

Karolina Hajdukiewicz

**Rola neuronów AgRP/NPY w rozwoju fenotypu otyłości u myszy z
indukowaną delecją genu *Dicer1***

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

PROMOTORZY:
Dr hab. Witold Konopka
Prof. dr hab. Urszula Wojda

Warszawa, 2022

Podziękowania

Wymagające to zadanie podziękować wszystkim tym, którzy byli obecni i wspierający na każdym etapie mojej dotychczasowej przygody naukowej. Jest ich tak wiele. Otoczona byłam ludźmi, którzy swoją wiarą we mnie, słowami zachęty, ale też swoim przykładem, spojrzeniem na świat, charyzmą byli dla mnie wzorem, inspiracją i punktem odniesienia. Pomógł mi również towarzyszący im dystans i poczucie humoru. To był dla mnie czas intensywnych, niejednokrotnie nieudanych, doświadczeń, wymagający czas podsumowania i zebrania w całość kilku lat pracy. To był czas konfrontacji z własnymi słabościami, przekonaniami. Czas, w którym poznawałam siebie znacznie szerzej niż w roli doktorantki. To był dla mnie czas nauki.

Dziękuję

Dr hab. Witoldowi Konopce

za bycie przewodnikiem, za wsparcie merytoryczne, za niegasnącą gotowość do rozmowy, za stworzenie warunków do realizacji projektu, za cierpliwość, zaufanie, optymizm, za przestrzeń do szeroko rozumianego rozwoju, za miejsce, do którego wracałam z zapalem, przyjemnością i ciekawością.

Profesor Urszuli Wojdzie

za bycie mentorem, za wsparcie merytoryczne, za opiekę, która była czymś znacznie więcej. Wiedzioną przykładem miałam szansę obserwować, uczyć się sposobu działania, myślenia, budowania strategii i tego, jak chciałabym realizować się poprzez pracę naukową.

Wszystkim serdecznym Koleżankom i Kolegom nieistniejącej już, ale niezapomnianej Pracowni Modeli Zwierzęcych. To było miejsce, które ugościło każdego indywidualistę, każdą osobowość, przepelnione atmosferą wzajemnego szacunku. Był tam zawsze czas na inspirujące dyskusje, które ćwicyły w nas sztukę argumentacji i myślenie krytyczne w miejsce krytycznych myśli. Była też przestrzeń na wspierającą rozmowę, gdy wydawało się, że „nic z tego nie będzie”. Było tam zawsze dużo miejsca na pomysły, gotowość na ich realizację, było zaufanie. Było wszystko to, czego potrzebowałam, żeby się rozwinąć.

*Koleżankom i Koledze z Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie
za jakże ciepłe przyjęcie, nieocenioną pomoc i wielką otwartość*

Dr Ani Beroun

za szczególne wsparcie i wyrozumiałość na etapie pisania pracy doktorskiej

Dr Rafałowi Czajkowskiemu

za czas spędzony razem na niezliczonych inspirujących wymianach poglądów i obserwacji wszelakich, za pozwalający złapać dystans żartobliwy ton naszych rozmów, za wsparcie każdego rodzaju

Dr Ani Konopce

za ogromne zrozumienie, za rady merytoryczne, za wnikliwą ocenę sytuacji, za głos rozsądku

Gabrysi Olech-Kochańczyk

za przyjacielską, budującą wymianę na każdym, równoległe przez nas realizowanym etapie pracy doktorskiej

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Pamięci Przestrzennej oraz Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania

za wspólnie spędzone chwile obfitujące w wymianę myśli nie tylko naukowych

Przyjaciołom

za uważne bycie razem i wspólny śmiech

Rodzicom

za całą mądrość jaką od nich dostałam, za to, że nauczyli mnie zadawać pytania i szukać odpowiedzi, za to, że pokazali mi świat książek, że obudzili we mnie, a potem podtrzymali zapal do nauki i ciekawość świata

Rodzeństwu

za bezwarunkowe wsparcie i wiarę w powodzenie sprawy

Jerzemu, Serafinie i Ignacemu

za każdą chwilę pełną zrozumienia dla obranego przeze mnie kierunku, za cierpliwość, za ciepłe słowa, milczenie, kiedy tego potrzebowałam, śmiech i zabawę, nieskończoną ilość miłości, która była dla mnie zawsze motorem do działania.

Spis treści

PODZIEKOWANIA	2
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
ABSTRACT	12
STRESZCZENIE	14
1. WSTĘP	16
1.1 ZABURZENIA ODŻYWIANIA	16
1.2 OŚRODKI W MÓZGU KLUCZOWE DLA REGULACJI ODŻYWIANIA	17
1.3 JĄDRO ŁUKOWATE JAKO NADRZĘDNY OŚRODEK REGULUJĄCY PROCESY GŁODU I SYTOŚCI ...	18
1.4 SYSTEM MELANOKORTYNOWY	22
1.4.1 CHARAKTERYSTYKA NEURONÓW POMC	24
1.4.2 CHARAKTERYSTYKA NEURONÓW AGRP	27
1.5 CZĄSTECZKI MIKRORNA W REGULACJI PROCESÓW BIOLOGICZNYCH.	36
1.5.1 BIOGENEZA CZĄSTECZEK MIKRORNA.	37
1.5.2 FUNKCJA MIKRORNA.	40
1.5.3 NEUROSPECYFICZNA UTRATA CZĄSTECZEK MIKRORNA, A FENOTYP OTYŁOŚCI.	42
1.6 METODY CELOWANEJ MODYFIKACJI GENETYCZNEJ NEURONÓW	44
1.6.1 ZWIERZĘTA TRANSGENICZNE	44
1.6.2 REKOMBINOWANE WEKTORY WIRUSOWE AAV	47
1.6.3 SYSTEM CRE-LOXP	51
1.6.4 SYSTEM CRISPR/Cas9	54
2. CELE PRACY	58
3. MATERIAŁY I METODY	59
3.1 MYSIE MODELE BADAWCZE	59
3.1.1 LINIE MYSZY DOŚWIADCZALNYCH STOSOWANE W BADANIACH WSTĘPNYCH (BEZ WYWOŁANIA MUTACJI W GENIE <i>DICER1</i>)	59
3.1.2 LINIE MYSZY DOŚWIADCZALNYCH PODDANYCH WARUNKOWEMU WYWOŁANIU MUTACJI ZA POMOCĄ TAMOKSYFENU	60
3.1.3 LINIE MYSZY DOŚWIADCZALNYCH PODDANYCH WYWOŁANIU MUTACJI ZA POMOCĄ INIEKCJI WEKTORÓW AAV	61
3.1.4 WARUNKI GENOTYPOWANIA POSZCZEGÓLNYCH LINII MYSZY	62
3.2 PRZYGOTOWANIE PLAZMIDOWYCH WEKTORÓW EKSPRESYJNYCH Z PROMOTOREM SPECYFICZNYM DLA NEURONÓW AGRP	67
3.2.1 DOBÓR ODPOWIEDNIEJ SEKWENCJI PROMOTOROWEJ <i>IN SILICO</i>	67
3.2.2 KLONOWANIE MOLEKULARNE	67
3.2.3 IZOLOWANIE PLAZMIDOWEGO DNA JAKO ETAP WSTĘPNY PRZYGOTOWANIA WEKTORÓW WIRUSOWYCH AAV	73
3.3 PRZYGOTOWANIE WEKTORÓW WIRUSOWYCH AAV	75
3.3.1 HODOWLA KOMÓREK AAV293	76
3.3.2 TRANSFEKCJA KOMÓREK AAV293	76
3.3.3 IZOLOWANIE I OCZYSZCZENIE WEKTORÓW AAV	77
3.3.4 OZNACZANIE MIANA WEKTORÓW AAV W REAKCJI PCR W CZASIE RZECZYWISTYM	79

