdujący się w neuronach oreksygenicznych. Opisana modyfikacja umożliwia wizualizację neuronów oreksygenicznych z ekspresją NPY (van den Pol i in., 2009). Wykorzystanie tej linii zwierząt posłużyło do określenia populacji neuronów, w których dochodzi do wzmożonej ekspresji genu *c-fos* i jego białkowego produktu podczas głodówki.

Linia AgRP^{Cre::Ai32}

Transgeniczna linia AgRP^{Cre::Ai32} powstała poprzez skrzyżowanie dwóch mysich linii AgRP-Cre oraz linii Ai32. Obie linie zostały zakupione w The Jackson Laboratory. Linia AgRP-Cre (Agrp^{tm1(cre)Lowl}; AgRP-IRES-Cre) powstała w pracowni Bradforda B. Lowella w Beth Israel Deaconess Medical Center (Harvard, USA) przy użyciu celowanej transgenezy. Kasetę IRES-Cre-FRT-Kan/Neo-FRT została wstawiona za kodonem STOP genu AgRP przy użyciu homologicznej rekombinacji. Następnie kasetę Kan/Neo została usunięta poprzez rekombinację FLP. Ekspresja rekombinazy Cre jest więc kierowana przez endogenne promotory i regiony wzmacniające (ang. *enhancers*) w neuronach wydzielających neuropeptyd AgRP. Linia została utworzona do badań fizjologicznych funkcji neurotransmisji GABAergicznej w neuronach AgRP podwzgórza przy użyciu systemu Cre-loxP. Po skrzyżowaniu z transgeniczną linią niosącą sekwencje loxP otaczające fragment badanego genu, Cre rekombinaza wycina oflankowany gen, tworząc tzw. warunkowy knock-out genu. Linia AgRP-Cre została skrzyżowana z linią Ai32 (Ai32(RCL-ChR2(H134R) / EYFP) stworzoną metodą celowanej transgenezy w komórkach macierzystych w laboratorium Hongui Zeng w Allen Institute for Brain Science (USA). Do *locus* Rosa26 wprowadzono wektor Rosa-CAG-LSL-ChR2(H134R)-EYFP-WPRE zawierający promotor CAG (ang. *chicken beta-actin/rabbit beta-globin hybrid promoter*), kasetę STOP otoczoną sekwencjami loxP, gen rodopsyny kanałowej 2 (ChR2, ang. *Channelrhodopsin-2*) ChR2(H134R)-EYFP będący w fuzji z białkiem fluorescencyjnym EYFP, element regulatorowy WPRE (ang. *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*) by wzmocnić stabilność transkryptu mRNA oraz sygnał poliadenylacji bGH polyA (ang. *bovine growth hormone polyadenylation signal*). Sekwencja cDNA genu ChR2(H134R)-EYFP kodująca 315 aminokwasów ChR2 została wyizolowana z algi *Chlamydomonas reinhardtii* i zmodyfikowana poprzez zmianę CAC na CGC aby wzmocnić aktywność receptora ChR2(H134R). Białko ChR2(H134R) jest opsyną funkcjonującą jako kanał wapniowy aktywowany światłem niebieskim o długości fali 450-490 nm, który po ekspozycji na światło ulega natychmiastowej i odwracalnej aktywacji, powodując

depolaryzację błony komórkowej i aktywację potencjałów czynnościowych. Do N-końca ChR2(H134R) wprowadzono do ramki odczytu wzmocnioną sekwencję białka żółtej fluorescencji (ang. *enhanced yellow fluorescent protein*, EYFP), tworząc kompletną sekwencję białka fuzyjnego ChR2(H134R)-EYFP. Cały konstrukt został wprowadzony pomiędzy 1. i 2. egzon *locus Rosa26*. Oflankowana sekwencjami loxP kasetą STOP zapobiega ekspresji genu ChR2-EYFP. Po skrzyżowaniu z linią z ekspresją rekombinazy Cre pod tkankowo-specyficznym promotorem dochodzi do wycięcia kasety STOP i ekspresji ChR2-EYFP. Obecność białka fuzyjnego ChR2-EYFP można obserwować przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Podwójnie transgeniczna linia AgRP-Cre::Ai32 ekspresjuje ChR2-EYFP pod promotorem AgRP i została wykorzystana do badań aktywności neuronalnej za pomocą stymulacji optogenetycznej przy użyciu światła niebieskiego.

3.1.1 Genotypowanie zwierząt

W celu określenia genotypu zwierząt z pobranego fragmentu tkanki pochodzącej z ucha lub ogona, wyizolowano genomowe DNA przy użyciu zestawu Genomic Mini (AiA Biotechnology, nr kat. 116-250), według protokołu załączonego przez producenta. Zgodnie z protokołem tkanka została poddana trawieniu przez noc w buforze lizującym zawierającym Proteinazę K, a uwolnione DNA zostało oczyszczone na kolumnkach i zawieszane w 100 μ l buforu TRIS. Wyizolowane genomowe DNA wykorzystano jako matrycę do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *polimerase chain reaction*) w celu amplifikacji określonego fragmentu genu. PCR wykonano z użyciem zestawu Hot Start (Syngen nr kat. SY550211) w dH₂O, zawierającego końcowe stężenia odczynników w próbce: 1x bufor 10x Gold Hot, 0,2 mM wolne nukleotydy (dNTP), 2,5 mM bufor zawierający jony magnezu, startery (Genomed) dla określonego genu o stężeniu końcowym 0,5 μ M, 0,05 IU polimerazy Hot Start. Przygotowana mieszanina reakcyjna została przeniesiona do probówek 0,2 ml (VWR, nr kat. 732-0548), do których dodano po 2 μ l wyizolowanego genomowego DNA (w końcowej objętości mieszaniny w próbce 20 μ l). Każda reakcja została przeprowadzana z kontrolą pozytywną pochodzącą od osobnika o znanym genotypie i kontrolą negatywną stanowiącą mieszaninę reakcyjną niezawierającą DNA. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze (Eppendorf lub BioRad) przy użyciu odpowiedniego programu opracowanego dla każdego genu. Po zakończeniu programu do mieszaniny reakcyjnej dodano 6X bufor obciążający i naniesiono na 1-2% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny w buforze TBE. Bromek etydyny jako składnik interkalujący DNA umożliwia detekcję końcowego produktu PCR przy

użyciu światła UV. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w aparacie BioRad przez 30 minut i przy napięciu 100V. Zdjęcia żelu wykonano za pomocą transiluminatora sprzężonego z aparatem do dokumentacji żeli (UVP).

Linia (gen)	Nazwa i sekwencja starterów	Rodzaj i wielkość produktu (pz)	Program PCR
Dicer	Dicer_F: 5'-CCATTTGCTGGAGTGA CTCTG-3' Dicer_R: 5'-TAAATCTGGCAAGCGAGACG-3'	mutant 500pz WT 400 pz	95°C 5:00 95°C 0:30 60°C 0:30 72°C 0:30 30x
CreERT2	CreERT2_F: 5'-GGCTGGTGTGTCCATCCCTGAA-3' CreERT2_R: 5'-GGTCAAATCCACAAAGCCTGGCA-3'	mutant 500 pz	72°C 1:00 4°C ∞
CRISPR-Cas9	Cas9_F (wspólny): 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3' Cas9-B_Mut_R: 5'-CGGGCCATTTACCGTAAGTTAT-3' Cas9-E_WT_R: 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'	mutant 300 pz WT 300 pz	94°C 5:00 94°C 2:00 57°C 0:45 72°C 0:40 72°C 10:00 4°C ∞ 30x
AgRP-Cre	AgRPCre_F (wspólny): 5'-GCTTCTTCAATGCCTTTTGC-3' IntPosContr_R: 5'-GTGTGTGGTTCAGCATGAC-3' Mutant_R: 5'-AGGAACTGCTTCCTTCACGA-3'	mutant 280 pz kontrola pozytywna 199 pz	95°C 5:00 95°C 0:30 49°C 0:30 72°C 0:30 72°C 1:00 4°C ∞ 30x
Ai32	oIMR9102: 5'-ACATGGTCCTGCTGGAGTTC-3' oIMR9103: 5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3'	mutant 212 pz	95°C 5:00 95°C 0:15 51°C 0:15 72°C 0:30 72°C 2:00 4°C ∞ 30x
	oIMR9020: 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3' oIMR9021: 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'	WT 297 pz	
	oIMR1850NPYMut_F: 5'-GCAACTGTTGGGAAGGGCG-3'	mutant 400 pz	

NPY-GFP	oIMR7096NPYMut_R: 5'-GAGCGGCAGTGGCTCCAG-3';		95°C 2:00
	oIMR1898NPYWT_F: 5'-TGCTAGGTAACAAGCGAATGG-3' oIMR1899NPYWT_R: 5'-TAGTGTCGCAGAGCGGAGTA-3'	Kontrola pozytywna 500pz	95°C 0:15 60°C 0:15 72°C 0:30 72°C 1:00 4°C ∞

Tabela 3.1 Genotypowanie linii transgeniczných – warunki PCR.

3.1.2 Przygotowanie zwierząt do wejścia w procedury doświadczalne

Zwierzęta przed wejściem w procedury eksperymentalne zostały poddane procesowi osuwajania (ang. *handling*), redukującemu poziom stresu, który mógłby negatywnie wpłynąć na wynik doświadczeń.

3.1.3 Oswajanie

Oswajanie jest standardową procedurą, służącą do habituacji (przyzwyczajenia) zwierząt zarówno do osoby wykonującej doświadczenia, jaki i pomieszczenia eksperymentalnego, co w znacznym stopniu redukuje poziom stresu wynikającego z obecności człowieka i wykonywanych procedur w dalszych etapach badawczych. Proces osuwajania przeprowadzono według wystandaryzowanego schematu, trwającego 6 dni: (Dzień 1) Przyzwyczajenie do obecności eksperymentatora poprzez otwarcie klatki na 2 minuty; (Dzień 2) Przeniesienie myszy za chwyt u nasady ogona na wewnętrzną stronę dłoni eksperymentatora z możliwością swobodnej eksploracji dłoni przez 2 minuty; (Dzień 3 i 4) Powtórzenie czynności z dnia 2.; (Dzień 5 i 6) Umieszczenie myszy na przedramieniu eksperymentatora i spokojny spacer po pokoju przez 2 minuty.

3.1.4 Indukcja mutacji za pomocą tamoksyfenu

Indukowalny system Cre-Lox polega na aktywacji rekombinazy Cre będącej w fuzji z receptorem estrogenowym (Cre^{ERT2}) poprzez podanie analogu tego receptora – tamoksyfenu (Sigma Aldrich, nr kat. T5648-5G), co powoduje translokację Cre do jądra komórkowego, rozpoznanie przez Cre konfiguracji krótkich sekwencji LoxP otaczających fragment genu i rekombinacji, polegającej na wycięciu lub odwróceniu oflankowanego odcinka. Tamoksyfen

rozpuszczono w oleju słonecznikowym (Sigma Aldrich nr kat S5007) z etanolem 99,8% (10:1) w stężeniu 10 mg/ml. Mutację indukowano wg standardowego protokołu polegającego na dootrzewnowym podaniu 1 mg związku (100 µl) 2 razy dziennie w odstępach 8-12-godzinnych przez 5 kolejnych dni. W niniejszym projekcie nie wykorzystano podania samego nośnika (oleju słonecznikowego z etanolem) jako kontroli, ponieważ z badań poprzednich grup wynika, że nie ma różnic fenotypowych pomiędzy grupami kontrolnymi $Dicer^{fl/fl}$ po podaniu tamoksyfenu oraz grupy $Dicer^{fl/flCamKII\alpha CreERT2}$ po podaniu oleju słonecznikowego (Mang i in., 2015). Ze względu na etyczny aspekt ograniczenia zwierząt wykorzystanych do doświadczeń, zdecydowano się na grupę kontrolną $Dicer^{fl/fl}$ poddaną iniekcjom tamoksyfenem, aby wykluczyć efekt podania leku na badane parametry.

3.2 Testy oceniające parametry metaboliczne linii $Dicer^{CaMKII\alpha CreERT2}$

Doświadczenia opisane w tej sekcji zostały przeprowadzone w celu określenia podstawowych parametrów metabolicznych u transgenicznych myszy $Dicer^{CaMKII\alpha CreERT2}$ ($Dicer$ cKO) po indukcji mutacji przy użyciu tamoksyfenu. Aktywowanie mutacji w tej linii już po kilku tygodniach prowadzi do wzrostu wagi i ilości spożywanego pokarmu, co świadczy o zaburzonej gospodarce energetycznej, regulującej bilans pomiędzy przyjmowanym pokarmem a wydatkiem energetycznym. Używając testu tolerancji glukozy (GTT, ang. *Glucose Tolerance Test*) i testu tolerancji insuliny (ITT, ang. *Insulin Tolerance Test*), sprawdzono tempo wchłaniania glukozy przez tkanki, rozwój insulinooporności oraz określono czas trwania tych zmian. Sprawdzono również czy efekt mutacji można zniwelować poprzez zwiększoną aktywność fizyczną i przeprowadzono ocenę wpływu aktywności na metabolizm glukozy.

3.2.1 Wpływ wysiłku fizycznego na masę ciała i pobór pokarmu u myszy $Dicer$ cKO – test kołowrotka

W modelu $Dicer^{CaMKCreERT2}$ dochodzi do akumulacji tkanki tłuszczowej spowodowanej zwiększonym poborem pokarmu obserwowanym w 5. i 6. tygodniu od indukcji mutacji. Test kołowrotka został przeprowadzony w celu sprawdzenia, czy wzmożona aktywność fizyczna wpłynie na fenotyp otyłości u myszy $Dicer$ cKO i metabolizm glukozy.

3.2.2 Test tolerancji glukozy

W dniu poprzedzającym doświadczenie, zwierzęta przeniesiono do nowych klatek do pokoju eksperymentalnego i pozbawiono pokarmu (w fazie nieaktywnej) przez ok. 12 godzin.

W dniu eksperymentu rano, dokonano pomiarów masy ciała i na tej podstawie została obliczona objętość do wstrzyknięcia 20% roztworu D(+) - glukozy (Sigma Aldrich, nr kat. G7021): **objętość (μl) = 10 x masa ciała**, a następnie określono poziom glukozy we krwi na czczo. Krew pobrano z żyły ogonowej po nacięciu końcówki ogona, po uprzednim miejscowym znieczuleniu za pomocą lidokainy. Po dootrzewnowej iniekcji roztworu glukozy, wykonano szereg pomiarów poziomu glukozy we krwi przy użyciu glukometru paskowego Accu-Check: 15, 30, 60 i 120 min od podania glukozy, bez potrzeby ponownego nacinania ogona. Test przeprowadzono w 6. i 9. tygodniu po indukcji mutacji. GTT przeprowadzono również na zwierzętach z dostępem do kołowrotka, w celu określenia wpływu wzmożonej aktywności fizycznej na tempo wchłaniania glukozy przez tkanki u myszy Dicer cKO. W warunkach fizjologicznych zwiększona aktywność fizyczna uwrażliwia tkanki na insulinę, powodując szybszy wychwyt glukozy.

3.2.3 Test tolerancji insuliny

W dniu eksperymentu rano dokonano pomiarów masy ciała i na tej podstawie obliczono dawkę insuliny (0.75 IU/g masy ciała, Sanofi Aventis). Zwierzęta przeniesiono do nowych klatek indywidualnych i pozbawiono pokarmu na 6 godzin (w fazie ciemnej/aktywnej). Przed podaniem insuliny, za pomocą glukometru paskowego, została określona zawartość glukozy we krwi na czczo. Krew pobrano z żyły ogonowej po uprzednim nacięciu końcówki ogona sterylnym ostrzem. Przygotowany roztwór insuliny w sterylnej soli fizjologicznej (0.25 IU/ml) został wstrzyknięty dootrzewnowo w następującej objętości: **0.25 IU/ml (μl) /mysz: 3 x masa ciała**, np. mysz ważąca 20g, 3 x 20= 60 μl. Pomiar stężenia glukozy we krwi powtórzono 15, 30, 45, 60 i 90 minut po podaniu insuliny (bez ponownego nacinania ogona). Po zakończeniu pomiarów zwierzęta zostały przeniesione do klatek domowych. Procedurę przeprowadzono w 6. i 9. tygodniu po indukcji mutacji na tych samych osobnikach.

3.2.4 Analiza parametrów metabolicznych z użyciem klatek metabolicznych

Klatki metaboliczne Phenomaster TSE System stanowią w pełni zautomatyzowany i całkowicie nieinwazyjny system do pomiarów funkcji metabolicznych badanych zwierząt. Dzięki szczelnie zamkniętym klatkom ze zdefiniowanymi mieszaninami gazów, moduł pośredniej kalorymetrii gazowej Phenomastera dostarcza precyzyjnych pomiarów metabolicznych, poprzez określenie poziomu konsumpcji tlenu (VO₂) i produkcji dwutlenku węgla (VCO₂) przez zwierzę w odniesieniu do klatki referencyjnej o znanym składzie

gazowym. Analiza stężenia gazów oddechowych pozwala na określenie współczynnika oddechowego (RER, ang. *Respiratory Exchange Ratio*) i wydatku energetycznego (EE, ang. *Energy Expenditure*). Współczynnik oddechowy RER jest wykorzystywany do oceny substratu wykorzystywanego do produkcji energii zgodnie z równaniem:

$$\text{RER} = \text{VCO}_2 / \text{VO}_2$$

Spalanie 1 cząsteczki glukozy:



Spalanie 1 cząsteczki kwasu palmitynowego:



Dzięki możliwości stałego monitorowania parametrów metabolicznych bez konieczności kontaktu zwierzęcia z eksperymentatorem, system jest dogodnym rozwiązaniem również do badań rytmu dobowego. System wyposażono w sensory poboru pokarmu i wody z odczytem konsumpcji co 15 minut przez okres do 10 dni. Dzięki modułowej budowie klatek metabolicznych, istnieje możliwość zamocowania kołowrotka i czujników na podczerwień pozwalających na bardzo dokładną analizę aktywności zwierzęcia i zapewniających niezakłócone pomiary fizyczne z wysoką rozdzielczością czasową (powyżej 40 sekund na zwierzę/klatkę). Ze względu na cel doświadczenia, wykorzystano sensory umożliwiające określenie wyjściowych parametrów badanej linii, w tym pobór pokarmu i wody, RER i EE, natomiast nie wprowadzono elementów umożliwiających ingerencję w parametry metaboliczne.

Ze względu na liczbę dostępnych klatek, nie było możliwości analizy obu płci. Doświadczenie zostało przeprowadzone na dorosłych samicach linii $\text{Dicer}^{\text{CaMKII}\alpha\text{CreERT2}}$ w podobnym wieku i masie ciała. Zwierzęta przed przystąpieniem do procedury przeniesiono do klatek metabolicznych na 7-10 dni w celu habituacji do środowiska panującego w klatkach i określenia podstawowych parametrów metabolicznych przed indukcją mutacji. W 5. tygodniu po podaniu tamoksyfenu, samice zostały przeniesione do klatek metabolicznych na 4 tygodnie (od 5. do 8. tygodnia od podania związku). Co tydzień zatrzymywano program, wymieniano ściółkę i dokonywano pomiaru masy ciała i ilości spożytego pokarmu przy użyciu wagi manualnej OHAUST Scout o zakresie 0,01g. Sensory wagowe w klatkach metabolicznych ze względu na techniczne ograniczenia wynikające z konieczności braku ruchu zwierzęcia

w trakcie pomiaru, generowały znaczną liczbę błędów, co wpływało na jakość otrzymanych danych i nie zostały uwzględnione w analizie.

3.2.5 Infuzja leptyny przy użyciu pomp osmotycznych

W celu ustalenia czy otyłość i hiperfagia obserwowane u myszy *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2} mogą wynikać z zaburzeń ścieżki leptynowej, wykorzystano pompy osmotyczne firmy ALZET 2006 o pojemności 200 µl, umożliwiające stałą infuzję badanego roztworu przez 42 dni. Leptynę (Sigma, nr kat. L3772) rozpuszczono w sterylnym roztworze 20 mM Tris-HCl, pH=8.0, następnie dodano sterylny PBS, aby otrzymać końcowo stężenie 0,83 mg/ml. Następnie roztwór wprowadzono do pomp osmotycznych zgodnie z instrukcją załączoną od producenta i aktywowano pompy poprzez całonocną inkubację w 37°C w sterylnym roztworze soli fizjologicznej. Gotowe pompy wprowadzono podskórnie do myszy, by zapewnić stałą infuzję leptyny (3µg/dobę, 15 µl/h) w czasie 6 tygodni. Doświadczenie przeprowadzono na samicach w wieku 8 tygodni. Do grupy badanej wykorzystano myszy *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2}, grupę kontrolną stanowiły zwierzęta bez rekombinazy Cre (*Dicer*^{fl/fl}). Zwierzętom podano tamoksyfen i przed okresem wzrostu masy ciała tj. w 3. tygodniu mutacji, zaimplantowano podskórnie pompy osmotyczne zawierające roztwór leptyny lub nośnik (PBS). Zabieg przeprowadzono z znieczuleniem ogólnym, poprzez wziewną inhalację roztworu izofluranu (Iso-Vet). Do indukcji zastosowano 3-5% roztwór izofluranu o przepływie 0.4 l/min przez ok. 5 min następnie 1-2% w masce. Podano leki przeciwbólowe, przeciwzapalne i antybiotyk zgodnie z tabelą 3. Pompy osmotyczne wprowadzono podskórnie poprzez niewielkie nacięcie po grzbietowej stronie ciała. Ranę zespolono nićmi chirurgicznymi (Safil 4/0 igła 26mm 1/2c; szew całkowicie absorbowany wykonany z kwasu poliglikolowego). Po zabiegu zwierzęta umieszczono w indywidualnych klatkach, ze względu na cotygodniowy monitoring przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu przez kolejne 6 tygodni. Wybrane losowo osobniki z grupy *Dicer* cKO (LEP) i *Dicer* cKO (PBS) przeniesiono do klatek metabolicznych, aby dodatkowo oprócz masy ciała i poboru pokarmu, określić wpływ leptyny na parametry metaboliczne, takie jak współczynnik oddechowy RER i wydatek energetyczny. Badanie miało na celu określenie roli leptyny w rozwoju otyłości u myszy *Dicer* cKO.

3.2.6 Pobranie materiału biologicznego do badań

Osocze do dalszych analiz pobrano z korpusu poprzez dekapitację poprzedzoną uśpieniem w wziewnym roztworze izofluranu lub z lewej komory serca po uśpieniu ketaminą

i medetomidyną przez perfuzję (opisaną w rozdziale 3.6.1). Krew z korpusu po dekapitacji zebrano do probówek 1.5 ml z EDTA. Krew pobraną z serca przed perfuzją pobrano za pomocą strzykawki o objętości 1ml (dicoSULIN), przepłukanej 2% roztworem EDTA (Bioshop, nr kat. 6381-92-6). Krew przeniesiono do probówki 1.5 ml (również przepłukanej roztworem EDTA) i wirowano przez 15 minut, 3000 x g, w temperaturze 4°C. Osocze przeniesiono do czystych probówek i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy.

3.2.7 Analiza poziomu leptyny i hormonów tarczycowych

W celu określenia czy zmiany metaboliczne u myszy Dicer cKO mogą być przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu gruczołu tarczycowego, który wpływa na tempo metabolizmu, przeprowadzono analizę hormonów oceniających jego pracę. Do ilościowego określenia hormonów tarczycy z mysiego osocza, wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy testów ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – testów immunoenzymatycznych, wykrywających TSH (MyBioSource nr kat. MBS269190), fT3 (MyBioSource nr kat. MBS705057), fT4 (MyBioSource nr kat. MBS262602). Każdy zestaw zawierał płytkę 96-dółkową opłaszczoną odpowiednim przeciwciałem I-rzędowym. Dla TSH i fT4 wykonano test podwójnego wiązania tzw. test kanapkowy (ang. *sandwich ELISA*), z wykorzystaniem dwóch przeciwciał wykrywających więcej niż dwa epitopy: opłaśczonego na płytce monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko określonemu antygenowi oraz wykrywającego biotynylowane przeciwciała poliklonalne. Po odpłukaniu, dodano peroksydazę chrzanową i awidynę oraz barwny substrat dla peroksydazy. Do określenia poziomu fT3 wykorzystano immunoenzymatyczny test kompetencyjnego hamownika. W tym teście do płytki opłaśczonej pierwszorzędowym przeciwciałem wykrywającym T3, dodano biotynylowane T3. Reakcja kompetycyjnej inhibicji zachodzi pomiędzy opłaśczonym przeciwciałem z antygenem zawartym w standardzie lub próbce lub z dodanym T3 skoniungowanym z biotyną. Im większa ilość endogennej T3 w próbce, tym mniejsze wiązanie z biotynylowanym T3 i mniejszy barwny sygnał po inkubacji z substratem dla peroksydazy chrzanowej. Po dodaniu buforu Stop obserwowano zmianę koloru z niebieskiego na żółtą i mierzono absorbancje w ciągu 10 minut od zatrzymania reakcji przy długości fali 450 nm i referencyjnej 630 nm, z użyciem czytnika płytek Tecan Infinite M1000Pro z zastosowaniem oprogramowania i-Control (wersja 1.11.1.0). Testy przeprowadzono zgodnie z protokołem od producenta. Dla każdego zestawu wykonano wstępny test optymalizujący rozcieńczenie osocza i dla TSH wykonano test przy rozcieńczeniu 10-krotnym, fT3 – 2-krotnym, fT4 – 4-krotnym.

Do ilościowego pomiaru stężenia leptyny w osoczu po infuzji z użyciem pomp osmotycznych, wykorzystano zestaw z płytką 96-dołkową opłaszczoną przeciwciałem specyficznym dla mysiej leptyny (Sigma Aldrich, nr kat. RAB0034). Dodano standardy i próbki osocza rozcieńczone 10-krotnie w roztworze dołączonym do kitu. Próbki krwi pobrano tydzień, 2, 3 i 4 tygodnie od podskórnej implantacji pomp osmotycznych z leptyną lub nośnikiem (PBS). Test przeprowadzono zgodnie z zaleceniami od dostawcy. Po odpłukaniu, dodano biotynylowane przeciwciało skierowane przeciwko mysiej leptynie. Inkubowano ze streptawidyną skoniungowaną z peroksydazą chrzanową, a następnie dodano barwny produkt TMB (tetrametylobenzydynę) i po dodaniu buforu Stop mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm.

3.3 Czasowe pozbawienie pokarmu w celu indukcji genu *c-fos* w jądrze łukowatym podwzgórza

W celu określenia ekspresji genu *c-fos* w jądrze łukowatym podwzgórza podczas głodówki, wykorzystano myszy szczepu dzikiego C57Bl/6J, które pozbawiono jedzenia na początku fazy aktywnej. Analiza została przeprowadzona w kilku punktach czasowych: 1.5, 3, 6, 12 i 24 godziny od wyjęcia pokarmu. W celu określenia populacji neuronów zaangażowanych w mechanizm głodu wykorzystano transgeniczny mysi model z neuronami NPY wyznakowanymi fluorescencyjnie za pomocą białka GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*). Zwierzęta NPY-GFP podzielono na 3 grupy: kontrola z pokarmem *ad libitum*, grupa z pozbawieniem jedzenia przez 12 godzin oraz grupa z 12-godzinną głodówką, po której dodano pokarm i zmierzono ilość spożytej karmy przez godzinę (ang. *refeeding*). Następnie zwierzęta uśmiercono w celu pobrania tkanek do dalszych analiz. Sprawdzono również poziom białka c-Fos u myszy Dicer cKO z dostępem *ad libitum* do pokarmu w 4, 6 i 10 tygodni od podania tamoksyfenu w fazie aktywnej oraz nieaktywnej oraz po 24-godzinnej głodówce w 6. i 10. tygodniu mutacji. U myszy Dicer cKO monitorowano masę ciała zwierząt i tygodniowy pobór pokarmu.

3.4 Przygotowanie preparatów mikroskopowych

3.4.1 Perfuzyjne utrwalanie tkanek

Zwierzęta uśpiono przez dootrzewnowe podanie mieszaniny ketaminy z medetomidyną 15 minut przez perfuzję. Po stwierdzeniu braku odruchów, świadczących o wprowadzeniu w stan głębokiej narkozy, zwierzęta uśmiercono farmakologicznie przez podanie morbitalu

(pentobarbital sodowy 133,3 mg/ml, pentobarbital 26,7 mg/ml; Biowet, Puławy) w dawce 50 µl/mysz. Po rozcięciu klatki piersiowej, przecięciu przepony i osierdza, do lewej komory serca wprowadzono igłę perfuzyjną podpiętą do pompy perystaltycznej i przecięto prawy przedsionek. Krew wypłukano z organizmu roztworem PBS, który następnie zastąpiono 4% roztworem paraformaldehydu (PFA, Sigma Aldrich, nr kat. 158127) utrwalającym tkanki. Po zakończeniu perfuzji wyizolowano mózgi, które przeniesiono do 4% roztworu PFA na 24 godziny, a następnie do 30% roztworu sacharozy (Sigma Aldrich, nr kat. 50389).

3.4.2 Zamrażanie i uzyskanie skrawków mózgów

Wyizolowane i odwodnione w 30% roztworze sacharozy mózgi, opłukano w wodzie, osuszono i przycięto odpowiednio za pomocą ostrza z obu stron, by zachować wybrane struktury mózgu. Następnie tkankę przytwierdzono do szkiełka podstawowego na suchym lodzie za pomocą medium FSC 22 Blue (ang. *Frozen Section Compound*, Leica, nr kat. 3801481) i po zamrożeniu zatopiono w warstwie FSC, i przeniesiono do -20°C. Aby pozyskać skrawki mózgu, uprzednio zamrożoną tkankę przeniesiono do komory kriostatu (Leica, CM 1850 UV), przytwierdzono do ruchomego bloczka za pomocą FSC na płytce Peltiera. Po zamrożeniu, mózg przeniesiono na głowicę kriostatu i za pomocą zamontowanego ostrza, pocięto materiał w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 50 µm. Skrawki następnie przeniesiono do uprzednio przygotowanego medium Anti-Freeze (300 ml glicerol, 300 ml glikol etylenowy, 300 dH₂O, 100 ml buforu [0,2M] NaOH; [0,3M] NaH₂PO₄) na płytce 24-dółkowej (VWR, nr kat. 732-3217) i przechowywano w temperaturze -20°C lub do roztworu buforowanej fosforanami soli fizjologicznej (PBS, ang. *Phosphate Buffered Saline*) (BioShop nr kat PBS404.100) i przechowywano w 4 °C przed wykonaniem barwienia.

3.4.3 Detekcja białek metodą barwienia immunohistochemicznego (IHC)

W celu detekcji białek (c-Fos i rekombinazy Cre) w badanych strukturach mózgu wykorzystano kolorymetryczny system oparty na barwnej reakcji enzymu peroksydazy chrzanowej (HRP, ang. *horseradish peroxidase*) z substratem 3,3'- diaminobenzydyną (DAB, Sigma Aldrich, nr kat. D4293) (Tsang et al. 1895). Barwienie przeprowadzono metodą polegającą na wytrząsaniu skrawków na kołysce laboratoryjnej (VWR) w temperaturze pokojowej. Skrawki mózgu o grubości 50 µm umieszczono na szalce 24-dółkowej i przepłukano roztworem PBS (dwa razy po 5 minut), w celu usunięcia pozostałości medium do przechowywania. Aby zablokować działanie endogennej peroksydazy, materiał

przeplukano w roztworze PBS z metanolem (Poch) (1:1) zawierającym 0,3% nadtlenek wodoru (30% H₂O₂, Sigma Aldrich, nr kat. H1009) przez 15 minut. Następnie, aby ułatwić dostęp przeciwciał do wnętrza komórek i ich wiązanie z antygenem zastosowano permeabilizację błon komórkowych poprzez trzykrotne płukanie przez 15 minut roztworem zawierającym detergent Triton X100 (Sigma Aldrich, nr kat. X100-500ml) w PBS (0,1% PBST). Do zablokowania niespecyficznych wiązań białek użyto 5% roztworu nieaktywnej immunologicznie surowicy świńskiej (NSS, *ang. Normal Swine Serum*) (Vector, nr kat. S-4000) w 0,1% PBST. Blokowanie przeprowadzono przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu blokującego, skrawki zanurzano w roztworze poliklonalnego, króliczego przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciwko białku c-Fos (Synaptic System), rozcieńczonego 1:1000 lub rekombinazie Cre, w rozcieńczeniu 1:3000 w 5% roztworze NSS w 0,1% PBST (Tabela 3.2). Materiał inkubowano na kołyszce laboratoryjnej przez noc w temperaturze 4°C. Następnie usunięto przeciwciała pierwszorzędowe, i aby dokładnie pozbyć się nadmiaru przeciwciała niezwiązanego z antygenem, materiał przeplukano trzykrotnie przez 5 minut w roztworze 0,1% PBST. Skrawki inkubowano przez godzinę w roztworze biotynylowanego, oślego przeciwciała drugorzędowego (rozcieńczonego 1:500 w 5% roztworze NSS w 0,1% PBST), skierowanego przeciwko króliczym IgG, następnie przeplukano roztworem 0,1% PBST i dwukrotnie roztworem PBS przez 5 minut, po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę w roztworze VECTASTAIN ABC (Vector Laboratories, PK-4000). Zastosowano system ABC oparty na wiązaniu glikoproteiny awidyny (białka z jaja kurzego) z niskocząsteczkową witaminą biotyną. Jedna cząsteczka awidyny przyłącza 4 cząsteczki biotyny i stanowi łącznik pomiędzy biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym a znacznikiem – biotynylowaną peroksydazą. Po kolejnym płukaniu w roztworze 0,1% PBST i PBS (przez 5 minut), dodano substrat dla peroksydazy – DAB (3'3- diaminobenzzydina) (Sigma Aldrich, nr kat. D4293), dzięki któremu został utworzony charakterystyczny zabarwiony na brązowo produkt reakcji. Po inkubacji przez 1- 2 minuty, skrawki przeplukano dwukrotnie w wodzie i nałożono na szkiełka Superfrost (Thermo Scientific, nr kat. 631-0848). Po wyschnięciu preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym (Menzel Glaser, Thermo Scientific, nr kat. B-1220) przy użyciu entellanu ksylenowego (Merck, nr kat 107961) i analizowano w mikroskopie świetlnym (Olympus).

3.4.4 Detekcja białek metodą barwienia fluorescencyjnego (IF)

Skrawki mózgu przepłukano roztworem PBS, dwa razy po 5 minut, w celu usunięcia pozostałości medium do przechowywania. Do zablokowania niespecyficznych wiązań białek zastosowano 5% roztworu nieaktywnej immunologicznie surowicy świńskiej w 0,1% PBST. Następnie skrawki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego – poliklonalnego, króliczego skierowanego przeciwko białku c-Fos, rozcieńczonego 1:1000 w 5% roztworze NSS w 0,1% PBST (Tabela 3.2). Po odsączeniu i trzykrotnym przepłukaniu materiału w 0,1% PBST przez 5 minut, materiał inkubowano w roztworze drugorzędowego przeciwciała – VectaFluor DyLight 594, skierowanego przeciwko króliczym IgG. Fluorochrom sprzężony z przeciwciałem drugorzędowym charakteryzuje się emisją dalekiej czerwieni po wzbudzeniu światłem o długości fali 594 nm. Po przepłukaniu roztworem PBS, skrawki nałożono na szkiełka Superfrost i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą Vectashield (Vector Laboratories, nr kat H-1800), zawierającego DAPI.

Wybarwione preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus Fluoview FV3000) a do analizy obrazu zastosowano program FIJI ImageJ.

Zastosowanie	Przeciwciała	Rozcieńczenie
Przeciwciała pierwszorzędowe	królicze, poliklonalne skierowane przeciwko białku c-Fos (Synaptic System, nr kat 226 003)	1:1000 w 5% NSS/ 0,1% PBST
	królicze, poliklonalne skierowane przeciwko rekombinazie Cre (użyczono z DKFZ, Niemcy)	1:3000 w 5% NSS/ 0,1% PBST
	królicze, monoklonalne skierowane przeciwko pSTAT3(Ser727) (Invitrogen, nr kat. MA5-32089,)	1:1000 w 5% NSS/ 0,1% PBST
Przeciwciała drugorzędowe	ośle, biotynylowane, skierowane przeciwko króliczym IgG (H+L) (Vector Laboratories, nr kat. BA-1000)	1:500 w 5% NSS/ 0,1% PBST
	Alexa Fluor 488, ośle, skierowane przeciwko mysim IgG (H+L) (Invitrogen, nr kat. A32723)	1:100 w 5% NSS/ 0,1% PBST
	Alexa Fluor 405, ośle, skierowane przeciwko króliczym IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific, nr kat. A31556,)	1:100 w 5% NSS/ 0,1% PBST
	VectaFluor DyLight 594, skierowane przeciwko króliczym IgG (Vector, nr kat. DI-1794)	Gotowe do użycia

Tabela 3.2 Przeciwciała stosowane do barwienia immunohistochemicznego i fluorescencyjnego.

3.5 Optogenetyczna stymulacja jądra łukowatego

Optogenetyka wykorzystuje światłoczułe białka – opsyny do aktywacji lub zahamowania aktywności komórkowej. W projekcie wykorzystano ChR2 (ang. *channelrhodopsin-2*) - opsynę aktywującą potencjały czynnościowe po stymulacji światłem. W celu wprowadzenia ChR2 do neuronów oreksygenicznych neuronów podwzgórza odpowiedzialnych za pobór pokarmu (AgRP), wykorzystano zwierzęta transgeniczne oparte na systemie Cre-loxP. Po skrzyżowaniu dwóch linii transgenicznych Ai32(RCL-ChR2(H134R)/EYFP) z linią AgRP-Cre, otrzymano linię, gdzie dochodzi do ekspresji ChR2 w neuronach AgRP zlokalizowanych w jądrze łukowatym podwzgórza. Do grupy badanej wykorzystano zwierzęta z aktywną rekombinazą Cre (Cre⁺) z ekspresją *ChR2* w neuronach AgRP. Do grupy kontrolnej użyto zwierząt bez

rekombinazy Cre (Cre-), u których nie doszło do wycięcia kasety STOP i ekspresji *ChR2*. ChR2 jest światłoczułym kanałem wapniowym, którego aktywacja następuje po ekspozycji na światło o długości fali w zakresie światła niebieskiego (450-490 nm). Światło niebieskie zostało wygenerowane przez laser i dostarczone do ARC za pomocą zaimplantowanego światłowodu według protokołu zaprogramowanego przy użyciu Arduino. Doświadczenie przeprowadzono w celu aktywacji głodu poprzez stymulację neuronów oreksygenicznych u najedzonych zwierząt oraz w celu określenia poziomu białka c-Fos w badanej strukturze w punktach czasowych: 1.5, 3 i 6 godzin po stymulacji optogenetycznej.

3.5.1 Przygotowanie implantu optogenetycznego

Implant optogenetyczny przygotowano poprzez przycięcie włókna szklanego (0.39 NA, Ø200 µm) zespolonego z ceramiczną skuwką (LC, 1.25 mm, O230 µm) (Stecker/Connector – LSH/APC 125.2 µm+0.5v-C0.5 µm sb, RiM), za pomocą nożyka diamentowego (THORLABS) na papierze milimetrowym na długość 5,5 mm. Włókno wprowadzono do metalowego gwintu (<http://www.specialtech.pl/>) o długości 1 cm komplementarnego do końcówki światłowodu (FC). Włókno przyklejono dwuskładnikowym klejem epoksydowym (Chemtronics). Moc implantu sprawdzono miernikiem mocy (THORLABS) i do doświadczenia wykorzystano implanty, których moc wynosiła nie mniej niż 70% mocy zadanej na laserze. Gotowe implanty pozostawiono na 24 godziny do wyschnięcia. Końcówkę implantu oczyszczono izopropanolem, a cały implant poddano sterylizacji światłem UV.



Rycina 3.1 Przygotowanie implantu optogenetycznego.

3.5.2 Implantacja światłowodu

Do doświadczenia wykorzystano podwójnie transgeniczną linię zwierząt AgRP-Ai32, dzięki której otrzymano stabilną ekspresję ChR2 w neuronach oreksygenicznych AgRP. Zabieg przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym po dootrzewnowym podaniu mieszaniny ketaminy z medetomidyną. Po wejściu w narkozę, myszy zaaplikowano mieszaninę leków o charakterze przeciwbólowym, przeciwzapalnym i antybiotyku (Butomidor, Tolfedine, Baytril) zgodnie z tabelą 3.4. Sierść z głowy usunięto za pomocą maszynki elektrycznej. Po sprawdzeniu braku odruchów świadczących o głębokiej anestezji, zwierzę unieruchomiono w aparacie stereotaktycznym. Skórę na czaszce zdezynfekowano jodyną. W miejscu nacięcia podskórne podano dodatkowy środek przeciwbólowy o przedłużonym działaniu – bupiwakainę. Wykonano około 1-cm nacięcie skóry by wyeksponować punkty orientacyjne na czaszce: bregmę i lambdę. Następnie przy użyciu igły sprawdzono ustawienie czaszki w płaszczyźnie przednio-tylnej i w odległości 1 cm od szwu na wysokości ARC z prawej i lewej strony. Za prawidłowe uznano, gdy różnica w wysokości nie przekraczała $\pm 0,05$ mm. Następnie wykonano 3 otwory w czaszce używając wiertła (JOTA AG, nr kat. C1.RA.006): jeden nad ARC do wprowadzenia implantu i dwa otwory z przodu i z tyłu od implantu na śrubki mocujące (1x2mm) (AGNTHO'S AB). Implant wprowadzono do trzeciej komory nad jądrem łukowatym zgodnie z koordynatami wg atlasu Paxinosa: AP: -1,46 mm; ML: 0,00 mm; DV: -5,50 mm. Całość pokryto cementem dentystycznym (Duracryl Plus, SpofaDental) i pozostawiono do utwardzenia na 10 minut. Następnie nacięcie w skórze zespolono nićmi chirurgicznymi Safil (4/0 igła 26mm 1/2c; szew całkowicie absorbowany wykonany z kwasu poliglikolowego). Zwierzę przeniesiono do czystej klatki i pozostawiono na płytce grzejnej do całkowitego wybudzenia. Po okresie rekonwalescencji trwającej 2 tygodnie, mysz poddano procedurze oszwajania przed przystąpieniem do właściwego doświadczenia.



Rycina 3.2 Stereotaktyczna implantacja światłowodu do stymulacji optogenetycznej jądra łukowatego myszy z ekspresją ChR2.

Środek	Sposób podania	Dawka
Ketamina 100 mg/ml (Biowet Puławy)	Dootrzewnowo 0.5ml/kg	50-75 mg/kg
Cepetor (chlorowodorek medetomidyny) 1mg/ml (CP Pharma)	Dootrzewnowo 0.5ml/kg	0.5-1 mg/kg
Bupivacainum hydrochloridum WZF 0,5% (Polfa Warszawa)	Podskórnice (miejscowo) 0.25%	100μl
Iso-Vet (Izofluran) 1000 mg/g (Channele Pharma)	Wziewnie	3-5% przepływ 0.5 L/min, indukcja 4% w tlenie, podtrzymanie ~2% w tlenie
Atipam (chlorowodorek atipamezolu) 5mg/ml (Eurovet)	Dootrzewnowo 0.5ml/kg	0,5-1 mg/kg
Środki o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i bakteriobójczym		
Środek	Sposób podania	Dawka
Butomidor (butorfanol winianu) 10mg/ml (Orion)	Podskórnice (3x rozcieńczony w 0,9% NaCl)	3.3 mg/kg
Baytril (enrofloksacyna) 25mg/ml (Bayer)	Podskórnice (20x rozcieńczony w 0,9% NaCl)	1.25 mg/kg
Tolfedine (kwas tolfenamowy) 40mg/ml (Vetoqinol Polska)	Podskórnice (20x rozcieńczony w 0,9% NaCl)	2 mg/kg

Tabela 3.3 Produkty lecznicze stosowane podczas zabiegów operacyjnych.

3.5.3 Fotostymulacja

Przed właściwym doświadczeniem przyzwyczajano zwierzęta do klatki doświadczalnej przez 10 minut dziennie oraz zakładania światłowodu. W dniu doświadczenia zwierzę przeniesiono do klatki eksperymentalnej z dostępem *ad libitum* do pokarmu. Następnie jeden koniec światłowodu (200/220/900-0.37_1.5m_FC-CM3 Mono Fiberoptic Patchcord, Doric Lences Inc) podpięto do implantu zamocowanego w czaszce, drugi podłączono do lasera (PSU-H-LED, Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd) ustawionego na moc 10 mW. Eksperyment przeprowadzono w trzech sesjach: sesja #1: 30 min bez stymulacji; sesja #2: 30 min stymulacji optogenetycznej; sesja #3: 30 min bez stymulacji. Rejestrowano pobór pokarmu po każdej sesji. Stymulację optogenetyczną przeprowadzono za pomocą lasera, generującego światło niebieskie na podstawie protokołu zaprogramowanego przez Arduino Uno: częstotliwość 10 Hz, puls 15 ms, stymulacja 30 s, przerwa 30 s zapętlone przez 30 min. Po 3. sesji zwierzę przeniesiono do klatki domowej. Następnie w odpowiednim punkcie czasowym: 1,5 godziny, 3 lub 6 godzin po stymulacji, zwierzę uśpiono przy użyciu mieszanki ketaminy z medetomidyną i uśmiercono przez podanie morbitalu przed przystąpieniem do perfuzji w celu analizy obecności białka c-Fos w jądrze łukowatym podwzgórza.

3.6 Technika CRISPR-Cas9 wykorzystana do wyciszenia genu *c-fos*

W projekcie wykorzystano transgeniczne zwierzęta z indukowalną ekspresją Cas9-EGFP zlokalizowaną w locus *Rosa26* i zaprojektowano guideRNA komplementarne do sekwencji w pierwszym egzonie genu *c-fos*. Za pomocą PCR wklonowano zaprojektowane guideRNA do plazmidu, który następnie wykorzystano do produkcji wektorów wirusowych AAV. Wektory wirusowe po sprawdzeniu *in vitro*, wprowadzono miejscowo do badanej struktury mózgu myszy z ekspresją *Cas9-EGFP*, w celu precyzyjnego cięcia DNA w zaprojektowane miejsca i uruchomieniu mechanizmów naprawczych NHEJ powodujących miejscowe wyciszenie genu *c-fos*.

3.6.1 Projektowanie guideRNA

W celu wyciszenia genu *c-fos* przy użyciu technologii CRISPR-Cas9 zaprojektowano cząsteczki guideRNA, które zgodnie z zasadą komplementarności łączą się z DNA genu *c-fos* i wskazują miejsce cięcia PAM o sekwencji NGG. Do zaprojektowania guideRNA wykorzystano narzędzie komercyjnie dostępne na stronie www.benchling.com/ i zaznaczono

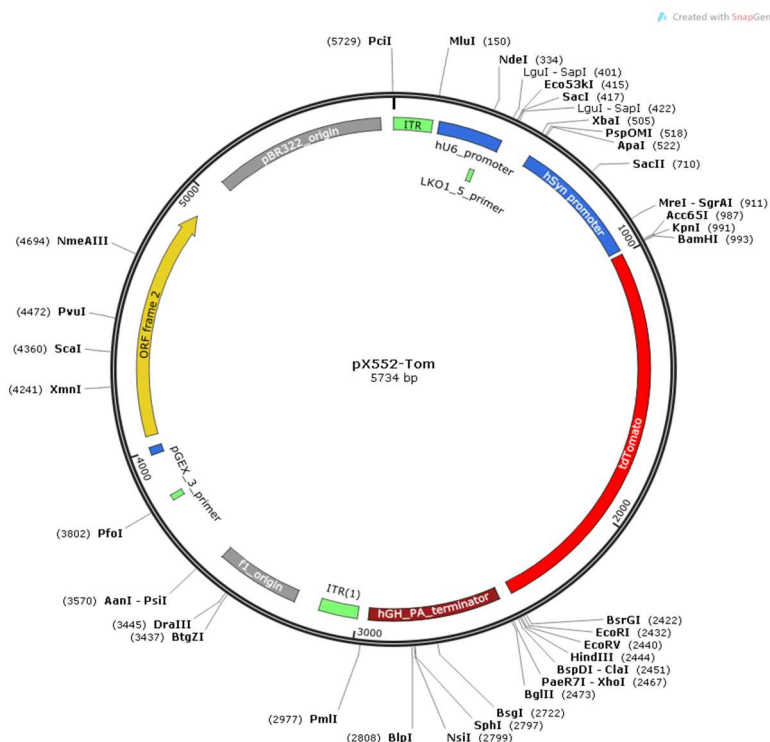
sekwencję nukleotydową znajdującą się w pierwszym egzonie genu *c-fos*:

ATGATGTTCTCGGGTTTCAACGCCGACTACGAGGCGTCATCCTCCCGCTGCAGTA
GCGCCTCCCCGGCCGGGGACAGCCTTTCCTACTACCATTCCCCAGCCGACTCCTTC
TCCAGCATGGGCTCTCCTGTCAACACACAGG.

Dla zadanej sekwencji, otrzymano listę wiodących cząsteczek RNA oraz ocenę każdej cząsteczki pod kątem efektywności wyciszania genu *c-fos* oraz tworzenia niespecyficznych mutacji (z ang. *off-target*). Do kolejnych etapów wybrano 4 sekwencję sgRNA:

guideRNA	Sekwencja PAM	off-target
#1	GGGTTTCAACGCCGACTACG AGG	98.7
#2	GGAGGATGACGCCTCGTAGT CGG	95.3
#3	GCGCGGTCACTGCTCGTTCG CGG	96
#4	TTGCTCGCTGCAGTCGCGGT TGG	95

Zaprojektowane sekwencje guideRNA wprowadzono do plazmidu px552-Tom, który następnie wykorzystano do produkcji rekombinowanych wektorów wirusowych AAV o serotypie mozaikowym 1/2, wykazującym tropizm do komórek nerwowych. Plasmid pX552-Tom zawiera sekwencje ITR służące do integracji fragmentu genu do wektora wirusowego, białko czerwonej fluorescencji (tdTomato), które umożliwia lokalizację komórek niosących sgRNA pod neurospecyficznym promotorem ludzkiej Synapsyny 1. Ekspresja guideRNA regulowana jest przez promotor U6.



Rycina 3.3 Mapa plazmidu pX552-Tom do produkcji wektorów wirusowych AAV (SnapGene), wykorzystanego do wprowadzenia zaprojektowanego guideRNA; sekwencje ITR służące do wprowadzenia fragmentu genu do wektora wirusowego, hU6 – ludzki promotor U6; hSyn ludzki neurospecyficzny promotor; tdTomato- białko czerwonej fluorescencji; hGH_PA_terminator translacji.

3.6.2 Klonowanie CRISPR-Cas9 guideRNA do wektora pX552-Tom

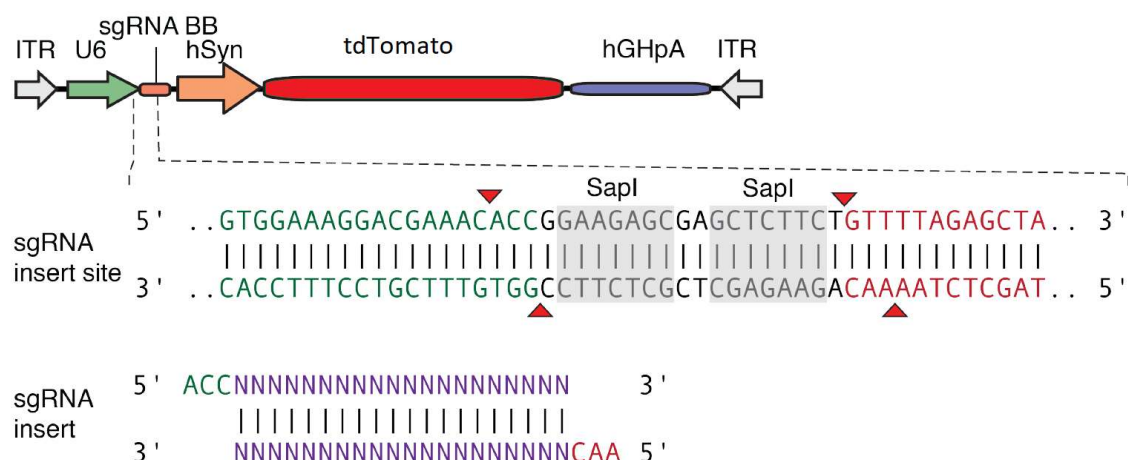
W celu wprowadzenia guideRNA do konstruku genetycznego, wykorzystano zmodyfikowaną formę oryginalnego protokołu z laboratorium Zhenga. Początkowo wykonano trawienie restrykcyjne wyjściowego plazmidu pX552-Tom (Addgene, nr kat. 60958) za pomocą enzymu restrykcyjnego SapI (Thermo Scientific, nr kat. 10705081) w celu powstania tzw. „lepkich końców”:

Składniki mieszaniny reakcyjnej Objętość (μl)

Plasmid pX552-Tom (1360 ng/μl):	5
10x Bufor FastDigest:	2
Enzym FastDigest SapI:	1
Sterylna woda	12
Objętość końcowa	20

Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 1 godzinę, a następnie wykonano elektroforezę na żelu agarozowym 0.7%. Prążek wycięto i oczyszczono za pomocą komercyjnie dostępnego

zestawu do oczyszczenia z żelu agarozowego QIAquick GelExtraction Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją od producenta. Elucji dokonano w 30 µl buforze elucyjnym.



guideRNA #1:

cfos_g1_F 5'-ACCGGGTTTCAACGCCGACTACG-3'

cfos_g1_R 5'-AACCGTAGTCGGCGTTGAAACCC-3'

guideRNA #2:

cfos_g2_F 5'-ACCACTACGAGGCGTCATCCTCC-3'

cfos_g2_R 5'-AACGGAGGATGACGCCTCGTAGT-3'

guideRNA #3:

cfos_g3_F 5'-ACCGCGCGGTCCTGCTCGTTTCG-3'

cfos_g3_R 5'-AACCGAACGAGCAGTGACCGCGC-3'

guideRNA #4:

cfos_g4_F 5'-ACCGTTGCTCGCTGCAGTCGCGGT-3'

cfos_g4_R 5'-AACACCGCGACTGCAGCGAGCAAC-3'

guideRNA_scramble

scr_F 5'-ACCGCACTACCAGAGCTAACTCA-3'

scr_R 5'-AAGTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC-3'

Rycina 3.4 Miejsce wprowadzenia wstawki pod promotorem U6 na plazmidzie pX552-Tom z uwzględnieniem miejsca cięcia restrykcyjnego za pomocą enzymu SapI. Poniżej schemat projektowania 20-nukleotydowych sekwencji starterów kodujących guideRNA wykorzystane do wyciszenia genu *c-fos*.

