

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. Wysłunięto 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.