3.4 METODY WPROWADZENIA MUTACJI W OBRĘBIE GENU <i>DICER1</i>	81
3.4.1 INFEKCJA NEURONALNEJ HODOWLI <i>IN VITRO</i> ZAWIESINĄ WEKTORÓW AAV	81
3.4.2 DOOTRZEWNOWE PODAWANIE TAMOKSYFENU	82
3.4.3 DOMÓZGOWE PODANIA WEKTORÓW AAV	82
3.5 BADANIE POZIOMU EKSPRESJI GENU <i>DICER1</i> W HODOWLI NEURONALNEJ <i>IN VITRO</i>	84
3.5.1 IZOLOWANIE RNA	84
3.5.2 REAKCJA ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI	84
3.5.3 REAKCJA PCR W CZASIE RZECZYWISTYM Z UŻYCIEM CDNA JAKO MATRYCY	85
3.6 BADANIE PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY	86
3.7 UTRWALANIE I PRZYGOTOWANIE TKANEK DO DALSZYCH ANALIZ	86
3.7.1 UTRWALANIE PERFUZYJNE	86
3.7.2 PRZYGOTOWANIE SKRAWKÓW TKANKOWYCH PRZY UŻYCIU VIBRATOMU	87
3.8 ANALIZA BIOCHEMICZNA SKRAWKÓW TKANKI MÓZGOWEJ Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH (IHC)	87
3.8.1 ZNAKOWANIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE Z UŻYCIEM 3'3- DIAMINOBENZYDINY (DAB)	87
3.8.2 ZNAKOWANIE IMMUNOFLUORESCENCYJNE	88
3.9 ANALIZA MIKROSKOPOWA WYZNAKOWANYCH SKRAWKÓW TKANEK MÓZGU	89
3.10 ANALIZA STATYSTYCZNA	90
4. WYNIKI	91
4.1 ANALIZA ZNACZENIA GENU <i>NPY</i> DLA ROZWINIĘCIA FENOTYPU OTYŁOŚCI U MYSZY DICERCKO	91
4.2 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY <i>AGRPCREERT2DICER</i>	94
4.3 ANALIZA WZORU REKOMBINACJI U MYSZY <i>NPY-GFP/STOPTdTomato</i> <i>AGRPCREERT2DICER</i>	96
4.4 PRZYGOTOWANIE PLAZMIDOWYCH WEKTORÓW EKSPRESYJNYCH Z PROMOTOREM SPECYFICZNYM DLA NEURONÓW <i>AGRP/NPY</i>	97
4.4.1 DOBÓR ODPOWIEDNIEJ SEKWENCJI PROMOTOROWEJ <i>IN SILICO</i>	98
4.4.2 WEKTORY PLAZMIDOWE Z FLUORESCENCYJNYM GENEM REPORTEROWYM: PAAV- <i>AGRPEYFP</i> , PAAV- <i>AGRPMCHERRY</i>	99
4.4.3 PRZYGOTOWANIE WEKTORA PLAZMIDOWEGO Z REKOMBINAZĄ CRE: PAAV- <i>AGRPCRE</i>	99
4.5 NEURONALNA CHARAKTERYSTYKA WEKTORÓW <i>AGRP-SPECYFICZNYCH</i> W MODELU <i>IN VIVO</i>	100
4.5.1 ANALIZA WZORU EKSPRESJI AAV- <i>AGRPYFP</i> ORAZ AAV- <i>AGRPMCHERRY</i> U MYSZY C57BL/6	101
4.5.2 ANALIZA WZORU EKSPRESJI AAV- <i>AGRP-mCherry</i> U MYSZY TRANSGENICZNEJ <i>NPY-GFP</i> ...	101
4.5.3 ANALIZA WZORU EKSPRESJI AAV- <i>AGRP-CRE</i> U MYSZY C57BL/6	103
4.6 OPTYMALIZACJA WARUNKÓW DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORÓW <i>AGRP-SPECYFICZNYCH</i>	104
4.6.1 ANALIZA EKSPRESJI REKOMBINAZY CRE U MYSZY C57BL/6, PO INIEKCJI RÓŻNĄ LICZBĄ CZĄSTEK WEKTORA AAV- <i>AGRPCRE</i>	105
4.6.2 ANALIZA ZMIENNEGO W CZASIE PROFILU EKSPRESJI REKOMBINAZY CRE U MYSZY C57BL/6 PO INIEKCJI WEKTOREM AAV- <i>AGRPCRE</i>	106
4.6.3 ANALIZA EKSPRESJI REKOMBINAZY CRE ORAZ PRZYROSTU MASY CIAŁA U MYSZY <i>DICER FL/FL</i> , W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU INIEKCJI WEKTORA AAV- <i>AGRPCRE</i> (PODANIE JEDNOSTRONNE, OBUSTRONNE, DO TRZECIEJ KOMORY)	108
4.7 FUNKCJONALNY EFEKT USUNIĘCIA W NEURONACH JĄDRA ŁUKOWATEGO CZĄSTECZEK MIRNA Z WYKORZYSTANIEM WEKTORA AAV-<i>AGRPCRE</i>	112
4.7.1 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA U MYSZY <i>DICER FL/FL</i> PO DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORA AAV- <i>AGRPCRE</i>	112
4.7.2 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA, POBORU POKARMU ORAZ EKSPRESJI REKOMBINAZY CRE, U MYSZY <i>DICER FL/FL</i> PO INIEKCJI RÓŻNĄ LICZBĄ CZĄSTEK WEKTORA AAV- <i>AGRPCRE</i>	114