Zaprojektowano i zsyntetyzowano krótkie sekwencje oligonukleotydowe (Genomed) niosące sekwencje kodujące guideRNA celujące w pierwszy egzon genu *c-fos*. Jako kontrolę wykorzystano sekwencję *scramble* zaprojektowaną przez Andrija Domanskyi z Uniwersytetu Helsińskiego i wprowadzoną do wektora wirusowego przez dr Gabrielę Olech-Kochańczyk w Instytucie Nenckiego. Startery zawieszono w stężeniu 100 μM w buforze zawierającym 10 mM TRIS, pH=8,5. Reakcja przyłączenia oligonukleotydów dla par starterów została wykonana w końcowej objętości 10 μl :

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
Starter c-fos_F (100 μM)	1
Starter c-fos_R (100 μM)	1
10x T4 Bufor do ligacji	1
Sterylna H_2O	7
Objętość końcowa	10

Reakcję wykonano w termocyklerze Eppendorf w następujących warunkach:

95°C 5 min

Spadek temperatury do 25°C w tempie 0,1°C/s

4°C ∞

Przed ligacją, dupleksy oligonukleotydów rozcieńczono 1:50 w buforze do elucji (5 mM TRIS, pH=8,5). Z użyciem zestawu T4 DNA Ligase Master Mix (Thermo Scientific, nr kat IVGN2104), przygotowano mieszaninę ligacyjną w łącznej objętości 10 μl :

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
Plasmid pX552-Tom_SapI (~50-100 ng)	3
Dupleksy oligonukleotydów	1
10x T4 Bufor do ligacji	1
T4 Ligaza DNA:	1
Sterylna woda	4
Objętość końcowa	10

Mieszaninę ligacyjną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 minut, a następnie plazmid wprowadzono do bakterii kompetentnych Stbl3 (Invitrogen, nr kat. C737303) poprzez dodanie 3 µl mieszaniny ligacyjnej do 30 µl bakterii. Bakterie inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie transformowano przy użyciu szoku termicznego przez 30 s w 42°C (Thermomixer Eppendorf). Po dodaniu 1 ml pożywki SOC (Thermo Scientific, nr kat. 15544034), bakterie wytrząsano przez godzinę w temperaturze 37°C i wysiano 10% hodowli bakterii na 10 cm szalki Petriego (VWR, nr kat. 391-0561) z 10% podłożem agarozowym (BioShop, nr kat. AGA001.500), z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego – ampicyliny (BioShop, nr kat. AMP201.25) w stężeniu 100 µg/ml. Szalki inkubowano przez noc w cieplarni w 37°C.

3.6.3 Izolacja plazmidowego DNA

Po nocnej inkubacji na stałym podłożu z antybiotykiem selekcyjnym z każdej szalki wybrano po 3-5 kolonii bakterii do izolacji plazmidu na małą skalę. Bakterie inkubowano z wytrząsaniem (~10h; 37°C; 200 rpm) w małej objętości LB (5 ml) z ampicyliną w probówkach typu Falcon o objętości 15 ml (Genoplast, nr kat. G66010522). Następnie izolowano plazmid przy użyciu zestawu QIAprep Spin Mini Prep Kit (Qiagen, nr kat. 27104) na kolumnkach zgodnie z załączonym protokołem. Wyizolowane DNA z hodowli bakteryjnych poddano sekwencjonowaniu w firmie Genomed z użyciem startera przyłączającego się do promotora U6 o następującej sekwencji:

U6_F: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTC-3'

Po sprawdzeniu zgodności wprowadzonych sekwencji, wykonano izolację plazmidów na dużą skalę w objętości 500 ml hodowli LB z ampicyliną z użyciem zestawu EndoFree Maxi Prep (Qiagen, nr kat. 12362) zgodnie z instrukcją od producenta. Plazmidy zawierające guideRNA: pX552-gRNA1-Tom, pX552-gRNA2-Tom, pX552-gRNA3-Tom, pX-552-gRNA4-Tom oraz plazmidy pomocnicze do produkcji wektorów wirusowych zawieszono w 100 µl buforu do elucji.

3.6.4 Produkcja wektorów wirusowych rAAV

Zestaw plazmidów do produkcji wektorów wirusowych AAV Helper-free System (Agilent, nr kat. 240071) umożliwia produkcję wirionów AAV, który nie wymaga obecności wirusa pomocniczego. W tym systemie większość genów adenowirusowych niezbędnych do wytworzenia cząsteczek infekcyjnych (geny E2A, E4 oraz VA RNA), genów kodujących białka

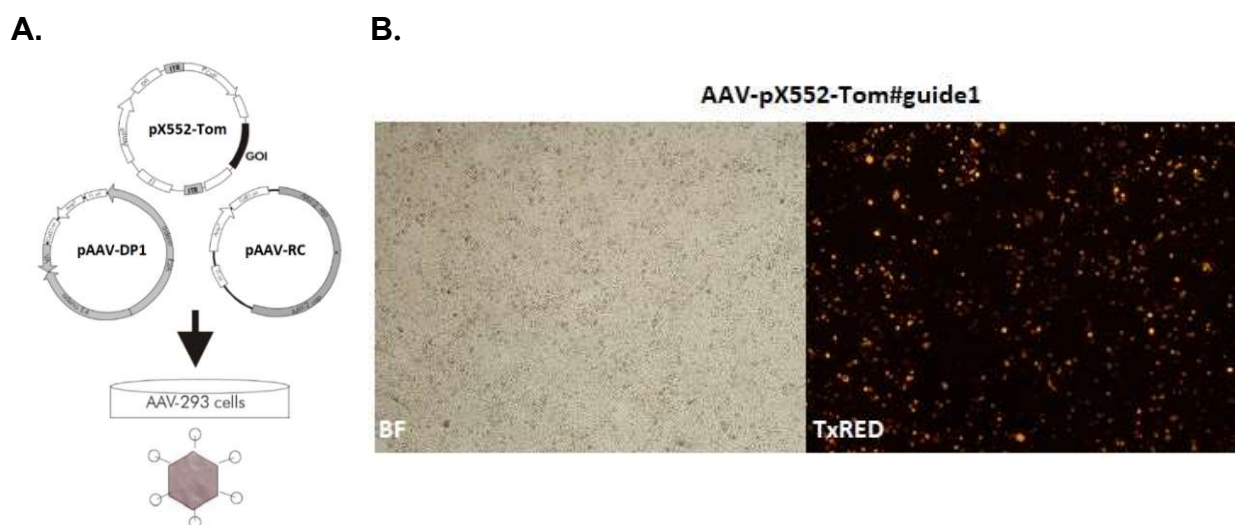
kapsydu serotypu AAV1 oraz gen kodujący białko czerwonej fluorescencji RFP (ang. *red fluorescent protein*) pochodzi od plazmidu pomocniczego pDP1(23700 pz). Drugi plazmid składowy pRC (7300 pz) zawiera geny *rep* i *cap* kodujące odpowiednio geny niezbędne do replikacji oraz białka kapsydu, które ulegają ekspresji z oddzielnej sekwencji promotorowej i pochodzą od serotypu AAV2. Oba plazmidy pomocniczne są wprowadzane podczas transfekcji do komórek HEK 293. Linia komórkowa HEK 293 (ang. *Human Embryonic Kidney*) jest to ludzka linia uzyskana z komórek embrionalnych nerki, zapewniającą stabilną ekspresję genów E1A, E1B, zapewniającą składanie cząsteczek wirusowych. Dzięki wyeliminowaniu konieczności ko-transfekcji z żywym wirusem pomocniczym, system stał się lepszą i bezpieczniejszą alternatywą (w porównaniu z adenowirusami lub retrowirusami) do wprowadzania genów. AAV-2 typu dzikiego zawiera geny *rep* i *cap*, oflankowane sekwencjami ITR w konfiguracji *cis*. W zrekombinowanym systemie geny *rep* i *cap* zostały usunięte z wektora wirusowego zawierającego ITR i wprowadzone do plazmidu pRC w konfiguracji *trans*. Usunięcie genów *rep* i *cap* umożliwiło wprowadzenie dowolnej wstawki genowej o wielkości do 3 tysięcy par zasad pomiędzy sekwencje ITR konstrukt do rekombinacji rAAV. Wektory wirusowe AAV infekują komórki zarówno dzielące, jak i niedzielące się, jednocześnie minimalizując odpowiedź ze strony układu odpornościowego. System umożliwia produkcję zrekombinowanych wektorów w zakresie miana 10^7 - 10^{12} cząstek wirusa w ml. Wektory wirusowe AAV zapewniają długoterminową ekspresję wprowadzonego genu, dzięki naturalnym mechanizmom AAV do replikacji epichromosomalnej. Komórki niedzielące się lub charakteryzujące się wolnymi podziałami wykazują stabilną ekspresję, z kolei komórki o szybkich podziałach z uwagi na działanie epichromosomalne i rzadką integrację z genomem mogą z czasem stracić ekspresję transgenu.

W niniejszej pracy do wprowadzenia wstawki wykorzystano plasmid pX552-Tom, gdzie pomiędzy sekwencje ITR wklonowano zaprojektowane guideRNA (gRNA1, gRNA2, gRNA3, gRNA4), służące do wyciszenia genu *c-fos*.

3.6.5 Izolacja wektorów wirusowych AAV z hodowli komórkowej HEK 293

Wszystkie etapy produkcji cząstek wirusowych wykonano pod komorą laminarną w pomieszczeniu przystosowanym do pracy z wektorami wirusowymi. Komórki HEK 293 rozmrożono w łaźni wodnej (Julabo, TW8) nastawionej na temperaturę 37°C i zawartość fiolki przeniesiono do pożywki hodowlanej DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Merck Life Science, nr kat. 6429) o podwyższonej zawartości glukozy (4500 mg/L),

zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*) (Biowest, nr kat. 5181H-500) i 2% L-glutaminy (Gibco, nr kat. A29168-01). Komórki zwirowano przez 5 minut, 1000 rpm, w temperaturze pokojowej (wirówka Sigma 2-16K PolyGen;), a osad komórkowy zawieszono w 20 ml pożywki hodowlanej. Całość wysiano na butelkę 175 cm² (Greiner, nr kat. 660175) i umieszczono w inkubatorze (Binder) w temperaturze 37°C i 5% stężeniu CO₂ na 3 dni. Po osiągnięciu 50% konfluencji, komórki przepłukano PBS (Biowest, nr kat. L0615-500) i dodano 3 ml trypsyny (Biowest, nr kat. L0940-500). Następnie inaktywowano trypsynę poprzez dodanie pożywki z FBS i zwirowano przez 5 min, 1000 rpm, w temperaturze pokojowej. Osad komórkowy zawieszono w pożywce do hodowli i przeniesiono do 5 butelek 175 cm². Po osiągnięciu 50% konfluencji (około 3 dni) komórki pasażowano na 10 dużych szalek hodowlanych 150 x 25 mm (Falcon, nr kat 734-0013) w 15 ml pożywki. Po osiągnięciu konfluencji (~70%) wykonano transfekcję. Przed transfekcją komórkom wymieniono pożywkę zawierającą niższe stężenie FBS (2% FBS, 2 % L-glutaminy). Sporządzono mieszaninę transfekcyjną zawierającą plazmidy składowe pDP1, pRC oraz plazmid niosący sgRNA pX-552-Tom_guide#1-4 w pożywce DMEM w stosunku molowym 1:1:1, zawierającej łącznie 50 µg DNA na płytkę. Do mieszaniny dodano polietylenoiminy, PEI (1mg/ml) (Sigma-Aldrich, nr kat. 919012) przy współczynniku R=3 (stosunek µl PEI przez µg DNA), zaklejono probówkę parafilmem i inkubowano w łaźni wodnej przez 20 minut w temperaturze 37°C, a następnie nakropiono na komórki. Po 5 godzinach inkubacji dodano równoważną objętość pożywki o wyższej zawartości FBS (18 % FBS, 2 % L-glutaminy) i pozostawiono na kolejne 3 dni w inkubatorze.



Rycina 3.4 (A) Schemat transfekcji komórek HEK 293 przy użyciu składowych plazmidów do produkcji wektorów wirusowych AAV. Plazmid pX552-Tom wykorzystany do rekombinacji fragmentu genu GOI (ang. *gene of interest*) zlokalizowanym pomiędzy sekwencjami ITR; pAAV-DP1 – plazmid pomocniczy zawierający geny adenowirusa E4 i E2A; pAAV-RC- plazmid niosący geny *rep* i *cap* zawierające

informację dotyczącą replikacji wirusa i geny kapsydu. **(B)** Zdjęcia przedstawiają obraz mikroskopowy po transfekcji HEK 293 składowymi do produkcji wektorów wirusowych AAV. Na powierzchni komórek widoczne charakterystyczne pęcherzyki (po lewej stronie), po prawej białko czerwonej fluorescencji RFP pochodzące z plazmidu pDP1. Oba obrazy świadczą o prawidłowym składaniu wirusa. BF (ang. *bright field*) – jasne pole, TxRed (ang. *texas red*) – czerwień teksańska.

Po sprawdzeniu wydajności transfekcji w mikroskopie fluorescencyjnym, wykonano lizę komórkową w obecności 10% deoksycholanu sodu (Sigma Aldrich, nr kat. D6750-100g). W tym celu do próbówki typu Falcon o objętości 50 ml, zebrano komórki z 5 szalek przy użyciu skrobaczki do kultur komórkowych (Corning, nr kat. 3008). Po zwirowaniu komórki (8 min; 1000 rpm; temperatura pokojowa), do osadu dodano bufor do lizy (5 ml/szalkę, łącznie 25 ml), a następnie dodano deoksycholan sodu (0,25 ml/szalkę, łącznie 1,25 ml). Następnie dodano benzonazę (1 μ l/szalkę; łącznie 5 μ l) (Sigma Aldrich, nr kat. E1014-25KU). Próbówkę uszczelniono parafilmem i inkubowano w łaźni wodnej w 37°C przez godzinę. Po inkubacji osad wirowano (15 min/3000 x g; w temperaturze pokojowej), a supernatant przelano do czystych próbówek typu Falcon i przechowano do momentu izolacji. W dniu izolacji rozmrożono supernatant w łaźni wodnej w 37°C do całkowitego rozpuszczenia i zwirowano przez 25 minut 3000 x g w temperaturze pokojowej. Następnie supernatant przefiltrowano przez 3 rodzaje filtrów zaczynając od filtra 0,8 μ m (Rotilabo, nr kat. P820.1), 0,45 μ m (Rotilabo, nr kat. KH55.1) i 0,22 μ m (Rotilabo, nr kat. KH54.1). Do pompy perystaltycznej (Leadfluid, YZ15) zamontowano silikonowe wężyki i podłączono kolumnę heparynową (HiTrap Heparin HP, Cytiva, nr kat 17-0406-01). Następnie aktywowano złożę poprzez przepłukanie 10 ml buforu #1 (Tabela 3.4). Przefiltrowany supernatant przepuszczono przez kolumnę heparynową, po czym przesączono 20 ml buforu płuczącego #2. Następnie kolumnę odłączyło od pompy i kolejne etapy przeprowadzono przez przepuszczanie przez kolumnę przy użyciu strzykawki (o objętości 5 ml) 1 ml buforu #3 i 1 ml buforu #4. Elucji wirusa z kolumny dokonano do czystej próbówki typu Falcon poprzez przepuszczenie, za pomocą strzykawki 1,5 ml buforu #5, 3 ml buforu #6 i 1,5 ml buforu #7. Eluat zagęszczono przy użyciu próbówki wirówkowej Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, nr kat. C7719) zawierającą membranę celulozową 50,000 NMWL. Wirowano do momentu uzyskania 50-100 μ l wirusa AAV, który rozpipetowano po 5 μ l do probówek 0,2 ml i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu użycia.

Nazwa	Skład buforu
Bufor #1 do lizy i zrównoważenia kolumny; pH=8.0; 1L	20 mM TRIS 150 mM NaCl
Bufor płuczający #2; pH=8.0, 200 ml	20 mM TRIS 100 mM NaCl
Bufor płuczający #3; pH=8.0; 50 ml	20 mM TRIS 200 mM NaCl
Bufor płuczający #4 pH=8.0; 50 ml	20 mM TRIS 300 mM NaCl
Bufor elucyjny #5; pH=8.0; 50 ml	20 mM TRIS 400 mM NaCl
Bufor elucyjny #6; pH=8.0; 50 ml	20 mM TRIS 450 mM NaCl
Bufor elucyjny #7; pH=8.0; 50 ml	20 mM TRIS 500 mM NaCl

Tabela 3.4 Bufory stosowane do produkcji wektorów wirusowych AAV.

3.6.6 Oznaczanie miana wirusa metodą qPCR

Oznaczenie miana wektorów wirusowych AAV wykonano za pomocą qPCR (ang. *quantitative PCR*), polegającym na amplifikacji fragmentu genu o długości 90 pz, określonego przez zaprojektowane startery zlokalizowane w rejonie polyA:

PolyA_F: 5'-AGTTGTTGGGATTCCAGGCATGC-3'

PolyA_R: 5'-ACCAGCCTGGCCAATATGGTGAA-3'

Do krzywej standardowej wykorzystano wyjściowy plazmid pX555-Tom (5750 pz), gdzie na podstawie jego wielkości (dla jednonicowego wirusa AAV wielkość plazmidu podzielono przez 2 otrzymując 2875 pz) i stężenia, obliczono liczbę kopii materiału korzystając z kalkulatora (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>): $2,32 \times 10^{11}$. Do wykonania krzywej standardowej wykonano szereg rozcieńczeń 10-krotnych plazmidu wykorzystanego do produkcji wirusów: 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1: 100 000, 1:1 000 000, 1:10 000 000. Do

określenia miana, wykonano serię rozcieńczeń każdego wirusa i do analizy wykorzystano: 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, 1:000 000. Reakcję przeprowadzono z użyciem odczynnika SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4367659) w końcowej objętości 20 µl/ dołek:

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość
SYBR Green	10 µl
Starter polyA_F (10 µM)	1 µl
Starter polyA_R (10 µM)	1 µl
Matryca DNA	1 µl
Sterylna woda	7 µl
Objętość końcowa	20 µl

Na płytkę 96-dółkową (Applied Biosystems) nakładano po 2 powtórzenia wzorca i po 3 powtórzenia każdego rozcieńczenia wirusa. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze StepOnePlus (Applied Biosystems) w warunkach:

Etap	Temperatura i czas trwania
Wstępna denaturacja	95°C, 5:00 min
Denaturacja	95°C, 0:20 min
Przylączenie starterów	60°C, 0:40 min
Elongacja	72°C, 1:00 min
x 40 cykli	
Etap krzywej topnienia	95°C, 0:15 min
	60°C, 1:00 min
	95°C, 0:15 min

Wyniki zostały opracowane przy użyciu oprogramowania StepOne. Miano wirusów wyliczono na podstawie krzywej standardowej. Do obliczeń użyto średnich wartości z 3 powtórzeń rozcieńczeń wirusów. Miano wirusa podano w gc/µl (gc, ang. *genome copies*):

AAV-sgRNA1-Tom $4,82 \cdot 10^9$ gc/µl

AAV-sgRNA2-Tom $7,77 \cdot 10^9$ gc/µl

AAV-sgRNA3-Tom $7,56 \cdot 10^9$ gc/ μ l

AAV-sgRNA4-Tom $8,48 \cdot 10^9$ gc/ μ l

AAV-AgRPCre $1,34 \cdot 10^{10}$ gc/ μ l

AAV-CaMKII α Cre $1,50 \cdot 10^9$ gc/ μ l

3.6.7 Transdukcja hodowli neuronalnej wektorami wirusowymi rAAV oraz indukcja ekspresji genu *c-fos*

Do sprawdzenia wyciszającego efektu systemu CRISPR-Cas9 *in vitro* wykorzystano pierwotne hodowle hipokampalne pozyskane z osesków myszy transgeniczných z Cre-zależną ekspresją genu *Cas9-EGFP*. Hodowla została założona na szklanych szkiełkach umieszczonych na dnie szalki 12-dółkowej. W każdym dołku wysiano 120 000 komórek. Hodowlę neuronalną pozyskaną z osesków myszy *Cas9-EGFP* zainfekowano wektorami wirusowymi AAV tydzień po założeniu hodowli. Mieszaninę wektorów wirusowych przygotowano w 100 μ l pożywki Neurobasal-A (Thermo Scientific, nr kat. 10888022) przy MOI = 1000 (ang. *multiplicity of infection*), co oznacza, że na jedną komórkę nerwową przypada 1000 cząstek wirusowych. Do transdukcji wykorzystano wektory wirusowe AAV niosące rekombinazę Cre pod neurospecyficznym promotorem CaMKII α (AAV-CaMKII α -Cre) w połączeniu z wektorami rAAV kodującymi zaprojektowane sekwencje guideRNA wyciszające gen *c-fos*: AAV-gRNA1-Tom (w skrócie g1), AAV-gRNA2-Tom (g2), AAV-gRNA3-Tom (g3), AAV-gRNA4-Tom (g4) pojedynczo i w wybranych mieszaninach AAV-gRNA1/2-Tom (g1/2) i AAV-3/4-Tom (g3/4) oraz wektor kontrolny AAV-scr-Tom (scr), który nie jest komplementarny do genomowego DNA. Po 3 dniach oceniano poziom ekspresji *Cas9-EGFP* oraz skuteczność transdukcji wektorami wirusowymi, przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Po tygodniu pierwotną hodowlę neuronalną stymulowano za pomocą 30 mM KCl w celu indukcji ekspresji genu *c-fos* i określenia wyciszającego efektu systemu CRISPR-Cas9. Po godzinnej inkubacji (37°C, 5% CO₂), izolowano RNA z hodowli w celu sprawdzenia poziomu transkryptu genu *c-fos* poprzez sondy TaqMan.

3.6.8 Izolacja RNA

RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji RNEasy Mini Kit (Qiagen, nr kat. 74104) na kolumnkach, zgodnie z instrukcją od producenta. Izolację RNA przeprowadzono

pod komorą laminarną oczyszczoną z RNaz za pomocą RNaseZAP (Sigma Aldrich, nr kat. R2020). RNA izolowano w wodzie wolnej od RNaz w objętości 30 μ l. Stężenie RNA zmierzono używając spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific) i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.6.9 Odwrotna transkrypcja

Wyizolowane RNA zostało wykorzystane jako matryca do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, ang. *reverse transcription polimerase chain reaction*), polegającej na przepisaniu informacji zawartej w RNA na cDNA (ang. *complementary DNA*) z użyciem zestawu TaqMan Reverse Transcription Reagent (Thermo Fisher Scientific, nr kat. N8080234). Odczynniki po rozmrożeniu trzymane na lodzie. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w końcowej objętości 20 μ l:

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość	Końcowe stężenie
Bufor RT 10x	2 μ l	1X
25 mM MgCl ₂	1,4 μ l	1,75 mM
10 mM mix dNTP (po 2,5 mM)	4 μ l	2 mM
Inhibitor RNaz (20 U/ μ l)	1 μ l	1 U/ μ l
MulitScribe RT (50 U/ μ l)	1 μ l	2,5 U/ μ l
50 μ M Random Hexamers	1 μ l	2,5 μ M
Matryca RNA	0,5 - 1 μ g	

Woda z 0,1 % dietylopirowęglańcem (DEPC) do 20 μ l

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w 37°C przez 30 minut w termocyklerze Eppendorf, inaktywowano w temperaturze 95°C przez 5 minut i schłodzono do 4°C. Materiał wykorzystano jako matrycę do przeprowadzenia qPCR z wykorzystaniem sond TaqMan.

3.6.10 Sondy TaqMan

Otrzymane cDNA wykorzystano do analizy ekspresji genu *c-fos* przy użyciu sond TaqMan (Applied Biosystem) w mieszaninie reakcyjnej TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, nr kat. 4369016). Sondy TaqMan zaprojektowano, żeby specyficznie

przyłączały się do komplementarnej sekwencji znajdującej się w badanym genie. Sonda zawiera na końcu 5' fluorofor oraz na końcu 3' wygaszacz sygnału tzw. quencher. Fluorofor wzbudzony przez światło w urządzeniu cyklera emituje fluorescencję. Działanie wygaszacza polega na wygaszeniu tej emisji poprzez transfer energii Förstera (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*), gdy obie cząsteczki znajdują się blisko siebie. Po hybrydyzacji sondy z DNA, polimeraza Taq zaczyna amplifikować fragment genu, co powoduje degradację sondy, uwolnienie fluoroforu od wygaszacza i emisję fluorescencji. Sondy TaqMan stanowią ilościową metodę PCR (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*), umożliwiającą pomiar emisji fluorescencji podczas wykładniczych etapów reakcji. Wykryty sygnał jest więc miarą matrycy (produktu) obecnego w próbce.

Do pomiaru transkryptu wykorzystano komercyjnie dostępne sondy TaqMan wykrywające RNA genu *c-fos*: TaqMan Gene Expression Assay Mm00487425_ml Fos (20x) oraz kontrolną sondę wykrywającą fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (Hprt) - enzym uczestniczący w metabolizmie puryn: Mm00446986_ml Hprt (20x). Mieszaninę reakcyjną przygotowano na lodzie w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki, zawierającej w dołku:

1 µl **20x sondy Mm00487425_ml Fos** lub **Mm00446986_ml Hprt**,

10 µl **2x TaqMan Gene Expression Master Mix**,

4 µl **wody wolnej od RNaz**.

Mieszaninę rozpipetowano na płytkę 96-dołkową MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (Applied Biosystem, nr kat. HAE6.1), następnie do odpowiednich dołków dodano po 100 ng cDNA (5 µl), w końcowej objętości próbki 20 µl. Reakcję przeprowadzono w aparacie StepOne (Applied Biosystem) w warunkach:

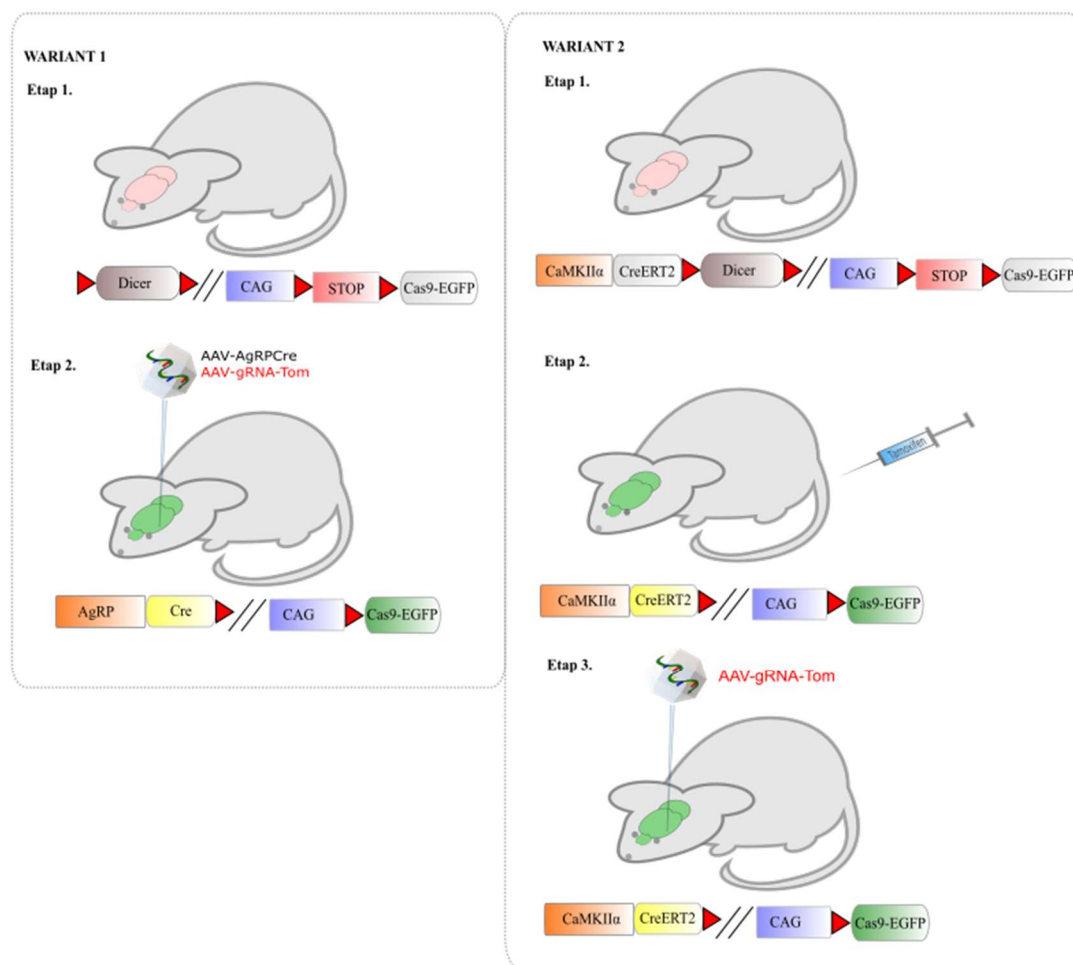
Etap	Temperatura i czas trwania
Wstępna denaturacja	50°C 02:00
Denaturacja	95 °C 10:00
Denaturacja	95 °C 00:15
Przyłączanie sondy	60 °C 01:00
] x 40 cykli	

Wyniki ekspresji genu *c-fos* znormalizowano do ekspresji genu *Hprt*. Poziomą ekspresję badano w odniesieniu do kalibratora (AAV-Scramble-Tom) w oparciu o metodę $\Delta\Delta Ct$.

3.6.11 Wyciszenie genu *c-fos* *in vivo* z użyciem techniki CRISPR/Cas9

W celu weryfikacji roli genu *c-fos* w rozwoju otyłości u myszy Dicer cKO wykonano iniekcje wektorów AAV niosących zaprojektowane warianty sekwencji guideRNA do jądra łukowatego *in vivo*. Pomimo, iż w badaniach *in vitro* nie zaobserwowano istotnego wyciszenia genu *c-fos*, lecz jedynie trend w kierunku obniżenia jego ekspresji, podjęto decyzję o sprawdzeniu efektywności systemu *in vivo*. Wstępnie w celu określenia potencjału wyciszającego systemu CRISPR/Cas9, wykonano próbne iniekcje wektorów wirusowych zawierających gRNA pojedynczo (gRNA1, gRNA2) oraz w zestawie gRNA1/2 do ARC myszy Cas9-EGFP i walidację systemu oparto na ocenie liczby komórek c-FosIR po 24h głodówce. Zdecydowano, że do doświadczenia właściwego zostanie wykorzystany zestaw wektorów zawierających mieszaninę wirusów gRNA1/2. Do doświadczenia wykorzystano podwójnie transgeniczną linię powstałą przez skojarzenie myszy Dicer^{fl/fl} z Cre-zależną linią Cas9-EGFP. Rekombinazę Cre wprowadzono do ARC przy użyciu wektora wirusowego AAV pod promotorem AgRP (AAV-AgRP-Cre). Model oparto na obserwacji rozwoju fenotypu otyłości po iniekcji wektorami AAV-AgRP-Cre u myszy Dicer (praca doktorska, K. Hajdukiewicz, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN). Z założenia wykorzystanie tego modelu miało umożliwić lokalną, ograniczoną do ARC, modyfikację genetyczną w neuronach oreksygenicznych. Tak więc, zarówno usunięcie genu *Dicer1*, jak i aktywacja Cas9-EGFP powinna zachodzić tylko w miejscu iniekcji, co umożliwia bardziej specyficzną obserwację fenotypu wynikającą ze zmian zachodzących w populacji neuronów z ekspresją AgRP-Cre w ARC. Jako pozytywną kontrolę rozwoju fenotypu otyłości wykorzystano zwierzęta DicerCas9, którym podano wirus AAV-AgRP-Cre. Zwierzęta kontrolne stanowiły myszy linii Cas9-EGFP (bez genu Dicer^{fl/fl}), którym podano takie same zestawy wektorów wirusowych (AAV-AgRP-Cre i AAV-AgRP-Cre/gRNA1/2-Tom). Zaobserwowany brak specyficzności wirusa kierującego Cre-rekombinazą do neuronów ARC, skłonił do ponownego zaprojektowania sekwencji guideRNA (gRNA3 i gRNA4) i powrotu do wyjściowej linii Dicer cKO, którą skrzyżowano z linią Cas9-EGFP, by wprowadzić Cas9 do komórek (wariant 2) otrzymując linię DicerCas9-EGFP^{CamKIIαCreERT2} (w skrócie DicerCas9). Wariant 2. zakładał indukcję mutacji poprzez dootrzewnowe podanie tamoksyfenu, aktywując rekombinazę Cre w neuronach z ekspresją *CaMKIIα*, co prowadzi do obniżenia poziomu genu *Dicer1*, jak również wycięcia „ofloksowanej” kasety STOP blokującej ekspresję *Cas9-EGFP* w tej samej populacji neuronów. Tydzień po indukcji mutacji przeprowadzono iniekcję domózgową mieszaniną wektorów wirusowych AAV-gRNA3/4-Tom oraz wirusa kontrolnego AAV-scr-Tom.

Kontrolnym zwierzętom bez ekspresji rekombinazy Cre – DicerCas9(-) również podano oba zestawy wirusów AAV-gRNA3/4-Tom oraz AAV-scr-Tom.



Rycina 3.6 Dwa warianty eksperymentalne iniekcji do ARC wektorów z wiodącym RNA wyciszającym gen *c-fos*. Pierwszy etap opisuje wykorzystanie odpowiedniej linii transgenicznej. Etap drugi przedstawia sposób indukcji mutacji i otrzymaną modyfikację genetyczną kierowaną przez promotor aktywujący Cre w neuronach. Wariant 1. zakłada lokalną, ograniczoną do miejsca iniekcji, modyfikację genów (usunięcie genu *Dicer1* oraz aktywację *Cas9-EGFP*) zachodzącą pod specyficznym dla neuronów oreksygenicznego promotorem AgRP. Wariant 2. zakłada indukcję mutacji poprzez iniekcję dootrzewnową tamoksyfenu, powodując usunięcie genu *Dicer1* z neuronów przodomózgowia z ekspresją *CamKIIα*. Wektory wirusowe do wyciszenia genu *c-fos* AAV-gRNA-Tom następnie są wprowadzane do ARC. Czerwone trójkąty oznaczają miejsca loxP.

Zabiegi przeprowadzono w aparacie stereotaktycznym zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.2. Do wprowadzenia wektorów wirusowych do ARC wykorzystano szklaną kapilarę (Blaubrand, nr kat 7087 70) wyciągniętą przy użyciu wyciągarki Sutter P-97. Wirusy rozcieńczono tak, aby do struktury wprowadzić podobną liczbę cząstek wirusa ($\sim 2-5 \times 10^7$ gc/stronę). Dla wariantu 1. w kontroli wykorzystano wirus AAV-AgRPCre, natomiast w grupie badanej sporządzono mieszaninę wirusów AAV-AgRPCre, AAV-gRNA1-Tom i AAV-gRNA2-Tom w stosunku 1:1:1. Dla wariantu 2. dla kontroli przygotowano wirusa AAV-scr-

Tom oraz dla grupy badanej mieszaninę wektorów AAV-gRNA3/4-Tom w stosunku 1:1. Następnie wykonano obustronną iniekcję mieszaniny wektorów AAV w objętości 125 μ l do ARC z użyciem następujących koordynatów: AP -1.46 mm; ML $\pm$ 0.30 mm; DV -5.75 mm. Po wybudzeniu myszy przeniesiono do nowych klatek domowych ze zdefiniowaną ilością karmy i dokonywano pomiaru masy ciała i poboru pokarmu raz w tygodniu przez 10 kolejnych tygodni. Aby określić efekt wyciszenia genu *c-fos in vivo*, myszy pozbawiono pokarmu przez 24h, co fizjologicznie prowadzi do wzrostu jego ekspresji w ARC.

3.7 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 9.4.1. Do analizy wykorzystano jedno-, dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) lub model mieszany dla porównań wielokrotnych z odpowiednimi testami post hoc opisanymi pod rycinami. Dla danych, które nie spełniają kryterium normalności rozkładu zastosowano test nieparametryczny Mann-Whitney U dla porównań wielokrotnych. Przyjęto poziom istotności $p=0,05$ (przedział ufności 95%) i wartość p skorygowano o wielokrotność dla każdego porównania, co na wykresach przedstawiono jako gwiazdki poziomu istotności przyjmujące wartości $p<0,0332$ (*), $p<0,0021$ (**), $p<0,0002$ (***), $p<0,0001$ (****). Dane przedstawiono w formie wykresów liniowych, słupkowych lub typu ramka-wąsy $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM, ang. *standard error of the mean*).

IV WYNIKI

4.1 Charakterystyka metaboliczna linii *Dicer*^{CaMKII α CreERT2}

Warunkowe i indukowalne usunięcie genu *Dicer1* z neuronów przodomózgowia pod promotorem genu podjednostki α kinazy CaMKII, a tym samym usunięcie funkcji regulatorowej miRNA, prowadzi do zaburzenia homeostazy energetycznej organizmu, skutkującej okresowym wzrostem poboru pokarmu i akumulacją tkanki tłuszczowej. Maksymalny poziom hiperfagii i masy ciała u zwierząt przypada na 5. i 6. tydzień po podaniu tamoksyfenu, po czym stopniowo wraca do normy. Dane literaturowe pokazują, że wzrost masy ciała u myszy *Dicer* cKO wynika głównie z akumulacji tłuszczu (10% zawartości tłuszczu u myszy kontrolnych vs 40% u myszy *Dicer* cKO). Usunięcie miRNA w neuronach zlokalizowanych w jądrze łukowatym, a w szczególności w neuronach AgRP (praca doktorska, K. Hajdukiewicz), a nie w innych strukturach podwzgórza, jest odpowiedzialne za ten fenotyp (Fiorenza i Barco, 2016; Mang i in., 2015; Vinnikov i in., 2014). W niniejszej rozprawie doktorskiej, w celu określenia stopnia zmian metabolicznych zachodzących u myszy *Dicer*^{CamKII α CreERT2} po indukcji mutacji, przeprowadzone zostały odpowiednie testy metaboliczne, umożliwiające ocenę rozwoju chorób związanych z otyłością. W grupie doświadczalnej wykorzystano zwierzęta transgeniczne o genotypie *Dicer*^{CamKII α CreERT2} (*Dicer* cKO), w grupie kontrolnej - myszy *Dicer*^{fl/fl} bez ekspresji rekombinazy Cre. Testy przeprowadzono na zwierzętach obu płci w przedziale wiekowym od 8 tygodni do 4 miesięcy. Zwierzęta po wejściu w procedury doświadczalne, przez cały okres trwania eksperymentu, były przetrzymywane w klatkach indywidualnych. Raz w tygodniu dokonywano pomiarów masy ciała i poboru pokarmu.

4.1.1 Wpływ wysiłku fizycznego na masę ciała i pobór pokarmu

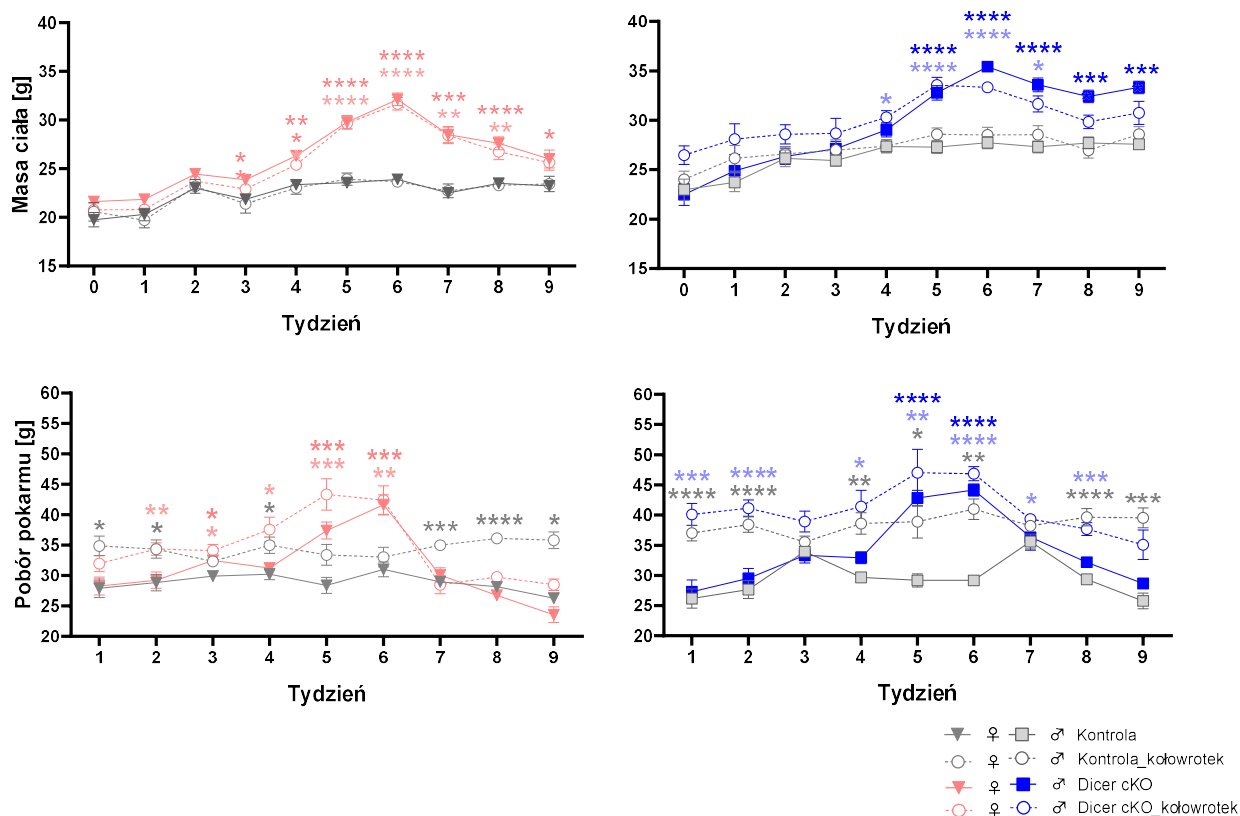
Test kołowrotka przeprowadzono w celu określenia wpływu wzmożonego wysiłku fizycznego na przyrost masy ciała i pobór pokarmu u myszy *Dicer*^{CamKII α CreERT2}. W warunkach fizjologicznych wysiłek fizyczny wspomaga redukcję masy ciała i przyspiesza metabolizm. Badanie przeprowadzono przez okres 9 tygodni od indukcji mutacji za pomocą tamoksyfenu. Grupy doświadczalne podzielono ze względu na płć i dostęp do kołowrotka. Do testu wykorzystano zwierzęta o genotypach: *Dicer*^{fl/fl} (grupa kontrolna) i *Dicer* cKO (grupa badana), podzielonych na grupy:

- 1) **bez dostępu do kołowrotka:**
 - a) samice: kontrola (n=15), Dicer cKO (n=19);
 - b) samce: kontrola (n=16), Dicer cKO (n=11);
- 2) **z dostępem do kołowrotka:**
 - a) samice: kontrola (n=9), Dicer cKO (n=11);
 - b) samce: kontrola (n=10), Dicer cKO (n=7).

Test wykazał, że efekt wzmożonego wysiłku fizycznego na masę ciała i spożycie pokarmu u myszy Dicer cKO jest zależny od płci. W grupach z dostępem do kołowrotka wykazano wzrost konsumpcji pokarmu wynikający ze wzmożonej aktywności i zwiększonego zapotrzebowania energetycznego. Nie stwierdzono jednak różnic w masie ciała w grupach kontrolnych. Zgodnie ze specyfiką linii myszy Dicer cKO, u obu płci po indukcji mutacji (4-6 tydzień) zaobserwowano czasową hiperfagię i towarzyszący jej przyrost masy ciała (Rycina 4.1, górny panel). W 7. tygodniu od podania tamoksyfenu, dochodzi do nagłego spadku spożycia pokarmu. U samic Dicer cKO dostęp do kołowrotka nie wpływa na redukcję masy ciała. Interesującym zjawiskiem obserwowanym u samic Dicer cKO w obu grupach w 7. tygodniu jest spadek poboru pokarmu (Rycina 4.1, dolny panel po lewej) i następcza hipofagia w kolejnych tygodniach, które stopniowo prowadzą do spadku masy ciała. W badanej grupie bez kołowrotka w ostatnim tygodniu testu, masa ciała pozostaje istotnie podwyższona.

U samców Dicer cKO z dostępem do kołowrotka zaobserwowano niewielką redukcję masy ciała w okresie maksymalnego tycia (w 6. tygodniu mutacji) i szybszy powrót do wagi zbliżonej do grupy kontrolnej. Dostęp do kołowrotka prowadzi do wzrostu konsumpcji pokarmu, która u samców Dicer cKO nie ulega drastycznemu obniżeniu, co świadczy o zwiększonym zapotrzebowaniu kalorycznym. Spadek poboru pokarmu u samców Dicer cKO w 7. tygodniu mutacji zaobserwowano jedynie w grupie samców Dicer cKO bez dostępu do kołowrotka. Konsumpcja pokarmu w tej grupie ustanawia się na poziomie zbliżonym do myszy kontrolnych.

Wynik doświadczenia pokazuje, że aktywność fizyczna może niwelować skutki mutacji, w sposób zależny od płci. Można zatem stwierdzić, iż u samców Dicer cKO wzmożona aktywność fizyczna wpływa na fenotyp otyłości i przynosi efekt terapeutyczny. Prawdopodobnie w efekcie mutacji u myszy Dicer cKO dochodzi do zaburzenia regulacji wydatku energetycznego i zmianach w obwodach odpowiedzialnych za regulację łaknienia. Możliwe jest, że u samic dochodzi również do ograniczenia aktywności fizycznej, o czym świadczy spadek konsumpcji pokarmu obserwowany po 7. tygodniu od podania tamoksyfenu.

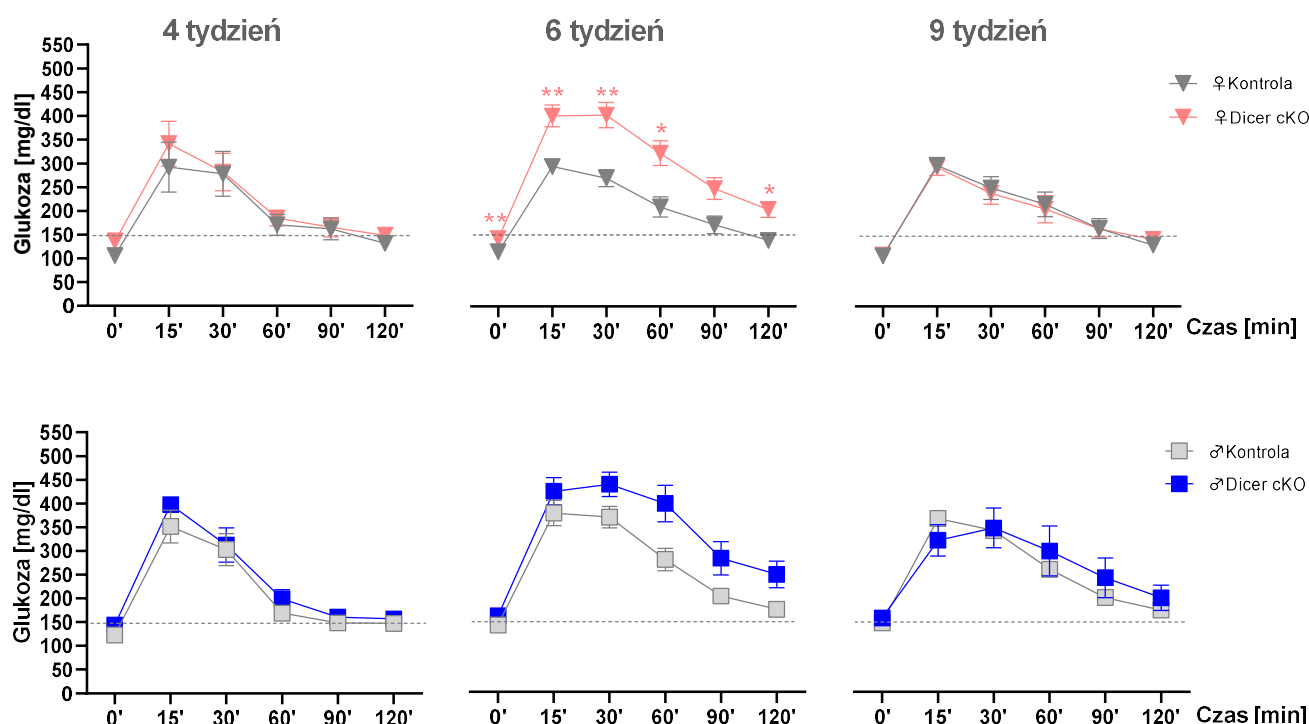


Rycina 4.1 Wpływ wysiłku fizycznego (test kołowrotka) na masę ciała i pobór pokarmu u samic (lewa strona) i samców (prawa strona) podzielonych na grupy z dostępem lub bez dostępu do kołowrotka. Test przeprowadzono przez 9 tygodni od indukcji mutacji. Do analizy statystycznej zastosowano model mieszany dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Dunnetta w odniesieniu do grupy kontrolnej; Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****). Kolory gwiazdek przedstawiają poziom istotności pomiędzy: (*) grupą kontrolną (bez kołowrotka), a kontrolą z dostępem do kołowrotka; (*/*) kontrolą vs Dicer cKO; (*/) kontrolą vs Dicer cKO z dostępem do kołowrotka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.1.2 Test tolerancji glukozy

U myszy Dicer cKO, w związku z zaburzoną łaknieniem i nagłym przyrostem masy ciała, może dochodzić do wzrostu ryzyka pojawienia się zmian metabolicznych towarzyszących otyłości. Test tolerancji glukozy (GTT) jest testem pierwszego wyboru w diagnostyce rozwoju cukrzycy 2 typu i rozwoju insulinooporności. Test wykonuje się w celu określenia tempa wychwytu glukozy przez tkanki w trakcie 2 godzin od podania bolusa glukozy (Pedro i in., 2020). Wrażliwość na insulinę jest zależna od płci i wieku, dlatego test został przeprowadzony u zwierząt w zbliżonym wieku u obu płci. Test przeprowadzono w trzech punktach czasowych: w **4. tygodniu** – samice: kontrola (n=5), Dicer cKO (n=6); samce: kontrola (n=6), Dicer cKO (n=5), **6. tygodniu** i **9. tygodniu** – samice:

kontrola (n=10), Dicer cKO (n=14); samce: kontrola (n=14), Dicer cKO (n=8). W 4. tygodniu mutacji nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami. W badaniu wykazano przejściową nietolerancję glukozy u samic Dicer cKO obserwowaną, w okresie maksymalnego tycia, tj. w 6. tygodniu od indukcji mutacji, gdzie zauważono zwiększone stężenie glukozy we krwi zarówno na czczo (samice kontrolne $114,8 \pm 14,6$ mg/dl; samice Dicer cKO $142,4 \pm 21,6$ mg/dl), jak i po 2 godzinach od podania glukozy (samice kontrolne $138,7 \pm 16,1$ mg/dl; samice Dicer cKO $203,8 \pm 61,4$ mg/dl;). U samców natomiast ze względu na duże odchylenia w grupach, nie wykazano istotności statystycznej w 6. tygodniu mutacji, chociaż zaobserwowano trend podobny do wyników u samic. Otrzymane wyniki wskazują na przejściowe zmiany w metabolizmie glukozy u myszy Dicer cKO, gdy masa ciała jest najwyższa, natomiast w 4. i 9. tygodniu mutacji, gdy waga jest zbliżona do myszy kontrolnych, metabolizm glukozy nie obiega od normy.



Rycina 4.2 Test tolerancji glukozy (GTT) przeprowadzony u samic (górny panel) i samców (dolny panel) w 4, 6, i 9 tygodniu od indukcji mutacji. Na osi x przedstawiono czas od podania glukozy. Pierwszy punkt czasowy 0' przedstawia poziom glukozy na czczo, przed podaniem glukozy, następnie pomiar tempa wchłaniania glukozy przez tkanki w ciągu 15, 30, 60, 90 i 120 minut. Po upływie 2 godzin w warunkach fizjologicznych, poziom glukozy powinien wrócić do normy (pozioma przerywana linia). Do analizy statystycznej zastosowano analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Tukey'a. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.1.3. Test tolerancji glukozy w teście kołowrotka u myszy Dicer^{CaMKII α CreERT2}

Wysiłek fizyczny uwrażliwia tkanki na insulinę, co prowadzi do szybszego wychwytu glukozy z krwiobiegu. Test przeprowadzono w celu oceny wpływu wysiłku fizycznego na metabolizm glukozy u samic i samców w 6. i 9. tygodniu od indukcji mutacji na tej samej kohorcie zwierząt:

Grupy bez kołowrotka:

samice: kontrolne (n=10), Dicer cKO (n=14);

samce: kontrolne (n=14), Dicer cKO (n=8).

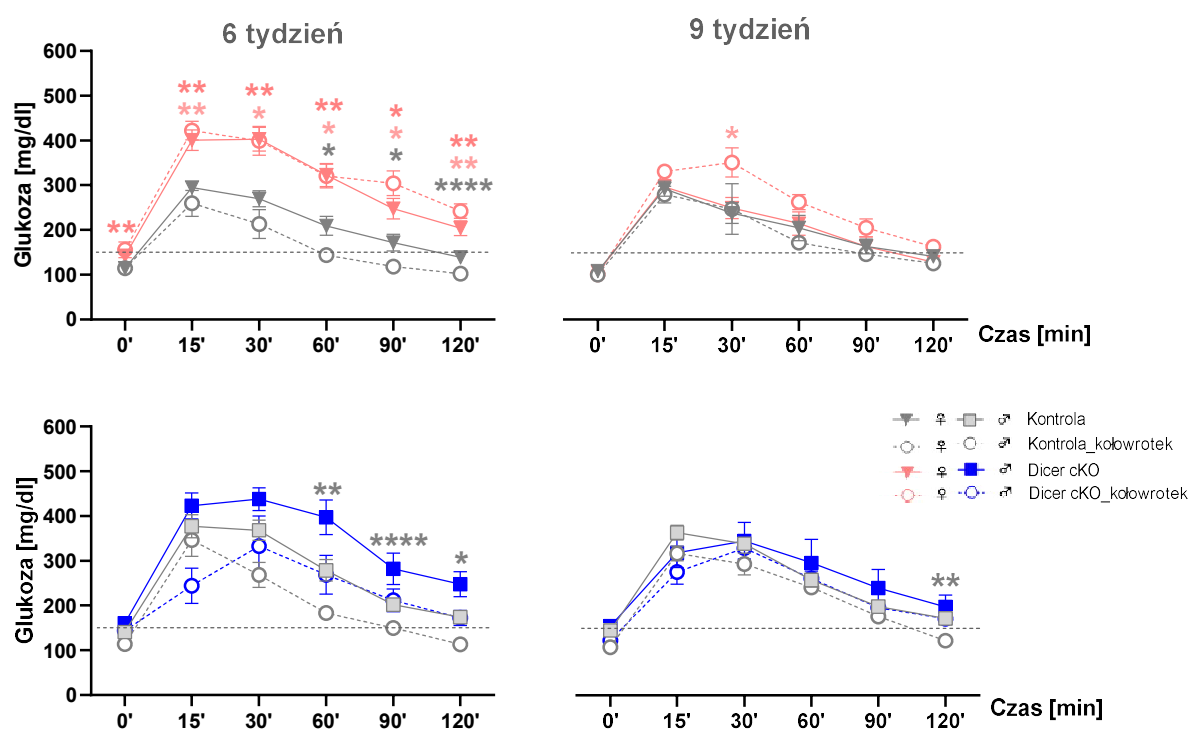
Grupy z kołowrotkiem:

samice: kontrolne (n= 5), Dicer cKO (n=5);

samce: kontrolne (n=4), Dicer cKO (n=4).

U zwierząt kontrolnych z dostępem do kołowrotka, zgodnie z założeniem, zaobserwowano szybszy powrót poziomu glukozy do normy (~150 mg/dl) po upływie 60 minut od podania roztworu glukozy. W 6. tygodniu u myszy Dicer cKO wykazano różnice w wynikach testu w zależności od płci. U samic Dicer cKO z dostępem do kołowrotka nie wykazano korzystnego wpływu aktywności fizycznej na metabolizm glukozy, podczas gdy u samców ten efekt został zaobserwowany. W grupie samców Dicer cKO z kołowrotkiem stężenie glukozy po 15 minutach od jej podania, przyjmuje najniższe wartości ze wszystkich grup i wynosi $244 \pm 79,1$ mg/dl vs samce kontrolne z wartością $377 \pm 98,9$ mg/dl ($p=0,07$) i Dicer cKO bez kołowrotka $422 \pm 82,3$ mg/dl ($p=0,03$, nie pokazano na rycinie 4.3). Kinetyka wychwytu glukozy w tej grupie jest podobna do myszy kontrolnych. W teście przeprowadzonym w 9. tygodniu u samców jedyną istotną różnicę zauważono po 2 godzinach u myszy kontrolnych z kołowrotkiem, gdzie wartości glukozy są najniższe ze wszystkich grup i świadczą o pozytywnym wpływie wysiłku fizycznego na uwrażliwienie tkanek na insulinę i wydawniejszy wychwyt glukozy z krwiobiegu. Natomiast u samic Dicer cKO z dostępem do kołowrotka w 9. tygodniu zaobserwowano wolniejszy wychwyt glukozy przez tkanki po 30 minutach. Jest to o tyle ciekawa obserwacja, gdyż z analizy masy ciała i spożycia pokarmu w teście kołowrotka wynika, iż w 9. tygodniu mutacji, samice Dicer z dostępem do kołowrotka nie spożywają więcej pokarmu, co mogłoby częściowo tłumaczyć jej spowolnione wchłanianie. U samic Dicer cKO dostęp do kołowrotka pogłębia zaburzenia metabolizmu glukozy. Zatem nasuwa się pytanie czy nie dochodzi u nich do rozwoju insulinooporności? Aby wyjaśnić

opisywany fenomen, należy przeprowadzić dokładniejsze badania związane z aktywnością i wydatkiem energetycznym u samic Dicer cKO. Wyniki przedstawione w tym teście pokazują, że w badanym modelu efekt aktywności fizycznej na metabolizm glukozy jest zależny od płci i u samic Dicer cKO prowadzi do nietolerancji glukozy w 6. tygodniu i pogorszenia wychwyty glukozy w 9. tygodniu. U samców Dicer cKO natomiast aktywność fizyczna przyczynia się do obniżenia stężenia glukozy we krwi w fazie maksymalnego tycia i pozostaje bez większego wpływu w późniejszym okresie.

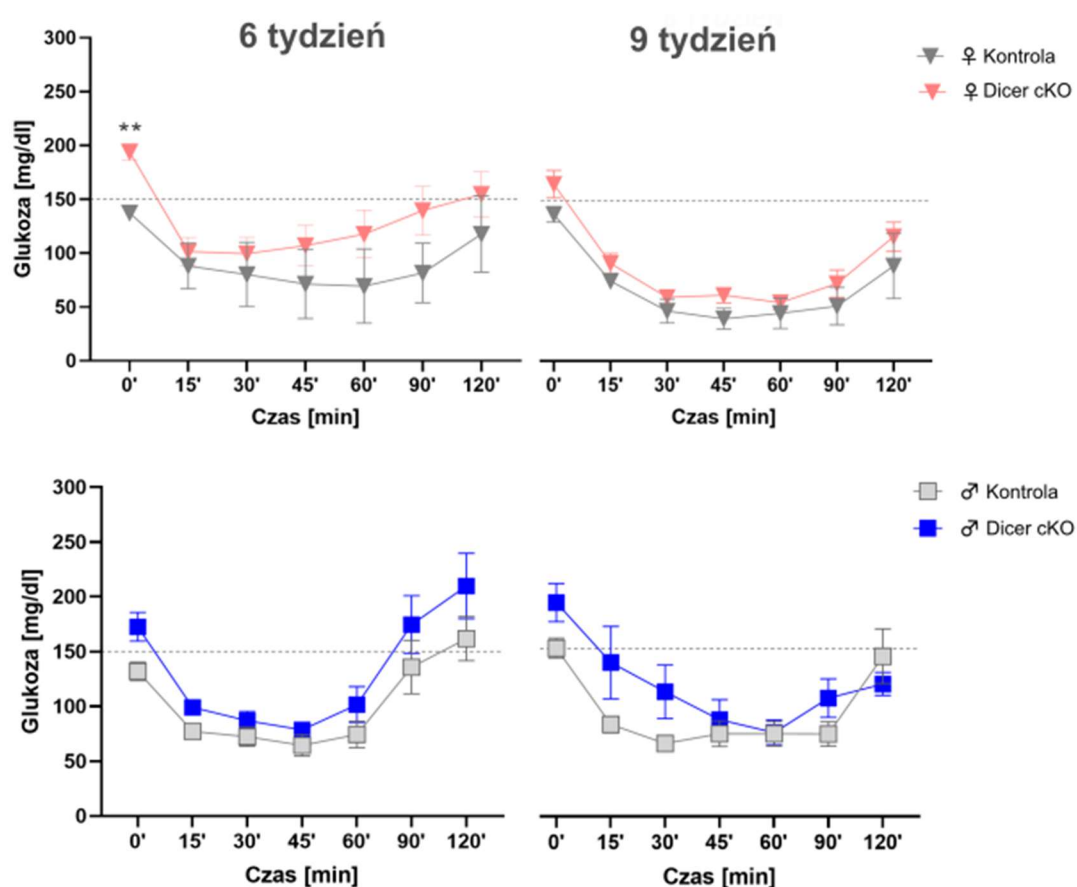


Rycina 4.3 Test tolerancji glukozy (GTT) w teście kołowrotka przeprowadzony u samic i samców w 6. i 9. tygodniu od indukcji mutacji w celu określenia wpływu aktywności fizycznej na metabolizm glukozy. Przed przystąpieniem do testu zwierzętom zmierzono stężenie glukozy na czczo, następnie podano roztwór glukozy w zależności od masy ciała i mierzono tempo wchłaniania glukozy przez tkanki w pięciu punktach czasowych (15, 30, 60, 90 i 120 minut) od podania. Aktywność fizyczna powinna przyspieszyć powrót glukozy do normy (150 mg/dl; pozioma przerywana linia). Do analizy statystycznej zastosowano model mieszany dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Dunnetta w odniesieniu do grupy kontrolnej; słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM). Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****). Kolory gwiazdek przedstawiają poziom istotności pomiędzy: (*) kontrolą bez kołowrotka a kontrolą z dostępem do kołowrotka; (*/*) kontrolą bez kołowrotka vs Dicer cKO; (*/*) kontrolą bez kołowrotka vs Dicer cKO z dostępem do kołowrotka.

4.1.4 Test tolerancji insuliny

Oporność na insulinę stanowi sygnał o rozwijających się zaburzeniach metabolicznych prowadzących do rozwoju cukrzycy 2 typu. Test oceny wrażliwości na insulinę

przeprowadzono w 6. i 9. tygodniu od indukcji mutacji na tej samej kohorcie zwierząt: samice kontrolne (n=5), samice Dicer cKO (n=6); samce kontrolne (n=6), samce Dicer cKO (n=5). Zwierzęta po aktywacji mutacji rozwinęły charakterystyczny dla linii fenotyp. Po podaniu insuliny u osobników z insulinoopornością spadek stężenia glukozy powinien być nieznaczny. U samic Dicer cKO w 6. tygodniu ze względu na nieprawidłową glikemię (pomiar na czczo w punkcie 0'), spadek stężenia nie jest aż tak znamieny jak u myszy kontrolnych, jednak w żadnym punkcie czasowym po podaniu insuliny, nie wykazuje istotności statystycznej. W 9. tygodniu wyniki przedstawiają się podobnie w obu grupach samic. U samców w 6. i 9. tygodniu nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami.



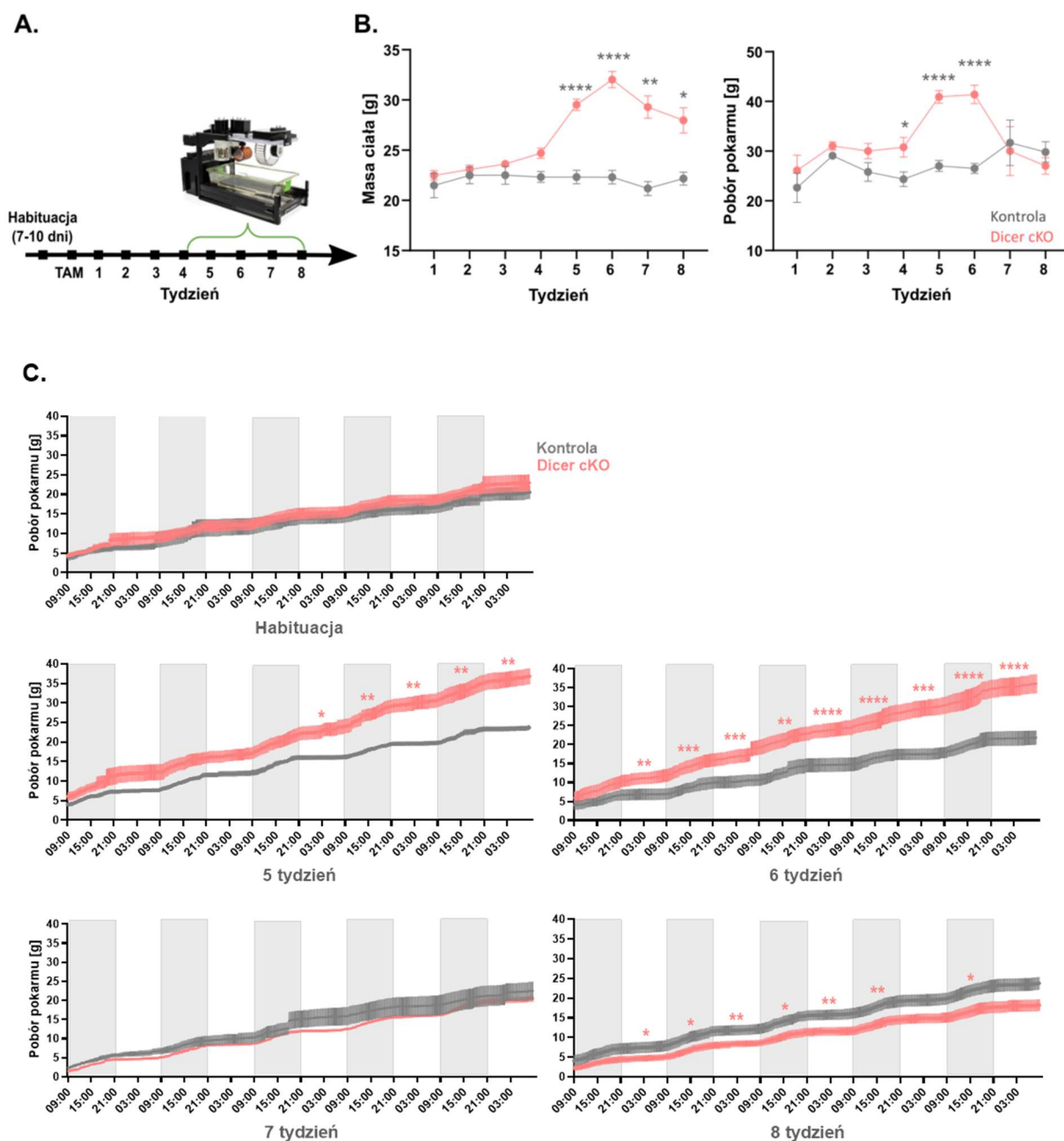
Rycina 4.4 Test tolerancji insuliny przeprowadzony dla obu płci w 6. i 9. tygodniu od indukcji mutacji. Przed przystąpieniem do testu zwierzęta pozbawiono pokarmu na 6 godzin, po czym zmierzono stężenie glukozy na czczo. Następnie zwierzętom podano roztwór insuliny w zależności od masy ciała i mierzono tempo wchłaniania glukozy przez tkanki w sześciu punktach czasowych (15, 30, 45, 60, 90 i 120 minut). Do analizy statystycznej zastosowano analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Tukey'a. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0021$ (**); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.1.5 Analiza parametrów metabolicznych z wykorzystaniem klatek metabolicznych

Testy metaboliczne wykonane dotychczas pokazały zależne od płci różnice fenotypowe. Ze względu na niewielką liczbę klatek w momencie wykonywania doświadczenia (4 sztuki) oraz długi okres obserwacji zwierząt, zdecydowano, że badanie z wykorzystaniem klatek metabolicznych (TSE Phenomaster) zostanie przeprowadzone wyłącznie na samicach: kontrola (n=6) i Dicer cKO (n=6). System Phenomaster umożliwia całkowicie nieinwazyjny i bezstresowy pomiar kilku parametrów jednocześnie (z odczytem co 15 minut). Mierzono pobór pokarmu zarówno przy użyciu sensorów wagowych w klatkach, jak i z użyciem wagi manualnej przy cotygodniowej wymianie ściółki, konsumpcję wody, współczynnik wymiany oddechowej oraz wydatek energetyczny. Badanie przeprowadzono według schematu (Rycina 4.5 A). Zwierzętom przyzwyczajonym do bytowania w klatkach metabolicznych (habitualizacja 10-12 dni) podano tamoksyfen, a następnie przeniesiono do indywidualnych klatek domowych na 4 tygodnie. Po 4. tygodniu od indukcji mutacji zwierzęta umieszczono ponownie w klatkach metabolicznych, gdzie przez kolejne 4 tygodnie dokonywano pomiarów badanych parametrów. Myszy Dicer cKO rozwinęły fenotyp charakterystyczny dla badanej linii – wzrost masy ciała i okresową hiperfagię w 4-6. tygodniu mutacji (Rycina 4.5 B).

Analiza poboru pokarmu

Analiza poboru pokarmu w klatkach metabolicznych umożliwiła stały monitoring konsumpcji pokarmu w ciągu kilku tygodni z uwzględnieniem cyklu okołodobowego. Myszy charakteryzują się nocnym trybem życia i w fazie aktywnej (ciemnej) spożywają więcej pokarmu. W fazie nieaktywnej pobór pokarmu jest znikomy, o czym świadczy wypłaszczona linia konsumpcji pokarmu (Rycina 4.5 C, białe pola). Myszy Dicer cKO począwszy od 4. tygodnia, zaczynają spożywać więcej pokarmu, a do wzmożonej konsumpcji dochodzi również w fazie nieaktywnej. Tygodnie 5. i 6. to czas intensywnej hiperfagii i przyrostu masy ciała u myszy Dicer cKO (Rycina 4.5 B). W 7. tygodniu dochodzi do nagłego spadku spożycia pokarmu i hipofagii 8. w tygodniu mutacji w porównaniu do myszy kontrolnych (Rycina 4.5 B, C).

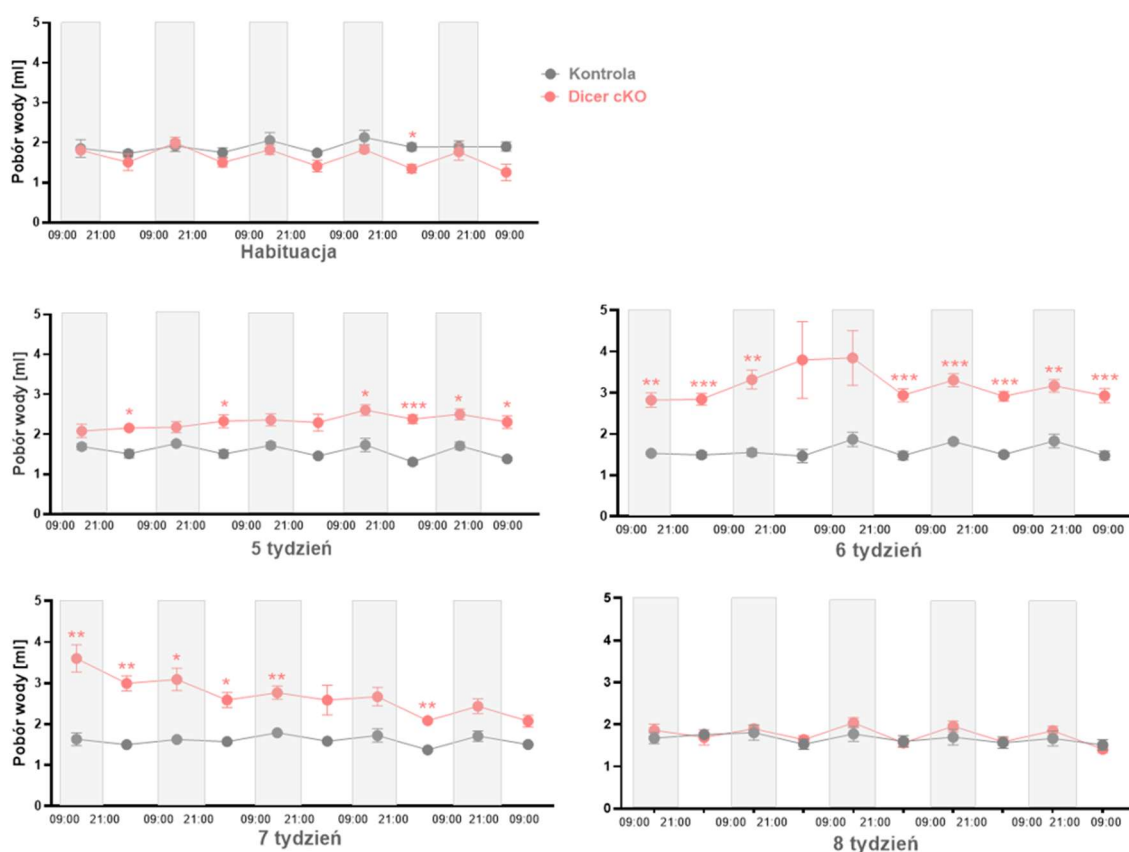


Rycina 4.5 (A) Schemat eksperymentu w klatkach metabolicznych. **(B)** Cotygodniowy pomiar masy ciała i poboru pokarmu przy użyciu wagi manualnej z dokładnością do 0,01 g. **(C)** Kumulatywny pomiar poboru pokarmu w trakcie habituacji i w 5, 6, 7 i 8. tygodniu od indukcji mutacji mierzony z użyciem sensorów wagowych na podajnikach pokarmu w klatkach metabolicznych (odczyt co 15 minut) przez 5 dni, z rozróżnieniem na fazy aktywności zwierząt. Badanie przeprowadzono w pomieszczeniu z odwróconą dobą: faza ciemna (aktywna, szare pole) 09:00-21:00; faza jasna (nieaktywna, białe pole) 21:00-09:00. Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Šidáka; słupki błędów przedstawiają błąd standardowy (SEM). Na wykresach umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Analiza spożycia wody

Czujniki wagowe na podajnikach wody w klatkach Phenomaster pozwalają na precyzyjny pomiar konsumpcji wody. Na Rycinie 4.6 przedstawiono ilość spożytej wody

w czasie 12-godzinnej fazy aktywnej i nieaktywnej. Pokazano, że ilość spożytej wody jest większa w fazie aktywnej. Analiza w klatkach metabolicznych wykazała, że w okresie hiperfagicznym (5-6 tydzień), dochodzi również do wzrostu poboru wody w obu fazach cyklu okołodobowego. Maksymalny pobór wody zaobserwowano w 5. tygodniu mutacji, gdzie ilość spożycia przez samice Dicer cKO była prawie dwukrotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (~3 ml u samic Dicer cKO vs ~1.5 ml dla zwierząt kontrolnych). Zaobserwowano również stopniowy spadek poboru wody u myszy Dicer w 6. tygodniu, a w 7. powrót do spożycia porównywalnego do kontroli.

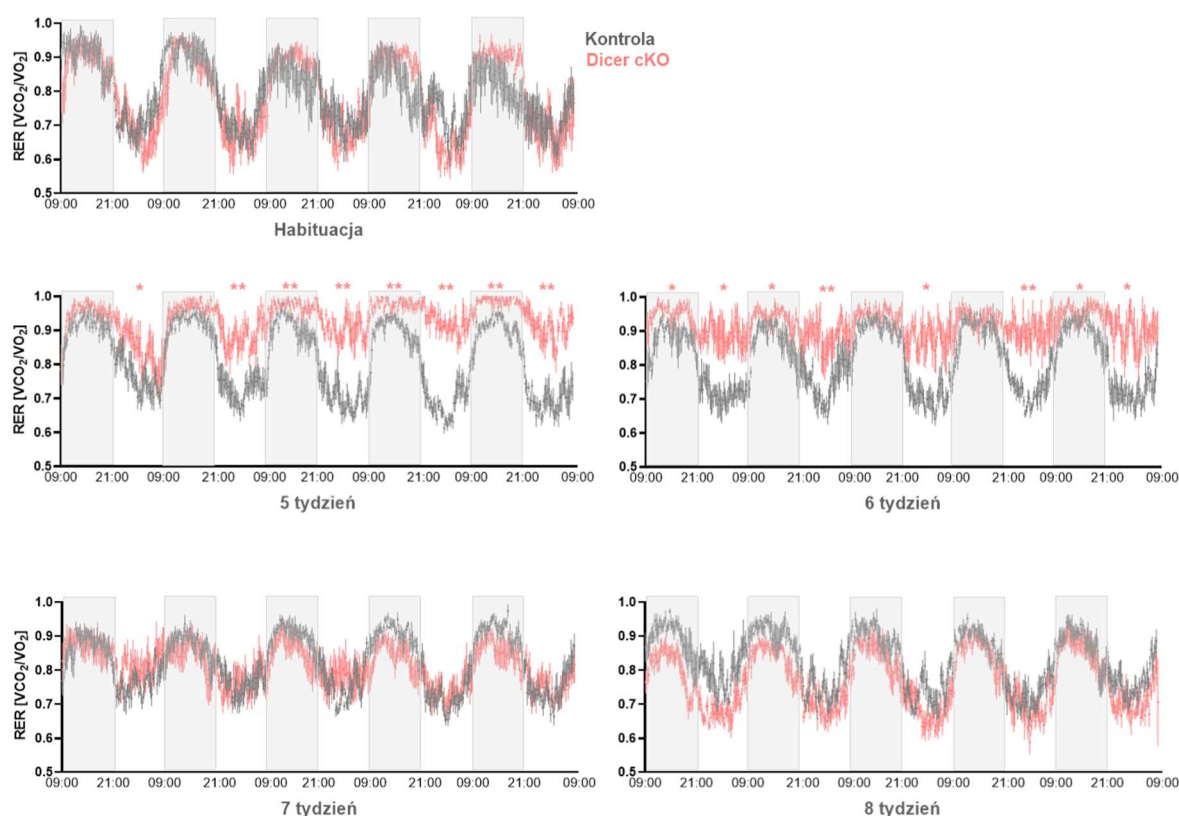


Rycina 4.6 Konsumpcja wody monitorowana przy użyciu klatek metabolicznych u samic Dicer cKO (n=6) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=6) przez 5 dni w obu fazach cyklu okołodobowego: faza ciemna (aktywna) – szare pole (09:00-21:00); faza jasna (nieaktywna) – białe pole (21:00-09:00) podczas habituacji i w 5, 6, 7 i 8. tygodniu mutacji. Wykres przedstawia sumę spożycia wody w ciągu 12 godzin dla każdej z faz. Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Šidáka; słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM). Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Współczynnik wymiany oddechowej (RER)

Współczynnik RER określa, który produkt jest wykorzystywany do produkcji energii. Myszy kontrolne w fazie nieaktywnej (Rycina 4.7) redukują pobór pokarmu, a energia

potrzebna do zapewnienia procesów życiowych pochodzi z utlenienia kwasów tłuszczowych ($RER=0.7$). W fazie aktywnej, gdy zwierzęta spożywają pokarm, to węglowodany z karmy stanowią główne źródło energii i współczynnik RER oscyluje wokół wartości 1. U myszy Dicer cKO, parametr RER znacząco różni się od myszy kontrolnych. W 5. tygodniu mutacji zaobserwowano jego podwyższoną wartość w obu fazach, a w szczególności w fazie nieaktywnej. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami opisującymi pobór pokarmu, ponieważ pokazują, że myszy Dicer cKO konsumują więcej pokarmu w fazie aktywnej i nieaktywnej. Zwiększony pobór pokarmu w fazie nieaktywnej, w której fizjologicznie jeść nie powinny, może świadczyć o zaburzeniach w odczuwaniu sygnałów sytości lub/i zaburzonym cyklu okołodobowym.

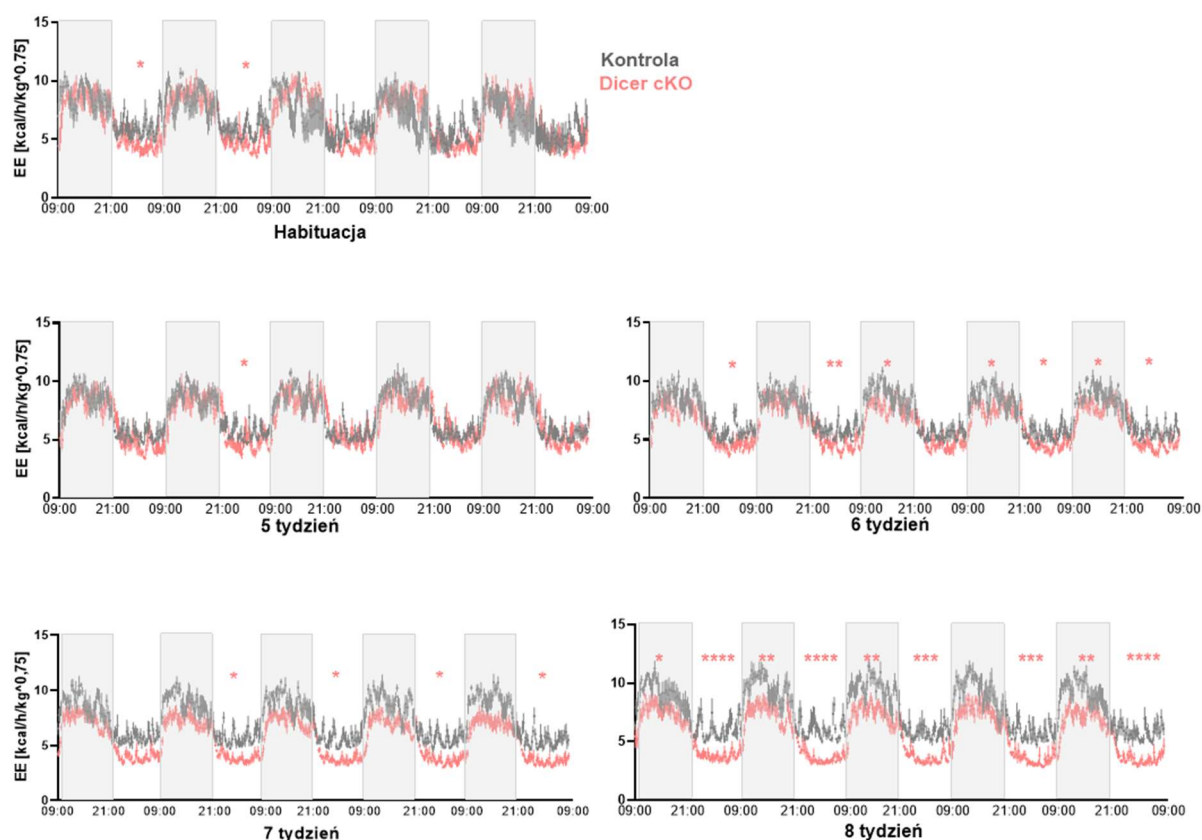


Rycina 4.7 Analiza średnich wartości współczynnika wymiany oddechowej RER z 12-godzinnej fazy aktywnej (odwrócona doba_szare pole, 09:00-21:00) i nieaktywnej (białe pole, 21:00-09:00) mierzony w klatkach metabolicznych u samic Dicer cKO ($n=6$) w porównaniu do grupy kontrolnej ($n=6$) przez 5 dni w trakcie habituacji oraz w 5, 6, 7 i 8. tygodniu mutacji. Do analizy statystycznej ze względu na brak spełnienia kryterium normalności rozkładu, zastosowano test nieparametryczny Mann-Whitney U dla porównań wielokrotnych z testem post-hoc Benjamini, Krieger i Yekutieli; słupki błędów przedstawiają błąd standardowy średniej (SEM). Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p<0,0332$ (*), $p<0,0021$ (**).

Wydatek energetyczny

Na całkowity wydatek energetyczny (TEE, ang. *total energy expenditure*) składają się następujące elementy: podstawowe tempo przemiany materii (BMR, ang. *basal metabolic*

rate), aktywność fizyczna i termogeneza (Bonet i in., 2005). Analiza w klatkach metabolicznych pokazała różnice w wydatku energetycznym u myszy Dicer cKO. W badanym modelu zaobserwowano spadek parametru EE poczynając od 6. tygodnia mutacji do końca trwania testu. Obniżenie wydatku energetycznego jest istotnie niższe w obu fazach dnia. Nie wiadomo jednak czy jest to zmiana tymczasowa, czy ma charakter stały, czyli utrzymuje się po 8. tygodniu od indukcji mutacji. Fizjologicznie spadek wydatku energetycznego jest obserwowany w odpowiedzi na deficyt energetyczny w celu ochrony przed nadmiernym wykorzystaniem energii podczas restrykcji pokarmowych/głódówki. Obniżenie EE u myszy Dicer cKO może świadczyć o stanie, w którym dochodzi do zaburzenia w prawidłowym wykrywaniu peryferyjnych sygnałów sytości. Sytuacja, w której obniżenie EE jest połączone z nadmierną konsumpcją, prowadzi do akumulacji tkanki tłuszczowej i w konsekwencji otyłości. Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia, iż mutacja może zmieniać funkcjonowanie neuronów kontrolujących EE w podwzgórzu.



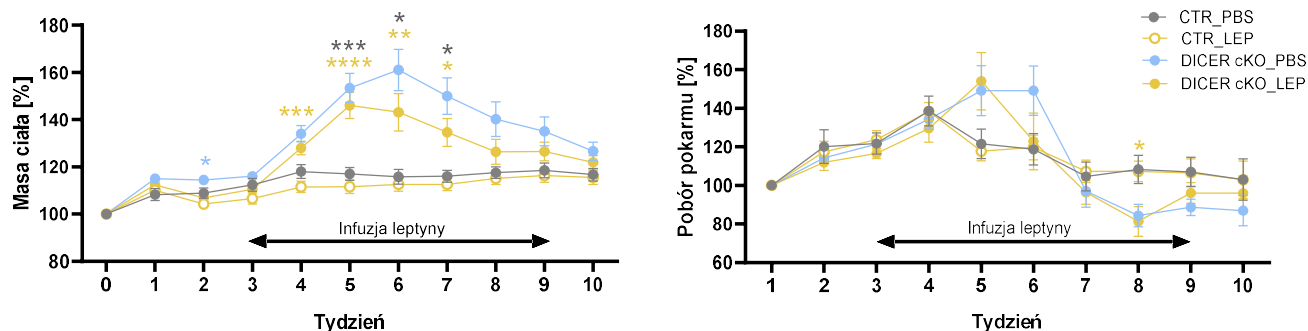
Rycina 4.8 Średnie wartości wydatku energetycznego z 12-godzinnej fazy cyklu okołodobowego (odwrócona doba: szare pole – faza aktywna 09:00-21:00; białe pole – faza nieaktywna 21:00-09:00), mierzone przez 5 dni w klatkach metabolicznych u samic Dicer cKO (n=6) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=6). Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Śidaka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Z badań przy użyciu klatek metabolicznych jasno wynika, że usunięcie genu *Dicer1*, a tym samym dojrzałych cząsteczek miRNA z neuronów przodomózgowia, prowadzi do zmian w badanych parametrach metabolicznych obserwowanych już w 4. tygodniu mutacji, co skutkuje rozregulowaniem mechanizmu łaknienia. Nie wiadomo jednak czy wzrost konsumpcji pokarmu i wody zwłaszcza w fazie nieaktywnej, wynika ze stanu, w którym zwierzęta nie mogą zaspokoić głodu/ nie odczuwają sytości, czy być może również mutacja powoduje zmiany w strukturach odpowiedzialnych za regulację cyklu okołodobowego i dlatego konsumują więcej w tej fazie cyklu. Szósty tydzień mutacji wydaje się najbardziej krytyczny w kontekście zmian metabolicznych, ponieważ wszystkie parametry są tutaj istotnie zmienione. Uwagę należy zwrócić zwłaszcza na obniżenie wydatku energetycznego, co w połączeniu z hiperfagią prowadzi do akumulacji tkanki tłuszczowej i otyłości.

4.1.6 Wpływ infuzji leptyny na rozwój otyłości u myszy *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2}

Leptyna, zwana również „hormonem sytości”, wpływa na ilość spożywanego pokarmu, poprzez aktywację neuronów POMC, a poziom leptyny jest wprost proporcjonalny do ilości tkanki tłuszczowej. Dane literaturowe pokazują, że u myszy kontrolnych poziom leptyny jest niski (~5 ng/ml), podczas gdy u myszy *Dicer* cKO począwszy od 4. tygodnia mutacji poziom leptyny wzrasta, osiągając nawet 60 ng/ml w 6. i 7. tygodniu, gdy poziom otluszczenia jest największy (Vinnikov i in., 2014). Kolejnym celem postawionym w pracy doktorskiej było stwierdzenie czy ograniczenie przyjmowania pokarmu w 7. tygodniu u myszy *Dicer* cKO, może być efektem zależnym od akumulacji leptyny, co z opóźnieniem (wynikającym z mutacji) prowadzi do masowej aktywacji neuronów anoreksygeniczných. Do sprawdzenia „hipotezy leptynowej” wykorzystano pompy osmotyczne, które umożliwiają zwiększenie poziomu leptyny w krwioobiegu we wcześniejszej fazie mutacji (przed przyrostem masy ciała) i określenie jej wpływu na łaknienie i rozwój fenotypu otyłości. W doświadczeniu wykorzystano zaimplantowane podskórną pompy osmotyczne ALZET 2006, które umożliwiają stałą infuzję leptyny od 3. tygodnia mutacji przez kolejne 42 dni. Do doświadczenia wykorzystano myszy kontrolne, którym wprowadzono pompy z leptyną (n=10) lub z nośnikiem (PBS) (n=9) oraz myszy *Dicer* cKO z pompami z leptyną (n=13) lub nośnikiem (n=13). Raz w tygodniu dokonywano pomiaru masy ciała i spożycia pokarmu w badanych grupach. Analizę statystyczną przedstawiono w odniesieniu do grupy *Dicer* cKO_LEP. W badaniu pokazano, że podanie leptyny redukuje masę ciała myszy *Dicer* cKO_LEP (143,1%

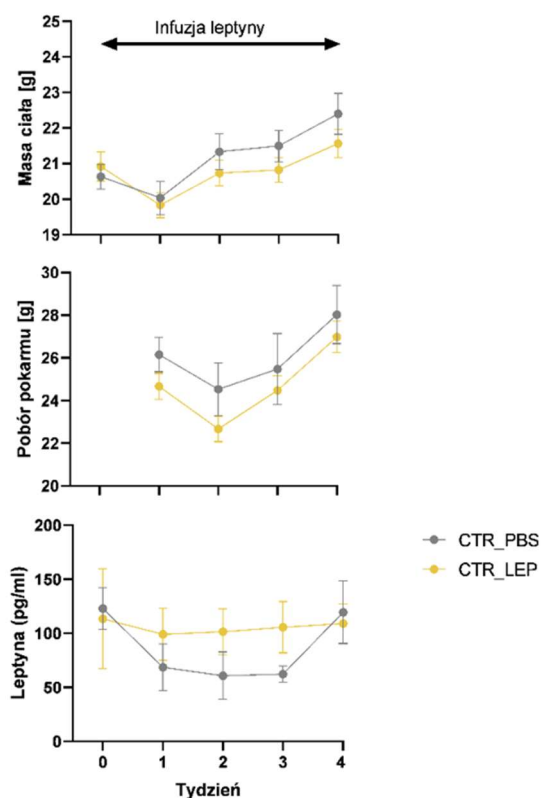
$\pm 7,9$) w 6. tygodniu mutacji w porównaniu do grupy Dicer cKO_PBS ($161\% \pm 8,7$) (Ryc. 4.9), lecz wartości te nie osiągają istotności statystycznej. Podobna sytuacja występuje w badaniu poboru pokarmu, gdzie w 6. tygodniu u myszy Dicer cKO_LEP konsumpcja wynosi $122,85\% \pm 14,73$, a u myszy Dicer cKO_PBS $149,15\% \pm 12,8$. Tutaj również z uwagi na duże odchylenia nie uchwycono istotności statystycznej. W 8. tygodniu natomiast ilość spożytego pokarmu w obu grupach myszy Dicer cKO znacząco maleje (Dicer cKO_LEP $81,38\% \pm 7,72$, Dicer cKO_PBS $84,38\% \pm 5,81$) w porównaniu do grup kontrolnych CTR_PBS $108,33\% \pm 7,35$ ($p=0,053$) i CTR_LEP $107,2\% \pm 5,33$ ($p=0,033$). W badaniu wykazano, że stała infuzja egzogennej leptyny ($3\mu\text{g}/\text{dobę}$) podana we wczesnej fazie mutacji nieznacznie wpływa na fenotyp myszy Dicer cKO, redukując masę ciała i pobór pokarmu w 6. tygodniu, skracając tym samym epizod hiperfagii i otyłości w badanym modelu.



Rycina 4.9 Wpływ infuzji leptyny ($3\mu\text{g}/\text{dobę}$) przez 6 tygodni na masę ciała i pobór pokarmu u myszy Dicer cKO. W doświadczeniu wykorzystano pompy osmotyczne ALZET 2006. Do analizy statystycznej zastosowano mieszany model analizy wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Dunnett'a. Gwiazdki poziomu istotności pokazano w odniesieniu do grupy badanej z leptyną (Dicer cKO_LEP). Na wykresie umieszczono porównanie grupy badanej w odniesieniu do pozostałych grup, które oznaczono różnymi kolorami gwiazdek: szare (*) – Dicer cKO_LEP vs CTR_PBS; żółte (*) – Dicer cKO_LEP vs CTR_LEP; niebieskie (*) – Dicer cKO_LEP vs Dicer cKO_PBS. Słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM; $p<0,0332$ (*), $p<0,0021$ (**), $p<0,0002$ (***)

Mając na uwadze, że krążąca leptyna krótko utrzymuje się w obiegu (~ 70 minut), a egzogenna leptyna po pojedynczej iniekcji (IP) w dawce $3\text{ mg}/\text{kg}$ masy ciała jest całkowicie niewykrywalna po 6 godzinach od podania (Burnett i in., 2017), kluczowe wydaje się sprawdzenie czy egzogenna leptyna w pompach nie ulega rozpadowi i czy wykazuje odpowiedni efekt biologiczny. W tym celu do pomp (ALZET 2004) wprowadzono leptynę ($n=8$) lub nośnik (PBS, $n=7$) i zaimplantowano podskórnie zwierzętom kontrolnym C57Bl/6J (CTR). Test przeprowadzono w czasie 4 tygodni od implantacji. Pobrano również próbki krwi z żyły ogonowej do testu ELISA wykrywającego leptynę w osoczu. Nie wykazano istotnie

statystycznych różnic w masie ciała i poborze pokarmu pomiędzy grupami, chociaż linia trendu zaznacza się w kierunku subtelnego działania leptyny. Nie pokazano również istotnych różnic w stężeniu leptyny przy użyciu testu ELISA, co z jednej strony może świadczyć o jej degradacji po wprowadzeniu do pomp lub słabego efektu terapeutycznego po podaniu 3 μ g leptyny na dobę i należałoby rozważyć użycie wyższej dawki.



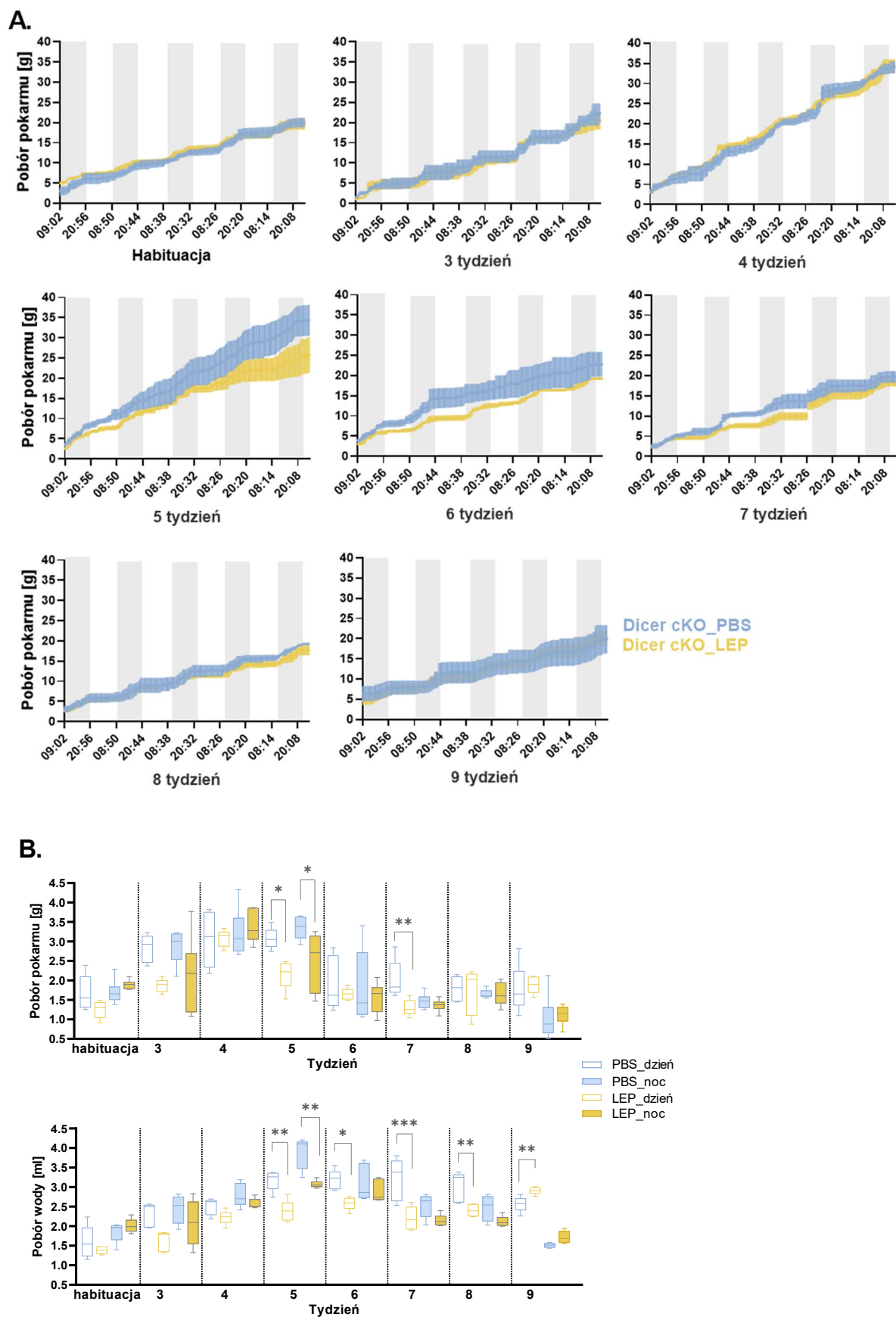
Rycina 4.10 Walidacja efektu działania pomp osmotycznych ALZET 2004 z leptyną (n=8) lub nośnikiem (PBS, n=7) zaimplantowanych podskórnie do myszy kontrolnych C57Bl/6J na okres 4 tygodni. Górny panel przedstawia masę ciała zwierząt, środkowy – pomiar spożytego pokarmu w danym tygodniu, dolny panel – pomiar stężenia leptyny w osoczu myszy po implantacji. Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Sidaka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.1.7 Analiza wpływu leptyny na wybrane parametry metaboliczne u myszy

Dicer^{CaMKII α CreERT2}

Część myszy Dicer cKO po wprowadzeniu podskórnie pomp osmotycznych z leptyną (n=3) lub nośnikiem PBS (n=3), zamiast w standardowych klatkach domowych, umieszczono w klatkach metabolicznych, gdzie rejestrowano wybrane parametry metaboliczne: pobór pokarmu, pobór wody, współczynnik wymiany oddechowej (RER) i wydatek energetyczny

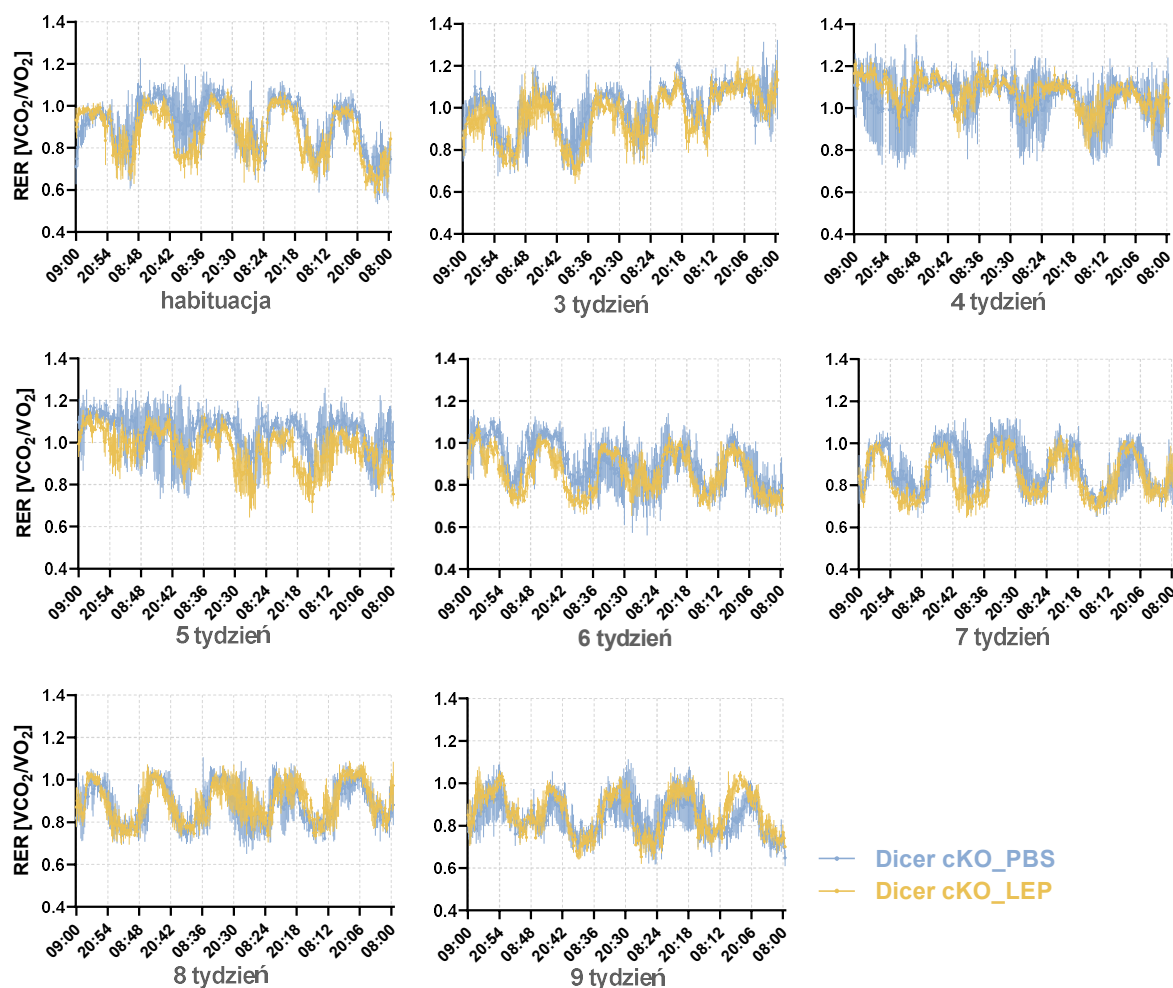
(EE) w celu uchwycenia różnic wynikających z działania egzogennej leptyny na rozwój fenotypu otyłości. Wyniki wskazują na różnicę w poborze pokarmu i wody, natomiast nie wykazano różnic w parametrach RER i EE. Analiza konsumpcji pokarmu, oceniana jako pobór kumulatywny, pokazała zaznaczającą się tendencję w kierunku obniżenia poboru pokarmu w grupie z leptyną, lecz w żadnym punkcie czasowym nie osiągnęła istotności statystycznej (Rycina 4.11 A). Natomiast analiza średnich wartości konsumpcji pokarmu dla fazy aktywnej i nieaktywnej dla danego tygodnia wykazała odstępstwa pomiędzy grupami w poborze pokarmu w 5. i 7. tygodniu mutacji (Rycina 4.11 B, górny wykres). Różnice zaobserwowano również w poborze wody. W tym przypadku również wyniki otrzymane po analizie średnich wartości (Rycina 4.11 B, dolny wykres) wykazały mniejszy pobór wody w grupie myszy Dicer cKO z leptyną, zwłaszcza w fazie nieaktywnej. Podanie leptyny ograniczyło picie w tygodniach 5-8, natomiast w 9. tygodniu w fazie nieaktywnej w tej grupie zaobserwowano efekt odwrotny tj. istotnie zwiększoną konsumpcję wody ($p=0.002$). W ostatnim, 9. tygodniu badania, zaobserwowano zaskakujące zjawisko odwracania aktywności dobowej, polegającym na zwiększonej konsumpcji pokarmu i wody w fazie nieaktywnej w porównaniu do fazy aktywnej w obu grupach myszy Dicer cKO, aczkolwiek wyniki RER zdają się przeczyć tej obserwacji, gdyż wykres dobowy wygląda prawidłowo. Zapis RER pokazuje, że w fazie aktywnej jego wartość oscyluje wokół 1, natomiast podczas fazy nieaktywnej przyjmuje wartości $\sim 0,7$. Możliwe jest, że długość pojedynczego posiłku ulega zmianie i jednorazowo myszy pobierają więcej pokarmu i wody, albo spożywają więcej pokarmu na granicy faz aktywności. Wynik może sugerować również zaburzenia cyklu okołodobowego. Należy jednak mieć na uwadze, iż sensory wagowe w klatkach metabolicznych nie są idealnie zaprojektowane i mogą w pewnych okolicznościach generować wadliwe pomiary, stąd zebrane wyniki mogą być obarczone pewnym błędem technicznym. Ponadto, badanie jest wykonane na małej grupie z uwagi na liczbę dostępnych klatek i długi czas obserwacji, co również przekłada się na uzyskane wyniki, gdyż wystarczy jeden osobnik, który będzie generował błędy, np. nie do końca nauczy się jak prawidłowo korzystać z podajników na pokarm lub wejdzie na podajnik pokarmu w trakcie odczytu, a wynik zostanie zaburzony.