4.7.3 ANALIZA PORÓWNAWCZA ZMIENNEGO W CZASIE PROFILU EKSPRESJI REKOMBINAZY CRE U MYSZY C57BL/6 ORAZ DICER FL/FL PO INIEKCJI WEKTOREM AAV-AGRPCRE	118
4.7.4 ANALIZA LICZEBNOŚCI NEURONÓW AGRP U MYSZY DICERCKO PO INDUKCJI MUTACJI	121
4.7.5 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY DICER FL/FL PO INIEKCJI WEKTORA AAV-AGRPCRE DO BRZUSZNO-PRZYŚRODKOWEGO JĄDRA W PODWZGÓRZU (VMH)	125
4.8 FUNKCJONALNY EFEKT USUNIĘCIA W NEURONACH ARC CZĄSTECZEK miRNA Z WYKORZYSTANIEM NARZĘDZI SYSTEMU CRISPR-Cas9	127
4.8.1 ANALIZA POZIOMU EKSPRESJI GENU <i>DICER1</i> <i>IN VITRO</i> W DYSOCJOWANEJ HODOWLI NEURONÓW HIPOKAMPALNYCH MYSZY Cas9, PO INFEKCJI MIESZANKĄ WEKTORÓW AAV KODUJĄCYCH SKŁADOWE SYSTEMU CRISPRCas9.	128
4.8.2 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY Cas9, PO DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORÓW AAV-AGRPCRE/AAV-GUIDE.	129
4.8.3 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY GadCreCas9, PO DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORA AAV-GUIDE2DICER.	132
4.8.4 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY VGLUT2CreCas9, PO DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORA AAV-GUIDE2DICER	135
4.8.5 ANALIZA PRZYROSTU MASY CIAŁA ORAZ POBORU POKARMU U MYSZY AGRPCRECas9, PO DOMÓZGOWEJ INIEKCJI WEKTORÓW AAV-GUIDE2DICER ORAZ AAV-GUIDE SCRAMBLE	139
4.8.6 WZÓR REKOMBINACJI W MYSICH LINIACH GadCreCas9, VGLUT2CreCas9 ORAZ AGRPCRECas9.	142
<u>5. Dyskusja</u>	<u>145</u>
5.1 Znaczenie genu <i>NPY</i> w fenotypie otyłości u myszy <i>Dicer</i>CKO	145
5.2 Wpływ profilu molekularnego neuronów jądra łukowatego na fenotyp otyłości z uwzględnieniem neuronów <i>AgRP</i> jako wiodących kandydatów	147
5.3 Wpływ czynników metodycznych na skuteczność tworzenia neurospecyficznego modelu.....	150
5.3.1 Model <i>AgRP-CreERT2</i>	150
5.3.2 Model z wykorzystaniem wektorów wirusowych AAV	152
5.3.3 Model CRIPR/Cas9.....	156
5.4 Wpływ płci zwierząt na obserwowany fenotyp otyłości.....	160
5.5 Zjawisko zaniku ekspresji (transkrypcji/translacji) w neuronach pozbawionych genu <i>Dicer1</i>	161
<u>6. Podsumowanie i wnioski.....</u>	<u>165</u>
<u>7. Bibliografia</u>	<u>166</u>
<u>8. Supplement</u>	<u>199</u>
8.1 Źródła finansowana pracy.....	199
8.2 DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI	199

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

α -MSH (ang. *α -melanocyte stimulating hormone*) - melanotropina

3V (ang. *Third ventricle*) - trzecia komora

5-HT_{2C} (ang. *5-hydroxytryptamine receptor*) - receptor dla serotoniny

AAV (ang. *Adeno-associated viruses*) - wirusy związane z Adenowirusami

ACTH (ang. *Adenocorticotropic hormone*) - hormon adrenokortykotropowy

AgRP (ang. *Agouti-related protein*) - białko związane z agouti

AMPK (ang. *5'AMP-activated kinase*) - kinaza aktywowana 5'AMP

ANOVA (ang. *Analysis of variance*) - analiza wariancji

ARC (ang. *Arcuate nucleus*) - jądro łukowate podwzgórza

BAC (ang. *Bacterial artificial chromosome*) - sztuczny chromosom bakteryjny

BAT (ang. *Brown adipose tissue*) - brązowa tkanka tłuszczowa

BNST (ang. *Bed nucleus of stria terminalis*) - jądro łożyskowe prążka krańcowego

CaMKII α (ang. *Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II*) - kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmodyliny

cAMP (ang. *Cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozymonofosforan

CART (ang. *Cocaine and amphetamine regulated transcript*) - układ regulowany kokainą i amfetaminą