Rycina 4.11 Analiza poboru pokarmu i wody u myszy Dicer cKO z zaimplantowanymi pompami osmotycznymi z leptyną lub roztworem PBS z użyciem klętek metabolicznych. Wykresy przedstawiają (A) kumulatywny pobór pokarmu z 5 dni podczas habituacji oraz od 3. do 9. tygodnia mutacji; (B) wykres typu

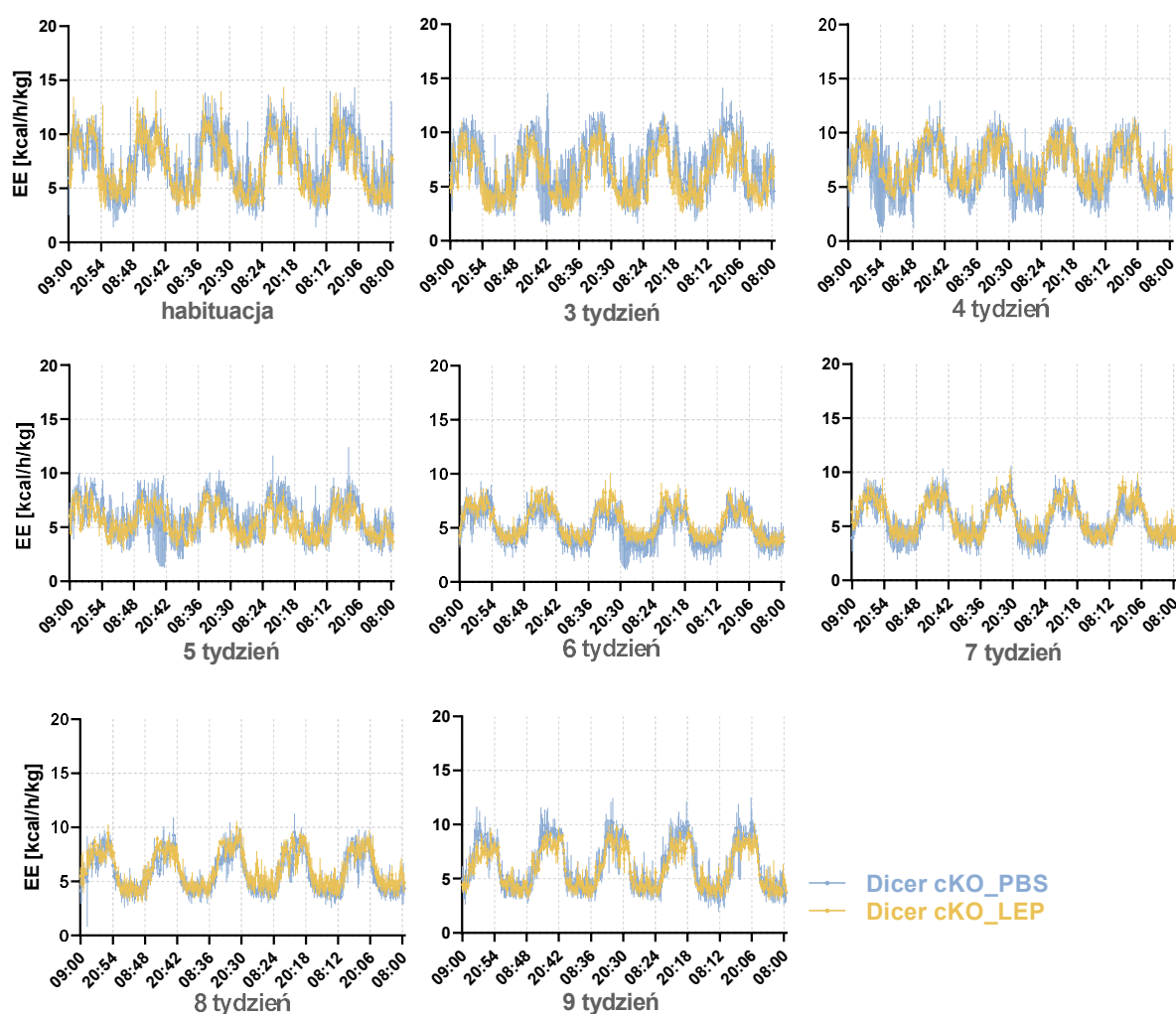
ramka-wąsy przedstawiający średnią konsumpcję pokarmu (górny wykres) i wody (dolny wykres) dla 12-godzinnej fazy jasnej i ciemnej cyklu okołodobowego w badanych tygodniach (dla większej przejrzystości na wykresie pokazano wyłącznie różnice pomiędzy grupami LEP vs PBS w fazie jasnej lub ciemnej z danego tygodnia). Do analizy (A) zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla (B) jednoczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami z testem post hoc Šidáka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM, $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***)

Parametr RER w obu grupach, zgodnie z wynikami z poprzedniej analizy myszy DicerKO kłatkach metabolicznych, wykazywał charakterystyczną dla badanej linii zmianę ujawniającą się już pod koniec 3. tygodnia i trwającą do połowy 6. tygodnia (Rycina 4.12), co świadczy o nadmiernej konsumpcji pokarmu, zarówno w fazie aktywnej i nieaktywnej. Po tym okresie wykres przyjmuje klasyczną sinusoidalną formę, świadczącą o spadku konsumpcji w fazie nieaktywnej ($RER=0,7$).



Rycina 4.12 Analiza współczynnika wymiany oddechowej (RER) u myszy Dicer cKO z infuzją leptyny lub nośnika (PBS) z wykorzystaniem kłatek metabolicznych. Pomiary przeprowadzono przez 5 kolejnych dni z każdego analizowanego tygodnia, poczynając od fazy adaptacyjnej (habitucja) oraz od 3. do 9. tygodnia od indukcji mutacji. Analizowano średnie wartości RER z 12-godzinnej fazy nieaktywnej (odwrócona doba, dzień: 21:00-09:00) i 12-godzinnej fazy aktywnej (noc: 09:00-21:00). Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z powtórzonymi pomiarami z testem post hoc Šidáka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

Do analizy wydatku energetycznego (EE) (Rycina 4.13) wykorzystano dane Phenomastera w odniesieniu do masy beztłuszczowej (ang. *lean mass*), która przyjmuje wartość wagi wykładniczej 0,75. W badanym parametrze nie uwidoczniono różnic pomiędzy grupami. W obu grupach, podobnie jak w poprzednich badaniach, można zaobserwować podobne niskie wartości wydatku energetycznego, co może świadczyć o obniżonej aktywności fizycznej, jednakże tego parametru nie uwzględniono w eksperymencie z uwagi na ingerencje we wskaźniki metaboliczne.



Rycina 4.13 Analiza wydatku energetycznego myszy Dicer cKO z infuzją leptyny lub nośnika z wykorzystaniem klatek metabolicznych, przeprowadzona przez 5 kolejnych dni z każdego analizowanego tygodnia. Analizowano średnie wartości EE z 12-godzinnej fazy nieaktywnej (odwrócona doba). Do analizy statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z powtórzonymi pomiarami, z testem post hoc Šidáka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.1.8 Analiza hormonów tarczycowych

Przysadka mózgowa jest „gruczołem nadrzędnym”, gdyż kontroluje pracę pozostałych gruczołów dokrewnych, poprzez wydzielanie hormonów, które pełnią kluczową rolę w regulacji metabolizmu, wzrostu i reprodukcji. Przysadka jest odpowiedzialna między innymi za stymulację nadnerczy poprzez wydzielanie ACTH, tarczycy - TSH, jajników i jąder - FSH, LH i produkcję mleka – prolaktyna, oraz pełni istotną rolę w utrzymaniu ciśnienia krwi i wydalania wody przez nerki. Przysadka mózgowa jest połączona i kontrolowana przez podwzgórze, które wykrywa poziom wydzielania danego gruczołu i określa poziom stymulacji. Zmiana masy ciała może być spowodowana zaburzeniami funkcji tarczycy, której rolą jest regulacja tempa metabolizmu. Niedoczynność tarczycy spowalnia spoczynkowe tempo metabolizmu i przyczynia się do wzrostu masy ciała (Pearce, 2012). Poziom produkowanego przez przysadkę mózgową TSH jest kontrolowany na zasadzie odwrotnego sprzężenia zwrotnego w odpowiedzi na stężenie hormonów tarczycowych w obiegu. Zbyt małe wydzielanie TSH jest związane z nadmierną produkcją hormonów tarczycy powodującą nadczynność tarczycy, stan, który oprócz wielu różnych dolegliwości, powoduje wzrost tempa metabolizmu i spadek wagi, pomimo zwiększonego apetytu. Jednakże, badanie w kierunku zmian w poziomie TSH oraz hormonów wydzielanych przez tarczycę: wolnej frakcji tyroksyny (tetrajodotyroniny, fT4, ang. *free thyroxine*) i trójjodotyroniny T3 (fT3, ang. *free triiodothyronine*) w teście ELISA nie wykazało zmian w pracy gruczołu tarczycowego, regulującego tempo metabolizmu. Do testu wykorzystano zwierzęta w trzech punktach czasowych od indukcji mutacji zarówno w fazie aktywnej, jak i nieaktywnej:

➤ **4. tygodniu:**

Kontrola: faza ciemna (n=5), faza jasna (n=4);

Dicer cKO: faza ciemna (n=5), faza jasna (n=4);

➤ **6. tygodniu:**

Kontrola: faza ciemna (n=8), faza jasna (n=4);

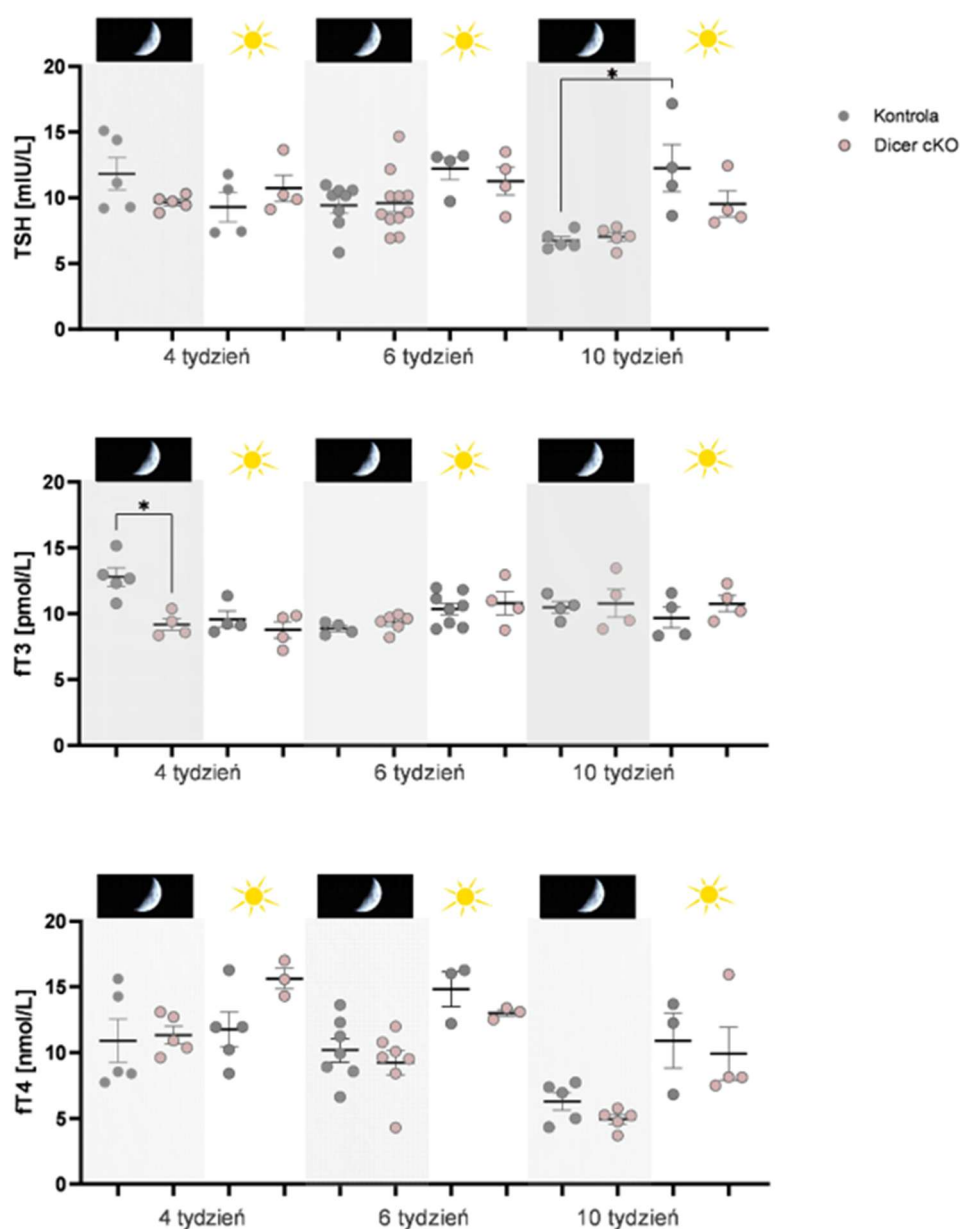
Dicer cKO: faza ciemna (n=11), faza jasna (n=4);

➤ **9. tygodniu:**

Kontrola: faza ciemna (n=5), faza jasna (n=4);

Dicer cKO: faza ciemna (n=5), faza jasna (n=4).

Nie zaobserwowano znaczących różnic w poziomie badanych hormonów pomiędzy grupami. Wynik poziomu $fT3$ w fazie aktywnej w 4. tygodniu mutacji wykazuje istotność statystyczną, ale wynika to prawdopodobnie z odchyień w grupie kontrolnej (Rycina 4.14). W innych punktach czasowych poziom $fT3$ w obu fazach cyklu okołodobowego przybiera podobne wartości. Wnioskować można zatem, że obniżenie poziomu $miRNA$ w neuronach przodomózgowia nie powoduje istotnych zmian w funkcjonowaniu tarczycy, które mogłyby tłumaczyć wpływ na tempo metabolizmu.



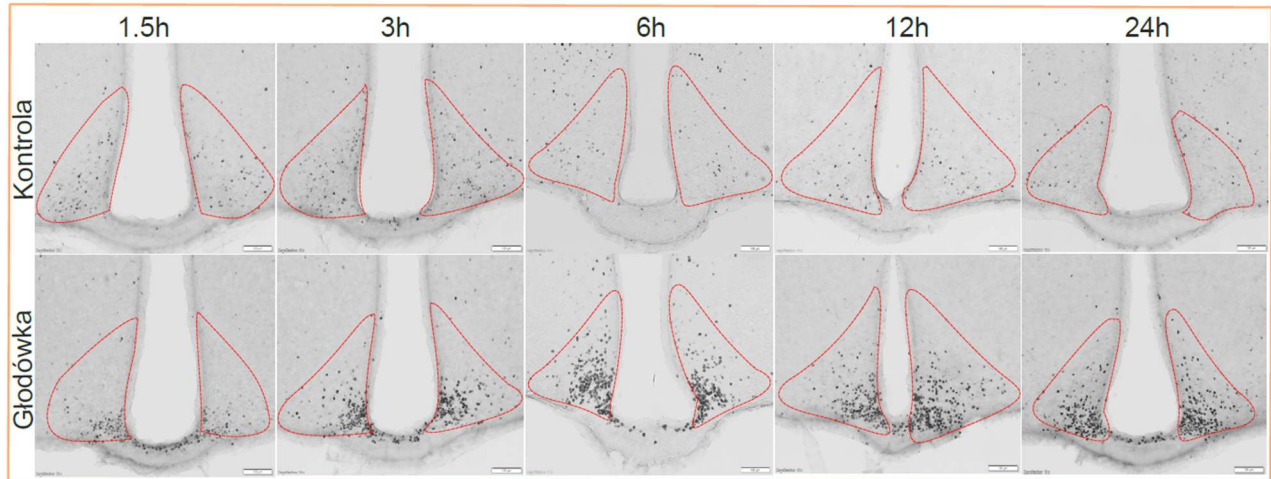
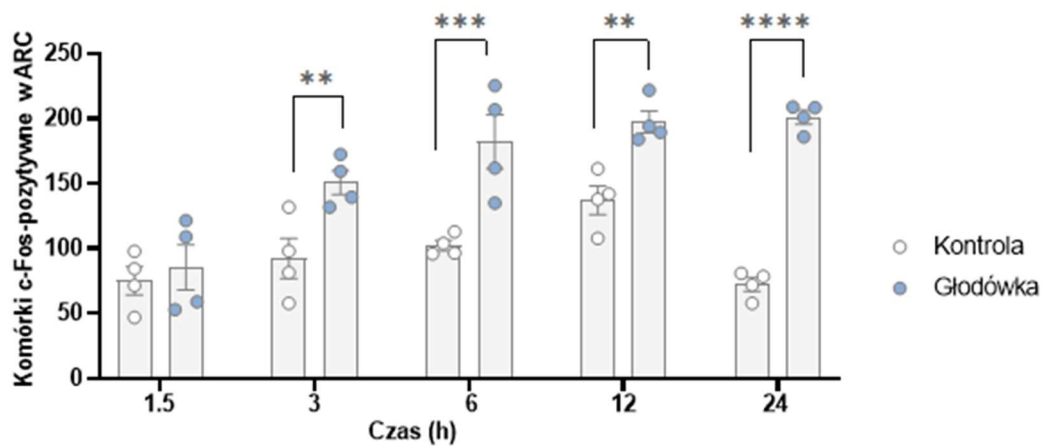
Rycina 4.14 Analiza hormonów tarczycowych przy użyciu testu ELISA z osocza samic Dicer cKO oraz samic kontrolnych pobranych w 4, 6 i 10 tygodni od indukcji mutacji w fazie aktywnej (szare pole) i nieaktywnej (białe pole) cyklu okołodobowego. Poziom TSH analizowany z wykorzystaniem testu Kruskal-Wallis z testem post hoc Dunna. Poziom $fT3$ i $fT4$ analizowany z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukey'a; gwiazdki poziomu istotności $p < 0,0332$ (*); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.2 Określenie roli genu *c-fos* w rozwoju otyłości u myszy *Dicer*^{CaMKIIαCreERT2}

Wyniki uzyskane do tej pory pokazują istotną rolę genu *Dicer1* w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu. MikroRNA pełni ważne funkcje w plastyczności neuronalnej, a podwzgórze jest rejonem mózgu wykazującym wysoki stopień plastyczności, gdyż kontroluje procesy wymagające szybkiej adaptacji do określonych warunków środowiskowych. Dane literaturowe pokazują, że podczas głodówki, a więc w stanie negatywnego statusu energetycznego, dochodzi do wzmożonej ekspresji genu *c-fos* - markera neuroplastyczności (T. Liu i in., 2012). W przedstawianej pracy doktorskiej postawiono hipotezę, że u myszy *Dicer* cKO w wyniku mutacji dochodzi do zaburzenia programu ekspresji genów regulujących łaknienie kontrolowanych przez IEG, i że *c-fos* odgrywa rolę w rearanżacji sieci neuronalnych kontrolujących bilans energetyczny w odpowiedzi na deficyt kaloryczny, a zaburzenie jego ekspresji przyczynia się do fenotypu obserwowanego u myszy *Dicer* cKO.

4.2.1 Analiza ekspresji genu *c-fos* podczas głodówki u myszy C57Bl/6J

Głodówka powoduje wzrost ekspresji genu *c-fos* w jądrze łukowatym podwzgórza – rejonie mózgu kontrolującym mechanizmy głodu i sytości. Jednakże, kinetyka tego wzrostu nie została do tej pory określona. Przeprowadzono zatem eksperyment z okresowym pozbawieniem pokarmu myszy C57Bl/6J (przez 1.5, 3, 6, 12 i 24 godziny) i dokonano analizy poziomu białka c-Fos za pomocą barwienia IHC. Wyniki pokazują, że usunięcie pokarmu stanowi silny bodziec stymulujący aktywność neuronalną w ARC, w szczególności w rejonie przykomorowym jądra łukowatego, gdzie zlokalizowane są neurony AgRP oraz w ME (Rycina 4.15 A). U myszy kontrolnych z dostępem do pokarmu, immunoreaktywność białka c-Fos jest niewielka i występuje głównie w rejonie lateralnym ARC, gdzie usytuowane są neurony POMC. Jednakże *c-fos* w ARC podczas głodówki nie zachowuje się jak klasyczny gen wczesnej odpowiedzi komórkowej, ponieważ jego ekspresja nie zanika po kanonicznych 6 godzinach. Podwyższony poziom białka c-Fos zaobserwowano już po 1.5 godziny, natomiast wartości istotne statystycznie wykryto w 3, 6, 12 i 24. godzinie od usunięcia pokarmu (Rycina 4.15 A, B). Przedstawiony wynik pokazuje, że głodówka stanowi silny bodziec aktywujący ekspresję genu *c-fos*, która nie ulega wyciszeniu w ARC. Otrzymane wyniki wskazują, iż podczas głodówki stale napływające peryferyjne sygnały, informujące o negatywnym bilansie energetycznym, nie pozwalają na wyciszenie genu *c-fos* w jądrze łukowatym.

A.**B.**

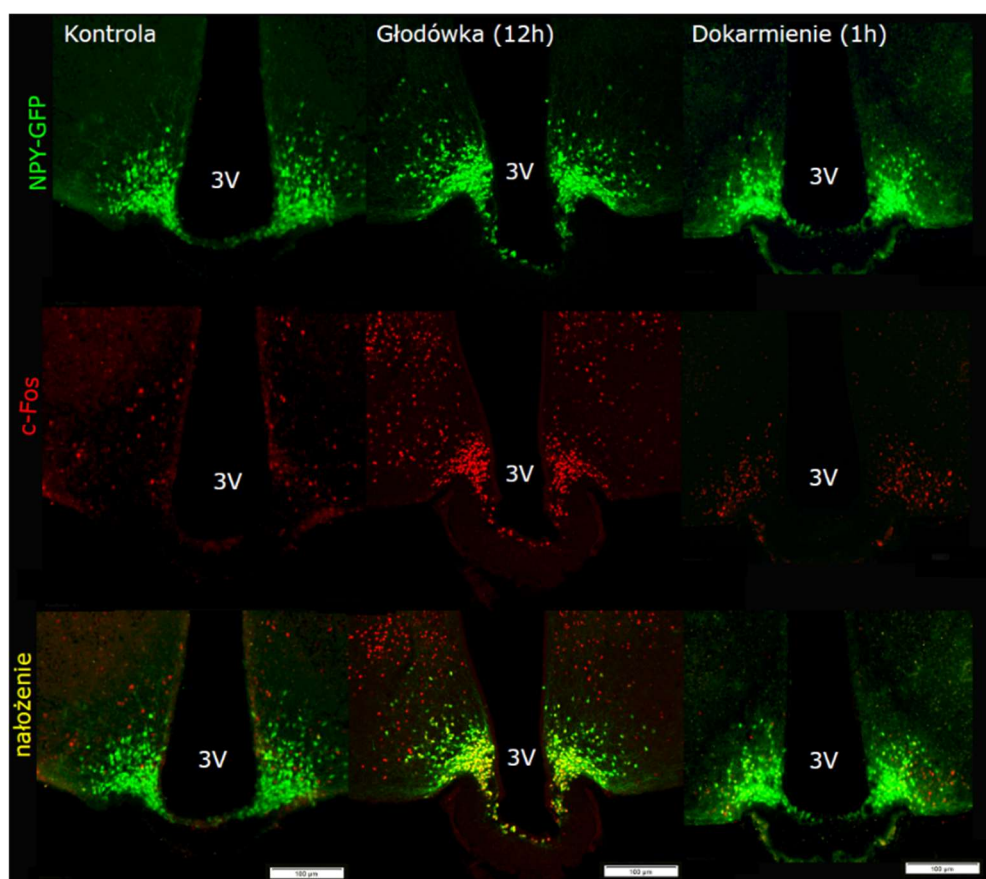
Rycina 4.15 Analiza ekspresji genu *c-fos* u myszy C57Bl/6J podczas okresowego pozbawienia pokarmu w jądrze łukowatym. **(A)** Barwienie IHC DAB wykrywające białko c-Fos w ARC 1.5, 3, 6, 12 i 24 godziny od wyjęcia pokarmu; górny panel – grupa kontrolna z obecnym jedzeniem; dolny panel – grupa badana; skala 100 μ m. **(B)** Analiza statystyczna białka c-Fos w jądrze łukowatym podczas głodówki z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA), z testem post hoc Śidaka. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności, $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.2.2 Określenie populacji neuronów wykazujących ekspresję genu *c-fos* podczas głodówki z wykorzystaniem myszy NPY-GFP

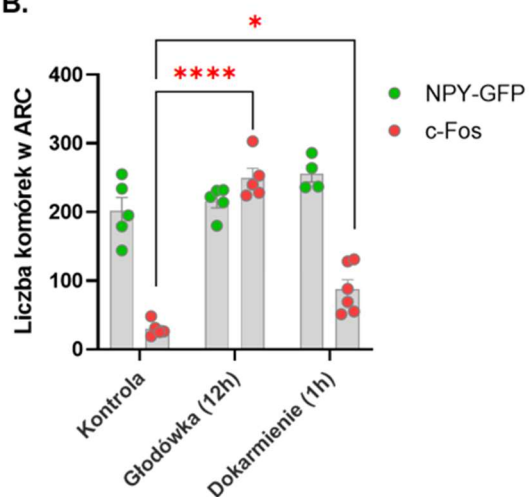
Transgeniczna linia myszy NPY-GFP charakteryzuje się specyficzną ekspresją białka fluorescencyjnego GFP w oreksygenicznym neuronach NPY. Wykorzystanie tego modelu umożliwiło określenie, która populacja neuronów wykazuje ekspresję genu *c-fos* podczas głodówki. Przeprowadzono doświadczenie oceniające poziom białka c-Fos na różnych poziomach energetycznych: u zwierząt z pokarmem *ad libitum* (kontrola) ($n=6$), u zwierząt po

12-godzinnej głodówce (n=5) i u zwierząt, u których po okresie głodówki ponownie dodano pokarm (n=6) (ang. *refeeding*). W ostatniej grupie zmierzono ilość spożytego pokarmu w ciągu godziny i oceniono poziom białka c-Fos. Pokazano, iż ekspresja genu *c-fos* w ARC jest ściśle zależna od statusu energetycznego organizmu. Wyniki z analizy białka c-Fos po 12-godzinnym okresie pozbawienia pożywienia pokrywają się z wynikami u myszy C57Bl/6J, gdzie wykazano intensywną c-Fos–zależną aktywność neuronalną w ARC, w szczególności w części przyśrodkowej, gdzie zlokalizowane są neurony AgRP/NPY. Natomiast u zwierząt, u których po okresie głodówki ponownie dodano pokarm na 60 minut, wykazano obniżenie poziomu białka c-Fos w ARC w neuronach oreksygenicznym i aktywację w części bocznej, gdzie zlokalizowane są neurony POMC. Dodatkowo zmierzono ilość spożytego pokarmu przez godzinę od ponownego dostarczenia karmy i pokazano, że myszy po okresie głodówki spożywają ~1/3 dobowego zapotrzebowania na pokarm (Rycina 4.16 C).

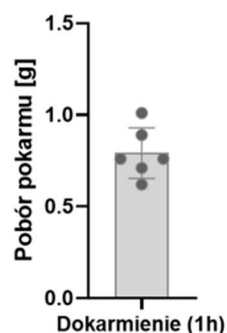
A.



B.



C.

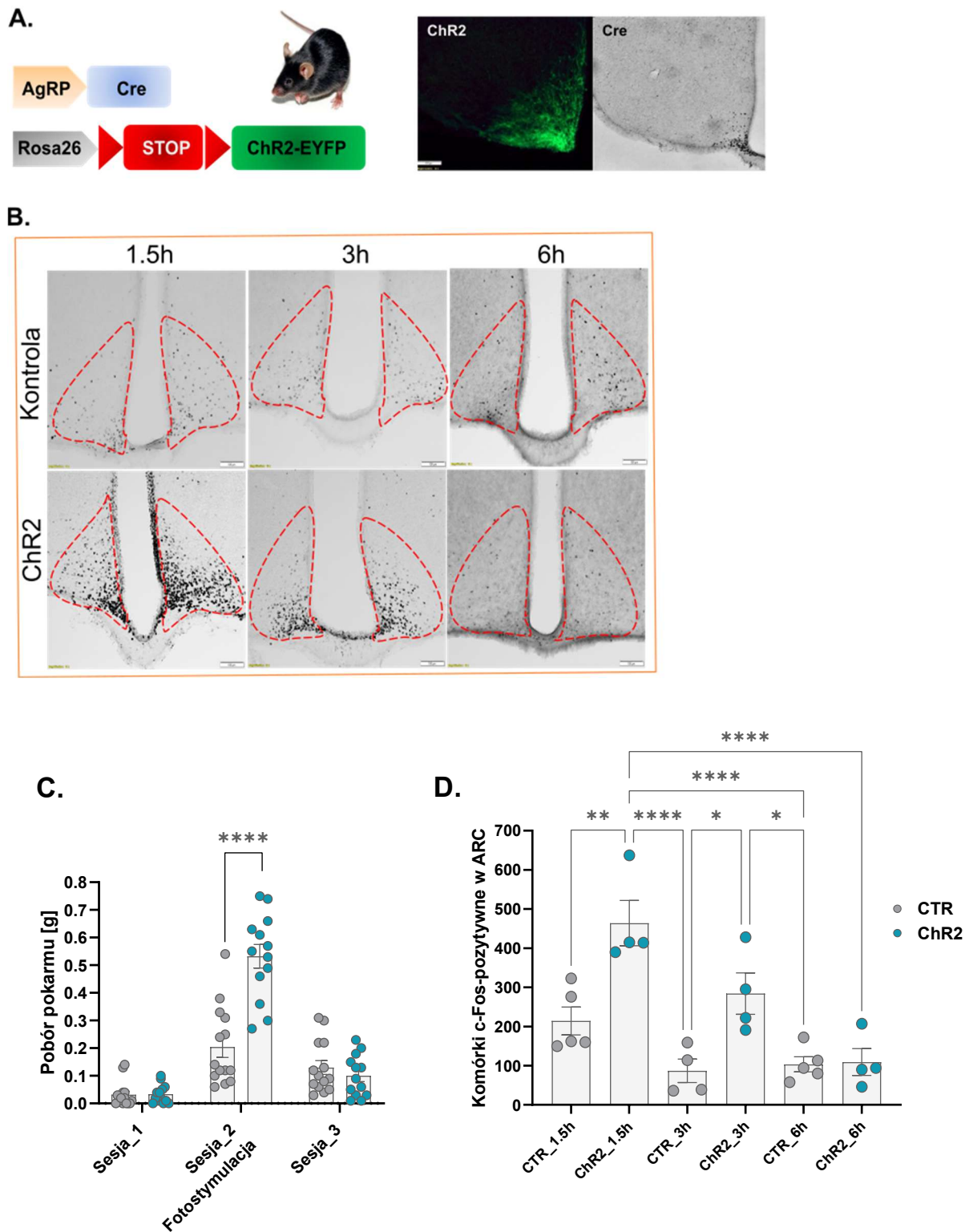


Rycina 4.16 Porównanie poziomu białka c-Fos i NPY-GFP w jądrze łukowatym u myszy kontrolnych (bez głodówki; lewa strona), podczas 12-godzinnej głodówki (środkowy panel) oraz z dokarmieniem po okresie głodówki (1 godzina; prawa strona). **(A)** Barwienie fluorescencyjne przeciwko białku c-Fos w ARC (czerwony sygnał); w górnym rzędzie sygnał GFP pochodzi od myszy transgenicjnych NPY-GFP; skala 100 μm **(B)** Wykres przedstawiający liczbę aktywnych komórek w ARC na różnym poziomie energetycznym. Do analizy wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych do myszy kontrolnych z testem post hoc Šidáka. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności, $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM. **(C)** Pomiar poboru pokarmu przez godzinę po okresie głodówki.

4.2.3 Optogenetyczna stymulacja jądra łukowatego

W kolejnym kroku, aby określić czy sama aktywacja neuronów oreksygenicznych (bez modulującego wpływu czynników obwodowych) jest wystarczająca, by wywołać ekspresję genu *c-fos* w ARC, wykorzystano selektywną stymulację optogenetyczną neuronów AgRP. Aktywacja neuronów oreksygenicznych przy użyciu światła wywołuje natychmiastową indukcję jedzenia u najedzonych zwierząt oraz umożliwia określenie kinetyki ekspresji genu *c-fos* w ARC. Stymulacja optogenetyczna ARC stanowiła kilkuetapowe wyzwanie. Po pierwsze, należało opracować efektywny i powtarzalny sposób wprowadzenia ChR2 do ARC, umożliwiając uzyskanie podobnego poziomu opsyne u wszystkich badanych zwierząt. W pierwszej kolejności wykorzystano wektory wirusowe AAV-CamKII α -ChR2-EGFP. W tym systemie poprawne podanie wirusa niosącego ChR2 oceniano na podstawie fluorescencji białka reporterowego EGFP. Wstępne doświadczenia pokazały jednak, że użycie wirusa AAV nie przynosiło optymalnych rezultatów. Zaobserwowano różnice w poziomie fluorescencji u poszczególnych osobników, co mogło przekładać się na ilość ChR2 w ARC. Dodatkowo użycie promotora CamKII α , kierującego ekspresją ChR2, skutkowało wprowadzeniem ChR2 zarówno do neuronów oreksygenicznych, jak i anoreksygenicznych. Ponadto zaobserwowano, że wykorzystanie wektorów AAV ze względu na retro- i anterogradny charakter, powodowało przemieszczanie się ChR2 do sąsiadujących jąder podwzgórza, które również biorą udział w regulacji łaknienia, co dodatkowo utrudniało interpretację wyników. Ostatecznie w celu wprowadzenia ChR2 do ARC, wykorzystano podwójnie transgeniczną linię myszy AgRP-Ai32 (połączenie linii AgRP-Cre oraz Cre-zależnej linii ChR2-EYFP), co umożliwiło stabilną ekspresję genu światłoczułego białka ChR2-EYFP w neuronach AgRP ograniczoną do jądra łukowatego (Rycina 4.17 A). Kolejny etap stanowiło utworzenie odpowiedniego implantu optogenetycznego, który dostarcza światło niebieskie do ARC. Zaprojektowano i przetestowano zarówno implanty bezprzewodowe, jak i przewodowe. System bezprzewodowy pomimo licznych zalet, takich jak brak widocznych elementów na głowie, brak potrzeby mocowania światłowodu podczas stymulacji i ograniczony kontakt z eksperymentatorem, okazał się niewydajny. Część implantów po wprowadzeniu do mózgu przestawała świecić, a świecenie uzależnione było od pozycji zwierzęcia, gdyż indukcja prądu możliwa była wyłącznie w pozycji równoległej do podłoża. Podczas eksploracji klatki, gdy zwierzę wstawało na tylne łapy, powodując ustawienie się implantu w pozycji pionowej, dochodziło do przerw w stymulacji. Biorąc pod uwagę wszystkie zalety i wady obu systemów,

ostatecznie wykorzystano system przewodowy, gdzie światło niebieskie pochodzące z lasera, przewodzone było z wysoką wydajnością przez włókna światłowodowe do badanego regionu mózgu. Stymulacja optogenetyczna umożliwiła zatem aktywację neuronalną w wybranym momencie, a wykorzystanie zwierząt z dostępem *ad libitum* do pokarmu, sprawdzenie jak długo po samej aktywacji bez dodatkowych sygnałów głodu z peryferii, sygnał c-Fos utrzymuje się w ARC. Fotostymulację podzielono na trzy 30-minutowe sesje, po każdej ważono pokarm: sesja 1. oraz 3. bez stymulacji, sesja 2. ze stymulacją optogenetyczną kontrolowaną przez Arduino Uno o zapętlonych parametrach: częstotliwość 10 Hz; puls 15 milisekund; stymulacja 30 sekund; przerwa 30 sekund. Pokazano, że aktywacja neuronów oreksygeniczných jest w stanie wywołać natychmiastowy pobór pokarmu, który przez 30 min stymulacji jest zbliżony do okresu dokarmienia po głodówce (Rycina 4.17 C). W ostatniej sesji pobór jedzenia był nieznacznie większy w porównaniu do sesji sprzed stymulacji, prawdopodobnie ze względu na stopniowe wyciszenie aktywności neuronalnej. Zwierzęta uśmiercono w 3 punktach czasowych: 1.5, 3 i 6 godzin po stymulacji, w celu określenia liczby komórek c-Fos–pozytywnych po aktywacji neuronów AgRP w ARC u najedzonych zwierząt. Pokazano, że sama aktywacja neuronalna jest wystarczająca by wywołać wzmożoną ekspresję genu *c-fos*, natomiast bez wzmocnienia ze strony sygnałów peryferyjnych informujących o negatywnym statusie energetycznym organizmu, sygnał ulega stopniowemu wyciszeniu (po 3h wykazuje wciąż podwyższony poziom) i po 6 godzinach powraca do poziomu podstawowego (Rycina 4.17 B, D).



Rycina 4.17 Indukcja jedzenia i ekspresji genu *c-fos* za pomocą stymulacji optogenetycznej jądra łukowego (A) Transgeniczna linia myszy z selektywną ekspresją ChR2-EGFP w neuronach AgRP jądra łukowego otrzymana poprzez połączenie linii AgRP-Cre z linią ChR2-EYFP. Wykorzystanie linii AgRP-Cre determinuje ekspresję rekombinazy Cre i powoduje wycięcie kasety STOP i ekspresję ChR2-EYFP w neuronach oreksygenicznym; po prawej stronie zdjęcia mikroskopowe obrazujące ChR2-EYFP w mikroskopie fluorescencyjnym oraz barwienie IHC przeciwko rekombinazie Cre obrazowane w mikroskopie świetlnym; skala 100 μ m (B) Poziom białka c-Fos w jądrze łukowym mierzone za pomocą barwienia IHC w trzech punktach czasowych od fotostymulacji (1.5, 3 i 6 godzin) u zwierząt kontrolnych oraz z aktywną ChR2 w neuronach AgRP; skala 100 μ m. (C) Stymulacja poboru pokarmu. Eksperyment

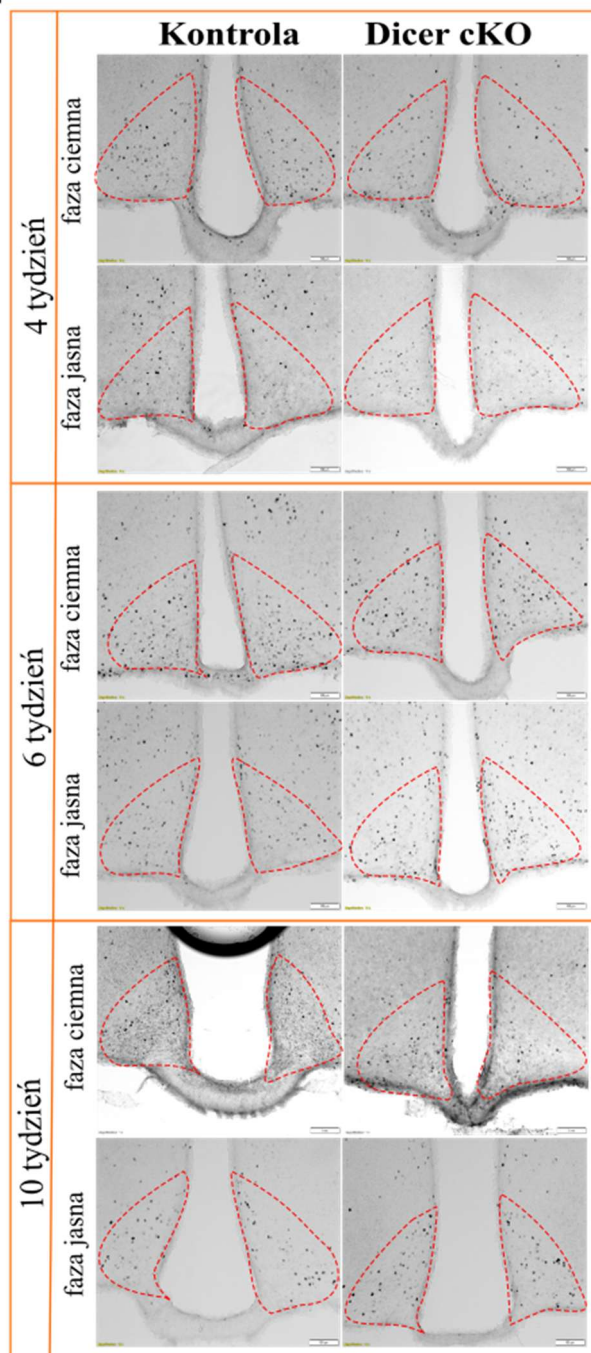
przeprowadzono w 3 sesjach po 30 min, po których mierzono pobór pokarmu; sesja 1,3 – bez stymulacji, sesja 2- fotostymulacja (częstotliwość 10 Hz, puls 15 ms, stymulacja 30 s, przerwa 30 s). **(D)** Analiza poziomu białka c-Fos 1.5, 3 i 6 godzin po stymulacji optogenetycznej za pomocą barwienia IHC. Do analizy wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukey’a. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności, $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

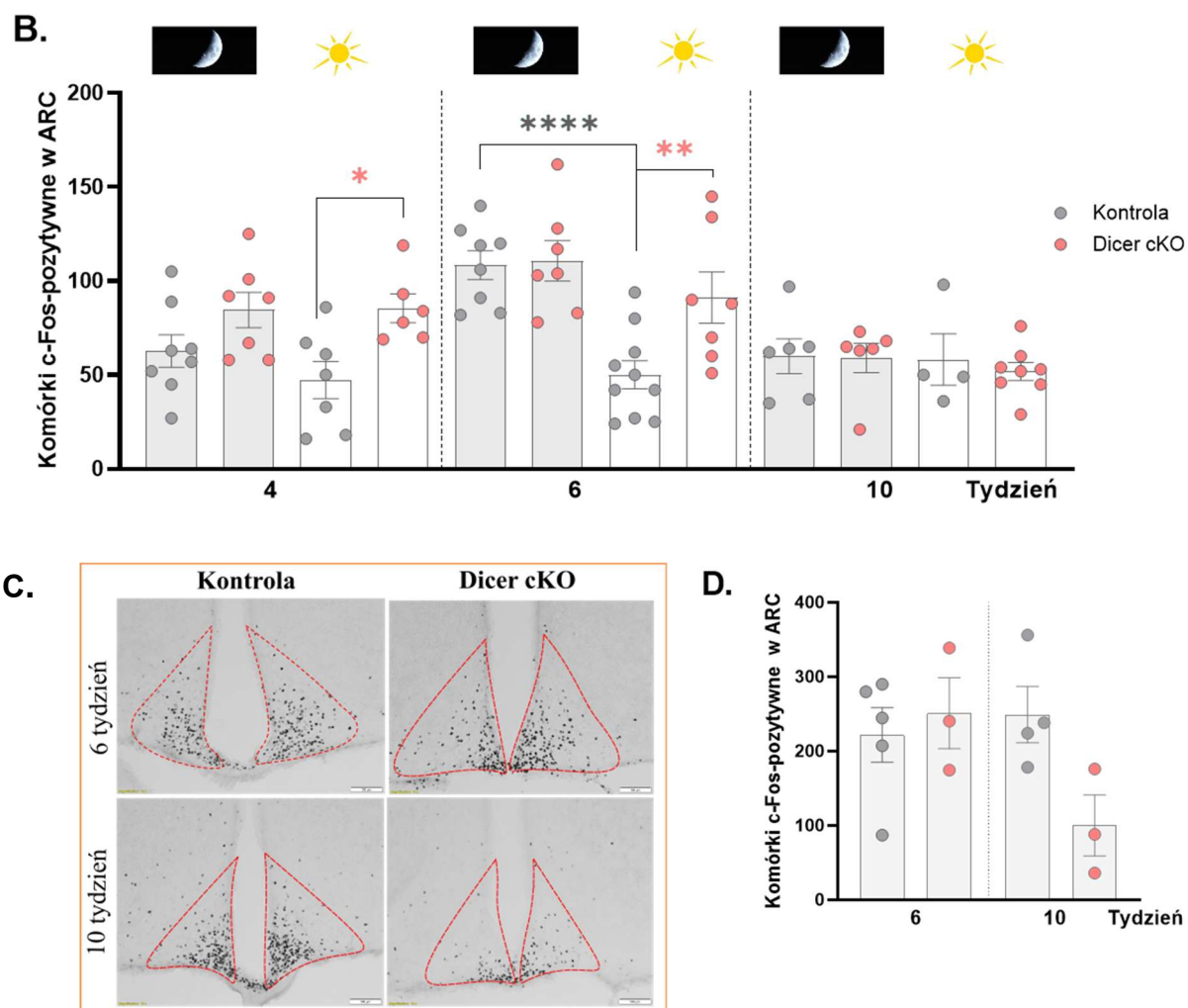
4.2.4 Analiza ekspresji genu *c-fos* u myszy Dicer^{CaMKII α CreERT2}

Poprzednie doświadczenia pokazały, że ekspresja genu *c-fos* w ARC jest ściśle skorelowana ze statusem energetycznym i wzrasta podczas głodu w neuronach oreksygenicznych. Dodatkowo, c-Fos podczas głodówki nie ulega wyciszeniu, prawdopodobnie z uwagi na stale napływające sygnały głodu. Myszy Dicer cKO charakteryzują się hiperfagią i otyłością, co oznacza, że obniżenie poziomu mikroRNA w neuronach wpływa na metabolizm i zaburza mechanizmy kontroli łaknienia. By zbadać, czy w wyniku mutacji u myszy Dicer cKO dochodzi do zmian w ekspresji genu *c-fos* w ARC, wykonano analizę poziomu białka c-Fos dla zwierząt obu płci, w 3 punktach czasowych: 4, 6 i 10. tygodniu od aktywacji mutacji, w obu fazach cyklu okołodobowego. Doświadczenie przeprowadzono na myszach z dostępem *ad libitum* do pokarmu, więc z założenia w warunkach, gdzie nie powinno dochodzić do jego aktywacji. Pokazano, że bazowy poziom ekspresji genu *c-fos*, zarówno u myszy kontrolnych, jak i Dicer cKO jest niski. Niemniej, w fazie jasnej (nieaktywnej), u myszy Dicer cKO, osiąga wyższe wartości (zbliżone do poziomu w fazie aktywnej) w 4. i 6. tygodniu w porównaniu do myszy kontrolnych. Analiza w 10. tygodniu wykazała podobne wartości w liczbie komórek c-Fos–reaktywnych we wszystkich grupach. Ze względu na brak różnic wynikających z płci w liczbie komórek c-Fos–pozytywnych, na wykresach umieszczono dane z obu płci (Rycina 4.18 B). Jednakże, na uwagę zwraca lokalizacja komórek c-Fos–pozytywnych w ARC u myszy Dicer cKO, gdzie zaobserwowano istotne różnice. Nie pokrywają się one bowiem z miejscem występowania neuronów oreksygenicznych, co mogłoby tłumaczyć wzmożoną aktywację i hiperfagię, lecz są rozsiane po ARC i częściowo umiejscowione lateralnie, gdzie usytuowane są neurony POMC. Oznaczać to może, że być może neurony anoreksygeniczne są aktywowane przez obwodowe sygnały sytości, jednakże nie reagują na nie prawidłowo. Sprawdzone również ekspresję genu *c-fos* po 24-godzinnej głodówce w 6. i 10. tygodniu od indukcji mutacji u samców Dicer cKO (Rycina 4.16 C, D). Nie wykazano różnic statystycznych, aczkolwiek w 10. tygodniu w grupie samców Dicer cKO można zauważyć tendencję w kierunku spadku liczby komórek c-Fos–

pozytywnych ($p=0.115$), świadczącą o osłabionej reakcji komórek na obwodowe sygnały głodu.

A.



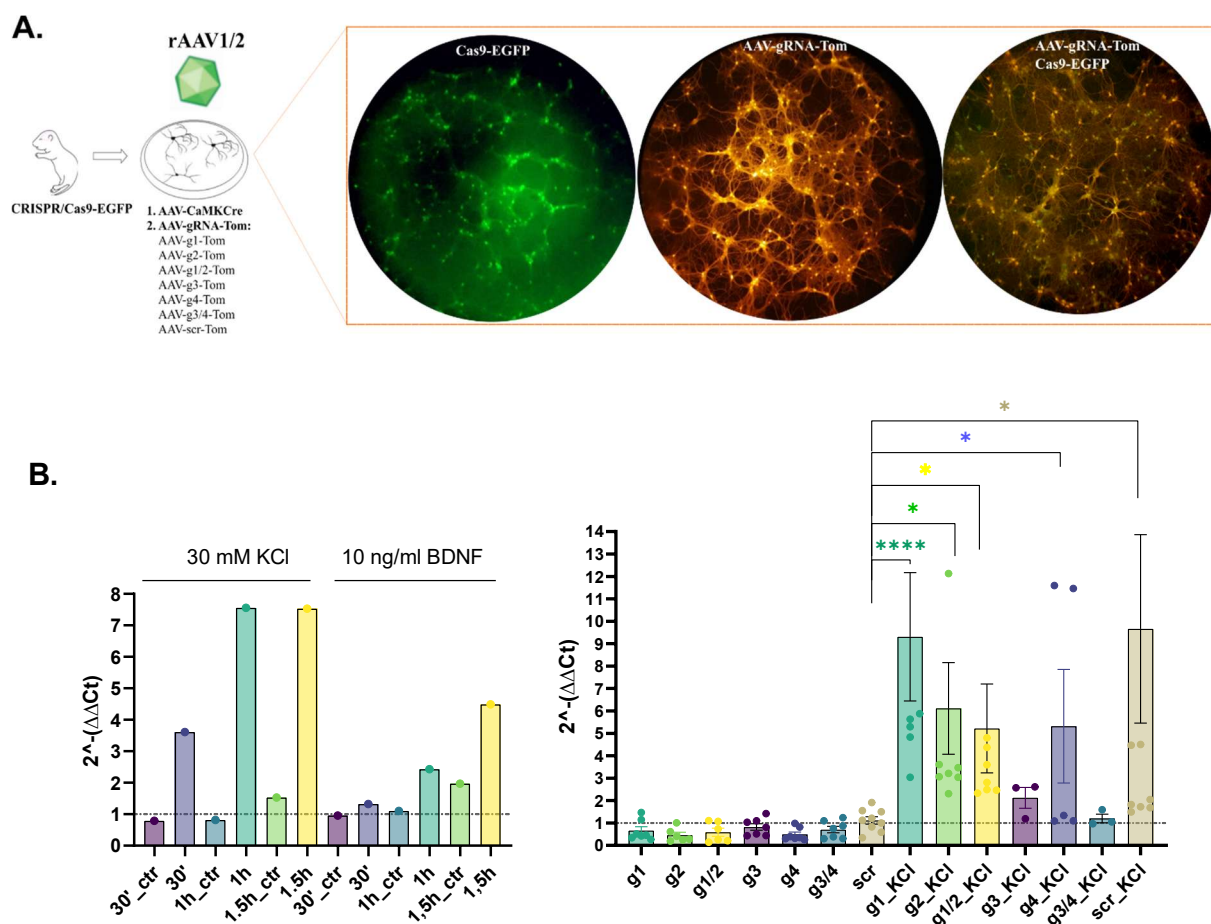


Rycina 4.18 Ekspresja genu *c-fos* u myszy Dicer cKO. (A) Barwienie IHC przeciwko białku c-Fos w jądrze łukowatym w 4, 6 i 9. tygodniu od podania tamoksyfenu w fazie aktywnej i nieaktywnej cyklu okołodobowego oraz (C) u samców Dicer cKO po 24h głodówce w 6. i 10. tygodniu; skala 100 μ m. (B) Analiza komórek c-Fos – pozytywnych w ARC w 4, 6 i 9. tygodniu od indukcji mutacji u myszy Dicer cKO obu płci z dostępem ad libitum do pokarmu oraz (D) u samców Dicer cKO po 24h głodówce, z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Šidáka. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności, $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

4.2.5 Walidacja systemu CRISPR-Cas9 *in vitro* w pierwotnej hodowli hipokampalnej

W celu określenia wpływu genu *c-fos* na rozwój fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO, wykorzystano technikę CRISPR/Cas9. Zaprojektowano sekwencje guideRNA1, guideRNA2, guideRNA3, guideRNA4 (w skrócie g1, g2, g3, g4), które po wprowadzeniu do wektorów wirusowych AAV, wstępnie sprawdzono pod kątem wydajności wyciszenia w pierwotnej hodowli hipokampalnej, izolowanej z myszy Cas9-EGFP. Ekspresję genu *c-fos* analizowano przy użyciu sond TaqMan, przyłączających się do transkryptu badanego genu. Przetestowano

2 protokoły aktywacji genu *c-fos* – po podaniu 30 mM roztworu KCl (Konopka i in., 2005) i przy użyciu BDNF (10 ng/ml; 0,1% BSA w PBS) (Kuzniewska i in., 2013) po upływie 30, 60 i 90 minut po podaniu związku. Zdecydowano, że do aktywacji genu *c-fos* zostanie wykorzystany 30 mM roztwór KCl (Rycina 4.19 B). Po godzinnej inkubacji w 37°C, w 5% CO₂, izolowano RNA i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. Następnie określono wyciszający efekt konstruktów za pomocą sond TaqMan. Sprawdzono każdy guideRNA indywidualnie oraz w wybranych na podstawie ich lokalizacji parach – gRNA1/2 oraz gRNA3/4. Indywidualne traktowanie komórek wirusami z wiodącym RNA, miało na celu wyciszenie genu poprzez zmianę ramki odczytu (naprawa NHEJ), natomiast podanie wirusów w parach, powinno zwiększyć prawdopodobieństwo wycięcia fragmentu badanego genu. Wyniki pokazują, że mieszanina gRNA3/4 posiada najwyższy potencjał wyciszający w porównaniu do kontrolnego konstruktu (AAV-scr-Tom).



Rycina 4.19 Analiza wydajności wyciszenia genu *c-fos* w pierwotnej hodowli hipokampalnej izolowanej z myszy Cas9-EGFP przy użyciu sond TaqMan. **(A)** Schemat transdukcji hodowli hipokampalnej pozyskanej z myszy Cas9-EGFP. Wektory wirusowe z rekombinazą Cre (AAV-CaMKCre) aktywują ekspresję Cas9-EGFP (zielony sygnał fluorescencyjny) w neuronach, a wektory z odpowiednimi sekwencjami guideRNA (AAV-gRNA-Tom) (czerwony sygnał) wprowadzają elementy genetyczne do wyciszenia genu *c-fos*. Po 3 dniach od transdukcji oceniano poziom fluorescencji białek reporterowych w mikroskopie fluorescencyjnym. **(B)** Optymalizacja protokołu aktywacji genu *c-fos* za pomocą 30mM KCl oraz przy

użyciu BDNF (10 ng/ml) (po lewej) oraz (po prawej) weryfikacja wyciszającego efektu poszczególnych guideRNA pojedynczo i w wybranych parach na indukcję genu *c-fos* przy użyciu 30mM roztworu KCl. Do analizy wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z testem post hoc Dunnett'a. Na wykresie umieszczono gwiazdki poziomu istotności, $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****); słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

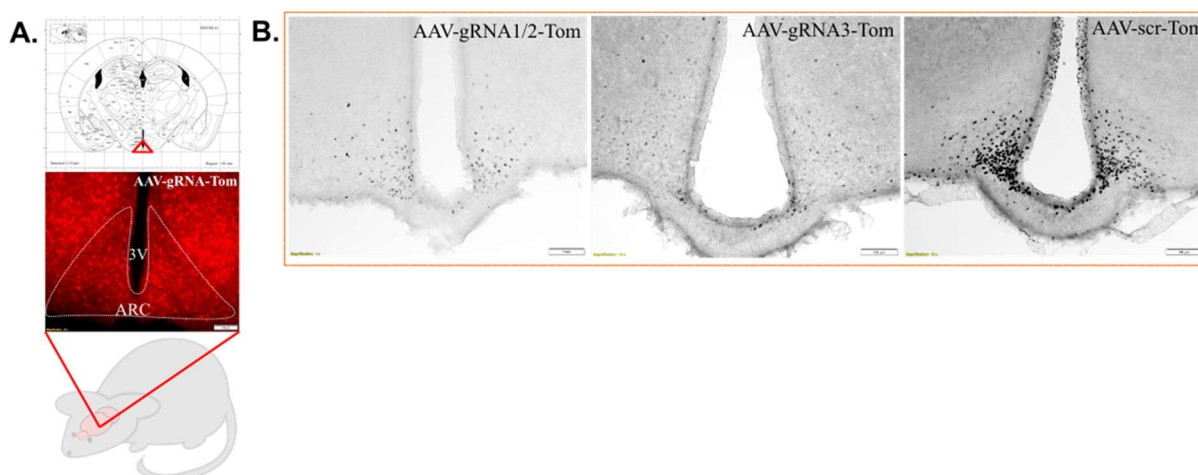
4.2.6 Wyciszenie genu *c-fos* *in vivo*

Weryfikację roli genu *c-fos* w rozwoju otyłości u myszy Dicer cKO *in vivo* dokonano poprzez wprowadzenie do jądra łukowatego rAAV, niosące zaprojektowane warianty sekwencji guideRNA do wyciszenia genu *c-fos*. Aby wprowadzić białko Cas9 do ARC, wykorzystano Cre–zależną linię transgeniczną z wyznakowanym fluorescencyjnie białkiem Cas9-EGFP, ułatwiającym wizualizację lokalizacji po rekombinacji i skrzyżowano ją z linią Dicer^{fl/fl} (**DicerCas9**). Początkowo zaprojektowano dwa gRNA (gRNA1 i gRNA2). Pomimo, iż dane uzyskane z badań *in vitro* nie wykazywały znaczącej efektywności wyciszania ekspresji genu *c-fos*, lecz ukazywały trend w kierunku obniżenia poziomu białka c-Fos, wykonano wstępne doświadczenie walidujące skuteczność wyciszania systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* u myszy Cas9-EGFP. Wykonano pilotażowe iniekcje wektorami wirusowymi zawierającymi gRNA1, gRNA2 oraz zestaw wirusów gRNA1/2 i zdecydowano, że do właściwego doświadczenia zostaną wykorzystane wektory zawierające obie sekwencje gRNA (gRNA1/2). Ostatecznie doświadczenie przeprowadzono w dwóch wariantach eksperymentalnych.

W pierwszym wariancie, bazując na obserwacji, że do fenotypu otyłości dochodzi poprzez utratę cząsteczek miRNA w neuronach oreksygenicznym (praca doktorska, K. Hajdukiewicz), wykonano doświadczenie, w którym selektywnie usunięto gen *Dicer1* w neuronach AgRP. Mutację indukowano w neuronach oreksygenicznym u myszy DicerCas9 za pomocą wirusa AAV niosącego rekombinazę Cre, kontrolowaną przez promotor AgRP (AAV-AgRPCre). Grupie stanowiącej kontrolę pozytywną rozwoju fenotypu otyłości, podano wirusa AAV-AgRPCre (DicerCas9_AAV-AgRPCre, n=7). Grupie badanej podano mieszaninę wektorów wirusowych zawierających oprócz wirusa aktywującego Cre (AAV-AgRPCre), wektory niosące guideRNA służące do wyciszenia genu *c-fos* w parze gRNA1/2 (DicerCas9_AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom, n=5). Grupy kontrolne stanowiły zwierzęta **Cas9-EGFP** bez „ofloksowanego” genu *Dicer1*, którym podano wektor wirusowy niosący rekombinazę Cre (Cas9_AAV-AgRPCre, n=5) oraz analogiczną mieszaninę wirusów aktywujących Cre i wyciszających ekspresję genu *c-fos* (Cas9_AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom, n=5). Zgodnie z założeniem, u zwierząt DicerCas9 podanie wirusa aktywującego

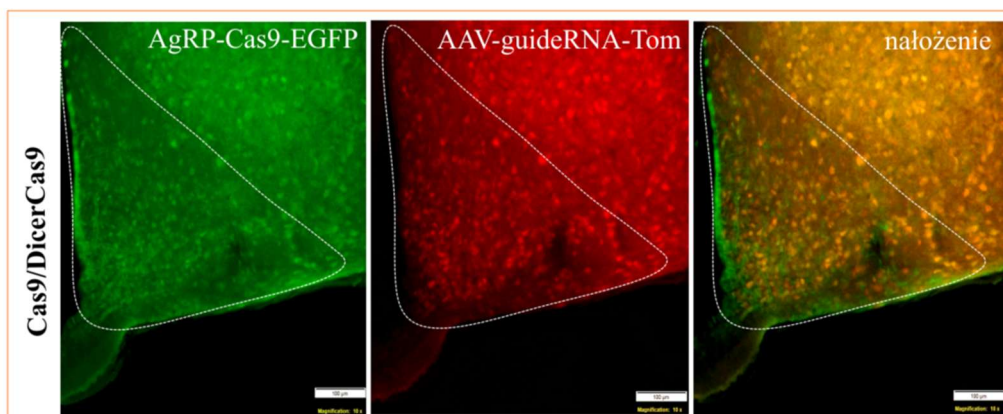
rekombinazę Cre, spowodowało wycięcie genu *Dicer1* w neuronach AgRP, co doprowadziło do rozwoju hiperfagii i otyłości (Rycina 4.22 A), jednakże z odmienną kinetyką niż u mutantów, gdzie rekombinacja zachodzi w neuronach kierowanych przez promotor CaMKII α . Dostrzec można bowiem, szybszy przyrost masy ciała oraz wydłużenie czasu trwania okresu otyłości. Doświadczenie pokazało, iż podanie mieszaniny guideRNA do wyciszenia genu *c-fos* nie wpływa na masę ciała myszy DicerCas9_AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom w porównaniu do grupy DicerCas9_AAVCre (Rycina 4.22 A, lewy wykres). Różnice natomiast zaznaczają się w poborze pokarmu. Analiza spożycia pokarmu wykazała tendencję w kierunku obniżenia konsumpcji u myszy DicerCas9 po podaniu wirusów obniżających ekspresję genu *c-fos* (Rycina 4.22 A, prawy wykres), jednakże ze względu na duże odchylenia, wynik nie osiąga istotności statystycznej. Należy również wziąć pod uwagę możliwość, iż obniżenie poboru pokarmu wynika z podania mniejszej ilości wirusa niosącego Cre (co może przekładać się na mniejszą liczbę zrekombinowanych komórek), a nie z efektu podania wektorów gRNA1/2. W grupie tej również pobór pokarmu utrzymuje się na względnie stałym, lekko podwyższonym poziomie, począwszy od 4. tygodnia i nie ulega nagłemu spadkowi, co jest widoczne w grupie kontrolnej DicerCas9_AAV-AgRPCre w 6. tygodniu. Tutaj również zaznacza się różnica wynikająca z promotora kierującego mutacją, ponieważ u myszy DicerCas9-AAV-AgRPCre okres hiperfagiczny przypada na 3-5 tydzień mutacji, a spadek spożycia pokarmu zachodzi wcześniej i przypada na 6. tydzień mutacji. U myszy Dicer cKO (promotor CamKII α , indukcja tamoksyfenem) hipofagii obserwowanej w 7. tygodniu towarzyszy spadek masy ciała, czego nie zaobserwowano u myszy DicerCas9-AAV-AgRPCre, gdzie zwiększona masa ciała się utrzymuje. Duże odchylenia wewnątrzgrupowe prawdopodobnie wynikają ze sposobu aktywacji mutacji. Iniekcja wirusa z rekombinazą Cre (AAV-AgRPCre), może prowadzić do różnic pomiędzy zwierzętami pod kątem liczby zrekombinowanych komórek. O ile w klasycznym modelu Dicer cKO wykorzystuje się wystandaryzowany protokół aktywacji mutacji poprzez podanie tamoksyfenu, w którym można założyć, że mutacja zachodzi w podobny sposób, o tyle indukcja mutacji poprzez podanie wirusa niosącego Cre (zwłaszcza w takiej strukturze jak ARC), generuje większą zmienność. Porównanie grupy myszy kontrolnych Cas9_AAV-AgRPCre vs Cas9_AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom pokazuje zaledwie niewielką różnicę w masie ciała (tylko w 6. tygodniu różnica jest istotna statystycznie, $p=0,0448$, czego nie uwzględniono na wykresie – Rycina 4.22 A). Zaznacza się natomiast tendencja w kierunku obniżenia liczby komórek c-FosIR w ARC po głodówce, choć wynik nie osiąga istotności statystycznej ($p=0,0692$) (Rycina 4.22 B). Liczba komórek c-Fos-pozytywnych w obu grupach myszy DicerCas9 jest podobna

i ustanowiona na poziomie porównywalnym do podstawowego poziomu ekspresji *c-fos*, co świadczy o tym, że podanie mniejszej ilości wirusa AAV-AgRPCre w grupie badanej jest wystarczające, by wywołać efekt podobny do kontroli i zahamować poprawną odpowiedź neuronów AgRP na negatywny status energetyczny. Doświadczenie wykazało, że usunięcie miRNA z neuronów oreksygenicznych, jest wystarczające by wyciszyć odpowiedź *c-Fos*–zależną indukowaną głodówką i nieznacznie zredukować spożycie pokarmu w okresie hiperfagicznym. Jednakże, ze względu na zaobserwowany brak specyficzności wirusa do neuronów ARC i jego rozejście się do sąsiadujących struktur (VMH) i komórek (obecność w tanacytach), zdecydowano, że zostaną zaprojektowane nowe guideRNA (gRNA3 i gRNA4), a iniekcje zostaną przeprowadzone w linii wyjściowej Dicer cKO (wariant 2).

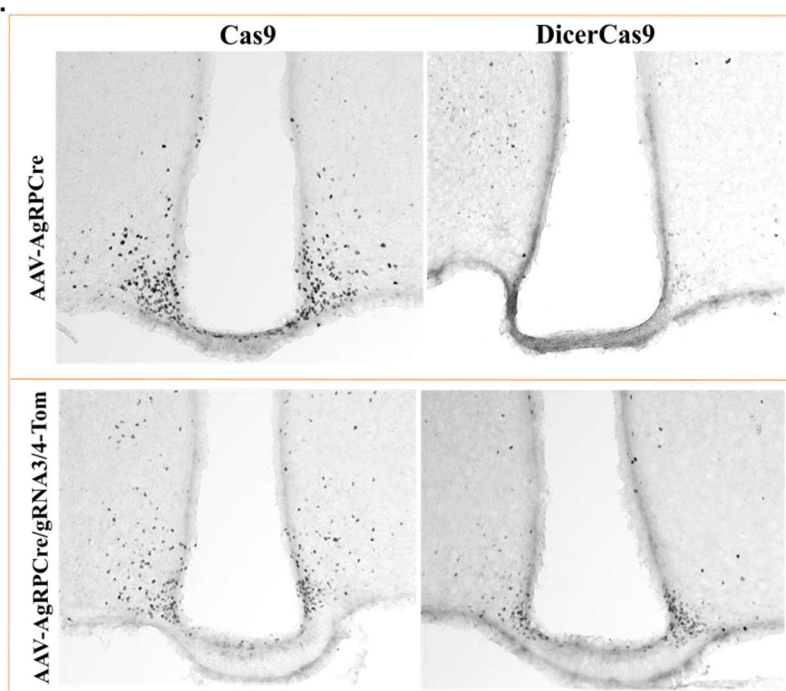


Rycina 4.20 Wstępne iniekcje w celu walidacji systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* (A) Schemat iniekcji wektorów AAV-gRNA-Tom do ARC myszy DicerCas9. Wektor wirusowy zawiera białko czerwonej fluorescencji – *Tomato*, umożliwiające ocenę prawidłowej iniekcji. (B) Przykładowe zdjęcia reprezentujące efektywność wyciszenia systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* u myszy Cas9-EGFP po wprowadzeniu guideRNA do ARC, w celu wyciszenia genu *c-fos in vivo* oraz wektora kontrolnego AAV-scr-Tom, oceniane po 24h głodówce (powiększenie 10x; skala 100 μ m)

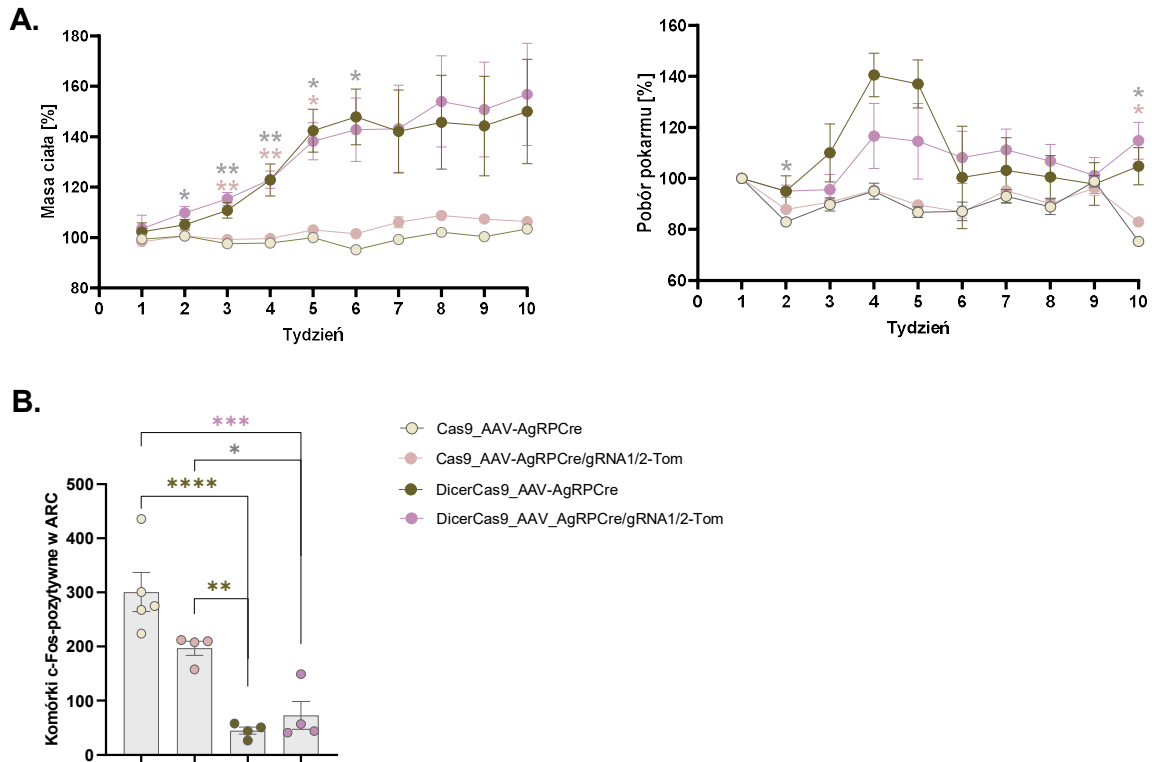
A.



B.



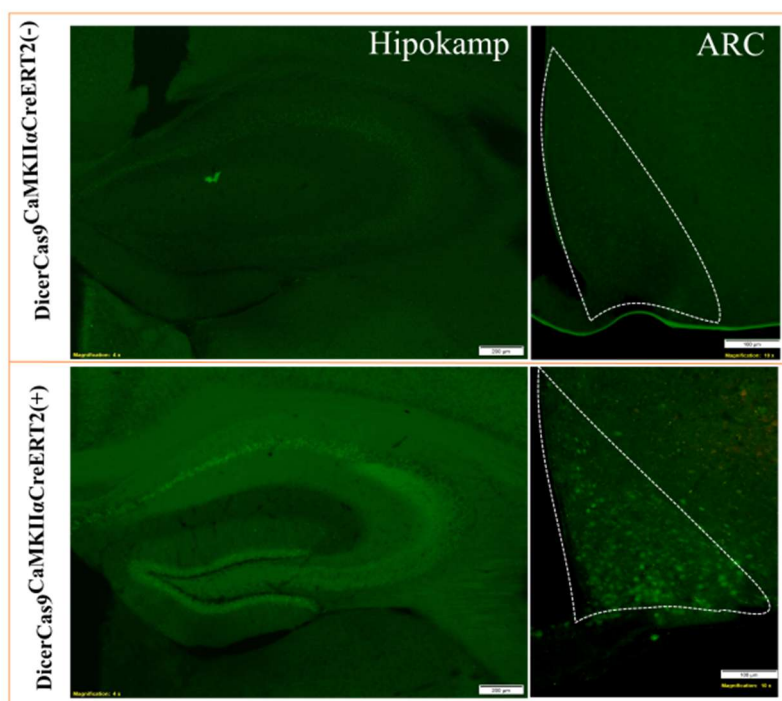
Rycina 4.21 (A) Zdjęcia reprezentujące indukcję mutacji poprzez wprowadzenie rekombinazy Cre kierowanej przez promotor AgRP do ARC myszy Cas9 (kontroli) i DicerCas9 (grupie badanej). W efekcie dochodzi do selektywnego wycięcia kasety STOP i ekspresji Cas9-EGFP w neuronach AgRP w docelowym miejscu (lewy panel). W grupie badanej jednocześnie podano mieszaninę wektorów wyciszającą gen *c-fos* AAV-gRNA1/2-Tom zawierającą białko fluorescencyjne Tomato (środkowy panel). Po prawej nałożenie obrazów. **(B)** Barwienie IHC anty c-Fos obrazujące poziom immunoreaktywności białka c-Fos w ARC w 10. tygodniu od podania wektorów wirusowych (AAV-AgRPCre oraz AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom) u zwierząt poddanych 24h głodówce: myszy Cas9 (lewy panel) i DicerCas9 (prawy panel); skala 100 μ m.



Rycina 4.22 Wyciszenie genu *c-fos* z użyciem systemu CRISPR/Cas *in vivo* wariant 1. **(A)** Analiza procentowego pomiaru masy ciała i poboru pokarmu mierzonego przez 10 tygodni od indukcji mutacji z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Dunnett'a, w odniesieniu do grupy badanej DicerCas9_AAV-AgRPCre/gRNA1/2-Tom. **(B)** Analiza liczby komórek c-Fos-pozytywnych w ARC przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Sidaka; słupki błędów $\pm$ SEM.

Aby sprawdzić efekt nowych guideRNA, w kolejnym kroku należało wprowadzić białko Cas9 do ARC myszy Dicer cKO, poprzez skrzyżowanie linii Dicer^{CamKII α CreERT2} z Cre–zależną linią Cas9-EGFP **DicerCas9^{CamKII α CreERT2}** (**DicerCas9**) (wariant 2). Mutację indukowano w sposób standardowy przez podanie tamoksyfenu, umożliwiając usunięcie mikroRNA i ekspresję Cas9 w tych samych neuronach kierowanych przez promotor CaMKII α . Tydzień po indukcji mutacji przeprowadzono iniekcję domózgową wektorów wirusowych AAV. Jako kontrolę wprowadzono wektor wirusowy niosący wstawkę z przemieszaną sekwencją (scr, ang. *scrambled*), zaprojektowaną by nie wykazywała homologii do genomu mysiego. Zwierzętom podano mieszaninę wirusów AAV-gRNA3/4-Tom (n=10) oraz wirusa kontrolnego AAV-scr-Tom (n=5). Kontrolnym zwierzętom bez rekombinazy Cre, DicerCas9(-) również podano oba zestawy wirusów AAV-gRNA3/4-Tom (n=5) oraz AAV-scr-Tom (n=5). Zgodnie z założeniem, zwierzęta kontrolne nie rozwinęły fenotypu otyłości (masa ciała zwierząt średnio nie większa niż 120% wyjściowej wagi). Zwierzęta DicerCas9(+)

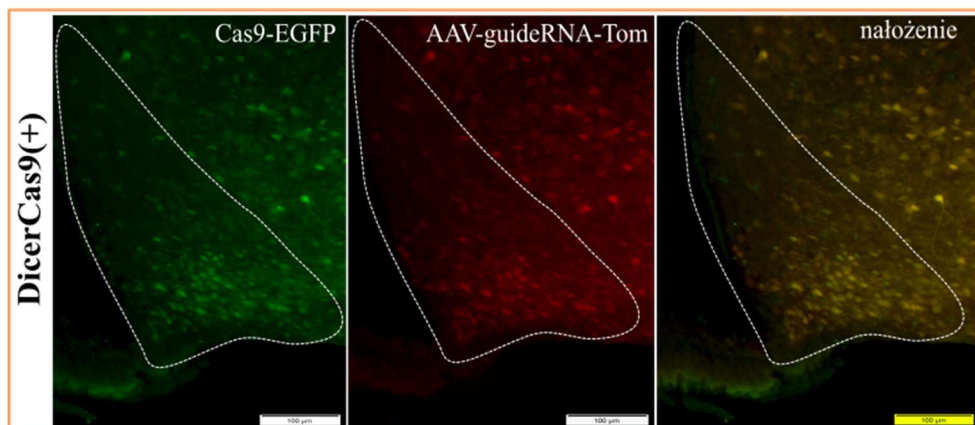
zarówno po iniekcji wirusem kontrolnym, jak i mieszaniną wyciszającą gen *c-fos* AAV-gRNA3/4-Tom, wykazywały charakterystyczny dla linii przyrost masy ciała oraz wzrost poboru pokarmu (Rycina 4.25 A). Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie grupy badanej DicerCas9(+)_AAV-gRNA3/4-Tom do wszystkich innych grup, w celu określenia skuteczności wyciszenia genu *c-fos* na rozwój fenotypu otyłości przy użyciu systemu CRISPR/Cas9. Nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w masie ciała i spożyciu pokarmu między grupą z podaną mieszaniną wektorów wyciszających gen *c-fos* (DicerCas9(+)_AAV-gRNA3/4-Tom), a grupą z wektorem kontrolnym (DicerCas9(+)_AAV-scr-Tom). Niezależnie od rodzaju podanego wirusa u zwierząt DicerCas9(+) w 10. tygodniu mutacji, zaobserwowano brak indukcji genu *c-fos* w odpowiedzi na 24h głodówkę (Rycina 4.24 B, 4.25 B). Przypominająca poziom podstawowy, niewielka liczba komórek c-Fos–reaktywnych w ARC po głodówce, może wynikać z braku prawidłowej odpowiedzi neuronów ARC na ujemny bilans energetyczny. Brak reaktywności neuronów ARC w odpowiedzi na głód prawdopodobnie wpływa na zahamowanie zmian plastycznych w neuronach AgRP/NPY, ale bez wpływu na rozwój fenotypu otyłości w badanym modelu. Otrzymane wyniki utrudniają jednoznaczną ocenę zaangażowania genu *c-fos* w kształtowaniu się fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO, jednak skłaniają do stwierdzenia, że takiego wpływu nie ma.



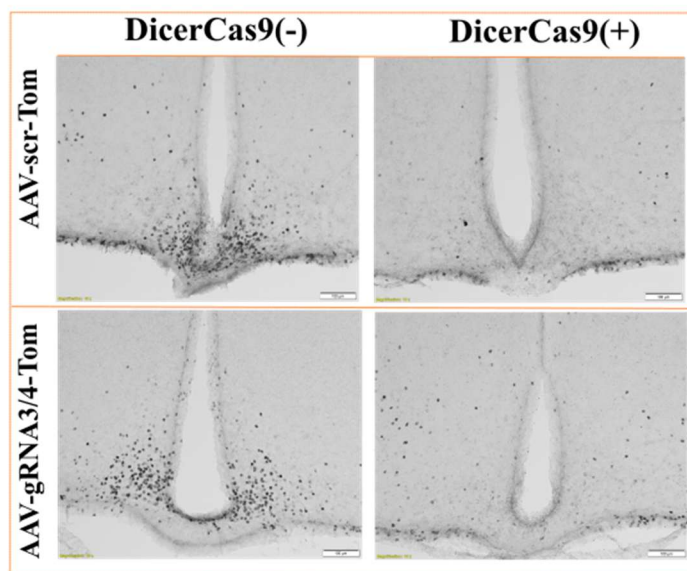
Rycina 4.23 Zależna od genotypu rekombinacja zachodząca u myszy DicerCas9^{CamKIIαCreERT2} po indukcji mutacji za pomocą tamoksyfenu. Rekombinaza Cre wycina oflankowany sekwencjami loxP fragment genu *Dicer1* oraz kasetę STOP zapobiegającą ekspresji *EGFP*. Ekspresja *EGFP* uwidacznia zatem neurony, w których dochodzi do rekombinacji (dolny panel). Po lewej stronie widoczna formacja hipokampa

(powiększenie 4x, skala 200µm), po prawej jądro łukowate (ARC) (powiększenie 10x, skala 100µm). Sygnał na zdjęciach nie jest wzmacniany metodami immunofluorescencyjnymi.

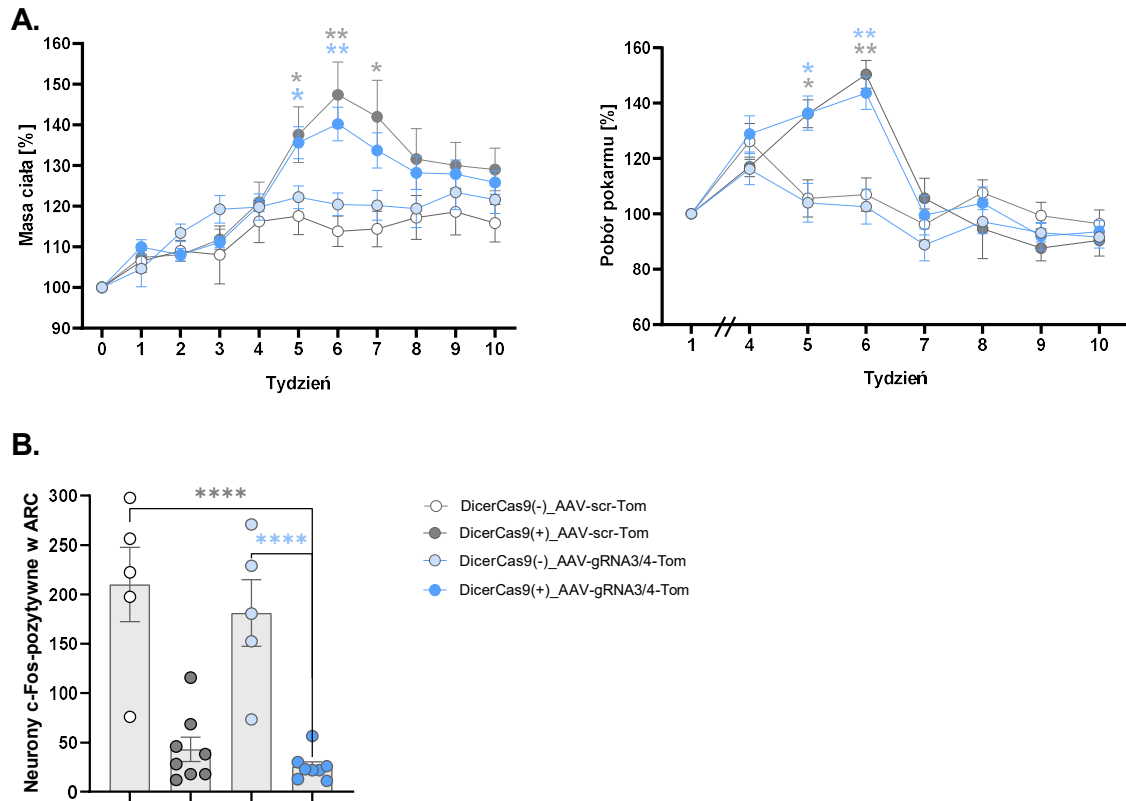
A.



B.



Rycina 4.24 Wyciszenie genu *c-fos* *in vivo* wariant 2. **(A)** Przykładowy obraz mikroskopowy jądra łukowatego myszy DicerCas9(+) przedstawiający ekspresję Cas9-EGFP, transdukcję neuronów przy użyciu wektorów wirusowych AAV-guideRNA-Tom oraz nałożenie uwidaczniające liczbę zrekombinowanych komórek w ARC. **(B)** Zdjęcia reprezentujące barwienie DAB IHC wykrywające białko c-Fos w ARC po 24h głodówce w 10. tygodniu mutacji. Myszy DicerCas9(+) w obu grupach nie reagują prawidłowo na krążące obwodowe sygnały głodu, ponieważ nie widać wzmożonej ekspresji genu *c-fos* (powiększenie 10x; skala 100 µm).



Rycina 4.25 Walidacja wyciszającego efektu systemu CRISPR/Cas9 na rozwój fenotypu otyłości *in vivo* u myszy DicerCas9 w wariancie 2. **(A)** Analiza cotygodniowego pomiaru masy ciała i poboru pokarmu w odniesieniu do grupy badanej DicerCas9(+)_AAV-gRNA3/4-Tom z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla porównań wielokrotnych z testem post hoc Dunnett'a. **(B)** Analiza komórek c-Fos-pozytywnych w ARC przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Sidaka; słupki błędów przedstawiają $\pm$ SEM.

V DYSKUSJA

5.1 Specyfika promotora kierującego ekspresją rekombinazy Cre w rozwoju fenotypu otyłości u myszy *Dicer* cKO

Linie transgeniczną *Dicer*^{CaMKII α CreERT2} cechuje mocny i nieoczywisty fenotyp. Mutacja prowadzi do indukowalnego usunięcia genu *Dicer1* – kluczowego enzymu w procesie dojrzewania mikroRNA, prowadząc do stopniowego obniżenia poziomu aktywnych cząsteczek miRNA pełniących funkcję buforową w regulacji puli dostępnych białek. Brak miRNA uczestniczących w maszynerii hamującej translację, prowadzi do zaburzenia funkcjonowania sieci neuronalnych zaangażowanych w procesy plastyczności synaptycznej i regulacji metabolicznej. Ekspresja CamKII α , charakteryzuje głównie neurony glutamatergiczne, jako jeden z głównych składników biorących udział w transmisji pobudzającej i procesach zaangażowanych w neuroplastyczność. CaMKII jest dominującym białkiem zagęszczenia postsynaptycznego i kluczowym elementem do wywołania LTP. Katalizuje fosforylację receptorów AMPA, zwiększając ich właściwości przewodzące oraz inicjuje proces eksternalizacji i insercji receptorów AMPA w błonę postsynaptyczną (Bear i Malenka, 1994). Ważnym procesem przy powstawaniu LTP jest autofosforylacja CaMKII. Fosforylowana forma znacząco wydłuża jej czas aktywności nawet, gdy przestają działać bodźce pobudzające neuron, stanowiąc pośrednik od otwarcia receptorów jonotropowych dla glutaminianu do dalszych etapów zjawisk molekularnych prowadzących do zmiany siły synapsy (Lisman i in., 2012). U myszy *Dicer* cKO, usunięcie miRNA w neuronach, kierowane przez promotor CamKII α , prowadzi do zmian związanych z plastycznością synaptyczną, co potwierdzono, badając funkcje kognitywne myszy *Dicer* cKO i obserwując późniejsze zmiany degeneracyjne w hipokampie (Konopka i in., 2010, 2011). Możliwe jest zatem, że mutacja zmienia właściwości podstawowych receptorów zaangażowanych w neuroplastyczność – AMPA i/lub NMDA. Literatura dostarcza dowodów, że mutacja u myszy *Dicer* cKO wpływa na ścieżki związane z receptorami AMPA, w tym zależne od aktywności usuwanie receptorów AMPA i ich wprowadzanie do synapsy (Mang i in., 2015). Ponadto, analiza transkryptomiczna z mózgów myszy *Dicer* cKO wykazała, że w wyniku mutacji (4 tydzień) dochodzi do zwiększenia (40%) albo obniżenia (60%) poziomów transkryptów, oraz do zmian w wielu ścieżkach sygnalizacyjnych, zaangażowanych m. in. w organizację cytoszkieletu, prowadząc do zjawiska obkurczania się neuronów, obserwowanych zwłaszcza w korze mózgowej (Dorval i in., 2012).

Analiza ekspresji CaMKII α w mózgu *in vivo* przy użyciu transgenicznej linii zawierającej GFP pod endogennym promotorem CaMKII α , pokazała, że w podwzgórzu jest on również aktywny, lecz wykazuje zmienną ekspresję w zależności od struktur. W jądrze łukowatym zaobserwowano silny, rozproszony sygnał GFP z ciał komórek nerwowych, jednak nie zdefiniowano tych komórek pod względem rodzaju przekazywania (X. Wang i in., 2013). Podobny rozproszony sygnał w ARC zaobserwowano w niniejszej pracy u myszy DicerCas9-EGFP^{CaMKII α CreERT2} (Rycina 4.23) i ze względu na lokalizację sygnału stwierdzono, że mutacja wpływa zarówno na neurony glutamatergiczne, jak i GABAergiczne. Uzasadnienie takiego założenia wynika z heterogenności ARC pod względem występowania wielu różnych populacji neuronów wykazujących w tym zakresie niejednokrotnie mieszany fenotyp. Dla neuronów AgRP/NPY dla uproszczenia przypisuje się fenotyp GABAergiczny, z kolei dla neuronów POMC – glutamatergiczny, jednak dokładna analiza Drop-seq ujawniła szereg klastrów i podklastrów, które cechuje ogromna różnorodność (Campbell i in., 2017) i częściowo wspólne pochodzenie (25% neuronów AgRP/NPY wywodzi się z populacji POMC) (Padilla i in., 2016). CaMKII α w podwzgórzu bierze udział w ważnych procesach, m.in. w ARC uczestniczy w zmianach plastycznych indukowanych leptyną (Morishita i in., 1998), a w jądrze nadwzrokowym (SCN, ang. *suprachiasmatic nucleus*) jest niezbędna w regulacji cyklu okołodobowego (Golombek i in., 2004). Analiza rekombinacji zachodzącej w mózgu myszy z ekspresją CamKII α CreERT2 za pomocą barwienia X-gal u myszy Rosa36-LacZ^{CaMKII α CreERT2}, po podaniu tamoksyfenu, wykazała silny sygnał, świadczący o intensywnym procesie rekombinacji w jądrach podwzgórza, w tym ARC, DMH i PVH. Pokazano również, że za rozwój fenotypu otyłości w linii Dicer cKO jest odpowiedzialne usunięcie miRNA w neuronach ARC. Stwierdzono także, że mutacja zachodzi zarówno w neuronach AgRP/NPY, jak i POMC (Vinnikov i in., 2014). Ze względu na bardzo duży obszar mózgu objęty mutacją, nie można wykluczyć jednak możliwości, iż za zmiany metaboliczne w badanej linii odpowiadają nie tylko modyfikacje w neuronach ARC, lecz również zmiany w neuronach I-, II-, lub/i III-rzędu, które odpowiadają bezpośrednio lub pośrednio za regulację metaboliczną (m.in. mutacja w SCN może prowadzić do rozregulowania cyklu okołodobowego, a w ciele migdałowatym – zaburzać behavior wpływając na motywację, czy zachowania zależne od stresu). Aby w pełni zrozumieć rolę ARC w regulacji metabolicznej, biorąc pod uwagę heterogenność populacji neuronalnych w nim występujących, w kolejnych krokach należałoby zawęzić mutację wyłącznie do badanej struktury. W niniejszej pracy, jak i w poprzednich badaniach prowadzonych w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Nenckiego (rozprawa doktorska 2022, K. Hajdukiewicz) udało się wywołać otyłość u myszy poprzez lokalną modyfikację

neuronów ARC^{AgRP} przy użyciu rAAV-AgRPCre, co również pokazuje, że mutacja w tej populacji neuronalnej jest wystarczająca do rozwoju fenotypu otyłości. Jednakże nie wykonano analizy metabolicznej tych zwierząt i nie porównano ich do mutantów Dicer^{CaMKIIαCreERT2}, co mogłoby dostarczyć cennych informacji odnośnie funkcji neuronów AgRP/NPY po usunięciu miRNA.

5.2 Zależne od płci mechanizmy regulujące metabolizm

Istnieje błędne przeświadczenie, że badania wykonywane na samicach są obarczone większą zmiennością w wyniku działania hormonów płciowych i zmian cyklicznych, a okazuje się, że w niektórych dziedzinach, w tym badaniach z zakresu metabolizmu, u samców obserwowana jest większa wariancja (Prendergast i in., 2014), co również zostało zaobserwowane w przedstawianej rozprawie doktorskiej. Wyniki otrzymane w pracy pokazują znaczące różnice fenotypowe w zależności od płci myszy Dicer cKO, które mogą być efektem kilku czynników. Jednym z nich jest różnica w wydatku energetycznym wynikająca z różnic w masie beztłuszczowej pomiędzy samicami a samcami. Masa beztłuszczowa (ang. *lean mass*) w tym masa mięśniowa, jest wiodącym determinantem podstawowego metabolizmu u ludzi (Zurlo i in., 1990). Stosunek masy beztłuszczowej do całkowitej masy ciała wynosi 60-70% u kobiet i 70-80% u mężczyzn, co wyjaśnia, dlaczego ciepło generowane w mięśniach szkieletowych stanowi największą część całkowitego wydatku energetycznego. Metabolizm w mięśniach szkieletowych determinuje nie tylko podstawową przemianę materii (BMR), lecz również termogenezę indukowaną zimnem (Tran i in., 2022). Pokazano, że nawet u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową, BMR jest bardziej zależny od masy beztłuszczowej, niż od masy tłuszczowej (Abreu-Vieira i in., 2015). Masa tłuszczowa jest kolejnym wyznacznikiem tempa metabolizmu u myszy. Otyłe osobniki mają wyższe spoczynkowe tempo metabolizmu w porównaniu do myszy o szczupłym fenotypie. W badaniach przeprowadzonych na otyłych myszach *ob/ob*, u których nie dochodzi do ekspresji leptyny, wykazano brak wpływu tkanki tłuszczowej na wydatek energetyczny. Podanie leptyny odwraca ten efekt, co pokazuje, że wpływ masy tłuszczowej na wydatek energetyczny jest zależny od leptyny (Kaiyala i in., 2010). Ze względu na różnice w stosunku masy tłuszczowej do beztłuszczowej, również poziom leptyny jest zmienny w zależności od płci. U kobiet stężenie leptyny jest trzykrotnie wyższe niż u mężczyzn, za co odpowiedzialny jest testosteron, który wzrasta u mężczyzn po wejściu w okres dorosłości (Saad i in., 1997).

Oprócz różnic w stosunku masy tłuszczowej do beztłuszczowej, zmiany metaboliczne zależne od płci wynikają z dymorfizmu związanego z obecnością hormonów płciowych.

Różnice międzypłciowe są widoczne w badaniach sygnalizacji estrogenowej w podwzgórzu oraz w wielu szlakach transdukcji sygnałów (Malyala i in., 2008). Sygnalizacja za pośrednictwem receptora estrogenowego alfa (ER α) w VMH bierze udział w homeostazie energetycznej poprzez regulację termogenezy (Martínez de Morentin i in., 2014). ER α ulega ekspresji w populacjach neuronów VMH, które mają zależną od płci ekspresję genu *Rprm*. Ekspresja *Rprm* może regulować temperaturę w sposób specyficzny dla płci. Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) pośredniczy w sygnalizacji ER α (Malyala i in., 2008). Usunięcie podjednostki katalitycznej w PI3K w neuronach z ekspresją czynnika steroidogennego (SF-1, ang. *steroidogenic factor 1*) wywołuje otyłość u samic, ale nie u samców. Samice w wyniku tej mutacji wykazują obniżony wydatek energetyczny w fazie jasnej, bez wpływu na zmiany w poborze pokarmu lub aktywności lokomotorycznej (Saito i in., 2016). Badania roli sygnalizacji PI3K w zmianach pobudliwości neuronów POMC w ARC za pośrednictwem estrogenów, pokazały, że estrogen zwiększa pobudliwość neuronów POMC (Malyala i in., 2008). Aktywacja PI3K reguluje homeostazę energetyczną i jest niezbędna w sygnalizacji insulinowej i leptynowej w ARC. Jednym z mechanizmów, za pomocą których estrogen zwiększa pobudliwość neuronalną ARC^{POMC} jest desensytyzacja (odwrażliwienie) receptorów GABA_B, związanych z zależnymi od białka G kanałami potasowymi. Otrzymane dane sugerują, że wzajemne oddziaływania pomiędzy estrogenem, a PI3K występują na wielu poziomach komórkowych, włączając wydarzenia inicjowane na powierzchni błony komórkowej, po transkrypcję, co ostatecznie wpływa na właściwości homeostatyczne neuronów POMC (Plum, 2006; Vinnikov i in., 2014).

Masa mięśni szkieletowych jest również regulowana przez androgeny, poprzez oś podwzgórze – przysadka – gonady. Podwzgórzowy hormon uwalniający gonadotropinę (GnRH) stymuluje wydzielanie hormonu luteinizującego przez przedni płat przysadki mózgowej, który stymuluje syntezę i wydzielanie testosteronu w jądrach. Receptory androgenowe (AR, ang. *androgen receptor*) w podwzgórzu są pozytywnymi modulatorami masy beztłuszczowej u samców, a myszy pozbawione tych receptorów obniżają EE, co skutkuje otyłością (Abreu-Vieira i in., 2015). Możliwe jest zatem, że u samców Dicer cKO ze względu na wyższy poziom testosteronu, efekt mutacji jest mniejszy niż u samic. Testosteron i obecność AR bowiem wpływa na metabolizm i bilans energetyczny. Młode samce, u których zahamowano krążący testosteron zwiększają procent masy tłuszczowej i obniżają oksydację kwasów tłuszczowych i spoczynkowy wydatek energetyczny (Mauras i in., 1998).

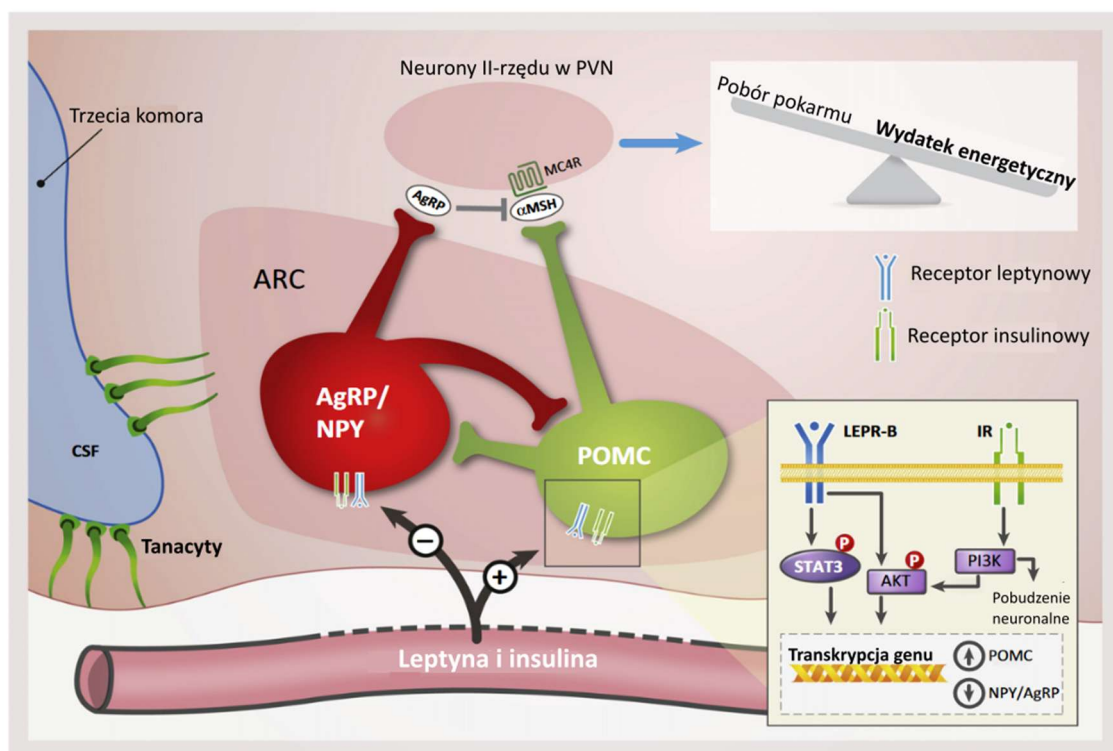
W innych ścieżkach sygnalizacyjnych regulujących wydatek energetyczny, również można doszukać się różnic związanych z płcią. Za przykład może posłużyć obecność receptora

5-HT₂CR (ang. *5-hydroxytryptamine 2c receptor*) w neuronach ARC^{POMC}. Przywrócenie aktywności tego receptora po delecji neuronów POMC w podwzgórzu przywraca wydatek energetyczny do poziomu sprzed mutacji u samców. U samic obserwowano w dalszym ciągu zaburzony wydatek energetyczny i spoczynkowe tempo metabolizmu podobne do zwierząt z delecją POMC w podwzgórzu (Burke i in., 2016).

W badanej linii Dicer cKO usunięcie miRNA w neuronach podwzgórza może wpływać na ścieżki sygnalizacyjne za pośrednictwem hormonów płciowych i w ten sposób zaburzać metabolizm zwierząt. Zostało już stwierdzone, że w linii Dicer cKO dochodzi do zmian w sygnalizacji PI3K (Vinnikov i in., 2014), co jak opisano powyżej może tłumaczyć różnice w rozwoju fenotypu otyłości pomiędzy samicami a samcami w badanej linii.

5.3 Wpływ mutacji na funkcjonowanie neuronów systemu melanokortynowego u myszy Dicer cKO

Gen *Dicer1* ulega ekspresji w 94% neuronów POMC i AgRP/ NPY, co świadczy o jego roli w regulacji ekspresji genów *Pomc*, *AgRP* i *NPY* (Schneeberger i in., 2012). Neurony oreksygeniczne w ARC wykazują ekspresję *AgRP*, *NPY*, *GABA* i wywierają antagonistyczny wpływ na receptory MC3R/MC4R w PVN oraz hamują neurony POMC/CART, stymulując w ten sposób konsumpcję pokarmu (Cowley i in., 2001). Neurony POMC wykazują odmienne działanie. Polipeptyd POMC rozpada się na peptydy, w tym α -MSH, ACTH, które są agonistami receptorów systemu melanokortynowego (MC3R/MC4R), prowadząc do zahamowania spożycia pokarmu i wzrost wydatku energetycznego (Deem i in., 2022). Aktywacja receptora MC4R za pośrednictwem α -MSH powoduje obniżenie poboru pokarmu, wzrost wydatku energetycznego oraz regulację homeostazy glukozy (Rossi i in., 2011). Mutacje w POMC, MC3R lub MC4R powodują wczesny rozwój masywnej otyłości u ludzi, co potwierdza istotną rolę układu melanokortynowego w regulacji homeostazy energetycznej (Krude i in., 1998). Receptor MC4R pełni kluczową rolę w zapobieganiu otyłości, co potwierdzono zarówno u ludzi ze spontaniczną mutacją, jak i w modelach zwierzęcych typu KO. Delecja tego receptora powoduje wzrost poboru pokarmu i spadek wydatku energetycznego, co skutkuje otyłością (Balthasar et al., 2005; Huszar et al., 1997). Oprócz odmiennego wpływu na bilans energetyczny, kontrolujący pobór pokarmu i wydatek energetyczny neurony POMC i AgRP są wzajemnie regulowane przez krążące sygnały dotyczące stanu odżywienia, w tym hormony otyłości, leptynę i insulinę.



Rycina 5.1 Modulowanie aktywności neuronów w ARC poprzez specyficzne receptory wykrywające peryferyjne sygnały dotyczące odżywienia i mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę poboru pokarmu, wydatku energetycznego i homeostazy glukozy (na podstawie Z.-Y. Zhang i in., 2015).

Myszy pozbawione genu *Dicer1*, w neuronach regulujących łaknienie w ARC wykazują wzrost transkryptów dla kluczowych neuropeptydów regulujących pobór pokarmu, co prowadzi do zaburzenia homeostazy energetycznej. Mutacja dotyka zarówno neurony POMC, jak i AgRP (Vinnikov i in., 2014), także obserwowany fenotyp hiperfagicznej otyłości, wynika z mutacji w obu populacjach neuronalnych w ARC zaangażowanych w homeostazę energetyczną. Nie można wykluczyć jednak, iż w wyniku mutacji dochodzi do zaburzeń szlaków odpowiedzialnych za prawidłową detekcję peryferyjnych sygnałów sytości, w efekcie czego dochodzi do wzrostu konsumpcji pokarmu i uruchomienia adaptacyjnych zmian (spadku) wydatku energetycznego. W następstwie dochodzi do akumulacji tłuszczu i otyłości. Jedną z hipotez stawianych w niniejszej pracy, że jednym z czynników wywołujących otyłość u myszy *Dicer* cKO, jest wpływ mutacji na osłabienie sygnalizacji leptynowej, hamującej pobór pokarmu (poprzez stymulację neuronów POMC lub/i zahamowanie aktywności neuronów AgRP-NPY). Akumulacja tłuszczu u myszy *Dicer* cKO, zwiększa poziom leptyny w obiegu, co pomimo jej nadmiaru nie wpływa na obniżenie łaknienia. Możliwe jest zatem, iż dopiero w wyniku nagromadzenia rezerw tłuszczowych, skomasowane działanie długoterminowych sygnałów sytości (insulina i leptyna) wywiera skuteczny efekt na neurony

podwzgórza, co ostatecznie wyhamowuje pobór pokarmu (Tremblay i Bellisle, 2015). Możliwe jest również, że cząsteczki miRNA produkowane w innych tkankach, a transportowane w lipoproteinach (głównie w HDL) w wyniku ich nagromadzenia i zwiększonej dostępności przenikają przez nieszczelną barierę krew–mózg w ARC i przywracają ich utracone funkcje (Dandare i in., 2023; Michell i Vickers, 2016, Rossi-Herring i in., 2023).