Cas (ang. *CRISPR-associated system*) - białko związane z CRISPR

CBP (ang. *CREB-binding protein*) - białko wiążące CREB

CCK (ang. *Cholecystokinin*) - cholecystokinina

CCR4 (ang. *Carbon Catabolite Repressor 4*) – repressor katabolitowy węgla 4

NOT (ang. *Negative Regulator of Transcription*) – negatywny regulator transkrypcji

cDNA (ang. *Complementary DNA*) - komplementarne DNA

CEA (ang. *Central amygdala*) - jądro centralne ciała migdałowatego

ChR2 (ang. *Channelrodopsin 2*) - rodopsyna kanałowa 2

ChT (ang. *Choline transporter*) - transporter choliny

CKO (ang. *Conditional knock-out*) - warunkowe usunięcie genu

CLIP (ang. *Corticotropin-like intermediate peptide*) - peptyd kortykotropinopodobny przedniego płata przysadki

CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - grupowane regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne

crRNA (ang. *CRISPR-RNA*)

DAB (ang. 3,3-diaminobenzidine) - 3,3-diaminobenzzydina

DAPI (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole) - 4',6-diamidyno-2-fenylindol

DGCR8 (ang. DiGeorge Critical region 8) - krytyczny region syndromu DiGeorge'a

dH₂O (ang. distilled water) - woda destylowana

DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium) – modyfikacja Dulbecco pożywki hodowlanej Eagle'a

DMH (ang. Dorsomedial hypothalamus) - jądro grzbietowo-przyśrodkowe podwzgórza

DREADD (ang. Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) - receptor aktywowany wyłącznie przez syntetyczny ligand

dsDNA (ang. double strand DNA) - podwójnoniciowe DNA

EDTA (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid) - kwas etylenodwuaminoczwerooctowy

eNpHR (ang. Natronomonas halorhodopsin) – halorodopsyna Natromonas

ER (ang. Estrogen receptor) - receptor estrogenowy

ER-LBD (ang. Estrogen receptor ligand binding domain) - domena wiążąca ligand receptora estrogenowego

ERT2 (ang. Estrogen ligand-binding domain) - domena wiążąca ligand estrogenowy

EYFP (ang. Enhanced yellow fluorescent protein) - wzmocnione białko żółtej fluorescencji

FBS (ang. Fetal bovine serum) - płodowa surowica bydlęca

GABA (ang. Gamma-aminobutyric acid) - kwas gamma-aminomasłowy

Gad (ang. Glutamate decarboxylate) - dekarboksylaza glutaminianu

GCaMP (ang. GFP Calmodulin peptide) - białko zielonej fluorescencji i białko kalmoduliny

GFP (ang. Green fluorescent protein) - białko zielonej fluorescencji

GHSR (ang. Growth hormone secretagogue receptor) - receptor wydzielania hormonu wzrostu

GLP-1 (ang. Glucagon-like peptide 1) - glukagonopodobny peptyd 1

GLP-1R (ang. Glucagon-like peptide receptor) - receptor dla glukagonopodobnego peptydu 1

GW182 (ang. Glycine-Tryptophan-Repeat Containing Protein of 182 kDa) - białko z powtórzeniami glicyny i tryptofanu o masie 182 kDa

HEK293 (ang. Human Embryonic Kidney 293 Cells) - ludzkie embrionalne komórki nerki 293

hGH PolyA (ang. Human growth hormone polyadenylation signal) – sygnał poliadenylacji ludzkiego hormonu wzrostu

Hprt (ang. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) - Fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1

hSyn (ang. *Human Synapsin*) - ludzka synapsyna

IHC (ang. *Immunohistochemistry*) - immunohistochemia

INSR (ang. *Insulin receptor*) - receptor dla insuliny

ITR (ang. *Inverted terminal repeats*) - odwrócone powtórzenia końcowe

KO (ang. *Knock-out*) - usunięcie genu

LepR (ang. *Leptin receptor*) - receptor dla leptyny

LH (ang. *Lateral hypothalamus*) - jądro boczne podwzgórza

MC3R/MC4R (ang. *Melanocortin receptor 3/4*) - receptor melanokortynowy 3/4

MGB-NFQ (ang. *Minor groove binder – nonfluorescent quencher*) – niefluorescencyjny element wygaszający wiążący się do małego rowka

miRISC (ang. *miRNA induced silencing complex*) - kompleks wyciszający indukowany obecnością mikroRNA

miRNA (ang. *microRNA*) - mikroRNA

MPO (ang. *Medial preoptic nucleus*) - przyśrodkowe jądro przedwzrokowe

MRE (ang. *miRNA response elements*) - element odpowiedzi na miRNA

mTOR (ang. *Mechanistic target of rapamycin*) - mechanistyczny cel rapamycyny

NHEJ (ang. *Non-homologous end joining*) - niehomologiczne łączenie końców

NLPZ - niesteroideowe leki przeciwzapalne

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

NSS (ang. *Normal swine serum*) - normalna świńska surowica

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

PABPs (ang. *Poly-A-Binding Proteins*) – białka wiążące się z ogonem Poly A

PAM (ang. *Protospacer adjacent motif*) - motyw sąsiadujący do protospacer

PAN2-PAN3 (ang. *Poly-A-specific Ribonuclease*) - rybonukleazy specyficzne dla ogonaPolyA

PBN (ang. *Parabrachial nucleus*) - jądro pararaszkowe

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

PBS-T (ang. *Phosphate buffered saline TritonX-100*) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami z dodatkiem Triton-X

PC (ang. *Prohormone convertase*) - konwertazy prohormonów

PCR (ang. *Polymerase chain reaction*) - łańcuchowa reakcja polimeryzacji

PEI (ang. *Polyethylenimine*) - polietylenoimina

PFA (ang. *Paraformaldehyde*) - paraformaldehyd

PM (ang. *Premamillary nucleus*) - jądro przedstrzałkowe

POMC (ang. *Proopiomelanocortin*) - proopiomelanokortyna

PVH (ang. *Paraventricular nucleus*) - jądro przykomorowe podwzgórza

PVT (ang. *Paraventricular thalamus*) - jądro przykomorowe wzgórza

PWS (ang. *Prader-Willi Syndrome*) - zespół Prader-Willi

qPCR (ang. *Quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

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

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

RT-PCR (ang. *Real-time polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

SD (ang. *Standard deviation*) - odchylenie standardowe

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

sgRNA (ang. *single guide RNA*) – pojedyncze wiodące RNA

Sim1 (ang. *Single-minded homolog 1*) - jednokierunkowy czynnik transkrypcyjny 1

SO (ang. *Supraoptic nucleus*) - jądro nadwzrokowe

ssDNA (ang. *single strand DNA*) - pojedynczoniciowe DNA

Sst (ang. *Somatostatin*) - somatostatyna

TALEN (ang. *Transcription activator-like effector nucleases*) - nukleazy efektorowe podobne do aktywatora transkrypcji