5.3.1 Rola neuronów AgRP/NPY w regulacji homeostazy energetycznej

Neurony AgRP/NPY pełnią ważną funkcję w regulacji homeostazy energetycznej, poprzez wpływ na pobór pokarmu, wydatek energetyczny i behavior (Deem i in., 2022). Mutacja u myszy Dicer cKO może znacząco wpływać na funkcjonowanie neuronów oreksygenicznych. Stymulacja poboru pokarmu jest możliwa poprzez wydzielanie synaptyczne trzech neuromodulatorów: AgRP, który działa hamująco na receptory MC3R/MC4R w neuronach II-rzędu systemu melanokortynowego (głównie w PVN); NPY, agonistę rodziny receptorów Y1-5 związanych z białkiem G, oraz hamującego neuroprzekaźnika GABA, działającego na receptory jonotropowe GABA_A i metabotropowe GABA_B (Horvath i in., 1997). W odróżnieniu od neuronów POMC, które bezpośrednio ulegają depolaryzacji w odpowiedzi na leptynę, neurony AgRP/NPY są hamowane przez sygnalizację zależną od insuliny i leptyny. Pokazano, że GABAergiczna sygnalizacja leptynowa z brzusznej części jądra grzbietowo-przyśrodkowego podwzgórza (DMH) hamuje aktywność neuronów AgRP/NPY w ARC ($vDMH^{LepR} \rightarrow ARC^{AgRP}$) i spożycie pokarmu (Garfield i in., 2016). Z kolei neuromodulatorem aktywującym neurony AgRP/NPY jest wydzielana przez żołądek grelina. W warunkach negatywnego statusu energetycznego, tak jak to ma miejsce podczas głodówki lub w odpowiedzi na restrykcje kaloryczne, dochodzi do obniżenia stężenia krążącej leptyny, wzrostu stężenia greliny, co aktywuje neurony AgRP/NPY, a hamuje neurony POMC. Stymulacja AgRP/NPY przez transmisję GABAergiczną dodatkowo hamuje neurony POMC (Cowley i in., 2001). Ablacja neuronów AgRP w dorosłym życiu wywołuje głodówkę, poprzez zanik sygnalizacji GABAergicznej do PBN (Q. Wu i in., 2009). Głodzenie jest również wywołane hiperaktywnością PBN. Jest to ważne jądro odbierające sygnał z nerwu błędnego z NTS, by zahamować pobór pokarmu (Q. Wu i in., 2012). Neurony AgRP modułują swoją aktywność również w odpowiedzi na cykl okołodobowy i wykazują zmniejszoną aktywność w fazie jasnej, natomiast zaobserwowano zwiększoną aktywność neuronów AgRP w fazie ciemnej, w której zwierzęta normalnie konsumują pokarm. Odwrotną aktywność wykazują neurony POMC (Mandelblat-Cerf i in., 2015).

Ponadto podczas posiłku, aktywacja neuronów AgRP/NPY stymuluje również pobór wody, ułatwiając połykanie treści pokarmowej i trawienie, tzw. posiłkowe pragnienie. Zwiększony pobór wody zauważono w obecności pokarmu, natomiast bez jedzenia, aktywacja AgRP, nie jest w stanie wywołać zwiększonej konsumpcji wody. Za pobór wody podczas posiłku odpowiedzialna jest glutamatergiczna populacja zlokalizowana w narządzie podsklepieniowym SFO^{Glut} (ang. *subfornical organ*). Jedzenie pobudza wydzielanie wazopresyny w celu zwiększenia retencji wody przez nerki w odpowiedzi na zmianę osmolarności osocza (stężenie angiotensyny II) po posiłku (Zimmerman i in., 2016, 2017). Konsumpcja wody jest dodatkowo modulowana przez NPY. Iniekcja NPY do PVN wpływa na behavior zwiększający zarówno pobór pokarmu, jak i wody, a w przypadku braku dostępności jedzenia, w dalszym ciągu wpływa na wzrost konsumpcji wody (Stanley i Leibowitz, 1984). Wydaje się zatem, że obserwowane w klatkach metabolicznych zwiększone spożycie wody u myszy Dicer cKO, może wynikać z nadaktywacji neuronów oreksygenicznych, a w szczególności ze wzrostem sygnalizacji NPY. Zwiększone spożycie wody u myszy Dicer cKO towarzyszy okresowi hiperfagii, po czym wraca do normy. W niniejszej pracy pokazano również, że podanie leptyny obniża pobór wody u myszy Dicer cKO (Rycina 4.11 B), zwłaszcza w fazie jasnej cyklu okołodobowego, co prawdopodobnie wynika z obniżenia aktywności neuronów AgRP/NPY.

Sygnalizacja NPY i GABA w PVN uczestniczy we wzroście poboru pokarmu po chemogenetycznej stymulacji neuronów AgRP. Badania przy użyciu transgenicznych linii selektywnie usuwających odpowiednie geny *Mc4r*, *Npy* i *Vgat* pokazują zahamowanie ostrej, ale nie chronicznej nadmiernej konsumpcji po aktywacji neuronów AgRP, co sugeruje, że sygnalizacja AgRP w systemie melanokortynowym bierze udział w długoterminowych zmianach we wzroście poboru pokarmu (Krashes i in., 2013). Aktywność neuronalna neuronów AgRP/NPY związana z głódówką lub restrykcjami kalorycznymi jest hamowana w odpowiedzi na sam widok pokarmu lub wyuczonych wskazówek skojarzonych z konsumpcją pokarmu, nawet w warunkach braku dostępu do jedzenia (Betley i in., 2015). Stymulacja chemo- i optogenetyczna neuronów AgRP/NPY sztucznie wywołuje wzmożony pobór pokarmu, ponieważ zwierzęta są w stanie sytości, co oznacza, że fizjologicznie ta populacja neuronalna jest zahamowana zanim dochodzi do indukcji konsumpcji. Sama aktywacja neuronów AgRP/NPY jest wystarczająca by zainicjować natychmiastową konsumpcję pokarmów i nie wymaga wyciszenia systemu melanokortynowego, co pokazuje literatura (Aponte i in., 2011; Krashes i in., 2013) oraz potwierdza doświadczenie z użyciem stymulacji optogenetycznej wykonane w przedstawianej pracy doktorskiej. Optogenetyczna aktywacja neuronów

AgRP/NPY u najedzonych zwierząt, pokazuje, że nawet po wyłączeniu lasera, wzmożona konsumpcja pozostaje podtrzymana (Rycina 4.17 C). Za obserwowany efekt odpowiedzialna jest sygnalizacja NPY, ponieważ dowiedziono, że usunięcie NPY, a nie AgRP lub GABA, znosi stymulowane optycznie wzmożone spożycie pokarmu (Y. Chen i in., 2019). NPY jest jednym z najsilniej działających związków oreksygennych (Levine i Morley, 1984). NPY jest zaangażowany we wzrost poboru pokarmu oraz w reakcji adaptacyjnej mającej na celu oszczędzanie energii. NPY podawany albo dokomorowo (icv) albo miejscowo do PVN, prowadzi do zmniejszenia wydatku energetycznego, co częściowo wynika z jego wpływu na redukcję transmisji zstępującej w układzie współczulnym, unerwiającym peryferyjne tkanki termogeniczne, takie jak brunatna tkanka tłuszczowa (BAT) (Egawa i in., 1990). Istnieją dowody na udział AMPK w VMH w regulacji współczulnej transmisji do BAT poprzez szlak AMPK/karboksylaza acetylo-CoA (ACC)/palmitoilotransferaza karnitynowa 1C (CPT1C). Po pierwsze, delecji AMPK $\alpha 1$ towarzyszy spadek fosforylacji ACC α w podwzgórzu. Po drugie, nokaut CPT1C osłabia skutki termogeniczne spożywania diety wysokotłuszczowej lub podawania leptyny (Seoane-Collazo i in., 2018).

Dodatkowo, chemo- i optogenetyczna stymulacja neuronów AgRP indukuje insulinooporność poprzez upośledzenie stymulowanego insuliną wychwyty glukozy przez BAT, bez wpływu na produkcję glukozy w wątrobie (Steculorum i in., 2016). Efekt ten nie jest obserwowany u myszy z delecją NPY (Engström Ruud i in., 2020). U myszy Dicer cKO w związku z nadmierną transkrypcją genu *NPY*, obserwujemy zarówno wzmożony pobór pokarmu, jak i spadek EE, który może wynikać częściowo z wpływu NPY na funkcjonowanie współczulnego systemu nerwowego kontrolującego adaptacyjne zmiany termiczne w tkance tłuszczowej (WAT i BAT).

Receptory PVN^{MC4R} odbierające sygnały z AgRP są zaangażowane w kontrolę łaknienia, ale nie kontrolują wydatku energetycznego (Garfield i in., 2015). Jednakże, neurony AgRP/NPY są wrażliwe na wahania temperatury i cykl okołodobowy. Temperatura otoczenia może modulować aktywność neuronów AgRP, przy czym niskie temperatury zwiększają aktywność neuronów AgRP, a wyższe temperatury zmniejszają ich aktywność. Neurony AgRP/NPY są szybko aktywowane w odpowiedzi na ekspozycję na zimno i ta aktywacja jest wymagana do związanego z tym zwiększenia spożycia pokarmu (ale nie do zwiększenia wydatku energetycznego) (Deem i in., 2020). Warunki termoneutralne dla myszy to 30°C. Ekspozycja na niższe temperatury indukuje ekspresję genu *c-fos* w ARC. W temperaturze 22°C, można zauważyć neurony c-Fos–reaktywne rozsiane po ARC z nieliczną ko-lokalizacją sygnału z neuronami AgRP. Natomiast w niższej temperaturze otoczenia w 14 °C, można

zauważyć silny sygnał c-Fos-pozytywny w ARC, szczególnie w neuronach AgRP (Deem i in., 2020). Doświadczenie to wskazuje na zaangażowanie neuronów AgRP/NPY w kontrolę wydatku energetycznego, gdyż zmieniają one swoją aktywność w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na energię (termogeneza indukowana zimnem) powodując kompensacyjną hiperfagię w odpowiedzi na zimno. Być może jest to efekt, za który odpowiedzialna jest sygnalizacja NPY. Neurony NPY w ARC uczestniczą w produkcji ciepła indukowanego przez dietę poprzez mechanizm angażujący ścieżkę sygnalizacyjną poprzez receptor 2 neuropeptydu FF (NPFFR2, ang. *neuropeptide FF receptor 2*). Ubytek tego receptora NPFFR2 prowadzi do obniżenia UCP-1 i PGC-1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) w brunatnej tkance tłuszczowej i obniżenia termogenezy w BAT. Jest to dowód na zaangażowanie obwodów zależnych od NPY w ARC w kontrolę termogenezy w BAT (L. Zhang i in., 2018). Istnieje zatem przypuszczenie, że myszy Dicer cKO mogą mieć zaburzoną termogenezę wynikającą z zaburzonej sygnalizacji NPY.

5.3.2 Neurony POMC/CART w zachowaniu bilansu energetycznego

Neurony POMC działają antagonistycznie do neuronów AgRP/NPY i stanowią integralną część układu melanokortynowego regulującego mechanizm poboru pokarmu i wydatek energetyczny. Selektywna abłacja neuronów POMC w podwzgórzcu zwiększa pobór pokarmu, obniża wydatek energetyczny i powoduje szerokie spektrum metabolicznych i endokrynnych zaburzeń związanych z otyłością. Efekty behawioralne wynikające z abłacji neuronów POMC w ARC przypominają zespół metaboliczny wywołany przez usunięcie neuronów POMC w całym mózgu (Zhan i in., 2013). POMC jest białkowym prekursorem, który poprzez konwertazy propeptydowe PC1 i PC2 rozpada się na wiele peptydów pełniących różne funkcje. Pacjenci z zespołem Pradera-Williego, chorobą genetyczną związaną z otyłością, wykazują obniżony poziom PC2. Do najważniejszych z punktu widzenia kontroli metabolicznej peptydów powstałych z POMC należą MSH, ACTH i β -endorfiny (Gabreels i in., 1998), które wywierają efekt biologiczny na neurony II-rzędu, hamując pobór pokarmu i modulując wydatek energetyczny. Neurony POMC są aktywowane w odpowiedzi na krążące sygnały sytości w tym insulinę i leptynę. Ostre zahamowanie aktywności ARC^{POMC} nieznacznie zmienia pobór pokarmu, podczas gdy chroniczna supresja redukuje spożycie pokarmu, co świadczy o ich funkcji w długoterminowej regulacji konsumpcji pokarmu. Interesujące jest natomiast zjawisko natychmiastowej aktywacji neuronów POMC poprzez detekcje pokarmu, która nieprzerwanie trwa podczas konsumpcji (Zhan i in., 2013). Neurony POMC stanowią

heterogenną populację wykazującą zarówno glutamatergiczną, jak i GABAergiczną transmisję oraz podział na liczne subpopulacje z ekspresją leptyny (~12% neuronów POMC), insuliny, GLP1 (<10%), 5HT2CR (Campbell i in., 2017).

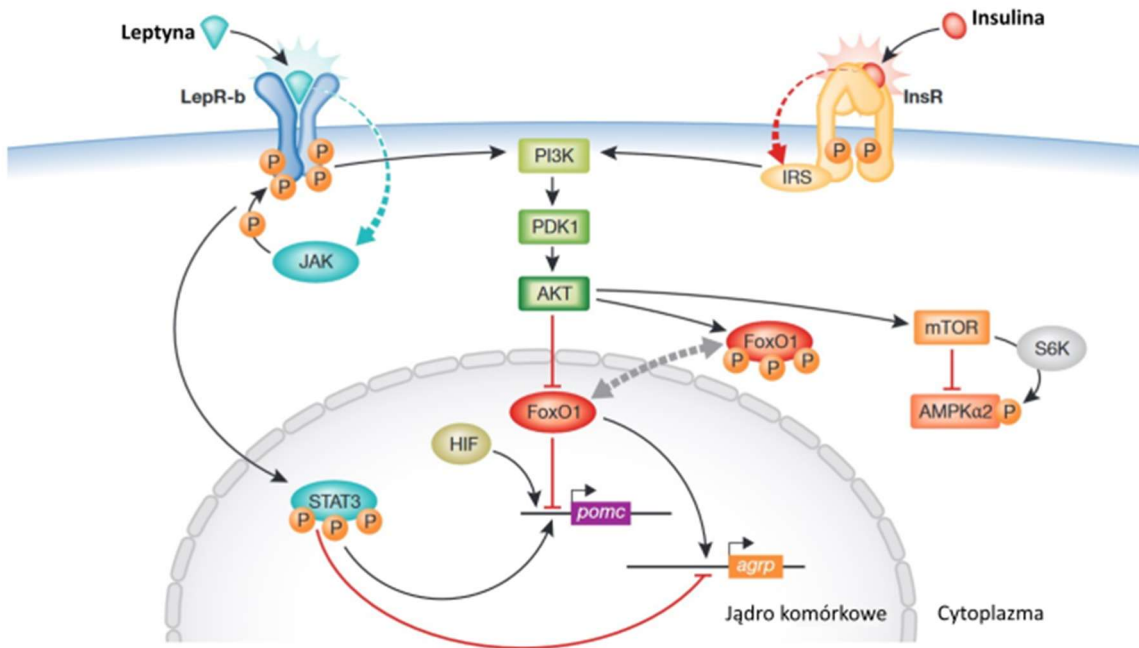
Zaburzenia w funkcjonowaniu neuronów POMC u myszy Dicer cKO mogą przyczyniać się do szeregu dysfunkcji regulujących homeostazę energetyczną i metaboliczną. Ze względu na dużą różnorodność tej populacji neuronalnej możliwe jest, że zmiana dotyczy pewnych podtypów neuronów POMC. Zmiany w aktywności POMC na rozwój fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO może wynikać z dwóch przyczyn. Jedną jest oczywista zmiana wynikająca z zaburzonej translacji białek po usunięciu miRNA. Druga dotyczy samej fizjologii neuronów POMC, którą można wytłumaczyć częściowo poprzez zrozumienie kinetyki aktywacji poszczególnych populacji neuronalnych zaangażowanych w mechanizm łaknienia w ARC. Wydaje się, że stymulacja neuronów AgRP/NPY jest silniejsza w modulowaniu zachowania pokarmowego, aniżeli stymulacja neuronów POMC. Potwierdzają to badania zarówno chemo- jak i optogenetycznej aktywacji obu populacji neuronalnych. Aby doszło do zahamowania konsumpcji pokarmu w wyniku aktywacji POMC, musi dojść do chronicznej stymulacji (~24h), dla porównania stymulacja neuronów AgRP/NPY powoduje natychmiastową konsumpcję pokarmu (Aponte i in., 2011).

5.3.3 Wpływ leptyny na rozwój fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO

Leptyna, wydzielana przez komórki tłuszczowe, oddziałuje z neuronami podwzgórza poprzez swoisty receptor LEPRb, informując o zasobach energetycznych organizmu, hamując jedzenie i zwiększając EE. Myszy pozbawione leptyny (*ob/ob*) lub długiej formy receptora leptynowego LEPRb (*db/db*) rozwijają otyłość z powodu zwiększenia przyjmowania pokarmu i obniżenia wydatku energetycznego (H. Chen i in., 1996). Analiza transkryptomiczna u myszy Dicer cKO wykazała zmiany w ścieżkach związanych z otyłością, m.in. w ścieżce leptynowej (Mang i in., 2015), co może odpowiadać za obserwowany fenotyp. Leptyna koordynuje bilans energetyczny poprzez oddziaływanie na obwody neuronalne w podwzgórzu kontrolujące pobór pokarmu, aktywność fizyczną, termogenezę i homeostazę glukozy (Balthasar i in., 2005; Coppari i in., 2005; Dodd i in., 2014). Leptyna hiperpolaryzuje neurony wydzielające NPY/GABA, które bezpośrednio unerwiają neurony POMC, redukując w ten sposób hamujący wpływ GABA na neurony POMC (Cowley i in., 2001). Aktywuje nerwy układu współczulnego, wpływając na tkanki peryferyjne, w tym tkankę tłuszczową czy nerki. Usunięcie LEPRb w neuronach PrRP (ang. *RFamide prolactin-releasing peptide neurons*)

w DMH blokuje reakcje termogeniczne indukowane leptyną, co prowadzi do otyłości (Dodd i in., 2014). Wydatek energetyczny jest również obniżony u zwierząt pozbawionych receptora LEPRb.

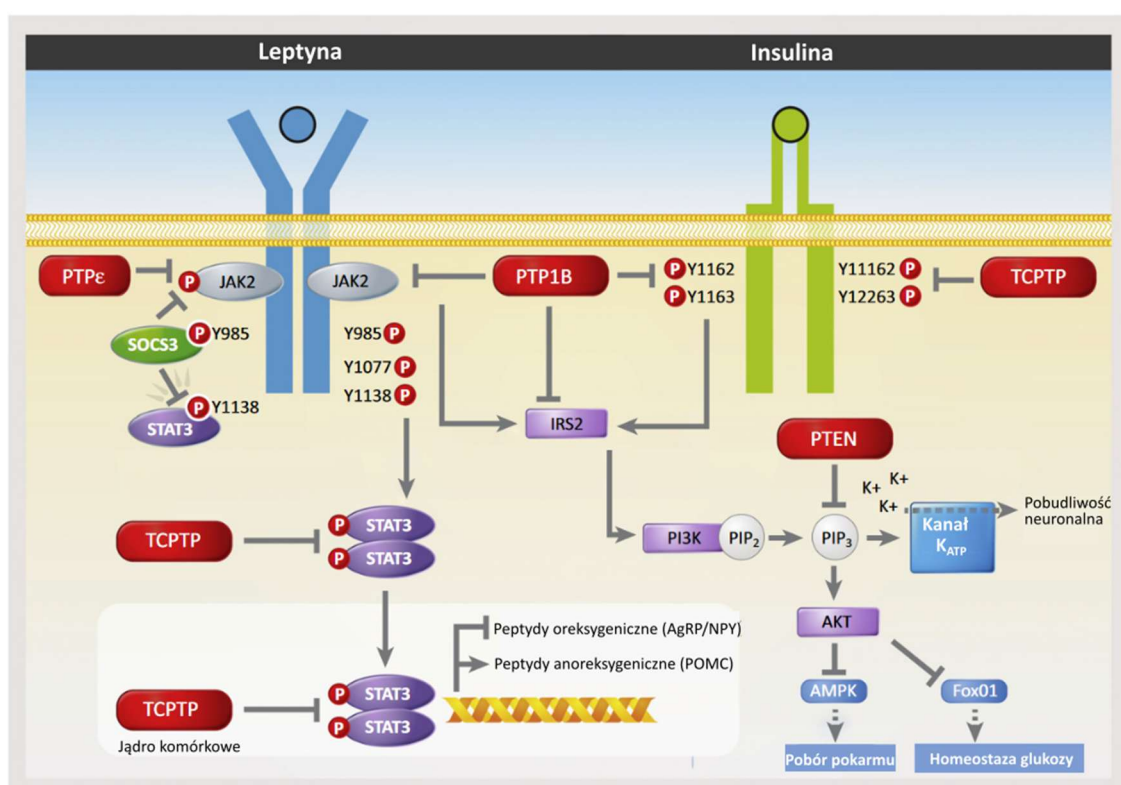
Leptyna wywiera swój efekt biologiczny poprzez różne wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne, które biorą udział w regulacji bilansu energetycznego i homeostazy glukozy (Z.-Y. Zhang i in., 2015). Kinaza AMP (AMPK) jest niezbędna w wewnątrzkomórkowych ścieżkach transdukcji sygnału po aktywacji receptora leptynowego (Tanida i in., 2013). AMPK w podwzgórzu odgrywa kluczową rolę nie tylko w regulacji homeostazy energetycznej, ale również w regulacji metabolizmu glukozy (C. S. Yang i in., 2010), snu (Chikahisa i in., 2009), czy kontroli układu sercowo-naczyniowego (S. Wang i in., 2011). Myszy z usuniętą podjednostką katalityczną (2α) kinazy AMP w neuronach POMC rozwijają otyłość poprzez redukcję wydatku energetycznego i rozregulowanie poboru pokarmu, lecz z zachowaną wrażliwością na leptynę. Podobna mutacja w neuronach AgRP powoduje zależny od wieku „szczupły” fenotyp połączony ze zwiększoną wrażliwością na agonistę receptora melanokortynowego. Badania elektrofizjologiczne w neuronach POMC lub AgRP z niedoborem AMPK $\alpha 2$ wykazały normalne działanie leptyny lub insuliny, ale brak reakcji na zmiany w poziomach zewnątrzkomórkowej glukozy, co pokazuje, że mechanizmy sygnalizacyjne wykrywające glukozę w tych neuronach różnią się od szlaków wykorzystywanych przez leptynę lub insulinę (Claret i in., 2007). Połączenie leptyny z jego receptorem, prowadzi do aktywacji kinazy Janus 2 (JAK2). JAK2 wiąże się i fosforyluje LEPRb, aktywując STAT3. Ufosforylowane STAT3 po dimeryzacji i translokacji do jądra zwiększają ekspresję *Pomc* i obniżają *AgRP* (Allison i Martin G Myers, 2014). Delecja STAT3 w podwzgórzu skutkuje otyłością oraz rozwojem objawów zespołu metabolicznego (H. Liu i in., 2021). Leptyna/LEPRb poprzez ścieżki sygnalizacyjne JAK2 i PI3K/AKT reguluje pobudliwość komórkową i aktywację kinazy AMP oraz fosforylację FoxO1 (ang. *forkhead box protein O1*), wpływając na ekspresję neuropeptydów i metabolizm glukozy (Dagon i in., 2012; J. W. Hill i in., 2008).



Rycina 5.2 Ścieżki sygnalizacyjne leptyny i insuliny w ARC. Związanie leptyny do receptora LEPRb powoduje aktywację i fosforylację STAT3; pSTAT3 po translokacji do jądra łączy się z promotorami *Pomc* i *Agrp*, stymulując ekspresję *Pomc* i hamując *Agrp*. Sygnalizacja insulinowa i leptynowa zbiega się na szlaku PI3K. Aktywacja PI3K prowadzi do fosforylacji i inaktywacji FoxO1, represora ekspresji *Pomc*. Fosforylacja FoxO1 powoduje jego eksport z jądra do cytoplazmy, umożliwiając pSTAT3 przyłączenie się do promotorów *Pomc* i *Agrp*. Leptyna pośredniczy w hamowaniu AMPK przez mTOR. AKT (kinaza białkowa B); AMPK (ang. *AMP-dependent kinase*); FoxO1 (ang. *Forkhead box protein O1*); HIF (ang. *hypoxia-inducible factor*); InsR (ang. *insulin receptor*); IRS (ang. *insulin receptor substrate*); JAK (ang. *Janus kinase*); mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*); PDK1 (ang. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*); PI3K (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase*); S6K (ang. *p70 S6 kinase*); STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*) (na podstawie Varela i Horvath, 2012).

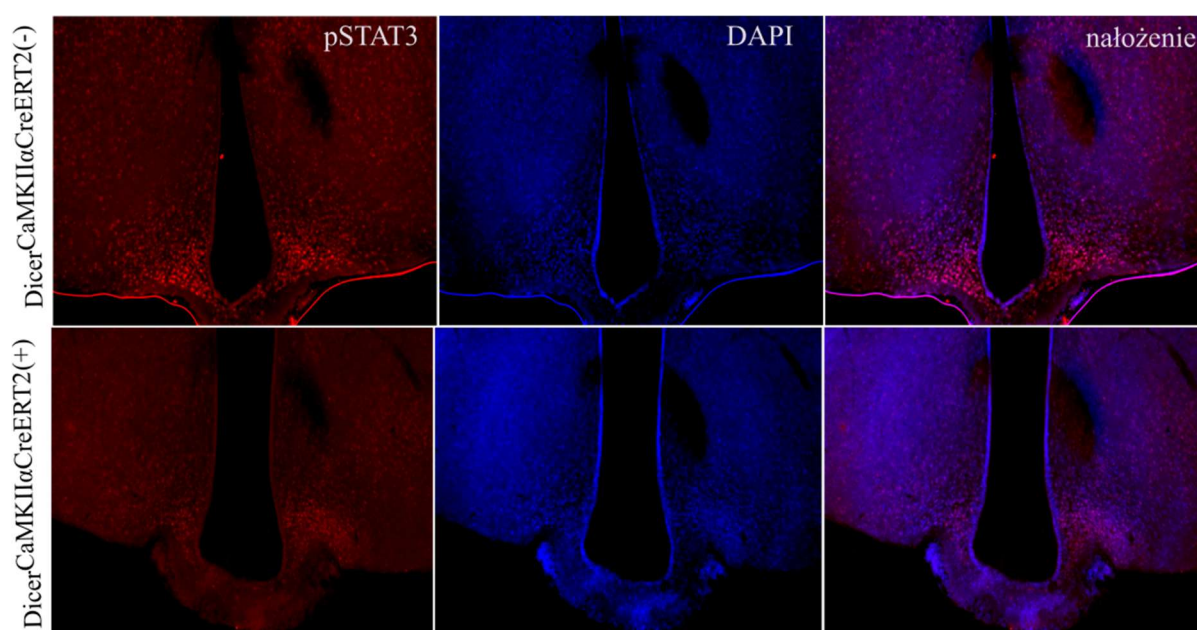
Otyłość wywołana dietą u myszy, powoduje spadek wrażliwości neuronów na leptynę, wynikający z zablokowania ścieżki z udziałem PI3K (Metlakunta i in., 2008). Leptyna i insulina poprzez receptory w podwzgórzu, hamują przyjmowanie pokarmu i stymulują wydatek energetyczny. U myszy Dicer cKO wykryto zwiększone stężenie zarówno leptyny, jak i insuliny (Vinnikov i in., 2014). Ponieważ ich sygnalizacja wewnątrzkomórkowa zbiega się na szlaku PI3K, zablokowano sygnalizację, w której pośredniczy 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3) w neuronach POMC poprzez inaktywację genu fosfatazy PIP3 - PTEN. Pokazano, że specyficzne zaburzenie PTEN w neuronach POMC powoduje hiperfagię i dymorficzną płciowo otyłość wrażliwą na dietę. Neurony POMC z delecją PTEN wykazują wyraźną hiperpolaryzację i zmniejszenie podstawowego tempa wyładowań, co wynika ze zwiększonej aktywności kanału potasowego (K_{ATP}) wrażliwego na ATP (Plum, 2006). Ponadto usunięcie PTEN w neuronach CaMKII α prowadzi do rozwoju fenotypu otyłości podobnej do fenotypu obserwowanego u myszy Dicer cKO, w sposób zależny od płci (Vinnikov i in., 2014). Aktywność sygnalizacji leptynowej jest również modulowana poprzez kilka białkowych

fosfataz tyrozynowych (PTP, ang. *Protein Tyrosine Phosphatase*), które również mogą uczestniczyć w rozregulowaniu opisywanych ścieżek i potencjalnie wpływać na fenotyp myszy Dicer cKO, co pokazano na Rycinie 5.3. Należą do nich SHP2 (ang. *SH2-containing PTP 2*), łącząca LEPRb ze ścieżką Ras/MAPK (ang. *Ras/mitogen-activated protein kinase*); PTP1B (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*) i PTP ϵ , która defosforyluje JAK2; TCPTP (ang. *T cell protein tyrosine phosphatase*), która defosforyluje STAT3 i PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*), która hamuje sygnalizację PI3K (Banno i in., 2010; Loh i in., 2011; Plum, 2006; Rouso-Noori i in., 2011).



Rycina 5.3 Białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTPs) osłabiają sygnalizację leptynową i insulinową w OUN poprzez szlaki JAK2/STAT3, JAK2/IRS2/PI3K i IRS2/PI3K, promując ekspresję *Pomc* i hamując ekspresję neuropeptydów oreksygeniczných *AgRP* i *Npy*. Ścieżka sygnalizacyjna IRS2/PI3K pobudza zależne od ATP kanały K⁺ (KATP) zmieniając aktywność elektryczną neuronów POMC i AgRP/NPY oraz aktywuje kinazę białkową AKT regulującą metabolizm glukozy. Ścieżki te są hamowane przez PTP1B, PTP ϵ i TCPTP oraz wykazującą podwójne działanie fosfatazę PTEN, która defosforyluje lipidowy produkt PI3K oraz SOCS3. PTP1B i TCPTP wspólnie działają, by obniżyć indukowaną leptyną sygnalizację JAK2/STAT3 poprzez defosforylację miejsc tyrozynowych na receptorze leptynowym związanych z kinazą JAK2 i w przypadku TCPTP miejsce fosforylacji STAT3, niezbędne do dimeryzacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie wywiera swój wpływ na ekspresję genów. PTP1B i TCPTP również defosforylują miejsca na receptorze insulinowym obniżając sygnalizację insulinową. Skróty: MSH (ang. *melanocyte-stimulating hormone*); JAK2 (ang. *Janus kinase 2*); PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*); PIP2/3 (ang. *phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate/ phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate*); PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*); SOCS3 (ang. *suppressor of cytokine signaling 3*); TCPTP (ang. *T cell protein tyrosine phosphatase*) (na podstawie Z.-Y. Zhang i in., 2015).

Zaburzenia w ścieżce leptynowej u myszy Dicer cKO, mogą wywierać efekt na opisane powyżej ścieżki sygnalizacyjne. Zostało stwierdzone, że mutacja wpływa na ścieżkę związaną z PI3K, która ulega chronicznej nadaktywacji na szlaku PI3K-Akt-mTOR u myszy Dicer cKO, co prowadzi do hiperfagicznej otyłości (Vinnikov i in., 2014). Można również zakładać, że nadaktywacja ścieżki PI3K powoduje chroniczną hiperpolaryzację neuronów POMC, przez co wpływ leptyny na aktywację tej populacji neuronów będzie osłabiony. Mutacja może również wpływać na ścieżkę JAK→STAT3, prowadząc do zmian w ekspresji neuropeptydów, obniżając ilość transkryptów *Pomc*. W ramach niniejszej rozprawy wykonano również barwienie IF przeciwko ufosforylowanej formie STAT3 (pSTAT3), jednego z głównych elementów sygnalizacji leptynowej (Rycina 5.4), którego zaburzenie prowadzi do otyłości. Barwienie przeciwko pSTAT3 jest powszechnie stosowane jako odczyt aktywności receptora LEPRb (Vaisse i in., 1996). Wykazano, że w ARC u samic Dicer cKO w 6. tygodniu mutacji, sygnał fluorescencyjny jest słabszy w porównaniu do kontroli, co wskazuje na obniżony poziom pSTAT3 i osłabienie sygnalizacji leptynowej. Stąd pomimo nadwyżki w krwiobiegu, leptyna nie wywiera swojej funkcji aktywującej neurony POMC i hamującej AgRP/NPY. Uzyskany wynik jest jednak sprzeczny z wynikami otrzymanymi w pracy Vinnikov i in., 2014, w której otrzymano wzrost pSTAT3 u myszy Dicer cKO w 6. tygodniu mutacji. Badania w przytaczanej pracy wykonano jednak na samcach i samicach, co może tłumaczyć rozbieżności w uzyskanych wynikach.



Rycina 5.4 Barwienie immunofluorescencyjne przeciwko pSTAT3 w ARC wykonane w 6. tygodniu mutacji u samic Dicer cKO; skala 100 μ m.

Możliwe jest również, że w wyniku mutacji u myszy Dicer cKO dochodzi do zmiany w samym receptorze leptynowym (LEPRb), który może wykazywać obniżoną wrażliwość na krążącą w krwioobiegu leptynę. Aby wykluczyć tę możliwość i ocenić czy podanie egzogennej leptyny na wczesnym etapie mutacji (przez ujawnieniem się fenotypu), wpłynie na rozwój hiperfagicznej otyłości u myszy Dicer cKO, wykorzystano pompy osmotyczne stale uwalniające określoną ilość leptyny (3 µg/dobę). Zwiększone stężenie leptyny, przy założeniu, że to ścieżki sygnałowe są dotknięte mutacją, a nie sam receptor, może zwiększyć aktywność neuronów POMC, ale też wpłynąć na zmniejszenie transmisji wynikającej z aktywacji neuronów AgRP/NPY, np. poprzez transmisję GABAergiczną z neuronów DMH wrażliwych na leptynę, hamującą aktywność neuronów AgRP w ARC ($DMH^{LEPR} \rightarrow ARC^{AgRP}$) (Garfield i in., 2016). Otrzymane wyniki pokazują, że infuzja egzogennej leptyny częściowo przyczynia się do obniżenia efektu mutacji na rozwój fenotypu otyłości. Pokazano, że jej podanie łagodzi, lecz nie niweluje efektu mutacji, m.in. przyspiesza spadek poboru pokarmu charakterystyczny dla 7. tygodnia mutacji, co implikuje rolę leptyny w tym zjawisku, oraz obniża o ok. 20% wzrost masy ciała w okresie maksymalnego tycia u myszy Dicer cKO. Dokładniejsza analiza w klatkach metabolicznych, wykazała dodatkowe różnice wynikające z podania leptyny. Bezsporną zaletą tej metody, jest ciągły pomiar badanych parametrów, generując wyniki kilka razy w ciągu godziny, zarówno w fazie aktywnej, jak i nieaktywnej, co pozwala również na ocenę aktywności w cyklu okołodobowym badanych zwierząt. Efekt podania leptyny jest najbardziej widoczny w fazie nieaktywnej, gdzie zauważono istotne obniżenie spożycia pokarmu w porównaniu do grupy z podanym nośnikiem (PBS). Prawdopodobnie w 7. tygodniu mutacji, gdzie spożycie pokarmu ulega wyhamowaniu, dochodzi do zmian w obwodach neuronalnych kontrolujących łaknienie (i być może aktywność okołodobową), w efekcie czego dochodzi do zmiany w schemacie poboru pokarmu i wzroście konsumpcji w fazie nieaktywnej (9. tydzień mutacji), lecz bez zmian widocznych w RER. Nie odnotowano również różnic w wydatku energetycznym.

Doświadczenie przeprowadzone w klatkach metabolicznych umożliwiło również ocenę poboru wody po indukcji mutacji w badanej linii. Wcześniejsza analiza z wykorzystaniem tego systemu, porównująca myszy Dicer cKO do myszy kontrolnych wykazała, że w badanej grupie zwierzęta piją istotnie więcej. Jednakże można wytłumaczyć to zjawisko zwiększonym posiłkowym pragnieniem, wynikającym ze zwiększonej konsumpcji pokarmu. U myszy Dicer cKO z podaną leptyną dochodzi do spadku konsumpcji wody w fazie nieaktywnej (5 - 8 tydzień mutacji), co wskazuje na rolę leptyny w okołodobowej kontroli spożycia wody. Różnicy w poborze wody pomiędzy grupą z leptyną a nośnikiem, nie można do końca wyjaśnić

posiłkowym pragnieniem, gdyż występuje również w czasie, gdy pobór pokarmu jest ograniczony. Raczej różnica wynika z wyciszenia aktywności neuronów AgRP/NPY i spadku wydzielania NPY za pośrednictwem leptyny. W ostatnim tygodniu badania również w tym parametrze można dostrzec zjawisko „odwrócenia doby”, gdyż myszy Dicer cKO z podaną leptyną wykazują wzrost poboru wody w fazie nieaktywnej.

Wyniki tego doświadczenia pokazują, że rozwój fenotypu otyłości i wzmożony pobór pokarmu i wody u myszy Dicer cKO, przynajmniej częściowo, są zależne od leptyny. Podanie leptyny nie zahamowało rozwoju fenotypu otyłości, jednak wpłynęło na osłabienie skutków mutacji. Być może wynika to ze zbyt niskiego stężenia podawanego związku lub z „przytępieniem” aktywności leptyny, wynikającym z rozwoju tzw. leptynooporności, czego przykładem są wyniki stwierdzające duże stężenia leptyny u osób otyłych, u których jej nadmiar nie obniża łaknienia. Najpewniej, podanie leptyny przed ujawnieniem się fenotypu u myszy Dicer cKO, również nie było w stanie wyciszyć aktywności neuronów AgRP/NPY, które ulegają hiperaktywacji, stymulując nadmierne wydzielanie NPY, co może wpływać na wzrost poboru pokarmu i wody oraz spadek wydatku energetycznego u myszy Dicer cKO. Teorię tę potwierdzają badania ekspresji kluczowych neuropeptydów kontrolujących łaknienie u myszy Dicer cKO, które pokazują, że do 5. tygodnia mutacji wzrasta poziom *NPY* i *AgRP*, a w 6. tygodniu obserwuje się ich spadek, co tłumaczy nagłe zahamowanie jedzenia (co ciekawe, poziom mRNA *AgRP* spada znacznie wcześniej, bo już w 4. tygodniu, co podkreśla rolę NPY w obserwowanym zjawisku). Jednocześnie w 4. i 6. tygodniu mutacji poziom transkryptów *Pomc* jest obniżony, co dodatkowo pogłębia efekt oreksygeny AgRP i NPY w tej fazie mutacji (Vinnikov i in., 2014).

5.4 Analiza metaboliczna myszy Dicer cKO

Efekt usunięcia dojrzałych cząsteczek miRNA w przedomózgowiu niesie ze sobą poważne zdrowotne implikacje, które oprócz zmian w neuronach, powodują rozregulowanie funkcjonowania tkanek peryferyjnych, co manifestuje się poprzez wzmożoną akumulację tkanki tłuszczowej i hiperfagię. Testy metaboliczne wykonane w przedstawianej rozprawie doktorskiej, pozwalają wstępnie określić stopień i czas trwania tych zmian u samic i samców myszy Dicer cKO, co umożliwia ocenę czy mutacja prowadzi do rozwoju chorób towarzyszących otyłości, w tym cukrzycy 2 typu i/lub insulinooporności. Przeprowadzono również testy oceniające hormony tarczycowe, których rozregulowanie może wywierać efekt na tempo metabolizmu. Nie wykazano jednak zmian w funkcjonowaniu tarczycy.

5.4.1 Ocena metabolizmu glukozy

Zaburzenia metabolizmu glukozy wpływają na rozwój chorób związanych z otyłością, które można wykryć poprzez wykonanie testu tolerancji glukozy (GTT) i testu tolerancji insuliny (ITT). W teście ITT przeprowadzonym u myszy Dicer cKO nie stwierdzono różnic, natomiast w GTT wykryto zależne od płci różnice w metabolizmie glukozy. Pokazano, że w 6. tygodniu od indukcji mutacji, dochodzi do przejściowej nietolerancji glukozy u samic Dicer cKO. U samców Dicer cKO również zaobserwowano tendencję w kierunku zwiększenia poziomu glukozy w tym okresie. Badania na zwierzętach transgenicznym modelujących cukrzycę, w tym myszy bez receptora insuliny *ob/ob*, pokazują, że wzrost aktywacji neuronów AgRP przyczynia się do hiperglikemii cukrzycowej, a obniżenie ich aktywności, podanie leptyny lub FGF1 (ang. *fibroblast growth factor 1*), obniżające poziom mRNA *AgRP*, ten efekt niweluje (Bentsen i in., 2020). Usunięcie receptora leptynowego za pomocą CRISPR/Cas9 z neuronów AgRP jest wystarczające, by wywołać otyłość i cukrzycę (J. Xu i in., 2018), co świadczy o tym, że niewłaściwa aktywacja neuronów AgRP lub zaburzona sygnalizacja leptynowa, może wywołać hiperglikemię. Leptyna zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę i wpływa na zwiększenie intensywności glikolizy (poprawa tolerancji glukozy) (Berti i in., 1997). Mechanizm zwiększonego poboru glukozy przez mięśnie szkieletowe pod wpływem leptyny, opiera się na aktywacji wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej poprzez fosforylację kinazy Akt oraz PI3K, co prowadzi do przemieszczenia transportera glukozy GLUT4 do błony komórkowej (Thorn i in., 2013).

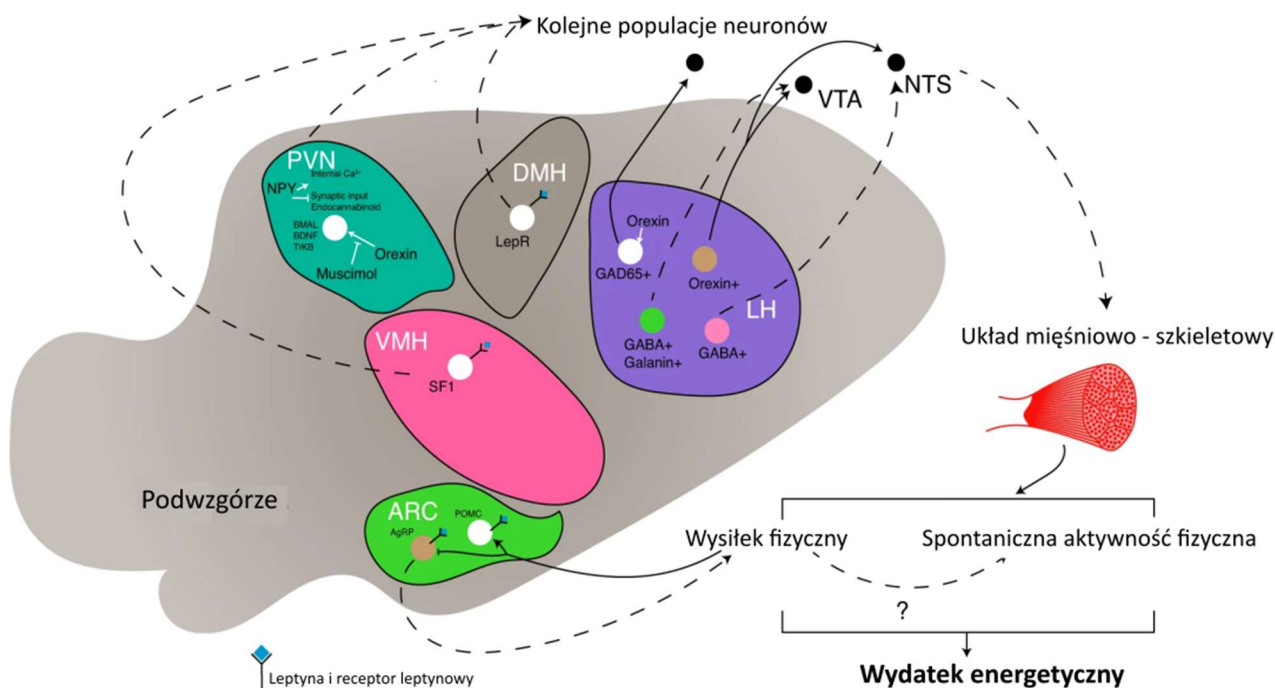
Procesy autofagii również odgrywają rolę w regulacji homeostazy energetycznej i metabolizmu glukozy w neuronach AgRP/NPY i POMC podwzgórza, co pokazano u myszy z brakiem genu związanego z autofagią *Atg7* (ang. *autophagy-related gene 7*). Autofagia stanowi proces uruchamiany podczas głodu, w którym organelle cytoplazmatyczne są sekwestrowane i degradowane w lizosomach, aby zapewnić komórce składniki odżywcze. W neuronach AgRP/NPY zablokowanie autofagii przyczynia się do spadku masy ciała i zwiększania aktywności lokomotorycznej. Ponadto, u tych myszy zaobserwowano obniżony efekt zwiększenia apetytu po głodówce, co sugeruje zwiększenie wrażliwości na leptynę (Kaushik i in., 2011). Natomiast usunięcie *Atg7* w neuronach POMC obniża poziom α -MSH, powoduje otyłość oraz zmiany w poborze pokarmu i wydatku energetycznym (Kaushik i in., 2012). Co więcej, zahamowanie autofagii w neuronach POMC silnie wpływa na homeostazę glukozy i powoduje zmiany strukturalne w tych neuronach. Myszy te wykazują oporność na leptynę i niezdolność leptyny do aktywacji i fosforylacji STAT3. Dodatkowo, brak *Atg7*

w neuronach POMC przyczynia się do wzrostu poziom glukozy we krwi pomimo wysokiego stężenia insuliny, co wskazuje na rozwój insulinooporności u tych myszy (Coupé i in., 2012; Kaushik i in., 2012; Quan i in., 2012).

W ramach niniejszej rozprawy, sprawdzono efekt wzmożonej aktywności fizycznej na metabolizm glukozy u myszy Dicer cKO z dostępem do kołowrotka, co fizjologicznie uwrażliwia tkanki na insulinę i poprawia wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe. Aktywność fizyczna powoduje szybszy powrót glukozy do normy (po upływie ~60 minut) od podania glukozy w teście GTT (Rycina 4.3). W tym doświadczeniu również uwidoczniono różnice wynikające z płci, ponieważ u samców Dicer cKO, zauważono terapeutyczny wpływ wysiłku fizycznego na redukcję poziomu glukozy do wartości obserwowanej w grupie kontrolnej, czego nie wykazano u samic Dicer cKO. Samice Dicer cKO z dostępem do kołowrotka zwiększały pobór pokarmu, co świadczy o zwiększonym zapotrzebowaniu energetycznym, jednakże bez korzystnego wpływu na wychwyt glukozy z krwiobiegu. Test GTT przeprowadzony w czasie maksymalnego tycia wykazał zaburzenia w tolerancji glukozy w obu grupach samic Dicer cKO, a po spadku masy ciała u samic Dicer cKO z kołowrotkiem (w 9. tygodniu) wciąż obserwowano niewielkie odstępstwa w wychwycie glukozy. Można zatem przypuszczać, że obserwowany fenotyp może wynikać z zaburzonej ścieżki leptynowej, kontrolującej glikemię poprzez opisaną w poprzednim rozdziale sygnalizację zależną od PI3K lub rozwijających się zaburzeń w procesach autofagii zachodzących w neuronach POMC.

5.4.2 Ocena wydatku energetycznego

Różne komponenty wydatku energetycznego (EE) są regulowane w odrębnych jądrach podwzgórza. Spoczynkowe tempo metabolizmu (RMR), stanowiące 70% EE, jest pod kontrolą PVN, ARC i VMH. EE związany z aktywnością fizyczną (20%), w którego skład wchodzi termogeneza generowana przez spontaniczną aktywność oraz termogeneza w wyniku aktywności fizycznej w mięśniach szkieletowych, jest kierowana przez LH, PVN, ARC, VMH. Adaptacyjna termogeneza indukowana dietą (10%) jest kontrolowana przez ARC, VMH, DMH, POA (ang. *preoptic area*), natomiast termogeneza indukowana zimnem, złożona z termogenezy związanej z dreszczami i termogenezy bez dreszczy, jest pod kontrolą POA, DMH, VMH i PVN (Tran i in., 2022).



Rycina 5.5 Schemat przedstawiający zaangażowanie poszczególnych jąder podwzgórza w aktywność fizyczną w formie spontanicznej aktywności fizycznej lub ćwiczeń, wpływając na wzrost wydatku energetycznego. Przerywane linie oznaczają przypuszczalne lub niejasne ścieżki regulujące aktywność. Skróty: BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*); SF-1 (ang. *steroidogenic factor 1*); TrkB (ang. *tropomyosin receptor kinase B*) (na podstawie Tran i in., 2022).

Spontaniczna aktywność fizyczna odgrywa znaczącą rolę w modulowaniu homeostazy energetycznej i wagi ciała zarówno u gryzoni, jak i u ludzi (Kotz i in., 2017). Podobnie do poboru pokarmu, spontaniczna aktywność fizyczna jest regulowana przez neuropeptydy wydzielane w różnych regionach mózgu. Jednym z nich jest oreksyna wydzielana przez neurony oreksynowe w LH. Ostra aktywacja neuronów oreksynowych, zwiększa ruchliwość bez wpływu na pobór pokarmu u samców, zwłaszcza w fazie jasnej. Zahamowanie neuronów oreksynowych u samic obniża aktywność i wydatek energetyczny zwłaszcza w fazie ciemnej (Zink i in., 2018). Co ciekawe, podanie prepro-oreksyny (oreksyny A), zwiększa pobór pokarmu w fazie nieaktywnej, w której zwierzęta powinny odpoczywać (Kotz i in., 2002). Chemogenetyczne wyciszenie neuronów oreksynowych w LH wykazujących ekspresję GAD65, obniża aktywność lokomotoryczną, natomiast ich aktywacja prowadzi do hiperaktywności (Kosse i in., 2017). Co więcej, ich długoterminowa aktywacja, chroni przed otyłością wywołaną dietą, poprzez wzrost spontanicznej aktywności i wydatku energetycznego (Zink i in., 2018). Kolejnym oreksygennym neuropeptydem wywierającym efekt na aktywność fizyczną poprzez PVN jest opisany wcześniej NPY. NPY jest zaangażowany we wzrost poboru pokarmu oraz w reakcji adaptacyjnej mającej na celu oszczędzanie energii. NPY, podawany

albo dokomorowo (icv) albo miejscowo do PVN, prowadzi do zmniejszenia wydatku energetycznego, co częściowo wynika z jego wpływu na redukcję transmisji zstępującej w układzie współczulnym, unerwiającym peryferyjne tkanki termogeniczne, takie jak brunatna tkanka tłuszczowa (BAT) (Egawa i in., 1990). Powoduje on wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i spadek transmisji synaptycznej w neuronach PVN. Modulacja wydatku energetycznego przez NPY w PVN jest spowodowana również przez zahamowanie sygnalizacji endokannabinoidowej (Péterfi i in., 2018). Ważną rolę w kontroli homeostazy energetycznej w PVN odgrywa także BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*), oddziałując poprzez swoisty receptor TrkB. Jego usunięcie powoduje hiperfagię, obniżenie aktywności fizycznej, zaburzenia termogenezy i otyłość (An i in., 2015). Wpływ BDNF na homeostazę energetyczną jest zależny od leptyny, co jednocześnie wskazuje na syntezę białek dendrytycznych w tym procesie (Liao i in., 2012).

Jądro łukowate również bierze udział w kontroli aktywności fizycznej. Zarówno neurony AgRP/NPY jak i POMC reagują dynamicznie na aktywność fizyczną poprzez szybki wzrost pobudzenia neuronów POMC i zahamowanie neuronów AgRP/NPY (Z. He i in., 2018). Aktywacja STAT3 poprzez leptynę w neuronach AgRP zwiększa aktywność lokomotoryczną, podczas gdy nokaut FoxO1 obniża tę aktywność (Heinrich i in., 2014; Mesaros i in., 2008).

W przedstawianej pracy doktorskiej oceniano wydatek energetyczny u myszy Dicer cKO w stanie podstawowym z użyciem klatek metabolicznych oraz podczas wysiłku fizycznego u zwierząt z dostępem do kołowrotka. Wpływ wysiłku fizycznego na fenotyp otyłości oceniano na podstawie masy ciała i ilości spożytego pokarmu. Zgodnie z przewidywaniami, osobniki z dostępem do kołowrotka w wyniku zwiększonej aktywności fizycznej (wzrostu wydatku energetycznego) wykazywały zwiększoną konsumpcję karmy. Zaobserwowano jednak różnice pomiędzy płcią zwierząt w poborze pokarmu w 7. tygodniu mutacji. Samice Dicer cKO ograniczyły w tym czasie pobór pokarmu, co sugeruje obniżenie ogólnej aktywności fizycznej. Eksperyment przeprowadzony w klatkach metabolicznych pokazuje, że ten fenomen zbiega się w czasie, gdzie przynajmniej u samic Dicer, dochodzi do obniżenia wydatku energetycznego. Przejście w stan ograniczenia użytkowania energii zachodzi w obu fazach cyklu okołodobowego i jest widoczny od 6. tygodnia mutacji do końca trwania eksperymentu. Niestety nie przeprowadzono podobnej analizy na samcach Dicer cKO, przez co brak jest danych na temat wpływu mutacji na EE u samców. Prawdopodobnie również w tym parametrze będą widoczne różnice, co sugeruje doświadczenie z użyciem kołowrotka. U samców Dicer cKO bez kołowrotka również dochodzi do spadku w poborze pokarmu po 7. tygodniu, co świadczy o obniżeniu wydatku energetycznego, natomiast nie zaobserwowano

takiego zjawiska u samców z dostępem do kołowrotka w badanej linii, gdzie pobór pokarmu pozostawał zwiększony. Ponadto u samców Dicer cKO, zaobserwowano redukcję masy ciała u osobników z dostępem do kołowrotka, co świadczy o prawidłowej reakcji organizmu na wzmożoną aktywność fizyczną. Redukcja masy ciała u samców może więc wynikać z efektu termicznego aktywności fizycznej, co prowadzi do wzrostu tempa metabolizmu o ~10-20%. W piśmiennictwie również można wyszukać informacje o obniżonej aktywności, a także zmniejszonej produkcji ciepła u myszy Dicer cKO (bez rozróżnienia na płeć wykorzystanych zwierząt) w porównaniu do myszy kontrolnych (Mang i in., 2015), co potwierdza wpływ mutacji na zaburzenie wydatku energetycznego w badanej linii. Efekt ten może również wynikać z zaburzonej sygnalizacji oreksygeniczej w podwzgórzu, głównie za pośrednictwem NPY. Pobór pokarmu związany z intensywnym wysiłkiem fizycznym wymaga bowiem aktywacji neuronów NPY w ARC (ARC^{NPY}) (W. Chen i in., 2020), stąd można zakładać, że zmiany w sygnalizacji NPY mogą mieć kluczowe znaczenie dla fenotypu myszy Dicer cKO. Pokazano również, że neurony NPY w ARC otrzymują połączenia synaptyczne z neuronów oreksynowych z ekspresją receptorów leptynowych z LH (Horvath, Diano, i in., 1999). Co oznacza, że leptyna może dodatkowo modulować ekspresję NPY w neuronach ARC i wpływać na wydatek energetyczny. Zahamowanie sygnalizacji oreksynowej w LH, zwłaszcza u samic prowadzi do obniżenia wydatku energetycznego (Zink i in., 2018). Ponadto neurony z ekspresją NPY w ARC, wykazują ko-ekspresję mitochondrialnego UCP2, zaangażowanego w lokalną produkcję ciepła, wpływając tym samym na wydatek energetyczny. Populacje wytwarzające UCP2 w ARC wykazują ekspresję receptorów leptynowych oraz receptorów estrogenowych (ER) lub androgenowych (AR) (Horvath, Warden, i in., 1999), co stanowi dodatkową przesłankę świadczącą o możliwych różnicach wynikających z płci na wydatek energetyczny, w tym proces termogenezy u myszy Dicer cKO.