TDP-43 (ang. *TAR DNA binding protein, 43kDa*) - białko wiążące się do sekwencji DNA

TAR

tdTomato (ang. *Tandem dimer Tomato*) - tandemowe podwójne Tomato

TIDA/THDA (ang. *Tuberoinfundibular /tuberohypophyseal dopaminergic*) - dopaminergiczne neurony tuberolejkowate/tuberoprzysadkowe

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

TRH (ang. *Tyreotropine releasing hormone*) - hormon uwalniający tyreotropinę

tSNE (ang. *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) – stochastyczna metoda porządkowania elementów sąsiadujących w oparciu o rozkład t

VACHT (ang. *Vesicular acetylcholine transporter*) - naczyniowy transporter acetylocholinę

VGAT (ang. *Vesicular GABA transporter*) - pęcherzykowy transporter GABA

Vglut2 (ang. *Vesicular glutamate transporter 2*) - pęcherzykowy transporter dla glutaminianu

vIPAG (ang. *Ventrolateral periaqueductal grey matter*) - brzuszno-boczna istota szara okołowodociągowa

VMH (ang. *Ventro-medial hypothalamus*) - jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza

VP (ang. *Viral proteins*) - (kapsydowe) białka wirusa

WPRE (ang. *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*)-
potranslacyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby świstaka

ZFN (ang. *Zinc finger nucleases*) – nukleazy zawierające motyw palca cynkowego

ABSTRACT

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

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

Models with *Dicer1* removal in the GABAergic and glutamatergic neurons of the arcuate nucleus revealed no weight gain while maintaining increased appetite (GadCreCas9) or a different weight gain kinetics unrelated to increased consumption (Vglut2CreCs9). Analysis of the obtained research models with the modification aimed at AgRP neurons evidenced that the system with the induced *Dicer1* deletion in adult AgRP neurons (AgRPCreERT2Dicerfl/fl) does not allow for conclusions about the involvement of these neurons, due to the insufficient level of recombination in this lineage. The remaining models provided significant information. The model with the inducible loss of microRNA in mature CaMKII α neurons and the simultaneous loss of both *Npy* alleles (NPY-KO/DicerCKO) excluded the involvement of NPY as a key stimulant of food intake. Meanwhile, experiments on Dicerfl/fl mice subjected to intracerebral injections of the AAV-AgRPCre vector into the arcuate nucleus, showed the

significant involvement of AgRP neurons in the development of microRNA-dependent obesity. Moreover, they revealed a quantitative relationship between the number of AAV-vector particles introduced determining the number of modified neurons and the increased nutritional requirements leading to increased body weight. Mice expressing Cre and Cas9 in AgRP neurons (AgRPCreCas9) proved to be the model generating the highest degree of specificity in the targeted modification of *Dicer1* in AgRP neurons. These animals, following intracerebral administration of the AAV-guide2Dicer vector, developed massive obesity associated with severe appetite while also revealing a sex-dependent effect, where only females lacking microRNA in AgRP neurons showed a significant increase in appetite and body weight.

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

STRESZCZENIE

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

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

Modele z usunięciem *Dicer1* w neuronach GABAergicznych i glutaminianergicznych jądra łukowatego odsłoniły brak przyrostu masy ciała przy zachowaniu zwiększonego apetytu (*GadCreCas9*) lub odmienną kinetykę tycia niepowiązaną ze zwiększoną konsumpcją (*Vglut2CreCs9*). Analiza adekwatności uzyskanych modeli z modyfikacją wycelowaną w neurony AgRP wykazała, że system z indukowanym usunięciem *Dicer1* w neuronach AgRP (*AgRPCreERT2Dicerfl/fl*) nie pozwala na wnioskowanie na temat udziału tych neuronów ze względu na niewystarczający poziom rekombinacji w tej linii. Pozostałe modele dostarczyły

istotnych informacji. Model z indukowalną utratą mikroRNA w dojrzałych neuronach CaMKII α oraz jednoczesną utratą obu alleli *Npy* (NPY-KO/DicerCKO) wykluczył udział NPY jako kluczowego czynnika stymulującego pobór pokarmu. Z kolei doświadczenia przeprowadzone na myszach Dicerfl/fl, poddanych domózgowym iniekcjom z wektorem AAV-AgRPCre do jądra łukowatego pokazały istotne zaangażowanie neuronów AgRP w rozwój otyłości zależnej od mikroRNA. Ponadto, odsłoniły ilościową zależność między liczbą wprowadzanych cząstek wektora AAV, determinującą liczbę zmodyfikowanych neuronów, a zwiększonym zapotrzebowaniem pokarmowym i rosnącą masą ciała. Modelem, który pozwolił uzyskać najwyższy stopień specyficzności w celowanej modyfikacji *Dicer1* w neuronach AgRP okazały się myszy z ekspresją Cre oraz Cas9 w neuronach AgRP (AgRPCreCas9). Zwierzęta te, po domózgowych podaniach wektora AAV-guide2Dicer, rozwinęły masywną otyłość powiązaną z niepohamowanym apetytem, uwidaczniając efekt zależny od płci. Znaczący wzrost apetytu i masy ciała charakteryzował jedynie samice pozbawione mikroRNA w neuronach AgRP.

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

1. Wstęp

1.1 Zaburzenia odżywiania

Neuronalna regulacja apetytu oraz utrzymania równowagi metabolicznej organizmu jest warunkiem koniecznym przetrwania zarówno jednostki jak i całych gatunków. Wszelkie zaburzenia w obrębie działania ośrodków w mózgu, kontrolujących pobór pokarmu i gospodarkę energetyczną, prowadzi do stanów patologicznych. Ze względu na nieograniczoną dostępność wysokoenergetycznego pożywienia oraz stałą obecność czynników stresowych, zmieniających nawyki żywieniowe, problem rozregulowania poboru pokarmu dotyczy w szczególności ludzi żyjących w wysoko rozwiniętych społeczeństwach. Skala tych zaburzeń jest bardzo szeroka, wielopoziomowa, a manifestacja fizjologiczna w połączeniu ze zróżnicowanym obrazem klinicznym zwiększają poziom złożoności i ograniczają wachlarz skutecznych rozwiązań diagnostyczno-terapeutycznych. Tym samym, wszelkie próby zrozumienia źródeł tych podstawowych, w swojej naturze, funkcjonalnych zagadnień związanych z jedzeniem, są niezbędne do stworzenia rozwiązań terapeutycznych, będących odpowiedzią na światowy rosnący trend otyłości i schorzeń psychicznych, związanych z zaburzeniami łaknienia i masy ciała.

Spośród jednostek chorobowych, związanych z zaburzeniami łaknienia, można wyszczególnić takie, o zdefiniowanym podłożu genetycznym, jak i te, których rozwój jest wypadkową wielu nakładających się czynników, niekoniecznie warunkowanych genetycznie. Przykładem tej pierwszej grupy jest zespół Prader-Willi (PWS, ang. *Prader-Willi Syndrome*). Osoby z zaburzeniem PWS cierpią na otyłość i niepohamowany apetyt. Jest to choroba polegająca na nieprawidłowym rozwoju podwzgórza, zawierającego ośrodki kluczowe w neuronalnej regulacji łaknienia. U jej podstaw leży delecja fragmentu chromosomu 15q11.2-q13, dziedziczonego w linii ojcowskiej. Efektem tej nieprawidłowości jest brak produktów co najmniej kilku genów (Cassidy i in. 2012) z których jeden- *Magel2* ulega ekspresji prawie wyłącznie we wspomnianym już podwzgórzu. Opisana w modelach zwierzęcych delecja genu *Magel 2*, prowadziła do zmniejszenia zarówno pobudliwości, jak i gęstości zmodyfikowanych neuronów, a także upośledzenia funkcji hamującej pobór pokarmu (Maillard i in. 2016; Oncul i in. 2018).

Innym przykładem zaburzeń w obrębie ośrodka głodu i sytości są choroby takie jak jadłowstręt psychiczny - anoreksja (ang. *anorexia nervosa*), czy kompulsywne objadanie się (ang. *binge eating disorder*). Ich genetyczna tożsamość została tylko częściowo potwierdzona

(Thaker 2018; Anorexia Nervosa Genetics Initiative i in. 2019), a powszechnie znany jest ich wieloczynnikowy charakter. Manifestują się one w przeciwstawnym sposób. W przypadku anoreksji jest to obniżona ilość spożywanego pokarmu, skutkująca zmniejszeniem masy ciała i wyniszczeniem organizmu. Z kolei, kompulsywne objadanie się prowadzi do otyłości poprzez akumulację nadwyżki energii w postaci tkanki tłuszczowej.

Wspólnym mianownikiem każdej z tych jednostek chorobowych jest nieprawidłowa odpowiedź organizmu w obrębie ścieżek leżących u podstaw neurobiologii apetytu (Zigman i Elmquist 2003; Schwartz i in. 2000).

1.2 Ośrodki w mózgu kluczowe dla regulacji odżywiania

Mózg jest nie tylko miejscem, które integruje czynniki środowiskowe, fizjologiczne i genetyczne, ale nadrzędnym ośrodkiem kontrolującym zachowania, związane m.in. z pozyskiwaniem i spożywaniem pokarmu. Odzwierciedleniem tej roli są liczne populacje komórek i obwodów neuronalnych, zaangażowanych w regulację apetytu. Ich wielogniskowa lokalizacja jest odbiciem niezwykle skomplikowanej i wyrafinowanej sieci wzajemnych powiązań, a właściwa organizacja jest warunkiem zachowania równowagi metabolicznej organizmu (Sternson i Eiselt 2017; Sternson i Atasoy 2014; Andermann i Lowell 2017). Te złożone sieci przetwarzają i integrują peryferyjne sygnały stanu metabolicznego, takie jak krążące w krwioobiegu składniki odżywcze oraz hormony np. leptyna, insulina, grelina, glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1, ang. *glucagon-like peptide 1*), cholecystokinina (CCK, ang. *cholecystokinin*), a także neuroprzebieżniki takie jak serotonina. W odpowiedzi na te sygnały, inicjowane bądź tłumione są zachowania związane z poszukiwaniem i spożywaniem jedzenia. Kluczowe w tym kontekście ośrodki znajdują się w podwzgórzu: jądro łukowate (ARC, ang. *arcuate nucleus*); jądro przykomorowe (PVH, ang. *paraventricular nucleus*); jądro boczne (LH, ang. *lateral hypothalamus*); jądro brzuszno-przyśrodkowe (VMH, ang. *ventromedial hypothalamus*); jądro grzbietowo-przyśrodkowe (DMH, ang. *dorsomedial hypothalamus*), pniu mózgu: jądro pararaszkowe (PBN, ang. *parabrachial nucleus*) oraz rdzeniu przedłużonym: jądro pasma samotnego (NTS, ang. *nucleus of solitary tract*).

Początkowe badania w kierunku identyfikacji funkcji poszczególnych ośrodków czy grup neuronów polegały na wykonaniu „leżji” (łac. *laesio* – uszkodzenie) określonych obszarów mózgu, poprzez mechaniczne lub elektrolityczne, śródoperacyjne zniszczenie. Ze względu na szeroki zakres uszkodzeń, obejmujący wszystkie typy komórek oraz połączeń