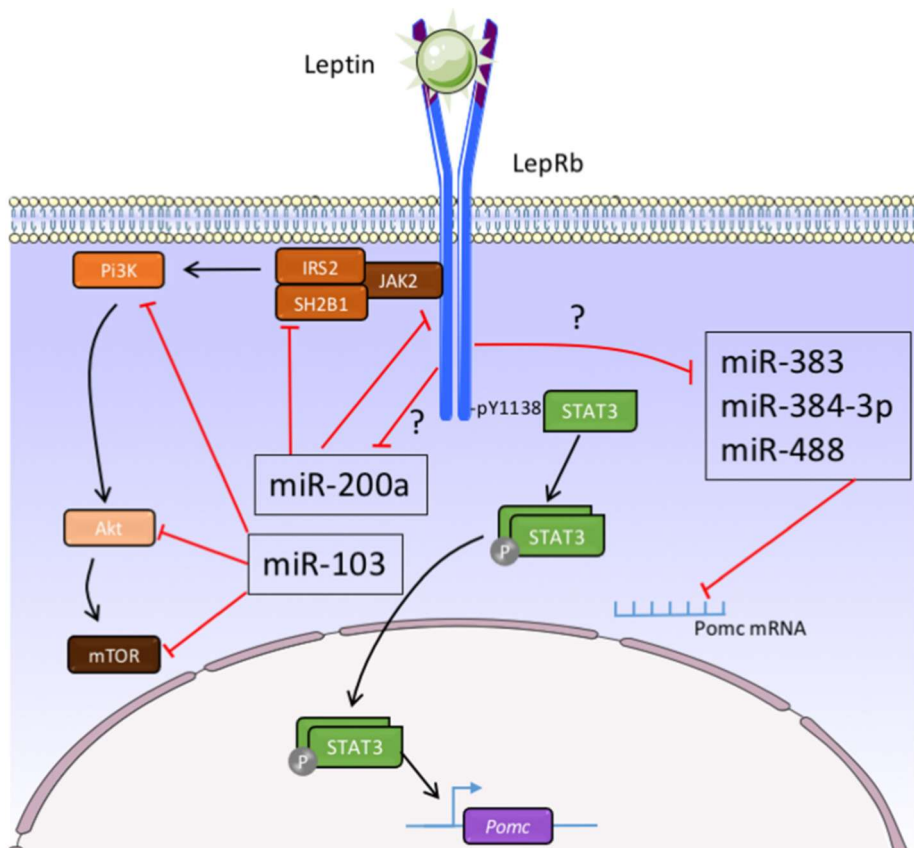
5.5 MikroRNA w regulacji metabolicznej i plastyczności synaptycznej w podwzgórzu

Wiele cząsteczek miRNA ulega ekspresji w mózgu, a usunięcie genu *Dicer1*, jednego z głównych enzymów w procesie dojrzewania miRNA, w określonych strukturach mózgu lub typach komórek, prowadzi do zaburzeń behawioralnych i neurodegeneracji (Hébert i in., 2010; Schaefer i in., 2007). RNaza III Dicer jest również niezbędna w centralnej kontroli metabolicznej. Pokazano, że można wywołać otyłość i hiperfagię poprzez usunięcie genu *Dicer1* w specyficznych populacjach neuronalnych w mózgu (Mang i in., 2015; Vinnikov i in., 2014), co pokazano również w niniejszej pracy. Ekspresja genu *Dicer1* jest ponadto modulowana poprzez dostępność substancji odżywczych oraz głódówkę (Schneeberger i in.,

2012). Gen *Dicer* ulega ekspresji w 94% neuronów POMC i AgRP/ NPY, co może świadczyć o jego istotnej roli w regulacji ekspresji genów *Pomc*, *AgRP* i *NPY* (Schneeberger i in., 2012).

Dojrzałe cząsteczki miRNA są względnie stabilne w obiegu, dlatego efekt usunięcia genu *Dicer1*, który odpowiada za dojrzewanie cząsteczek miRNA, jest obserwowany, gdy pula krążących cząsteczek zostanie wykorzystana. Wówczas brak nowo zsyntetyzowanych dojrzałych cząstek miRNA regulujących poziom białek docelowych wykazuje efekt biologiczny i prowadzi do rozregulowania procesów kontrolowanych przez te białka. Przykładowo, cząsteczka miR-33 odgrywa kluczową rolę w regulacji neuronów oreksygeniczných i jej selektywne usunięcie z neuronów AgRP powoduje wzrost transkryptów *Agrp*, zwiększenie poboru pokarmu, otyłość, zaburzenia metaboliczne (w tym metabolizmu glukozy), zaburzenia biogenezy mitochondriów i oksydacji kwasów tłuszczowych (Price i in., 2024). Usunięcie genu *Dicer1* w neuronach POMC z użyciem klasycznego systemu Cre-loxP powoduje ich degenerację u myszy w wieku 12 tygodni. Mutacja powoduje otyłość oraz zaburzenia homeostazy energetycznej manifestujące się poprzez hiperglikemię obserwowaną zarówno w stanie sytości, jak i podczas negatywnego statusu energetycznego, nietolerancję glukozy badaną w teście GTT, a także hiperinsulinemię (Schneeberger i in., 2012).

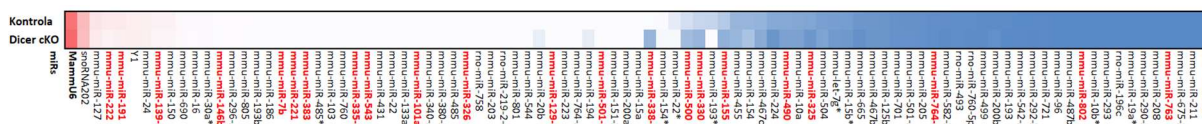
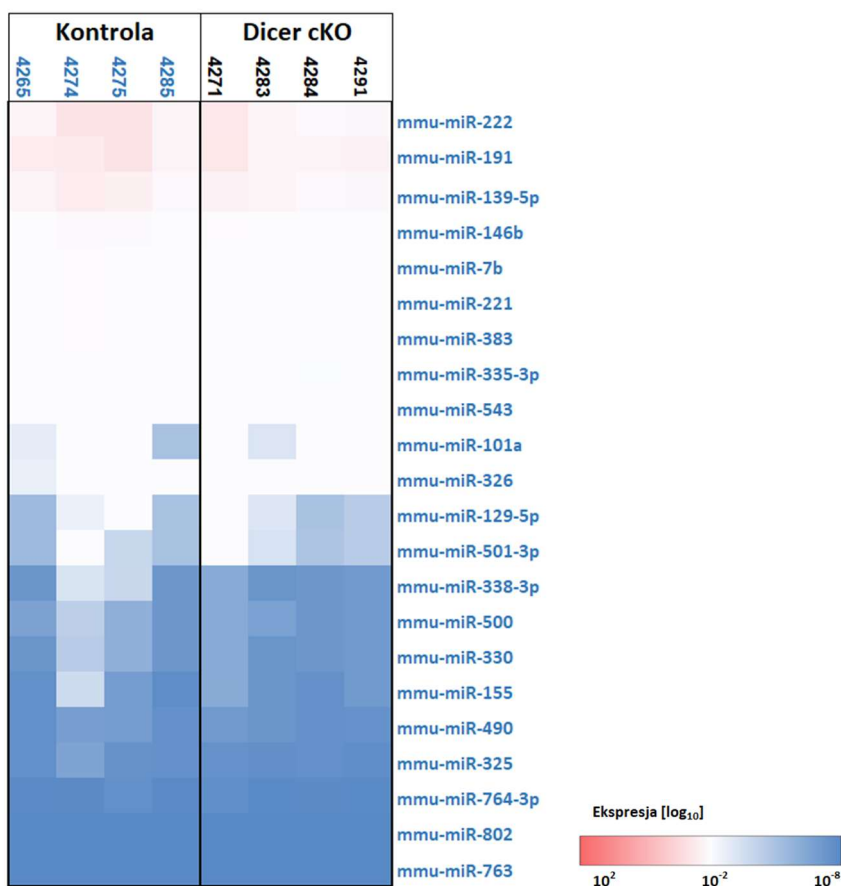
Analiza transkryptomyczna w indukowalnym modelu usunięcia genu *Dicer1* (*Dicer* cKO) z neuronów przodomózgowia, czyli w modelu badanym w przedstawionej pracy, wykazała zmiany w ścieżkach związanych z otyłością, m.in. w ścieżce leptynowej (Mang i in., 2015). Badania profilu ekspresji podwzgórzowych cząsteczek miRNA u myszy *ob/ob* pokazały zmiany w 11 z 524 badanych cząsteczek (m.in. nadekspresji ulegały cząsteczki miR-200a, miR-200b, miR-429, które normalizowały się po podaniu leptyny). Jednocześnie pokazano, że nadekspresja miR-200a powoduje obniżenie ekspresji zarówno IRS2 (ang. *insulin receptor substrate 2*), jak i podwzgórzowego receptora leptynowego (Rycina 5.6), co wpływa na funkcjonowanie ścieżki sygnałowej insuliny i leptyny (Crépin i in., 2014).



Rycina 5.6. Funkcja mikroRNA w kontroli systemu melanokortynowego za pośrednictwem leptyny. Akt (ang. *serine-threonine protein kinase*), IRS-2 (ang. *insulin receptor substrate 2*), JAK2 (ang. *janus kinase 2*), LepRb (ang. *leptin receptor type b*), mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*), POMC (ang. *pro-opiomelanocortin*), SH2B1 (ang. *Src homology 2 B adaptor protein 1*), STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*), ? niezbadane ścieżki.

Literatura dostarcza również danych dotyczących zaangażowania cząsteczek miRNA w regulacji lokalnej translacji białek na zakończeniach synaptycznych, prowadząc do zmian strukturalnych kolców dendrytycznych, drzewa dendrytycznego i zmian w połączeniach synaptycznych (G. M. Schratt i in., 2006). Całkowity poziom ekspresji cząsteczek miRNA może wywierać wpływ na utrzymanie długotrwałej plastyczności. Co ciekawe, badania wiązania czynników transkrypcyjnych obejmujące cały genom wykazały, że CREB może regulować ekspresję poszczególnych miRNA specyficznych dla mózgu (zidentyfikowano 33 cząsteczki zawierające sekwencje regulatorowe CRE), a cząsteczka miR-132, ulegająca ekspresji głównie w hipokampie, bezpośrednio reguluje CREB (J. Wu i Xie, 2006). Przykładem miRNA, który blokuje translację kilku mRNA ważnych dla plastyczności synaptycznej i strukturalnej jest cząsteczka miR-134, która zapobiega translacji kinazy domeny LIM1, zaangażowanej w regulację morfogenezy kolców dendrytycznych po stymulacji czynnikiem BDNF (G. M. Schratt i in., 2006). Cząsteczka miR-181a z kolei zapobiega translacji receptora

glutaminianu 2 (GluA2), miR-125b odpowiada za represję translacji jonotropowego receptora glutaminianu NMDA 2A (NR2A), a miR-223 hamuje syntezę jonotropowego receptora glutaminianu NMDA 2B (NR2B) (Edbauer i in., 2010; Harraz i in., 2012; Saba i in., 2012; G. Schratt, 2009). MikroRNA potranskrypcyjnie mogą kontrolować pulę białek modyfikujących liczbę, kształt i funkcje kolców dendrytycznych, a więc białek zaangażowanych w plastyczność synaptyczną, do których należy BDNF i MMP-9. Jednakże należy mieć na uwadze, że pojedyncza cząsteczka mikroRNA celuje w dziesiątki mRNA, dlatego wkład miRNA w kontrolę plastyczności neuronalnej wykracza poza kontrolę translacji pojedynczego docelowego mRNA. Wpływ usunięcia miRNA na plastyczność neuronalną pokazano u myszy Dicer cKO, które wykazywały znaczną poprawę funkcji kognitywnych w testach behawioralnych oceniających procesy uczenia się i pamięci, ostatecznie jednak prowadząc do degeneracji neuronów hipokampa (Konopka i in. 2010). Śmierć neuronów w wyniku ich wzmożonej aktywności i zmian plastycznych, świadczy o neuroprotektoryjnej roli miRNA, poprzez zapobieganie nadmiernej aktywności neuronów, która może wywołać negatywne skutki tj. ekscytotoksyczność. Cząsteczki miRNA modulują również działanie genów wczesnej odpowiedzi, zaangażowanych w neuroplastyczność, czego przykładem jest miR-7b, której interakcję wykazano z regionem 3'UTR mRNA genu *c-fos*, wyciszając jego translację (H.-J. Lee i in., 2006). Analiza cząsteczek miRNA zaangażowanych w regulację genu *c-fos* przy użyciu techniki TaqMan MicroRNA Array u myszy Dicer cKO w 9. tygodniu nie wykazała istotnych różnic w poziomie cząsteczek (Rycina 5.7) (Vinnikov i in., 2014). Należy jednak mieć na uwadze, że gen *Dicer1* nie jest usunięty we wszystkich komórkach i pozostała niezmodyfikowana część oraz otaczający glej i tanocyty lokalnie dalej syntetyzują aktywne cząsteczki miRNA (Fiorenza i in., 2016) lub nawet może dochodzić do wzrostu ich ekspresji w pozostałych komórkach, by zrekompensować skutki utraty miRNA u zmutowanych neuronów, co również może przywracać homeostazę energetyczną w badanej linii.



Rycina 5.7 Analiza poziomu ekspresji cząsteczek miRNA zaangażowanych w regulację genu *c-fos* u myszy Dicer cKO w 9. tygodniu mutacji z wykorzystaniem techniki TaqMan MicroRNA Array i bazy danych Target Scan nie wykazała istotnych różnic w ekspresji wybranych cząsteczek miRNA.

5.6 Wzorzec ekspresji genu *c-fos* jako markera neuroplastyczności

Analiza ekspresji genu *c-fos* stanowi jedno z najczęściej używanych narzędzi do mapowania aktywności neuronalnej w mózgu. Ekspresja genu *c-fos* w warunkach podstawowych jest ustanowiona na niewielkim poziomie, jednakże może być bardzo szybko uruchamiana w odpowiedzi na szeroką gamę bodźców zewnętrznych. Analiza ekspresji *c-fos* jest używana wyłącznie do pomiarów aktywacji komórkowej, nie jest możliwe wykorzystanie jej do określania procesów hamujących aktywność (Lara Aparicio i in., 2022). Badania z udziałem zwierząt laboratoryjnych, u których analizowana jest jego ekspresja wymagają szczególnego przygotowania. Ekspresja genu *c-fos* może być modulowana poprzez środki stosowane do anestezji takie jak, zakazany obecnie, pentobarbital sodowy czy ketamina, które hamują jego ekspresję, natomiast uretan czy metoksyfluran działają przeciwnie powodując

stymulację ekspresji *c-fos* (Marota i in., 1992). Czynniki wywołujące stres u zwierząt w toku doświadczenia na przykład chwytanie lub unieruchomienie (Melia i in., 1994), a także ekspozycja na nowe otoczenie (Handa i in., 1993) stanowią silny bodziec indukujący ekspresję genu *c-fos*. Efekt ten może być znacząco zredukowany poprzez trwającą przez okres około tygodnia, powtarzaną ekspozycję na dany bodziec (handling), powodującą habituację zwierzęcia do określonych warunków, w efekcie czego dochodzi do osłabienia odpowiedzi *c-Fos*–zależnej niezwiązanej z doświadczeniem. Doniesienia literaturowe wykazują, że ekspozycja na nowe bodźce (ang. *novelty*) stymulujące uczenie się, aktywują ekspresję genu *c-fos*, natomiast bodźce o charakterze chronicznym, powodują obniżenie/zahamowanie jego ekspresji. Ogólnie przyjmuje się tzw. kanoniczny wzorzec ekspresji genu *c-fos*, polegający na jego tymczasowej aktywacji po zadziałaniu bodźca, gdzie czas półtrwania transkryptu mRNA wynosi ok. 15-30 minut, natomiast białko utrzymuje się dłużej i można je wykryć nawet po kilku godzinach od zadziałania bodźca (~6h), po czym wraca do poziomu podstawowego (Hoffman i Murphy, 2000; Krukoff, 1998). Jednakże, opisano również eksperyment, w którym dochodzi do długotrwałej ekspresji *c-fos* po chronicznej stymulacji osmotycznej w jądrze nadwzrokowym (SON, ang. *supraoptic nucleus*) (Miyata i in., 2001). We wspomnianej pracy porównano ekspresję członków rodziny Fos po stymulacji zarówno bodźcem ostrym (3% NaCl, po iniekcji dootrzewnowej, i.p.), jak i chronicznym (2% NaCl, przez 2 i 5 dni doustnie zamiast wody). W pierwszym wariantcie zauważono istotnie zwiększoną liczbę komórek *c-Fos*–, *FosB*– i *FRA*–pozytywnych w SON po 2 godzinach od iniekcji 3% roztworem NaCl i powrót do poziomu podstawowego komórek *c-Fos*IR po 4 godzinach, natomiast po 8 godzinach nadal obserwowano podniesioną liczbę komórek *FosB*– i *FRA*–pozytywnych. W przypadku chronicznej stymulacji zauważono podwyższoną liczbę komórek *c-Fos*–reaktywnych przez cały okres trwania eksperymentu (2 i 5 dni), natomiast 2 godziny po zaprzestaniu picia 2% roztworu NaCl i zamianie na zwykłą wodę pitną, zauważono spadek komórek *c-Fos*–pozytywnych. Przez cały czas trwania chronicznej stymulacji obserwowano również podniesiony poziom komórek *FosB*– i *FRA*–pozytywnych w SON i spadek ich liczby po zamianie na zwykłą wodę po 2-8 godzinach po zakończeniu stymulacji. Warto nadmienić, iż w wymienionym doświadczeniu wykorzystano przeciwciało specyficzne dla białka *c-Fos*, wykrywające epitop zlokalizowany na N-końcu, które nie wykazuje reakcji krzyżowej z innymi białkami z rodziny Fos (Miyata i in., 2001). Wynik tego eksperymentu pokazuje, że ekspresja genu *c-fos* może różnić się w zależności od stymulowanej struktury i nie w każdym przypadku zachowuje się w sposób kanoniczny, a także chroniczna stymulacja niektórych regionów

mózgu w podwzgórzu (SON) może wywołać długofalową ekspresję genu *c-fos*, co pokrywa się z wynikiem opisanym w niniejszej rozprawie.

5.7 Rola genu *c-fos* w regulacji homeostazy energetycznej

W niniejszej rozprawie badano ekspresję genu *c-fos* w jądrze łukowatym (ARC) w odpowiedzi na głodówkę. Pokazano, że neurony ARC wykazują silny *c-Fos*–pozytywny sygnał, utrzymujący się nawet po 24h od usunięcia jedzenia. Głodówka stanowi bodziec o charakterze chronicznym i wymaga pozbawienia pokarmu na przynajmniej kilka godzin, żeby organizm mógł na niego odpowiednio zareagować. Głodówka stanowi silny, wieloczynnikowy bodziec, powodujący określone zmiany fizjologiczne, regulujące status energetyczny poprzez aktywację neuronów zaangażowanych w kontrolę łaknienia. Aktywacja neuronalna zachodzi w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne (stymulacja sensoryczna wzrokowa i węchowa w odpowiedzi na brak pokarmu) i wewnętrzne, polegające m.in. na zmianie krążących sygnałów obwodowych regulujących status energetyczny (spadek glukozy w krwiobiegu, spadek stężenia insuliny i leptyny, wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, wydzielanie greliny). Wymienione czynniki powodują aktywację określonych populacji neuronalnych w podwzgórzu działając poprzez odpowiednie receptory zlokalizowane na neuronach AgRP/NPY i POMC, które z kolei indukują kaskadę reakcji w odpowiedzi na negatywny status energetyczny, włączając ekspresję odpowiednich genów. Aktywność neuronalna indukuje ekspresję genów modulujących funkcję i plastyczność układu nerwowego (Su i in., 2017). Głodówka wywołuje masywne zmiany w ekspresji genów w neuronach AgRP/NPY i POMC. Analiza Drop-seq wykazała zmiany w setkach genów w neuronach AgRP (w jednym podtypie zmianie ulegało 647 genów) i 42 genach w jednym lub dwóch podtypach neuronów POMC (Campbell i in., 2017). Głodówka zwiększa sekrecję NPY w PVN (Kalra i in., 1991), powodując szereg reakcji prowadzących do wzrostu poboru pokarmu i wody (Stanley i Leibowitz, 1984), utylizacji węglowodanów, obniżenia wydatku energetycznego i ekspresji UCP1 w BAT, co przyczynia się do wzrostu masy ciała. Głodówka indukuje również zmiany plastyczne w systemie melanokortynowym (Diano i in., 2006). Promuje powstanie nowych synaps pobudzających i wzrost transmisji synaptycznej na neuronach oreksynowych w LH. Zmiany te ulegają cofnięciu po podaniu pokarmu lub leptyny (Horvath & Gao, 2005). Stymulowane głodówką wydzielanie greliny silnie indukuje zmiany plastyczne w podwzgórzu i w hipokampie, wpływając na synaptogenezę, powstanie i propagację LTP, wzmacniając procesy uczenia się, konsolidację pamięci oraz regulując zależny od hipokampa behavior (Abizaid i in., 2006; Diano i in., 2006). Z ewolucyjnego punktu widzenia, wzrost funkcji

poznawczych po stymulacji greliną/głodówką może przyczynić się do sprawniejszego sposobu na znalezienie pokarmu i przetrwanie. W badaniach *in vitro* pokazano, że grelina aktywuje AMPK za pośrednictwem kinazy białkowej CaMK, co wpływa na utrzymującą się godzinami plastyczność synaptyczną (Y. Yang i in., 2011). Zarówno tworzenie engramu pamięciowego, jak i utrzymująca się plastyczność synaptyczna, wymagają aktywacji IEG i syntezy białek. Głodówka powoduje wzrost poziomu białka c-Fos w neuronach AgRP/NPY poprzez mechanizm zależny od receptorów NMDA (T. Liu i in., 2012). Wydaje się zatem zasadne stwierdzenie, że c-Fos podczas głodówki aktywuje programy ekspresji genów, mające na celu syntezę białek zaangażowanych w plastyczność synaptyczną. Białko UCP2 w mózgu również wzmacnia neurotransmisję i przebudowę synaptyczną (Andrews i in., 2005; Horvath, Warden, i in., 1999), a neurony c-Fos–pozytywne po manipulacjach takich jak głodówka lub ekspozycja na zimno, otrzymują połączenia z zakończeń aksonów zawierających UCP2 (Horvath, Warden, i in., 1999). Funkcja genu *c-fos* w kontroli metabolicznej nie została dokładnie określona, natomiast istnieją przesłanki świadczące o jego istotnej roli w tym aspekcie. Spadek temperatury otoczenia indukuje ekspresję genu *c-fos* w neuronach AgRP/NPY (Deem i in., 2020). Te same neurony są unerwiane przez neurony z ekspresją UCP2, białka odpowiedzialnego za lokalną produkcję ciepła (Horvath, Warden, i in., 1999), co świadczy o wpływie na procesy termoregulacyjne i zdolność adaptacyjną do zmian w temperaturze otoczenia. Zmiany w ekspresji podwzgórzowych cząsteczek miRNA po chronicznej stymulacji hiperosmotycznej regulują ekspresję genu *c-fos* (H.-J. Lee i in., 2006). Jego ekspresja spada w części przyśrodkowej i grzbietowej części podwzgórza w odpowiedzi na hipoglikemię, co może być wykorzystane jako indykator niewydolności autonomicznej związanej z hipoglikemią (HAAF, ang. *hypoglycemia-associated autonomic failure*). Zmiany w ekspresji genu *c-fos* wynikające z neuropatii cukrzycowej, niedotlenienia czy niedokrwienia, ukazują jego neuroprotektoryjną funkcję (Mussa i in., 2019).

W niniejszej pracy pokazano, że ekspresja *c-fos* w ARC jest ściśle zależna od statusu energetycznego organizmu i utrzymuje się w trakcie trwania 24-godzinnej głodówki, natomiast spada po ponownym dostarczeniu pokarmu (analizowanym po godzinie), co jest spójne z informacjami podanymi w literaturze (Q. Wu i in., 2014). Utrzymujący się sygnał c-Fos–pozytywny podczas negatywnego statusu energetycznego, jest zlokalizowany w przyśrodkowej części ARC, gdzie usytuowane są neurony AgRP/NPY, co wyraźnie widać podczas głodówki u transgenicznym myszy NPY-GFP, gdzie oba sygnały w większości się nakładają. Godzinne dokarmianie zwierząt po 12-godzinnej głodówce u myszy NPY-GFP ukazuje wzorec ekspresji genu *c-fos* w warunkach fizjologicznej głodówki, z całym spektrum obwodowych sygnałów

wywierających wpływ na neurony ARC. Liczba komórek c-Fos-pozytywnych w ARC ulega obniżeniu, ale zmienia się również miejsce występowania komórek c-FosIR. Po dokarmianiu neurony AgRP/NPY wygaszają odpowiedź c-Fos-zależną, natomiast sygnał pojawia się w części lateralnej ARC, gdzie zlokalizowane są neurony POMC, aktywowane po detekcji sygnałów sytości. Aby ocenić kinetykę ekspresji *c-fos* w ARC po aktywacji neuronów AgRP/NPY, ale bez wpływu obwodowych sygnałów głodu na aktywność neuronalną, wykorzystano stymulację optogenetyczną u najedzonych myszy transgenicznych AgRP-ChR2-EGFP, gdzie wprowadzono światłoczułe białko ChR2, aktywujące neurony AgRP. Włączenie lasera skutkowało natychmiastowym poborem pokarmu, porównywalnym do spożycia pokarmu po głodówce. Wyniki barwienia IHC z tego doświadczenia pokazują, że ekspresja genu *c-fos* jest masywnie uruchamiana po samej stymulacji neuronów AgRP, jednak bez obwodowych sygnałów głodu, jego wzmożona ekspresja ulega stopniowemu wyciszeniu i wygasa po upływie ~6h, a więc zachowuje się w sposób klasyczny dla IEG. Wynik tego doświadczenia świadczy o wpływie obwodowych sygnałów głodu na utrzymującą się aktywność neuronalną neuronów oreksygeniczných. Brak wyciszenia odpowiedzi c-Fos-zależnej może powodować długofalowe zmiany w ekspresji genów, co prowadzi do rearanżacji sieci neuronalnych zaangażowanych w łaknienie i homeostazę energetyczną oraz wywiera wpływ na behavior, promując zachowania dążące do zlokalizowania pokarmu i uzupełnienia zasobów energetycznych. Aktywacja genu *c-fos* w podwzgórzu może zatem modulować ekspresję genów docelowych, które odpowiadają za zmianę zachowania poprzez obniżenie stresu związanego z podejmowaniem działań ryzykownych, takich jak eksploracja nowych terytoriów w celu poszukiwania pokarmu, zwiększają motywację (zachowania leptyno-zależne) i faworyzują aktywację układu nagrody (zdobycie pokarmu). Podwzgórze jest również bezpośrednio połączone z hipokampem przez podporę (ang. *subiculum*) i prawdopodobnie to połączenie odpowiada za kodowanie kontekstu/środowiska zagrażającego życiu, jakim jest brak pokarmu. Doszukać się można informacji o zaangażowaniu genu *c-fos* w regulacji łaknienia i motoryki żołądka (Olson, 1993), a także indukcji jego ekspresji w PVN również w wyniku odwodnienia (Sagar i in., 1987). Pokazano zmiany w ilości zarówno mRNA, jak i białka c-Fos oraz białka związanego z masą tłuszczową i otyłością (FTO, ang. *fat mass and obesity-associated protein*) w embrionalnych neuronach podwzgórza w odpowiedzi na obniżenie stężenia glukozy w hodowli. W zadanych warunkach ekspresja genu *c-fos* ulega podwyższeniu, natomiast FTO drastycznemu obniżeniu (Mussa i in., 2019). Można zatem wnioskować, że c-Fos pełni istotną rolę w procesach adaptacyjnych w odpowiedzi na niesprzyjające warunki środowiskowe zagrażające życiu.

5.7.1 Ocena wpływu genu *c-fos* w kontroli homeostazy energetycznej u myszy Dicer cKO

Cechą charakterystyczną myszy Dicer cKO, oprócz rozwoju fenotypu otyłości i obserwowanych zmian metabolicznych badanych w przedstawianej pracy, jest wzrost funkcji poznawczych ocenianych na podstawie szeregu testów behawioralnych przeprowadzonych w 12 tygodniu od podania tamoksyfenu, co świadczy o wpływie miRNA na procesy uczenia się i pamięci (Konopka i in., 2010). Po indukcji mutacji u myszy Dicer cKO zauważono zmiany w kształcie kolców dendrytycznych i wzrost liczby kolców filopodialnych, świadczących o przebudowie synaptycznej oraz zmianie ekspresji genów zaangażowanych w plastyczność synaptyczną, takich jak proBDNF i BDNF, MMP9 oraz podjednostek receptorów AMPA (GluR1 i GluR2) (Konopka i in., 2010). Program ekspresji genów jest kontrolowany przez IEG. Wzmoczona aktywacja ekspresji genu *c-fos* podczas głodówki jest przypisana neuronom AgRP/NPY. Fenotyp hiperfagicznej otyłości skłania do stwierdzenia, że w badanym modelu dochodzi do hiperaaktywacji neuronów oreksygenicznych lub/i spadku transmisji w neuronach aktywujących uczucie sytości. W pierwszym przypadku, hiperaktywność neuronów AgRP/NPY może prowadzić do wzrostu ekspresji genu *c-fos*, tak jak to ma miejsce podczas głodówki w neuronach AgRP/NPY, co pokazano poprzez sztuczne włączenie ich aktywacji z użyciem narzędzi optogenetycznych. Analiza ekspresji genu *c-fos* w ARC u myszy Dicer cKO w warunkach podstawowych, w obu fazach cyklu okołodobowego, z dostępem *ad libitum* do pokarmu, tj. w sytuacji, w której w warunkach fizjologicznych nie dochodzi do uruchomienia ekspresji *c-fos*, ujawniła zmiany w liczbie komórek c-Fos-pozytywnych. Podwyższony poziom białka zaobserwowano w fazie nieaktywnej cyklu okołodobowego w tygodniach mutacji, gdzie dochodzi do przyrostu masy ciała, co jest spójne z wynikami z części metabolicznej, w której pokazano, że myszy w tym czasie konsumują więcej pokarmu. Co ciekawe, zwiększona liczba komórek c-Fos-pozytywnych jest rozszana po ARC, co sugeruje zmiany w ekspresji genów zachodzących w obu populacjach neuronalnych, jednak z przewagą komórek w bocznej części ARC, czyli w miejscu ulokowania neuronów POMC, co świadczy o ich aktywacji, lecz prawdopodobnie zaniku responsywności w odpowiedzi na liczne krążące sygnały sytości, które powinny wyhamowywać jedzenie. W konwencjonalnym modelu mysim, gdzie usunięto gen *Dicer1* w neuronach POMC dochodzi do rozwoju otyłości i zaburzeń metabolicznych, które prowadzą do degeneracji neuronów POMC (Schneeberger i in., 2012). U myszy Dicer cKO nie zaobserwowano zmian neurodegeneracyjnych w neuronach ARC po indukcji mutacji, natomiast można je zaobserwować po 14 tygodniu w neuronach hipokampa (Konopka i in., 2010). Neurodegeneracja po usunięciu miRNA w obu modelach ukazuje neuroprotekcyjną

funkcję miRNA. Indukcja ekspresji genu *c-fos*, może być zainicjowana w sytuacjach, gdzie dochodzi do aktywacji procesów wymagających syntezy białek, a więc również procesów naprawczych. Dane literaturowe wskazują na zaangażowanie białek Jun i Fos w inicjowaniu programu regeneracji w neuronach (Leah i in., 1991). Przypuszczalnie mutacja może zachodzić w niektórych podtypach neuronów POMC, które jak opisano wcześniej, wykazują ogromną różnorodność fenotypową. Można sobie wyobrazić, że subpopulacja, która ulega mutacji to „typowe” neurony glutamatergiczne i w jej następstwie dochodzi do osłabienia ich funkcji, co prowadzi m. in. do spadku ekspresji *Pomc* (Vinnikov i in., 2014), zaburzenia odczuwania sytości i hiperfagii. W takim przypadku neurony wykazujące mieszany fenotyp, mogą odgrywać bardzo istotną rolę w przywracaniu funkcji neuronów POMC, a wzmożona ekspresja *c-fos* może wskazywać na intensywne procesy przebudowy w tej nielicznej subpopulacji, by wzmocnić ich transmisję i „przejąć” funkcje zaburzonych neuronów. W takim scenariuszu, aktywacja tych neuronów poprzez detekcję peryferyjnych sygnałów sytości, które są dostępne w nadmiarze, powoduje ich wzmocnione przekazywanie, które jest w stanie aktywować receptory MC3R/MC4R w systemie melanokortynowym i zahamować łaknienie (efekt obserwowany w 7. tygodniu mutacji). Teorię tę może poprzeć wynik zwiększonej ekspresji *Lepr* badanej w 4. tygodniu mutacji i jej zanik w 8. tygodniu (Mang i in., 2015).

5.8 Wykorzystanie techniki CRISPR/Cas9 do wyciszenia genu *c-fos*

Weryfikacja roli poszczególnych genów w badanych procesach najczęściej polega na nadekspresji danego genu lub jego wyłączeniu. Wzmoczoną ekspresję genu *c-fos* u myszy Dicer cKO zaobserwowano w tygodniach, gdzie dochodzi do rozwoju fenotypu otyłości w fazie nieaktywnej cyklu okołodobowego, co sugeruje, że odgrywa on nieokreśloną dotąd rolę w tym zjawisku. Aby tę rolę określić wykorzystano technikę CRISPR/Cas9 oraz wektory wirusowe jako nośniki sekwencji guideRNA w celu wyciszenia badanego genu, a białko Cas9 zostało wprowadzone do genomu zwierząt poprzez skrzyżowanie myszy Dicer^{CamKIIαCreERT2} z linią Cas9-EGFP. Do oceny wpływu genu *c-fos* w rozwoju fenotypu wykorzystano dwa warianty eksperymentalne. W pierwszym poprzez iniekcję wektorów wirusowych niosących Cre-rekombinazę kierowaną przez promotor AgRP, w drugim mutacji dokonano w klasyczny sposób, a więc poprzez podanie tamoksyfenu. W systemie drugim indukcja mutacji powoduje wycięcie genu *Dicer1* oraz ekspresję Cas9-EGFP kierowane przez promotor CamKIIα w różnych strukturach mózgu w tym w ARC, natomiast pierwszy system jest ograniczony do neuronów w ARC. W obu przypadkach dochodzi do rozwoju fenotypu otyłości, jednak na uwagę zwracają pewne różnice. W wariantcie 1. zauważono szybszy przyrost masy ciała

i krótszy epizod hiperfagii, lecz spadkowi spożycia pokarmu nie towarzyszy redukcja masy ciała. Efektem podania wektorów wirusowych wyciszających gen *c-fos* w 1. wariacie jest tendencja w kierunku obniżenia poboru pokarmu w okresie hiperfagicznym w porównaniu do kontroli, bez typowego spadku konsumpcji pokarmu po osiągnięciu maksymalnej wagi ciała, co z jednej strony może wynikać z podania wektorów wyciszających lub z podania mniejszej ilości wirusa niosącego rekombinazę Cre. Jednakże, po głodówce w grupach myszy DicerCas9 wykazano porównywalnie niską liczbę komórek c-Fos-pozytywnych, co świadczy o podobnym efekcie mutacji i wpływie na reaktywność neuronów AgRP po głodówce. Można zatem wnioskować, że użycie wektorów wirusowych gRNA1/2 może wpływać na obniżenie ekspresji genu *c-fos* w neuronach oreksygenicznym u myszy Dicer *in vivo* w okresie hiperfagicznym, co przyczynia się do obniżenia konsumpcji pokarmu. W wariacie 2. mutacja przebiega w sposób charakterystyczny dla badanej linii, a wykorzystanie wektorów wyciszających gen *c-fos* nie wywiera wpływu na fenotyp otyłości, co badano poprzez wpływ podania rAAV na masę ciała i pobór pokarmu. Uzyskane wyniki skłaniają do stwierdzenia, że gen *c-fos per se* nie wpływa na rozwój fenotypu otyłości w badanym modelu. Istotną informacją uzyskaną w przebiegu całego eksperymentu jest zaskakująca obserwacja, ukazująca zahamowanie odpowiedzi c-Fos-zależnej po głodówce u myszy DicerCas9 po 10. tygodniu mutacji. Nasuwa się więc wniosek, że usunięcie genu *Dicer1* w neuronach oreksygenicznym jest wystarczające do zaburzenia prawidłowej odpowiedzi neuronalnej na stan negatywnego bilansu energetycznego, który w warunkach fizjologicznych powoduje wzrost ekspresji genu *c-fos*. Ekspresja genu *c-fos* odzwierciedla procesy plastyczne w odpowiedzi na negatywny status energetyczny, co w badanej linii może ulegać zaburzeniu. Możliwe, iż cała maszyna aktywująca program ekspresji genów, w tym genu *c-fos*, zostaje zaburzona z powodu braku odpowiednich cząsteczek mikroRNA modulujących funkcjonowanie synapsy poprzez wpływ na prawidłowe działanie odpowiednich receptorów, kinaz lub fosfataz odpowiedzialnych za „przetwarzanie danych”. Wyciszenie genu *c-fos* upośledza indukowane aktywnością neuronalną otwarcie chromatyny w miejscach wiązania c-Fos, co powoduje utratę reaktywności neuronów (Su i in., 2017). Należy rozważyć również scenariusz, iż do wyciszenia genu *c-fos* nie dochodzi bezpośrednio w wyniku mutacji, ale jest następstwem zmian w ważnych elementach inicjujących pobudzenie komórkowe, np. zaburzeń w receptorach dla pobudzającego neuroprzekaźnika glutaminianu. Receptory AMPA, złożone z podjednostek przepuszczalnych dla jonów Ca^{2+} , odgrywają istotną rolę w neuroplastyczności. Przedłużone pobudzenie tych receptorów aktywuje ścieżkę z udziałem JNK, powodując uszkodzenie komórek w wyniku toksyczności pobudzeniowej (ang. *excitotoxicity*) (H.-N. Liu i in., 2002).

U myszy Dicer cKO dochodzi do wzmożonej ekspresji podjednostek GluR1 i GluR2 receptorów AMPA, a także zmianie ulegają procesy wprowadzania receptorów AMPA na błonę komórkową oraz ich internalizacji (Konopka i in., 2010; Mang i in., 2015), co może stanowić nadrzędną modyfikację wynikającą z mutacji, która zaburza responsywność neuronów w odpowiedzi na docierające bodźce, co może manifestować się m.in. w spadku ekspresji genu *c-fos*. Możliwy jest również inny scenariusz, w którym u myszy Dicer cKO, ze względu na mniejszą aktywność promotora CaMKII α w podwzgórzu w porównaniu do hipokampa, nie dochodzi do śmierci neuronów, lecz uruchamiane zostają procesy związane ze starzeniem komórkowym (ang. *senescence*), które polegają na stopniowej utracie funkcjonalności przez komórki z zachowaną przeżywalnością (McHugh i Gil, 2018). Obniżenie transkrypcji genu *c-fos* może przyczynić się do ucieczki przed c-Fos–zależną apoptozą (Tulchinsky, 2000). Usunięcie miRNA i rozwój fenotypu otyłości może zaburzać funkcjonowanie mitochondriów, zwiększać procesy zapalne, prowadzi do zaburzeń w sygnalizacji substancji odżywczych, które są czynnikami indukującymi wejście w procesy starzenia komórkowego (McHugh i Gil, 2018).

VI PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Usunięcie dojrzałych cząsteczek miRNA wpływa na rozregulowanie homeostazy energetycznej i rozwój hiperfagicznej otyłości u myszy Dicer cKO. Zwierzęta konsumują pokarm w obu fazach cyklu okołodobowego i wykazują przejściowy, zależny od płci rozwój zaburzeń metabolicznych (m.in. nietolerancję glukozy w fazie maksymalnego tycia oraz obniżony wydatek energetyczny).
2. Zaburzenia sygnalizacji leptynowej mogą częściowo przyczyniać się do rozwoju fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO.
3. Głodówka indukuje ekspresję genu *c-fos*, która nie wygasa nawet po 24-godzinnym poście, za co prawdopodobnie odpowiadają stale napływające sygnały głodu z tkanek peryferyjnych. Wzmoczona ekspresja genu *c-fos* może być związana ze wzmocnieniem przekazywania w neuronach oreksygenicznych i indukcji zmian plastycznych w neuronach AgRP/NPY.
4. Aktywacja neuronów AgRP przy użyciu stymulacji optogenetycznej u najedzonych myszy jest wystarczająca do indukcji poboru pokarmu i ekspresji genu *c-fos*, która ulega wyciszeniu w sposób klasyczny dla IEG.
5. U myszy Dicer cKO dochodzi do wzrostu ekspresji genu *c-fos* w ARC w okresie hiperfagicznym, w fazie nieaktywnej cyklu okołodobowego.
6. Wyciszenie ekspresji genu *c-fos* w ARC z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* nie wpływa na rozwój fenotypu otyłości u myszy Dicer cKO, ale u myszy z mutacją w neuronach oreksygenicznych zaobserwowano tendencję w kierunku obniżenia poboru pokarmu.
7. Usunięcie genu *Dicer1* prowadzi do utraty reaktywności neuronów oreksygenicznych w odpowiedzi na negatywny status energetyczny, co manifestuje się poprzez wyciszenie ekspresji genu *c-fos* w jądrze łukowatym.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Sleeman, M. W., Picciotto, M. R., Tschöp, M. H., Gao, X.-B., & Horvath, T. L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3229–3239. <https://doi.org/10.1172/JCI29867>
2. Abreu-Vieira, G., Xiao, C., Gavrilova, O., & Reitman, M. L. (2015). Integration of body temperature into the analysis of energy expenditure in the mouse. *Molecular Metabolism*, 4(6), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.001>
3. Ahima, R. S., & Flier, J. S. (2000). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(8), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00301-5)
4. Akasaka, Y., Tsunoda, M., Ide, T., & Murakami, K. (2009). Chronic leptin treatment stimulates lipid oxidation in immortalized and primary mouse skeletal muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.003>
5. Algire, C., Medrikova, D., & Herzog, S. (2013). White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(5), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.10.001>
6. Allison, M. B., & Martin G Myers, J. (2014). Connecting leptin signaling to biological function. *The Journal of Endocrinology*, 223(1), T25. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0404>
7. An, J. J., Liao, G.-Y., Kinney, C. E., Sahibzada, N., & Xu, B. (2015). Discrete BDNF Neurons in the Paraventricular Hypothalamus Control Feeding and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 22(1), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.008>
8. Andrews, Z. B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 829–840. <https://doi.org/10.1038/nrn1767>
9. Andrews, Z. B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschöp, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I., Coppola, A., Gao, X.-B., Horvath, T. L., & Diano, S. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454(7206), 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature07181>
10. Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
11. Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183–190. <https://doi.org/10.2337/diaspect.17.3.183>
12. Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), Article 7410. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
13. Bading, H., Segal, M. M., Sucher, N. J., Dudek, H., Lipton, S. A., & Greenberg, M. E. (1995). N-methyl-D-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 64(3), 653–664. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00462-E](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00462-E)
14. Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 123(3), 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.035>
15. Banno, R., Zimmer, D., Jonghe, B. C. D., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., & Bence, K. K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 720. <https://doi.org/10.1172/JCI39620>

16. Barka, T., & Gubits, R. M. (1986). β -Adrenergic Stimulation of c-fos Gene Expression in the Mouse Submandibular Gland. *MOL. CELL. BIOL.*, 6.
17. Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
18. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
19. Batterham, R. L., Cohen, M. A., Ellis, S. M., Le Roux, C. W., Withers, D. J., Frost, G. S., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2003). Inhibition of Food Intake in Obese Subjects by Peptide YY3–36. *New England Journal of Medicine*, 349(10), 941–948. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030204>
20. Bear, M. F., & Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), 389–399. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90101-5)
21. Bentsen, M. A., Rausch, D. M., Mirzadeh, Z., Muta, K., Scarlett, J. M., Brown, J. M., Herranz-Pérez, V., Baquero, A. F., Thompson, J., Alonge, K. M., Faber, C. L., Kaiyala, K. J., Bennett, C., Pyke, C., Ratner, C., Egerod, K. L., Holst, B., Meek, T. H., Kutlu, B., ... Pers, T. H. (2020). Transcriptomic analysis links diverse hypothalamic cell types to fibroblast growth factor 1-induced sustained diabetes remission. *Nature Communications*, 11, 4458. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17720-5>
22. Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., & Gatto, G. J. (2018). *Biochemia* (5. wyd.). Wydawnictwo Naukowe PWN SA.
23. Bernardinelli, Y., Nikonenko, I., & Muller, D. (2014). Structural plasticity: Mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2014.00123>
24. Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., & Destrade, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3803–3812. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00258.x>
25. Berti, L., Kellerer, M., Capp, E., & Häring, H. U. (1997). Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: Evidence for a PI3-kinase mediated effect. *Diabetologia*, 40(5), 606–609. <https://doi.org/10.1007/s001250050722>
26. Betley, J. N., & Sternson, S. M. (2011). Adeno-Associated Viral Vectors for Mapping, Monitoring, and Manipulating Neural Circuits. *Human Gene Therapy*, 22(6), 669–677. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.204>
27. Betley, J. N., Xu, S., Cao, Z. F. H., Gong, R., Magnus, C. J., Yu, Y., & Sternson, S. M. (2015). Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature*, 521(7551), 180–185. <https://doi.org/10.1038/nature14416>
28. Bonet, M. L., Picó, C., & Palou, A. (2005). Thermogenesis and the Metabolic Syndrome. W *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century* (s. 283–303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8174-892-5.50017-6>
29. Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, 22(3), 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
30. Brown, J. R., Nigh, E., Lee, R. J., Ye, H., Thompson, M. A., Saudou, F., Pestell, R. G., & Greenberg, M. E. (1998). Fos Family Members Induce Cell Cycle Entry by Activating Cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), 5609–5619.
31. Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., & Kahn, C. R. (2000). Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science*, 289(5487), 2122–2125. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122>
32. Burke, L. K., Doslikova, B., D'Agostino, G., Greenwald-Yarnell, M., Georgescu, T., Chianese, R., Martinez de Morentin, P. B., Ogunkowo-Bada, E., Cansell, C., Valencia-Torres, L., Garfield, A. S., Apergis-Schoute,

- J., Lam, D. D., Speakman, J. R., Rubinstein, M., Low, M. J., Rochford, J. J., Myers, M. G., Evans, M. L., & Heisler, L. K. (2016). Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. *Molecular Metabolism*, 5(3), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.005>
33. Burnett, L. C., Skowronski, A. A., Rausch, R., LeDuc, C. A., & Leibel, R. L. (2017). Determination of the half life of circulating leptin in the mouse. *International journal of obesity* (2005), 41(3), 355–359. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.238>
 34. Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H., Pers, T. H., Lyubetskaya, A., Tenen, D., Goldman, M., Verstegen, A. M. J., Resch, J. M., McCarroll, S. A., Rosen, E. D., Lowell, B. B., & Tsai, L. T. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature Neuroscience*, 20(3), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nn.4495>
 35. Chamberlin, N. L., Du, B., de Lacalle, S., & Saper, C. B. (1998). Recombinant adeno-associated virus vector: Use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain research*, 793(1–2), 169–175.
 36. Chaput, J.-P., & Tremblay, A. (b.d.). The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *International Journal of Obesity*.
 37. Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., & Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 60(3), Article 3. <https://doi.org/10.55782/ane-2000-1359>
 38. Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., More, K. J., Breitbart, R. E., Duyk, G. M., Tepper, R. I., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81294-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81294-5)
 39. Chen, P.-C., Kryukova, Y. N., & Shyng, S.-L. (2013). Leptin Regulates KATP Channel Trafficking in Pancreatic β -Cells by a Signaling Mechanism Involving AMP-activated Protein Kinase (AMPK) and cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) ♦. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 34098–34109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516880>
 40. Chen, W., Liu, Y., Liu, W., Zhou, Y., He, H., & Lin, S. (2020). Neuropeptide Y Is an Immunomodulatory Factor: Direct and Indirect. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.580378>
 41. Chen, Y., Essner, R. A., Kosar, S., Miller, O. H., Lin, Y.-C., Mesgarzadeh, S., & Knight, Z. A. (2019). Sustained NPY signaling enables AgRP neurons to drive feeding. *eLife*, 8, e46348. <https://doi.org/10.7554/eLife.46348>
 42. Chikahisa, S., Fujiki, N., Kitaoka, K., Shimizu, N., & Séi, H. (2009). Central AMPK contributes to sleep homeostasis in mice. *Neuropharmacology*, 57(4), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.015>
 43. Chung, L. (2015). A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. *Development & Reproduction*, 19(2), 61–67. <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.2.061>
 44. Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
 45. Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G. D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Violette, B., Vaulont, S., Ashford, M. L. J., Carling, D., & Withers, D. J. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2325–2336. <https://doi.org/10.1172/JCI31516>
 46. Cohen, M. A., Ellis, S. M., Le Roux, C. W., Batterham, R. L., Park, A., Patterson, M., Frost, G. S., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2003). Oxyntomodulin Suppresses Appetite and Reduces Food Intake in Humans.

47. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
48. Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C. E., Pullen, A. E., Kenny, C. D., McGovern, R. A., Tang, V., Liu, S. M., Ludwig, T., Chua, S. C., Lowell, B. B., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.004>
49. Coupé, B., Ishii, Y., Dietrich, M. O., Komatsu, M., Horvath, T. L., & Bouret, S. G. (2012). Loss of Autophagy in Pro-opiomelanocortin Neurons Perturbs Axon Growth and Causes Metabolic Dysregulation. *Cell Metabolism*, 15(2), 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.016>
50. Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
51. Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., ... Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1)
52. Crépin, D., Benomar, Y., Riffault, L., Amine, H., Gertler, A., & Taouis, M. (2014). The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 384(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.016>
53. Cruz-Mendoza, F., Jauregui-Huerta, F., Aguilar-Delgadillo, A., García-Estrada, J., & Luquin, S. (2022). Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sciences*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060687>
54. Curran, T., & Morgan, J. I. (1995). Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of Neurobiology*, 26(3), 403–412. <https://doi.org/10.1002/neu.480260312>
55. Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N. M., & Verma, I. M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: Identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *Journal of Virology*, 44(2), 674–682.
56. Czarnek, M., & Bereta, J. (2016). The CRISPR-Cas system – from bacterial immunity to genome engineering. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, 901–916. <https://doi.org/10.5604/17322693.1216379>
57. Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L. C., & Kahn, B. B. (2012). p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metabolism*, 16(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.010>
58. Dalhäuser, A. K. (2022). Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases. *Gene* 821 (2022) 146284
59. Dandare, A., Khan, M. J., Naeem, A., & Liaquat, A. (2023). Clinical relevance of circulating non-coding RNAs in metabolic diseases: Emphasis on obesity, diabetes, cardiovascular diseases and metabolic syndrome. *Genes & Diseases*, 10(6), 2393–2413. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.022>
60. Dávalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramírez, C. M., Warriar, N. P., Andreo, U., Cirera-Salinas, D., Rayner, K., Suresh, U., Pastor-Pareja, J. C., Esplugues, E., Fisher, E. A., Penalva, L. O. F., Moore, K. J., Suárez, Y., Lai, E. C., & Fernández-Hernando, C. (2011). miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9232. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102281108>

61. Davidson, B. L., Stein, C. S., Heth, J. A., Martins, I., Kotin, R. M., Derksen, T. A., Zabner, J., Ghodsi, A., & Chiorini, J. A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3428–3432. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3428>
62. de Hoz, L., Gieriej, D., Lioudyno, V., Jaworski, J., Blazejczyk, M., Cruces-Solis, H., Beroun, A., Lebitko, T., Nikolaev, T., Knapska, E., Nelken, I., & Kaczmarek, L. (2018). Blocking c-Fos Expression Reveals the Role of Auditory Cortex Plasticity in Sound Frequency Discrimination Learning. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 28(5), 1645–1655. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx060>
63. de Luca, C., Kowalski, T. J., Zhang, Y., Elmquist, J. K., Lee, C., Kilimann, M. W., Ludwig, T., Liu, S.-M., & Chua, S. C. (2005). Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3484–3493. <https://doi.org/10.1172/JCI24059>
64. Deem, J. D., Faber, C. L., & Morton, G. J. (2022). AgRP neurons: Regulators of feeding, energy expenditure, and behavior. *The FEBS Journal*, 289(8), 2362–2381. <https://doi.org/10.1111/febs.16176>
65. Deem, J. D., Faber, C. L., Pedersen, C., Phan, B. A., Larsen, S. A., Ogimoto, K., Nelson, J. T., Damian, V., Tran, M. A., Palmiter, R. D., Kaiyala, K. J., Scarlett, J. M., Bruchas, M. R., Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2020). Cold-induced hyperphagia requires AgRP neuron activation in mice. *eLife*, 9, e58764. <https://doi.org/10.7554/eLife.58764>
66. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
67. Derghal, A., Djelloul, M., Trouslard, J., & Mounien, L. (2017). The Role of MicroRNA in the Modulation of the Melanocortinergic System. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00181>
68. Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., Da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F. S., Nonaka, N., Jaeger, L. B., Banks, W. A., Morley, J. E., Pinto, S., Sherwin, R. S., Xu, L., Yamada, K. A., Sleeman, M. W., Tschöp, M. H., & Horvath, T. L. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience*, 9(3), 381–388. <https://doi.org/10.1038/nn1656>
69. Díaz, N. F., Cruz-Reséndiz, M. S., Flores-Herrera, H., García-López, G., & Molina-Hernández, A. (2014). MicroRNAs in central nervous system development. *Reviews in the Neurosciences*, 0(0). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0014>
70. Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: Insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.005>
71. Distel, R. J., & Spiegelman, B. M. (1990). Protooncogene c-fos as a transcription factor. *Advances in Cancer Research*, 55, 37–55. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60467-4](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60467-4)
72. Dodd, G. T., Worth, A. A., Nunn, N., Korpai, A. K., Bechtold, D. A., Allison, M. B., Martin G Myers, J., Statnick, M. A., & Luckman, S. M. (2014). The Thermogenic Effect of Leptin Is Dependent on a Distinct Population of Prolactin-Releasing Peptide Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus. *Cell Metabolism*, 20(4), 639. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.022>
73. Dorval, V., Smith, P. Y., Delay, C., Calvo, E., Planel, E., Zommer, N., Buée, L., & Hébert, S. S. (2012). Gene Network and Pathway Analysis of Mice with Conditional Ablation of Dicer in Post-Mitotic Neurons. *PLoS ONE*, 7(8), e44060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044060>
74. Doubi-Kadmiri, S., Benoit, C., Benigni, X., Beaumont, G., Vacher, C.-M., Taouis, M., Baroin-Tourancheau, A., & Amar, L. (2016). Substantial and robust changes in microRNA transcriptome support postnatal development of the hypothalamus in rat. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep24896>
75. Dragunow, M., & Robertson, H. A. (1987). Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*, 329(6138), 441–442. <https://doi.org/10.1038/329441a0>

76. Duncan, G. E., Knapp, D. J., & Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research*, 713(1–2), 79–91. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01486-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01486-1)
77. Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell*, 149(3), 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>
78. Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468), 1415–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66378-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66378-7)
79. Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C.-F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A., & Sheng, M. (2010). Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.005>
80. Egawa, M., Yoshimatsu, H., & Bray, G. A. (1990). Effect of corticotropin releasing hormone and neuropeptide Y on electrophysiological activity of sympathetic nerves to interscapular brown adipose tissue. *Neuroscience*, 34(3), 771–775. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90181-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90181-3)
81. Engström Ruud, L., Pereira, M., Solis, A., Fenselau, H., & Brüning, J. (2020). NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP neurons. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14291-3>
82. Erdmann, G., Schütz, G., & Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neuroscience*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-63>
83. Fazolini, N. P., Cruz, A. L., Werneck, M. B., Viola, J. P., Maya-Monteiro, C. M., & Bozza, P. T. (2015). Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle*, 14(16), 2667–2676. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1041684>
84. Feil, S., Valtcheva, N., & Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 530, 343–363. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_18
85. Fernández-Hernando, C., Ramírez, C. M., Goedeke, L., & Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in Metabolic Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2), 178. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300144>
86. Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V. H., Lorsignol, A., & Pénicaud, L. (2007). Characterization of Glucosensing Neuron Subpopulations in the Arcuate Nucleus: Integration in Neuropeptide Y and Pro-Opio Melanocortin Networks? *Diabetes*, 56(5), 1219–1227. <https://doi.org/10.2337/db06-0567>
87. Fiorenza, A., & Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 135, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.05.001>
88. Fiorenza, A., Lopez-Atalaya, J. P., Rovira, V., Scandaglia, M., Geijo-Barrientos, E., & Barco, A. (2016). Blocking miRNA Biogenesis in Adult Forebrain Neurons Enhances Seizure Susceptibility, Fear Memory, and Food Intake by Increasing Neuronal Responsiveness. *Cerebral Cortex*, 26, 1619–1633. <https://doi.org/doi:10.1093/cercor/bhu332>
89. Flak, J. N., & Myers, M. G. (2016). Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action. *Molecular Endocrinology*, 30(1), Article 1. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1232>
90. Friedman, J. (2014). 20 YEARS OF LEPTIN: Leptin at 20: an overview. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0405>
91. Frühbeck, G., & Gómez-Ambrosi, J. (2001). Rationale for the existence of additional adipostatic hormones. *The FASEB Journal*, 15(11), 1996–2006. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0829hyp>
92. Gabreels, B. A. TH. F., Swabb, D. F., De Kleijn, D. P. V., Seidah, N. G., Van De Loo, J.-W., Van De Ven, W. J. M., Martens, G. J. M., & Van Leeuwen, F. W. (1998). Attenuation of the Polypeptide 7B2, Prohormone Convertase PC2, and Vasopressin in the Hypothalamus of Some Prader-Willi Patients: Indications for a

- Processing Defect. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), 591–599. <https://doi.org/doi:10.1210/jcem.83.2.4542>
93. Garfield, A. S., Li, C., Madara, J. C., Shah, B. P., Webber, E., Steger, J. S., Campbell, J. N., Gavrilova, O., Lee, C. E., Olson, D. P., Elmquist, J. K., Tannous, B. A., Krashes, M. J., & Lowell, B. B. (2015). A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nature Neuroscience*, 18(6), 863–871. <https://doi.org/10.1038/nn.4011>
 94. Garfield, A. S., Shah, B. P., Burgess, C. R., Li, M. M., Li, C., Steger, J. S., Madara, J. C., Campbell, J. N., Kroeger, D., Scammell, T. E., Tannous, B. A., Myers, M. G., Andermann, M. L., Krashes, M. J., & Lowell, B. B. (2016). Dynamic GABAergic afferent modulation of AgRP neurons. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1628–1635. <https://doi.org/10.1038/nn.4392>
 95. Ghosh, A., Ginty, D. D., Bading, H., & Greenberg, M. E. (1994). Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *Journal of Neurobiology*, 25(3), 294–303. <https://doi.org/10.1002/neu.480250309>
 96. Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1993). Regulation of Gene Expression in Hippocampal Neurons by Distinct Calcium Signaling Pathways. 260.
 97. Gogga, P., Karbowska*, J., Meissner, W., & Kochan, Z. (2011). Rola leptyny w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 65, 255–262. <https://doi.org/10.5604/17322693.940259>
 98. Golombek, D. A., Agostino, P. V., Plano, S. A., & Ferreyra, G. A. (2004). Signaling in the mammalian circadian clock: The NO/cGMP pathway. *Neurochemistry International*, 45(6), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.023>
 99. González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martinez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
 100. Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311(5985), 433–438. <https://doi.org/10.1038/311433a0>
 101. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
 102. Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine*, 48, e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
 103. Handa, R. J., Nunley, K. M., & Bollnow, M. R. (1993). Induction of c-fos mRNA in the brain and anterior pituitary gland by a novel environment. *Neuroreport*, 4(9), 1079–1082.
 104. Harraz, M. M., Eacker, S. M., Wang, X., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2012). MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18962–18967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121288109>
 105. He, X., & Rosenfeld, M. G. (1991). Mechanisms of complex transcriptional regulation: Implications for brain development. *Neuron*, 7(2), 183–196. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90257-Z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90257-Z)
 106. He, Z., Gao, Y., Alhadeff, A. L., Castorena, C. M., Huang, Y., Lieu, L., Afrin, S., Sun, J., Betley, J. N., Guo, H., & Williams, K. W. (2018). Cellular and synaptic reorganization of arcuate NPY/AgRP and POMC neurons after exercise. *Molecular Metabolism*, 18, 107. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.08.011>
 107. Hébert, S. S., Papadopoulou, A. S., Smith, P., Galas, M.-C., Planel, E., Silahatoglu, A. N., Sergeant, N., Buée, L., & De Strooper, B. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 19(20), 3959–3969. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq311>
 108. Heidenreich, M., & Zhang, F. (2016). Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.2>

109. Heinrich, G., Meece, K., Wardlaw, S. L., & Accili, D. (2014). Preserved Energy Balance in Mice Lacking FoxO1 in Neurons of Nkx2.1 Lineage Reveals Functional Heterogeneity of FoxO1 Signaling Within the Hypothalamus. *Diabetes*, 63(5), 1572–1582. <https://doi.org/10.2337/db13-0651>
110. Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*, 28(3), 370–490. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00018-6)
111. Herrera, G., & Robertson, H. A. (1996). ACTIVATION OF c-fos IN THE BRAIN. *Progress in Neurobiology*, 50, 83–107.
112. Hill, C. S., & Treisman, R. (1995). Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *The EMBO Journal*, 14(20), 5037–5047.
113. Hill, J. W., Elias, C. F., Fukuda, M., Williams, K. W., Berglund, E. D., Holland, W. L., Cho, Y.-R., Chuang, J.-C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C. E., Coppari, R., Richardson, J. A., Zigman, J. M., Chua, S., Scherer, P. E., Lowell, B. B., Brüning, J. C., & Elmquist, J. K. (2010). Direct Insulin and Leptin Action on Pro-opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. *Cell Metabolism*, 11(4), 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>
114. Hill, J. W., Williams, K. W., Ye, C., Luo, J., Balthasar, N., Coppari, R., Cowley, M. A., Cantley, L. C., Lowell, B. B., & Elmquist, J. K. (2008). Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(5), Article 5. <https://doi.org/10.1172/JCI32964>
115. Hoffman, G. E., & Murphy, A. Z. (2000). Anatomical Markers of Activity in Hypothalamic Systems. W P. M. Conn & M. E. Freeman (Red.), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine* (s. 541–552). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-707-9_31
116. Horvath, T. L., Andrews, Z. B., & Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: Roles for ROS. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(2), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.003>
117. Horvath, T. L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S. P., & Leranath, C. (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*, 756(1), 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00184-4)
118. Horvath, T. L., Diano, S., & Van Den Pol, A. N. (1999). Synaptic Interaction between Hypocretin (Orexin) and Neuropeptide Y Cells in the Rodent and Primate Hypothalamus: A Novel Circuit Implicated in Metabolic and Endocrine Regulations. *The Journal of Neuroscience*, 19(3), 1072–1087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-03-01072.1999>
119. Horvath, T. L., & Gao, X.-B. (2005). Input organization and plasticity of hypocretin neurons: Possible clues to obesity's association with insomnia. *Cell Metabolism*, 1(4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.003>
120. Horvath, T. L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P. J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J. A., Perez-Tilve, D., Pfluger, P. T., Brönnke, H. S., Levin, B. E., Diano, S., Cowley, M. A., & Tschöp, M. H. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14875–14880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004282107>
121. Horvath, T. L., Warden, C. H., Hajos, M., Lombardi, A., Goglia, F., & Diano, S. (1999). Brain uncoupling protein 2: Uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(23), 10417–10427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10417.1999>
122. Hughes, P., & Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 47(1), 133–178.
123. Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., Gu, W., Kesterson, R. A., Boston, B. A., Cone, R. D., Smith, F. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Lee, F. (1997).

- Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell*, 88(1), 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81865-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6)
124. Ikeda, K., & Yamada, T. (2020). UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 498. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00498>
 125. Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7), e00580-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
 126. Jais, A., & Brüning, J. C. (2022). Arcuate Nucleus-Dependent Regulation of Metabolism—Pathways to Obesity and Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 43(2), 314–328. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab025>
 127. Janknecht, R. (1995). Regulation of the c-fos Promoter. *Immunobiology*, 193(2–4), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80536-X](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80536-X)
 128. Jarvie, B. C., & Hentges, S. T. (2012). Expression of GABAergic and glutamatergic phenotypic markers in hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 520(17), 3863–3876. <https://doi.org/10.1002/cne.23127>
 129. Jaworski, J., Kalita, K., & Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: The aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78(4), Article 4. <https://doi.org/10.21307/ane-2018-027>
 130. 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
 131. Kaczmarek, L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning? *Journal of Neuroscience Research*, 34(4), 377–381. <https://doi.org/10.1002/jnr.490340402>
 132. Kaczmarek, L. (1994). Glutamate-evoked gene expression in brain cells—Focus on transcription factors. *Amino Acids*, 7(3), 245–254. <https://doi.org/10.1007/BF00807700>
 133. Kaczmarek, L. (2000). Gene expression in learning processes. *Acta Neurobiol. Exp.*, 60, 419–424.
 134. Kaczmarek, L., & Kamińska, B. (1989). Molecular biology of cell activation. *Experimental Cell Research*, 183(1), 24–35. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90415-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90415-1)
 135. Kaczmarek, L., Siedlecki, J. A., & Danysz, W. (1988). Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 3(2), 183–186. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(88\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0169-328X(88)90064-2)
 136. Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473–481.
 137. Kaiyala, K. J., Morton, G. J., Leroux, B. G., Ogimoto, K., Wisse, B., & Schwartz, M. W. (2010). Identification of Body Fat Mass as a Major Determinant of Metabolic Rate in Mice. *Diabetes*, 59(7), 1657–1666. <https://doi.org/10.2337/db09-1582>
 138. Kalra, S. P., Dube, M. G., Sahu, A., Phelps, C. P., & Kalra, P. S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10931. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10931>
 139. Karin, M., Liu, Z., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 240–246. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80068-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80068-3)
 140. Kaushik, S., Arias, E., Kwon, H., Lopez, N. M., Athonvarangkul, D., Sahu, S., Schwartz, G. J., Pessin, J. E., & Singh, R. (2012). Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Reports*, 13(3), 258–265. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.260>
 141. Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, J. A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, G. J., Cuervo, A. M., & Singh, R. (2011). Autophagy in Hypothalamic AgRP Neurons Regulates Food Intake and Energy Balance. *Cell Metabolism*, 14(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.008>

142. Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
143. Keeseey, R. E., & Powley, T. L. (2008). Body energy homeostasis. *Appetite*, 51(3), 442–445. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.06.009>
144. Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 140(901), 578–596. <https://doi.org/10.1098/rspb.1953.0009>
145. Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115(2), 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
146. Kievit, P., Howard, J. K., Badman, M. K., Balthasar, N., Coppari, R., Mori, H., Lee, C. E., Elmquist, J. K., Yoshimura, A., & Flier, J. S. (2006). Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metabolism*, 4(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.06.010>
147. Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: General principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147–159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
148. Kirchgessner, A. L., & Sclafani, A. (1988). PVN-hindbrain pathway involved in the hypothalamic hyperphagia-obesity syndrome. *Physiology & Behavior*, 42(6), 517–528. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90153-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90153-9)
149. Klein, R. L., Meyer, E. M., Peel, A. L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N., & King, M. A. (1998). Neuron-Specific Transduction in the Rat Septohippocampal or Nigrostriatal Pathway by Recombinant Adeno-associated Virus Vectors. *Experimental Neurology*, 150(2), 183–194. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6736>
150. Klockars, A., Levine, A. S., & Olszewski, P. K. (2019). Hypothalamic Integration of the Endocrine Signaling Related to Food Intake. W L. M. Coolen & D. R. Grattan (Red.), *Neuroendocrine Regulation of Behavior* (s. 239–269). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/7854_2018_54
151. Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda, S., Fuller, P. M., Krashes, M. J., Vong, L., Ray, R. S., Olson, D. P., & Lowell, B. B. (2012). GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. *Cell*, 151(3), 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.020>
152. Konopacki, F. A., Rylski, M., Wilczek, E., Amborska, R., Detka, D., Kaczmarek, L., & Wilczynski, G. M. (2007). Synaptic localization of seizure-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA. *Neuroscience*, 150(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.08.026>
153. Konopka, W., Duniec, K., Mioduszevska, B., Proszynski, T., Jaworski, J., & Kaczmarek, L. (2005). hCMV and Tet promoters for inducible gene expression in rat neurons in vitro and in vivo. *Neurobiology of Disease*, 19(1), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.018>
154. Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J. R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merckenschlager, M., Theis, F. J., Köhr, G., Kaczmarek, L., & Schütz, G. (2010). MicroRNA Loss Enhances Learning and Memory in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 30(44), 14835–14842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3030-10.2010>
155. Konopka, W., Schütz, G., & Kaczmarek, L. (2011). The MicroRNA Contribution to Learning and Memory. *The Neuroscientist*, 17(5), Article 5. <https://doi.org/10.1177/1073858411411721>
156. Kosse, C., Schöne, C., Bracey, E., & Burdakov, D. (2017). Orexin-driven GAD65 network of the lateral hypothalamus sets physical activity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619700114>
157. Kossut, M. (2019). Basic mechanism of neuroplasticity. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia*, 14(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.5114/nan.2019.87727>

158. Kotz, C. M., Perez-Leighton, C. E., Teske, J. A., & Billington, C. J. (2017). Spontaneous Physical Activity Defends Against Obesity. *Current Obesity Reports*, 6(4), 362–370. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0288-1>
159. Kotz, C. M., Teske, J. A., Levine, J. A., & Wang, C. (2002). Feeding and activity induced by orexin A in the lateral hypothalamus in rats. *Regulatory Peptides*, 104(1–3), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(01\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00346-9)
160. Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0)
161. Kovács, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
162. Krashes, M. J., Shah, B. P., Koda, S., & Lowell, B. B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators, GABA, NPY and AgRP. *Cell metabolism*, 18(4), 10.1016/j.cmet.2013.09.009. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.009>
163. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., & Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. 19, 3.
164. Krukoff, T. L. (1998). c-fos Expression as a Marker of Functional Activity in the Brain: Immunohistochemistry. W A. A. Boulton, G. B. Baker, & A. N. Bateson, *Cell Neurobiology Techniques* (T. 33, s. 213–230). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-510-7:213>
165. Krützfeldt, J., & Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabolism*, 4(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.009>
166. Kuda, O., Rossmesl, M., & Kopecky, J. (2018). Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology. *Molecular Aspects of Medicine*, 64, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.004>
167. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., & Kalita, K. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Neurons via the Serum Response Factor/c-Fos Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2149. <https://doi.org/10.1128/MCB.00008-13>
168. Lam, T. K. T., Schwartz, G. J., & Rossetti, L. (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience*, 8(5), 579–584. <https://doi.org/10.1038/nn1456>
169. Lanahan, A., & Worley, P. (1998). Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70(1), 37–43. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>
170. Lancha, A., Frühbeck, G., & Gómez-Ambrosi, J. (2012). Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutrition Research Reviews*, 25(2), 223–248. <https://doi.org/10.1017/S0954422412000145>
171. Lara Aparicio, S. Y., Laureani Fierro, Á. D. J., Aranda Abreu, G. E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L. I., Coria Ávila, G. A., Rojas Durán, F., Aguilar, M. E. H., Manzo Denes, J., Chi-Castañeda, L. D., & Pérez Estudillo, C. A. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*, 3(4), 687–702. <https://doi.org/10.3390/neurosci3040050>
172. Leah, J. D., Herdegen, T., & Bravo, R. (1991). Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: Evidence for a role in the regeneration process. *Brain Research*, 566(1–2), 198–207. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91699-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91699-2)
173. Lee, H.-J., Palkovits, M., & Young, W. S. (2006). miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15669–15674. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605781103>
174. Lee, K., Li, B., Xi, X., Suh, Y., & Martin, R. J. (2005). Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology*, 146(1), 3–10. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0968>

175. Lee, M.-J., Yang, R.-Z., Gong, D.-W., & Fried, S. K. (2007). Feeding and Insulin Increase Leptin Translation: IMPORTANCE OF THE LEPTIN mRNA UNTRANSLATED REGIONS*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 72–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609518200>
176. Lerea, L. S. (1997). Glutamate Receptors and Gene Induction: Signalling from Receptor to Nucleus. *Cellular Signalling*, 9(3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(96\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(96)00134-9)
177. Levine, A. S., & Morley, J. E. (1984). Neuropeptide Y: A potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*, 5(6), 1025–1029. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90165-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90165-7)
178. Levitsky, D. A., Barre, L., Michael, J. J., Zhong, Y., He, Y., Mizia, A., & Kaila, S. (2022). The Rise and Fall of Physiological Theories of the Control of Human Eating Behavior. *Frontiers in Nutrition*, 9, 826334. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.826334>
179. Liao, G.-Y., An, J. J., Gharami, K., Waterhouse, E. G., Vanevski, F., Jones, K. R., & Xu, B. (2012). Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nature Medicine*, 18(4), 564–571. <https://doi.org/10.1038/nm.2687>
180. Lieu, L., Chau, D., Afrin, S., Dong, Y., Alhadeff, A. L., Betley, J. N., & Williams, K. W. (2020). Effects of metabolic state on the regulation of melanocortin circuits. *Physiology & behavior*, 224, 113039. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113039>
181. Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
182. Liu, H., Du, T., Li, C., & Yang, G. (2021). STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. *Nutrition & Metabolism*, 18(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00569-w>
183. Liu, H.-N., Giasson, B. I., Mushynski, W. E., & Almazan, G. (2002). AMPA receptor-mediated toxicity in oligodendrocyte progenitors involves free radical generation and activation of JNK, calpain and caspase 3. *Journal of Neurochemistry*, 82(2), 398–409. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00981.x>
184. Liu, T., Kong, D., Shah, B. P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J. B., Yang, Z., Sabatini, B. L., & Lowell, B. B. (2012). Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone. *Neuron*, 73(3), 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.027>
185. Lo, C. C., Langhans, W., Georgievsky, M., Arnold, M., Caldwell, J. L., Cheng, S., Liu, M., Woods, S. C., & Tso, P. (2012). Apolipoprotein AIV requires cholecystokinin and vagal nerves to suppress food intake. *Endocrinology*, 153(12), 5857–5865. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1427>
186. Loh, K., Fukushima, A., Zhang, X., Galic, S., Briggs, D., Enriori, P. J., Simonds, S., Wiede, F., Reichenbach, A., Hauser, C., Sims, N. A., Bence, K. K., Zhang, S., Zhang, Z.-Y., Kahn, B. B., Neel, B. G., Andrews, Z. B., Cowley, M. A., & Tiganis, T. (2011). Elevated Hypothalamic TCPTP in Obesity Contributes to Cellular Leptin Resistance. *Cell Metabolism*, 14(5), 684–699. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.011>
187. Lohmann, C., & Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 1), 13–31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235119>
188. Lu, W., Mi, R., Tang, H., Liu, S., Fan, M., & Wang, L. (1998). Over-expression of c-fos mRNA in the hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Chinese Medical Journal*, 111(1), 35–37.
189. Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S., & Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science*, 310(5748), 683–685. <https://doi.org/10.1126/science.1115524>
190. Malyala, A., Zhang, C., Bryant, D. N., Kelly, M. J., & Rønnekleiv, O. K. (2008). PI3K signaling effects in hypothalamic neurons mediated by estrogen. *Journal of Comparative Neurology*, 506(6), 895–911. <https://doi.org/10.1002/cne.21584>
191. Mandelblat-Cerf, Y., Ramesh, R. N., Burgess, C. R., Patella, P., Yang, Z., Lowell, B. B., & Andermann, M. L. (2015). Arcuate hypothalamic AgRP and putative POMC neurons show opposite changes in spiking across multiple timescales. *eLife*, 4, e07122. <https://doi.org/10.7554/eLife.07122>

192. Mang, G. M., Pradervand, S., Du, N.-H., Arpat, A. B., Preitner, F., Wigger, L., Gatfield, D., & Franken, P. (2015). A Neuron-Specific Deletion of the MicroRNA-Processing Enzyme DICER Induces Severe but Transient Obesity in Mice. *PLOS ONE*, 18.
193. Marota, J. J. A., Crosby, G., & Uhl, G. R. (1992). Selective Effects of Pentobarbital and Halothane on c-fos and jun-B Gene Expression in Rat Brain. *Anesthesiology*, 77, 365–371. <https://doi.org/doi.org/10.1097/00000542-199208000-00021>
194. Martinez, J. A. (2000). Body-weight regulation: Causes of obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3), 337–345. <https://doi.org/10.1017/S0029665100000380>
195. Martínez de Morentin, P. B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., Fernández-Mallo, D., Martínez-Sánchez, N., Ruíz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D. A., Pinilla, L., Gallego, R., Saha, A. K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P. H., Diéguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Tena-Sempere, M., & López, M. (2014). Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*, 20(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.031>
196. Mauras, N., Hayes, V., Welch, S., Rini, A., Helgeson, K., Dokler, M., Veldhuis, J. D., & Urban, R. J. (1998). Testosterone deficiency in young men: Marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(6), 1886–1892. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4892>
197. Mayer, J., & Thomas, D. W. (1967). Regulation of Food Intake and Obesity: The regulation of food intake is complex; a number of abnormalities may cause obesity. *Science*, 156(3773), 328–337. <https://doi.org/10.1126/science.156.3773.328>
198. McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of Cell Biology*, 217(1), 65. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>
199. McLaughlin, S. K., Collis, P., Hermonat, P. L., & Muzyczka, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: Analysis of proviral structures. *Journal of Virology*, 62(6), 1963–1973.
200. Melia, K., Ryabinin, A., Schroeder, R., Bloom, F., & Wilson, M. (1994). Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *The Journal of Neuroscience*, 14(10), 5929–5938. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-05929.1994>
201. Mesaros, A., Koralov, S. B., Rother, E., Wunderlich, F. T., Ernst, M. B., Barsh, G. S., Rajewsky, K., & Brüning, J. C. (2008). Activation of Stat3 Signaling in AgRP Neurons Promotes Locomotor Activity. *Cell Metabolism*, 7(3), 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.01.007>
202. Metlakunta, A. S., Sahu, M., & Sahu, A. (2008). Hypothalamic Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway of Leptin Signaling Is Impaired during the Development of Diet-Induced Obesity in FVB/N Mice. *Endocrinology*, 149(3), 1121–1128. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1307>
203. Michaluk, P., & Kaczmarek, L. (2007). Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402141>
204. Michell, D. L., & Vickers, K. C. (2016). Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica et biophysica acta*, 1861(12 Pt B), 2069–2074. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.011>
205. Miyata, S., Tsujioka, H., Itoh, M., Matsunaga, W., Kuramoto, H., & Kiyohara, T. (2001). Time course of Fos and Fras expression in the hypothalamic supraoptic neurons during chronic osmotic stimulation. *Molecular Brain Research*, 90(1), 39–47. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00072-9)
206. Moratalla, R., Elibol, B., Vallejo, M., & Graybiel, A. M. (1996). Network-Level Changes in Expression of Inducible Fos–Jun Proteins in the Striatum during Chronic Cocaine Treatment and Withdrawal. *Neuron*, 17(1), 147–156. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80288-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80288-3)
207. Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 343–349. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90594-I](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90594-I)

208. Morishita, T., Hidaka, T., Sugahara, K., & Noguchi, T. (1998). Leptin changes Ca²⁺/calmodulin-dependent response and upregulates the gene expression of calcineurin in rat hypothalamus. *Life Sciences*, 63(20), 311–315. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00460-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00460-3)
209. Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2015). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Jun; 15(6): 367–378. <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
210. Müller, R., Bravo, R., Müller, D., Kurz, C., & Renz, M. (1987). Different types of modification in c-fos and its associated protein p39: Modulation of DNA binding by phosphorylation. *Oncogene Research*, 2(1), 19–32.
211. Mussa, B. M., Taneera, J., Mohammed, A. K., Srivastava, A., Mukhopadhyay, D., & Sulaiman, N. (2019). Potential role of hypothalamic microRNAs in regulation of FOS and FTO expression in response to hypoglycemia. *The Journal of Physiological Sciences : JPS*, 69(6), 981–991. <https://doi.org/10.1007/s12576-019-00718-0>
212. Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409(6817), Article 6817. <https://doi.org/10.1038/35051587>
213. Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D., & Citri, Y. (1993). Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature*, 363(6431), 718–722. <https://doi.org/10.1038/363718a0>
214. Nikolaev, E. (1997). Pobudzenie ekspresji genu c-Fos jako jeden z możliwych warunków powstawania zmian plastycznych w ośrodkowym układzie nerwowym. *Kosmos. Kosmos*, 46(2), 243–258.
215. Nikolaev, E., Kaminska, B., Tischmeyer, W., Matthies, H., & Kaczmarek, L. (1992). Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training. *Brain Research Bulletin*, 28(3), 479–484. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90050-8)
216. Nikolaev, E., Tischmeyer, W., Krug, M., Matthies, H., & Kaczmarek, L. (1991). C-fos Protooncogene expression in rat hippocampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path. *Brain Research*, 560(1–2), 346–349. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91257-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91257-2)
217. Niswender, K. D., Morton, G. J., Stearns, W. H., Rhodes, C. J., Myers, M. G., & Schwartz, M. W. (2001). Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*, 413(6858), Article 6858. <https://doi.org/10.1038/35101657>
218. Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., & Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nature Medicine*, 9(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nm873>
219. Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y.-K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. *Science*, 278(5335), 135–138. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135>
220. Olson, B. (1993). C-Fos Expression in Rat Brain and Brainstem Nuclei in Response to Treatments That Alter Food Intake and Gastric Motility. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4(1), 93–106. <https://doi.org/doi:10.1006/mcne.1993.1011>
221. Ons, S., Martí, O., & Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: Relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1111–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02396.x>
222. Oomura, Y., & Yoshimatsu, H. (1984). Neural network of glucose monitoring system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 10(3–4), 359–372. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(84\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0165-1838(84)90033-X)
223. Padilla, S. L., Carmody, J. S., & Zeltser, L. M. (2010). Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic populations in hypothalamic feeding circuits. *Nature medicine*, 16(4), 403–405. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>

224. Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., Quintana, A., Zweifel, L. S., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., & Palmiter, R. D. (2016). Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nature Neuroscience*, 19(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nn.4274>
225. 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40283–40291. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607545200>
226. Pearce, E. N. (2012). Thyroid hormone and obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 19(5), 408–413. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328355cd6c>
227. Pedro, P. F., Tsakmaki, A., & Bewick, G. A. (2020). The Glucose Tolerance Test in Mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2128, 207–216. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0385-7_14
228. Pérez-Cadahía, B., Drobic, B., & Davie, J. R. (2011). Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 89(1), 61–73. <https://doi.org/10.1139/O10-138>
229. Péterfi, Z., Farkas, I., Denis, R. G., Farkas, E., Uchigashima, M., Füzesi, T., Watanabe, M., Lechan, R. M., Liposits, Z., Luquet, S., & Fekete, C. (2018). Endocannabinoid and nitric oxide systems of the hypothalamic paraventricular nucleus mediate effects of NPY on energy expenditure. *Molecular Metabolism*, 18, 120. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.08.007>
230. Piché, M.-E., Tchernof, A., & Després, J.-P. (b.d.). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, 126(11), 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
231. Pico, C., Jilkova, Z. M., Kus, V., Palou, A., & Kopecky, J. (2011). Perinatal programming of body weight control by leptin: Putative roles of AMP kinase and muscle thermogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(suppl_6), 1830S-1837S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000752>
232. Plum, L. (2006). Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1886–1901. <https://doi.org/10.1172/JCI27123>
233. Poggioli, R., Vergoni, A. V., & Bertolini, A. (1986). ACTH-(1–24) and α -MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides*, 7(5), 843–848. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90104-X)
234. Poher, A.-L., Tschöp, M. H., & Müller, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, 100, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>
235. Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 40, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>
236. Preston, G. A., Lyon, T. T., Yin, Y., Lang, J. E., Solomon, G., Annab, L., Srinivasan, D. G., Alcorta, D. A., & Barrett, J. C. (1996). Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16(1), 211–218.
237. Price, N. L., Fernández-Tussy, P., Varela, L., Cardelo, M. P., Shanabrough, M., Aryal, B., De Cabo, R., Suárez, Y., Horvath, T. L., & Fernández-Hernando, C. (2024). microRNA-33 controls hunger signaling in hypothalamic AgRP neurons. *Nature Communications*, 15(1), 2131. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46427-0>
238. Quan, W., Kim, H.-K., Moon, E.-Y., Kim, S. S., Choi, C. S., Komatsu, M., Jeong, Y. T., Lee, M.-K., Kim, K.-W., Kim, M.-S., & Lee, M.-S. (2012). Role of Hypothalamic Proopiomelanocortin Neuron Autophagy in the Control of Appetite and Leptin Response. *Endocrinology*, 153(4), 1817–1826. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1882>

239. Raivich, G., & Behrens, A. (2006). Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Progress in Neurobiology*, 78(6), 347–363. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.03.006>
240. Rajadhyaksha, A., Barczak, A., Macías, W., Leveque, J.-C., Lewis, S. E., & Konradi, C. (1999). L-Type Ca²⁺ Channels Are Essential for Glutamate-Mediated CREB Phosphorylation and c-fos Gene Expression in Striatal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(15), 6348–6359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06348.1999>
241. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
242. Ravussin, E., Lillioja, S., Knowler, W. C., Christin, L., Freymond, D., Abbott, W. G. H., Boyce, V., Howard, B. V., & Bogardus, C. (1988). Reduced Rate of Energy Expenditure as a Risk Factor for Body-Weight Gain. *New England Journal of Medicine*, 318(8), 467–472. <https://doi.org/10.1056/NEJM198802253180802>
243. Ravussin, Y., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2014). A Missing Link in Body Weight Homeostasis: The Catabolic Signal of the Overfed State. *Cell Metabolism*, 20(4), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.002>
244. Reason, A. J., Morris, H. R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R. H., Haltiwanger, R. S., Hart, G. W., Kelly, W. G., & Dell, A. (1992). Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 16911–16921.
245. Rezai-Zadeh, K., & Münzberg, H. (2013). Integration of sensory information via central thermoregulatory leptin targets. *Physiology & Behavior*, 121, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.02.014>
246. Roman, E. A. F. R., Reis, D., Romanatto, T., Maimoni, D., Ferreira, E. A., Santos, G. A., Torsoni, A. S., Velloso, L. A., & Torsoni, M. A. (2010). Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 α activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.007>
247. Rosenbaum, M., Goldsmith, R., Bloomfield, D., Magnano, A., Weimer, L., Heymsfield, S., Gallagher, D., Mayer, L., Murphy, E., & Leibel, R. L. (2005). Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3579–3586. <https://doi.org/10.1172/JCI25977>
248. Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., Choi, M. J., Lauzon, D., Lowell, B. B., & Elmquist, J. K. (2011). Melanocortin-4 Receptors Expressed by Cholinergic Neurons Regulate Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism*, 13(2), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.010>
249. Rossi-Herring, G., Belmonte, T., Rivas-Urbina, A., Benítez, S., Rotllan, N., Crespo, J., Llorente-Cortés, V., Sánchez-Quesada, J. L., & de Gonzalo-Calvo, D. (2023). Circulating lipoprotein-carried miRNome analysis reveals novel VLDL-enriched microRNAs that strongly correlate with the HDL-microRNA profile. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114623. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114623>
250. Roussio-Noori, L., Knobler, H., Levy-Apter, E., Kuperman, Y., Neufeld-Cohen, A., Keshet, Y., Akepati, V. R., Klinghoffer, R. A., Chen, A., & Elson, A. (2011). Protein Tyrosine Phosphatase Epsilon Affects Body Weight by Downregulating Leptin Signaling in a Phosphorylation-Dependent Manner. *Cell Metabolism*, 13(5), 562–572. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.017>
251. Rubil, S., Rössler, O. G., & Thiel, G. (2016). CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *British Journal of Pharmacology*, 173(2), 305–318. <https://doi.org/10.1111/bph.13372>
252. Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9261-9>
253. Rylski, M. (2004). AP-1 targets in the brain. *Frontiers in Bioscience*, 9(1–3), 8. <https://doi.org/10.2741/1207>

254. Saad, M. F., Damani, S., Gingerich, R. L., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S. D., El-Tawil, K., Rude, R. K., & Kamdar, V. (1997). Sexual Dimorphism in Plasma Leptin Concentration. 82(2).
255. Saba, R., Störchel, P. H., Aksoy-Aksel, A., Kepura, F., Lippi, G., Plant, T. D., & Schratt, G. M. (2012). Dopamine-Regulated MicroRNA MiR-181a Controls GluA2 Surface Expression in Hippocampal Neurons. *Molecular and Cellular Biology*, 32(3), 619–632. <https://doi.org/10.1128/MCB.05896-11>
256. Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1987). Expression of c-fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level | *Science*. https://www.science.org/doi/10.1126/science.3131879?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed
257. Saito, K., He, Y., Yang, Y., Zhu, L., Wang, C., Xu, P., Hinton, A. O., Yan, X., Zhao, J., Fukuda, M., Tong, Q., Clegg, D. J., & Xu, Y. (2016). PI3K in the ventromedial hypothalamic nucleus mediates estrogenic actions on energy expenditure in female mice. *Scientific Reports*, 6(1), 23459. <https://doi.org/10.1038/srep23459>
258. Salegio, E. A., Samaranch, L., Kells, A. P., Mittermeyer, G., San Sebastian, W., Zhou, S., Beyer, J., Forsayeth, J., & Bankiewicz, K. S. (2013). Axonal transport of adeno-associated viral vectors is serotype-dependent. *Gene Therapy*, 20(3), 348–352. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.27>
259. Sam, A. H., Troke, R. C., Tan, T. M., & Bewick, G. A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, 63(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.008>
260. Samulski, R. J., Chang, L. S., & Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: Normal integration does not require viral gene expression. *Journal of Virology*, 63(9), 3822–3828.
261. Sauer, B. (1993). [53] Manipulation of transgenes by site-specific recombination: Use of cre recombinase. *W Methods in Enzymology* (T. 225, s. 890–900). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)25056-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)25056-8)
262. Schaefer, A., O’Carroll, D., Tan, C. L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., & Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1553–1558. <https://doi.org/10.1084/jem.20070823>
263. Schneeberger, M., Altirriba, J., García, A., Esteban, Y., Castaño, C., García-Lavandeira, M., Alvarez, C. V., Gomis, R., & Claret, M. (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Molecular Metabolism*, 2(2), 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.10.001>
264. Schratt, G. (2009). microRNAs at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 842–849. <https://doi.org/10.1038/nrn2763>
265. Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283–289. <https://doi.org/10.1038/nature04367>
266. Schultz, B. R., & Chamberlain, J. S. (2008). Recombinant Adeno-associated Virus Transduction and Integration. *Molecular Therapy*, 16(7), 1189–1199. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.103>
267. Schwartz, M. W., & Porte, D. (2005). Diabetes, Obesity, and the Brain. *Science*, 307(5708), 375–379. <https://doi.org/10.1126/science.1104344>
268. Scott, R., Tan, T., & Bloom, S. (2013). Gut hormones and obesity: Physiology and therapies. *Vitamins and Hormones*, 91, 143–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00007-9>
269. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), Article 7209. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
270. Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., López-González, T., Morgan, D. A., Pardavila, J. Á., Sánchez-Tapia, M. J., Martínez-Sánchez, N., Contreras, C., Fidalgo, M., Diéguez, C., Coppari, R., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). SF1-Specific AMPK α 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. 67.

271. Shen, J., Sakaida, I., Uchida, K., Terai, S., & Okita, K. (2005). Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sciences*, 77(13), 1502–1515. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.004>
272. Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
273. Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1991). CREB: A Ca²⁺-Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases. *Science*, 252(5011), 1427–1430. <https://doi.org/10.1126/science.1646483>
274. Shepherd, J. D., & Bear, M. F. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience*, 14(3), 279–284. <https://doi.org/10.1038/nn.2708>
275. Sherling, D. H., Perumareddi, P., & Hennekens, C. H. (2017). Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 22(4), 365–367. <https://doi.org/10.1177/1074248416686187>
276. Sinha, M. K., Ohannesian, J. P., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Magosin, S., Marco, C., & Caro, J. F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 97(5), 1344–1347. <https://doi.org/10.1172/JCI118551>
277. Sohn, J.-W., Xu, Y., Jones, J. E., Wickman, K., Williams, K. W., & Elmquist, J. K. (2011). Serotonin 2C Receptor Activates a Distinct Population of Arcuate Pro-opiomelanocortin Neurons via TRPC Channels. *Neuron*, 71(3), 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.012>
278. Sonnenberg, J. L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P. F., Hempstead, J., Morgan, J. I., & Curran, T. (1989). Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research*, 24(1), 72–80. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240111>
279. Spanswick, D., Smith, M. A., Groppi, V. E., Logan, S. D., & Ashford, M. L. J. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, 390(6659), Article 6659. <https://doi.org/10.1038/37379>
280. Stanley, B. G., & Leibowitz, S. F. (1984). NEUROPEPTIDE Y: STIMULATION OF FEEDING AND DRINKING BY INJECTION INTO THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS. 35(26).
281. Steculorum, S. M., Ruud, J., Karakasilioti, I., Backes, H., Engström Ruud, L., Timper, K., Hess, M. E., Tsaousidou, E., Mauer, J., Vogt, M. C., Paeger, L., Bremser, S., Klein, A. C., Morgan, D. A., Frommolt, P., Brinkkötter, P. T., Hammerschmidt, P., Benzing, T., Rahmouni, K., ... Brüning, J. C. (2016). AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell*, 165(1), 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.044>
282. Stefan, N., Häring, H.-U., & Cusi, K. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: Causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7(4), 313–324. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30154-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30154-2)
283. Sternson, S. M., & Eiselt, A.-K. (2017, luty 13). Three Pillars for the Neural Control of Appetite (world) [Review-article]. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Physiol-021115-104948](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Physiol-021115-104948); Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-104948>
284. Su, Y., Shin, J., Zhong, C., Wang, S., Roychowdhury, P., Lim, J., Kim, D., Ming, G., & Song, H. (2017). Neuronal activity modifies the chromatin accessibility landscape in the adult brain. *Nature neuroscience*, 20(3), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn.4494>
285. Szekely, A. M., Barbaccia, M. L., & Costa, E. (1987). Activation of specific glutamate receptor subtypes increases C-fos proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 26(12), 1779–1782. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(87\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90132-8)

286. Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013). Involvement of Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation. *PLoS ONE*, 8(2), e56660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056660>
287. Taymans, J.-M., Vandenberghe, L. H., Haute, C. V. D., Thiry, I., Deroose, C. M., Mortelmans, L., Wilson, J. M., Debyser, Z., & Baekelandt, V. (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human Gene Therapy*, 18(3), 195–206. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.178>
288. Thorn, S. L., Gollob, M. H., Harper, M.-E., Beanlands, R. S., deKemp, R. A., & DaSilva, J. N. (2013). Chronic AMPK activity dysregulation produces myocardial insulin resistance in the human Arg302Gln-PRKAG2 glycogen storage disease mouse model. *EJNMMI Research*, 3, 48. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-48>
289. Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5), 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>
290. Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J. E., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience*, 11(9), 998–1000.
291. Tran, L. T., Park, S., Kim, S. K., Lee, J. S., Kim, K. W., & Kwon, O. (2022). Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), 358–369. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00741-z>
292. Trayhurn, P., Thurlby, P. L., & James, W. P. (1976). A defective response to cold in the obese (obob) mouse and the obese Zucker (fafa) rat [proceedings]. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 35(3), 133A.
293. Tremblay, A., & Bellisle, F. (2015). Nutrients, satiety, and control of energy intake. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(10), 971–979. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0549>
294. Triantafyllou, G. A., Paschou, S. A., & Mantzoros, C. S. (2016). Leptin and Hormones. 45, 633–645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.04.012>
295. Tschöp, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), Article 6806. <https://doi.org/10.1038/35038090>
296. Tsurumi, C., Ishida, N., Tamura, T., Kakizuka, A., Nishida, E., Okumura, E., Kishimoto, T., Inagaki, M., Okazaki, K., & Sagata, N. (1995). Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5682–5687.
297. Tulchinsky, E. (2000). Fos family members: Regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histology and Histopathology*, 33, 921–928. <https://doi.org/10.14670/HH-15.921>
298. Urban, A., & Rossier, J. (2012). Genetic targeting of specific neuronal cell types in the cerebral cortex. *W Progress in Brain Research* (T. 196, s. 163–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59426-6.00009-4>
299. Vaccarino, F. M., Hayward, M. D., Nestler, E. J., Duman, R. S., & Tallman, J. F. (1992). Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Molecular Brain Research*, 12(1–3), 233–241. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90089-T](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90089-T)
300. Vaisse, C., Halaas, J. L., Horvath, C. M., Darnell, J. E., Stoffel, M., & Friedman, J. M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics*, 14(1), 95–97. <https://doi.org/10.1038/ng0996-95>
301. Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R., & Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell*, 32(4), 1241–1255. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90306-9)

302. van den Pol, A. N., Acuna, C., Davis, J. N., Huang, H., & Zhang, X. (2019). Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons. *J Physiol*, 597.6, 1605–1625. <https://doi.org/DOI: 10.1113/JP277152>
303. van den Pol, A. N., Yao, Y., Fu, L.-Y., Foo, K., Huang, H., Coppari, R., Lowell, B. B., & Broberger, C. (2009). Neuromedin B and Gastrin-Releasing Peptide Excite Arcuate Nucleus Neuropeptide Y Neurons in a Novel Transgenic Mouse Expressing Strong Renilla Green Fluorescent Protein in NPY Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(14), 4622–4639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3249-08.2009>
304. van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M., & Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nn1226>
305. Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Reports*, 13(12), 1079. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
306. Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-Dependent Coincident Expression of the Effector Immediate-Early Genes Arc and Homer 1a in Hippocampal and Neocortical Neuronal Networks. *The Journal of Neuroscience*, 22(23), 10067–10071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10067.2002>
307. Velazquez, F. N., Caputto, B. L., & Boussin, F. D. (2015). C-Fos importance for brain development. *Aging (Albany NY)*, 7(12), 1028–1029.
308. Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., & Laroche, S. (2014). Chapter Four—The Transcription Factor Zif268/Egr1, Brain Plasticity, and Memory. W Z. U. Khan & E. C. Muly (Red.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (T. 122, s. 89–129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00004-0>
309. Vinnikov, X. I. A., Hajdukiewicz, K., Reymann, J., Beneke, J., Czajkowski, R., Roth, L. C., Novak, M., Roller, A., Dorner, N., Starkuviene, V., Theis, X. F. J., Erfle, H., Schutz, G., Grinevich, V., & Konopka, W. (2014). Hypothalamic miR-103 Protects from Hyperphagic Obesity in Mice. 16.
310. Wang, D., He, X., Zhao, Z., Feng, Q., Lin, R., Sun, Y., Ding, T., Xu, F., Luo, M., & Zhan, C. (2015). Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 40. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00040>
311. Wang, S., Liang, B., Viollet, B., & Zou, M.-H. (2011). Inhibition of the AMP-Activated Protein Kinase- α 2 Accentuates Agonist-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction and High Blood Pressure in Mice. *Hypertension*, 57(5), 1010–1017. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168906>
312. Wang, T., Chen, X., Wang, K., Ju, J., Yu, X., Wang, S., Liu, C., & Wang, K. (2023). Cre-loxP-mediated genetic lineage tracing: Unraveling cell fate and origin in the developing heart. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1085629. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1085629>
313. Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., & Sun, Q.-Q. (2013). Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain Research*, 1518, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>
314. West, A. E., & Greenberg, M. E. (2011). Neuronal Activity–Regulated Gene Transcription in Synapse Development and Cognitive Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a005744. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005744>
315. Williams, K. W., Scott, M. M., & Elmquist, J. K. (b.d.). From observation to experimentation: Leptin action in the mediobasal hypothalamus1–4. 6.
316. Wolfgang, M. J., Kurama, T., Dai, Y., Suwa, A., Asaumi, M., Matsumoto, S., Cha, S. H., Shimokawa, T., & Lane, M. D. (2006). The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7282–7287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602205103>

317. Wortley, K. E., Anderson, K. D., Yasenchak, J., Murphy, A., Valenzuela, D., Diano, S., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., & Sleeman, M. W. (2005). Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. *Cell Metabolism*, 2(6), 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.11.004>
318. Wu, J., & Xie, X. (2006). Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biology*, 7(9), R85. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r85>
319. Wu, Q., Clark, M. S., & Palmiter, R. D. (2012). Deciphering a neuronal circuit that mediates loss of appetite. *Nature*, 483(7391), 594. <https://doi.org/10.1038/nature10899>
320. Wu, Q., Howell, M. P., & Palmiter, R. D. (2009). Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell*, 137(7), 1225. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.022>
321. Wu, Q., Lemus, M. B., Stark, R., Bayliss, J. A., Reichenbach, A., Lockie, S. H., & Andrews, Z. B. (2014). The Temporal Pattern of cfos Activation in Hypothalamic, Cortical, and Brainstem Nuclei in Response to Fasting and Refeeding in Male Mice. *Endocrinology*, 155(3), 840–853.
322. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Morton, G. J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., Baskin, D. G., Havel, P., Schwartz, M. W., & Barsh, G. S. (2005). Effects of Hypothalamic Neurodegeneration on Energy Balance. *PLOS Biology*, 3(12), e415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030415>
323. Xu, J., Bartolome, C. L., Low, C. S., Yi, X., Chien, C.-H., Wang, P., & Kong, D. (2018). Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. *Nature*, 556(7702), 505–509. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0049-7>
324. Xu, X., Raber, J., Yang, D., Su, B., & Mucke, L. (1997). Dynamic regulation of c-Jun N-terminal kinase activity in mouse brain by environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12655–12660.
325. Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Trends in genetics : TIG*, 37(7), 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008>
326. Yang, C. S., Lam, C. K., Chari, M., Cheung, G. W., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G. A., & Lam, T. K. (2010). Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Glucose Production. *Diabetes*, 59(10), 2435. <https://doi.org/10.2337/db10-0221>
327. Yang, L., Mao, L., Tang, Q., Samdani, S., Liu, Z., & Wang, J. Q. (2004). A Novel Ca²⁺-Independent Signaling Pathway to Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase by Coactivation of NMDA Receptors and Metabotropic Glutamate Receptor 5 in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24(48), 10846–10857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2496-04.2004>
328. Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2011). Hunger States Switch a Flip-Flop Memory Circuit via a Synaptic AMPK-Dependent Positive Feedback Loop. *Cell*, 146(6), 992–1003. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.039>
329. Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019a). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
330. Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019b). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
331. Zhan, C. (2018). POMC Neurons: Feeding, Energy Metabolism, and Beyond. W Q. Wu & R. Zheng (Red.), *Neural Regulation of Metabolism* (T. 1090, s. 17–29). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1286-1_2
332. Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J., Lin, S., Bao, J., Wu, P., & Luo, M. (2013). Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. *The Journal of Neuroscience*, 33(8), 3624–3632. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>

333. Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J. S., Behbehani, M., Tsien, J. Z., & Xu, M. (2002). C-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature Genetics*, 30, 5.
334. Zhang, L., Ip, C. K., Lee, I.-C. J., Qi, Y., Reed, F., Karl, T., Low, J. K., Enriquez, R. F., Lee, N. J., Baldock, P. A., & Herzog, H. (2018). Diet-induced adaptive thermogenesis requires neuropeptide FF receptor-2 signalling. *Nature Communications*, 9(1), 4722. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06462-0>
335. Zhang, Z.-Y., Dodd, G. T., & Tiganis, T. (2015). Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(10), 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003>
336. Zhao, A. Z., Huan, J.-N., Gupta, S., Pal, R., & Sahu, A. (2002). A phosphatidylinositol 3-kinase–phosphodiesterase 3B–cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nature Neuroscience*, 5(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nn885>
337. Zimmerman, C. A., Leib, D. E., & Knight, Z. A. (2017). Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), 459–469. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.71>
338. Zimmerman, C. A., Lin, Y.-C., Leib, D. E., Guo, L., Huey, E. L., Daly, G. E., Chen, Y., & Knight, Z. A. (2016). Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature*, 537(7622), 680–684. <https://doi.org/10.1038/nature18950>
339. Zink, A. N., Bunney, P. E., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2018). Neuromodulation of orexin neurons reduces diet-induced adiposity. *International Journal of Obesity*, 42(4), 737–745. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.276>
340. Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C., & Ravussin, E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *Journal of Clinical Investigation*, 86(5), 1423–1427.

VIII SUPPLEMENT

8.1 Źródła finansowania pracy

Foundation for Polish Science (FNP) – Team Tech Core Facility Plus
ANIMOD - Integrated platform for generation and analysis of animal models for biomedical applications

Principal investigator - Witold Konopka 2018-2019

8.2 Dorobek naukowy doktorantki

Publikacje naukowe:

Murgia N, Ma Y, Najam SS, Liu Y, **Przybys J**, Guo C, Konopka W, Vinnikov IA. *In Vivo* Reductionist Approach Identifies miR-15a Protecting Mice From Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 7;13:867929. doi: 10.3389/fendo.2022.867929. PMID: 35873003; PMCID: PMC9302447.

Xu Y, Hajdukiewicz K, Tiwari A, **Przybyś J**, Parkitna JR, Novak M, Vinnikov IA, Schütz G, Konopka W. MicroRNAs are indispensable for the proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Sep 10;530(1):209-214. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.143. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32828287.

Koza P, **Przybyś J**, Klejman A, Olech-Kochańczyk G, Konopka W. Generation of Transgenic Rats using a Lentiviral Vector Approach. *J Vis Exp*. 2020 May 17;(159). doi: 10.3791/60570. PMID: 32478714.

Rusakov K., Radzewicz C., Czajkowski R., **Chilczuk J.**, Konopka W., Mobile optogenetic modules for mice" *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High Energy Physics Experiments* 2017;104452Z
DOI: 10.1117/12.2280450