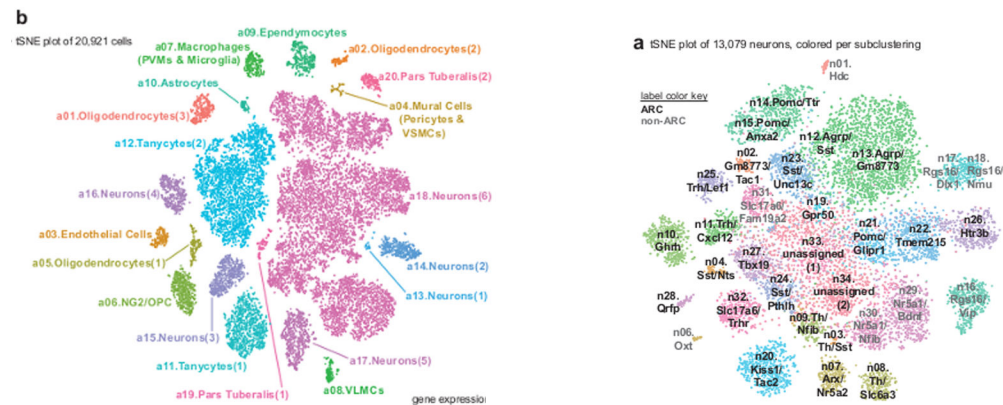
przechodzących przez niszczoną strukturę, doświadczenia te nie dawały możliwości precyzyjnego wnioskowania na temat wysoce wyspecjalizowanych komórek nerwowych, zlokalizowanych w miejscu uszkodzenia, oraz ich funkcjonalnych połączeń. Zatem obserwowany efekt mógł być wynikiem wielu nakładających się zmian, wychodzących, swoim zakresem, poza wąski zakres pytania badawczego. Niemniej jednak, wyłaniający się obraz zarysował przybliżone zrozumienie roli poszczególnych ośrodków podwzgórza, istotnych dla regulacji łaknienia i sytości (Hetherington i Ranson 1940; Brobeck 1946). W ten właśnie sposób PVN czy VMH zostały zaklasyfikowane jako ośrodki sytości, bowiem ich uszkodzenie prowadziło do nadmiernej konsumpcji i rozwijającej się otyłości. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku każdego z ośrodków obserwowany fenotyp miał nieco odmienną metaboliczną oraz behawioralną charakterystykę (Hetherington i Ranson 1940; Anand i Brobeck 1951; Bernardis' i Bellinger, b.d.; Bernardis i Bellinger 1996). Z kolei jądra podwzgórza LH i DMH opisane zostały jako ośrodki głodu. Zwierzęta z obustronnym upośledzeniem funkcji tych jąder wykazywały obniżoną masę ciała oraz występujący, w określonych warunkach, obniżony pobór pokarmu (Milam i in. 1980; Hetherington i Ranson 1940). Natomiast historyczne prace związane z utratą funkcji komórek jądra łukowatego dostarczyły nieoczywistych obserwacji, związanych m.in. z faktem, że neurony te są zaangażowane w inne, poza regulacją głodu i sytości, funkcje takie jak regulację wydzielania hormonów przysadki czy zaangażowanie w ścieżki związane z układem nagrody. Co prawda, Hamilton i in. robiąc badania na małpach, usunięcie jądra łukowatego powiązał jedynie z brakiem wzmożonego apetytu (Hamilton, Ciaccia, i Lewis 1976), jednak późniejsze odkrycia doprowadziły do zdefiniowania dwóch przeciwstawnie działających grup neuronów w obrębie tej struktury. Identyfikacja komórek stymulujących i hamujących pobór pokarmu, zlokalizowanych w ARC, uzasadniała dwoistą rolę tego obszaru w regulacji głodu i sytości.

1.3 Jądro łukowate jako nadrzędny ośrodek regulujący procesy głodu i sytości

Wyłaniający się obraz stawia neurony jądra łukowatego w centrum układu sterującego przyjmowaniem pokarmu. Jedną z oczywistych przesłanek jest umiejscowienie neuronów ARC w bezpośredniej bliskości wyniosłości pośrodkowej (ME, ang. *median eminence*). Ta z kolei, dzięki wysokiemu wyspecjalizowaniu komórek i bezpośredniemu kontaktowi z naczyniami krwionośnymi, jest miejscem, przez które przedostają się z jednej strony (do krwioobiegu) peptydy i monoaminy, z drugiej zaś (do mózgu) krążące w krwioobiegu sygnały stanu metabolicznego takie jak hormony czy składniki odżywcze (Rodríguez, Blázquez, i Guerra

2010). Podwzgórze jest jednym z obszarów mózgu o najwyższym stopniu zróżnicowania komórek nerwowych. Analiza transkrypcyjna na poziomie pojedynczych komórek (Drop-seq, single cell RNA-seq) pozwoliła wydzielić kilkadziesiąt frakcji komórek jądra łukowego i wyniosłości pośrodkowej (Campbell i in. 2017; R. Chen i in. 2017; Romanov i in. 2017). Klasyfikacja ta, oprócz podstawowego podziału na neurony GABAergiczne, glutaminergiczne, dopaminergiczne oraz komórki nie będące neuronami (oligodendrocyty, ependymocyty, tanocyty, makrofagi, komórki endotelialne), uwzględnia mnogość specyficznych, dla danych komórek, transkryptów, tworzących kolejne kategorie i podkategorie. Wśród kilku głównych klas neuronów jądra łukowego i wyniosłości przyśrodkowej wyróżniono m.in. neurony wydzielające somatokryninę zwaną również somatoliberyną, kontrolujące wydzielanie przysadkowego hormonu wzrostu. Drugą grupą są dopaminergiczne neurony tuberolejkowate/tuberoprzyśadkowe (TIDA/THDA, ang. *tuberoinfundibular /tuberohypophyseal dopaminergic*), regulujące uwalnianie prolaktyny. Kolejną dużą grupą są te, produkujące kisspeptynę/neurokininę B/dynorfinę wpływające na płodność oraz neurony wydzielające somatostatynę (Sst), działającą przeciwstawnie do somatoliberyny. Dwie kolejne populacje neuronów to właśnie tzw. komórki głodu i sytości, o kluczowej, dla regulacji metabolizmu i przyjmowania pokarmu, roli. Neurony stymulujące apetyt charakteryzują się ekspresją białka AgRP (ang. *Agouti-Related Protein*), a te hamujące go, wykazują ekspresję proopiomelanokortyny POMC (ang. *Proopiomelanocortin*). Wśród dwóch ostatnich grup odnotowano wysoki poziom heterogenności, wynikający ze zmiennego wzoru ekspresji poszczególnych transkryptów w obrębie opisanych klas neuronów w zależności od stanu fizjologicznego badanych zwierząt (głodówka bądź jedzenie *ad libitum*, różna dieta)(Campbell i in. 2017), a także cyklu dobowego (Cedernaes i in. 2020). Udokumentowana została ponadto obecność komórek, które wykazują podwójną (jednoczesna ekspresja *gad1/gad2, th*), a nawet potrójną (jednoczesna ekspresja *gad1/gad2, th, slc17a6*) charakterystykę fenotypową w obrębie szybkiego neuroprzebieżnictwa. To sugeruje, że opisane neurony mogą uwalniać różne typy neuroprzebieżników jednocześnie, bądź przełączać się między trybami neuroprzebieżnictwa w odpowiedzi na docierające sygnały (Romanov i in. 2017). Potwierdzeniem tej hipotezy jest doświadczalna obserwacja Hentges i in., że pewne frakcje neuronów POMC zdolne są do uwalniania neuroprzebieżnika GABA, pomimo, że generalnie klasyfikowane są one jako neurony glutaminianergiczne (Hentges 2004; Hentges i in. 2009). Ponadto, opisano frakcję neuronów POMC zlokalizowanych w wybranym fragmencie jądra łukowego- ARC^{POMC}, która (w przeciwieństwie do neuronów POMC zlokalizowanych w NTS- NTS^{POMC}) wykazywała ekspresję znaczników przebieżnictwa cholinergicznego (VAChT oraz ChT), tylko

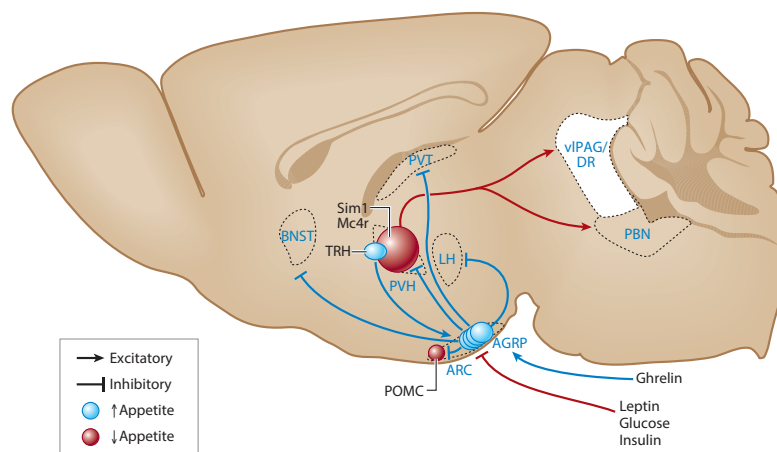
częściowo pokrywającą się z ekspresją anorektycznego czynnika α -MSH, będącego markerem dla neuronów POMC (Meister i in. 2006). Innym przykładem omawianej różnorodności komórkowej jest zidentyfikowana grupa neuronów AgRP, która wykazywała jednoczesną ekspresję Sst, choć do tej pory uważano je za całkowicie oddzielne populacje komórkowe (Campbell i in. 2017).



Rycina 1.1 Zróznicowanie komórek jądra łukowego (ARC) i wyniosłości pośrodkowej (ME) (lewa strona) oraz szczegółowa analiza transkryptomyczna typów neuronów w tym rejonie (prawa strona); tSNE plot (ang. *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) oznacza metodę statystycznej wizualizacji danych wielowymiarowych (na podstawie Campbell i in. 2017).

Głód i jego tłumienie, są głównymi czynnikami napędzającymi i hamującymi przyjmowanie pokarmu. Regulacja związanego z tym zachowania odbywa się na kilku poziomach. Pierwszy związany jest z poszukiwaniem jedzenia, kolejny dotyczy samej konsumpcji i związanego z tym pozytywnego wzmocnienia, a trzeci jest odpowiedzią na zaspokojenie deficytu energetycznego (Sternson i Eiselt 2017). Kanoniczna ścieżka regulująca ten proces zakłada zaangażowanie neuronów głodu AgRP, które są zlokalizowane w jądrze łukowym (opisanych szczegółowo w podrozdziale 1.4.2), które są aktywowane w odpowiedzi na hormonalne sygnały deficytu energetycznego oraz odpowiedzialne za inicjowanie poszukiwania i poboru jedzenia. Ponadto, w konsekwencji działania tych oreksygenicznych (stymulujących jedzenie) neuronów następuje bezpośrednie hamowanie neuronów anoreksygenicznych (hamujących jedzenie) zlokalizowanych w jądrze łukowym (Rau i Hentges 2017) oraz w odległych ośrodkach sytości takich jak PVN oraz PBN (Deniz Atasoy i in. 2012; Essner i in. 2017; M. M. Li i in. 2019). Jednocześnie neurony z NTS w rdzeniu przedłużonym, wysyłające projekcje do PBN, obniżają swoją aktywność. Zmniejszają w ten

sposób siłę oddziaływania na, zlokalizowane w PBN, neurony hamujące pobór pokarmu (Date i in. 2002). Opisane zjawiska są skutkiem podwyższonego poziomu greliny, będącej hormonem głodu, wydzielanym przez komórki trzonu i dna żołądka, oraz obniżonej aktywności zakończeń nerwu błędnego z układu pokarmowego. Ponadto oreksygeniczne neurony ARC komunikują się z jądrem bocznym podwzgórza (LH), odpowiedzialnym za zachowania związane z napędzaniem konsumpcji (zwłaszcza smacznej, odżywczej żywności) (Wiepkema 1971), satysfakcją i pozytywnym wzmocnieniem. Obwody te zaangażowane są w podtrzymanie konsumpcji do momentu uzupełnienia deficytu składników odżywczych. Dodatkowo projekcje oreksygenicznych neuronów ARC do innych, niż ośrodki sytości, miejsc w mózgu, ograniczają konkurujące, z poszukiwaniem i konsumpcją pożywienia, równoległe potrzeby i zachowania (Burnett i in. 2016; Alhadeff i in. 2018; Goldstein i in. 2018; X.-Y. Li i in. 2019).



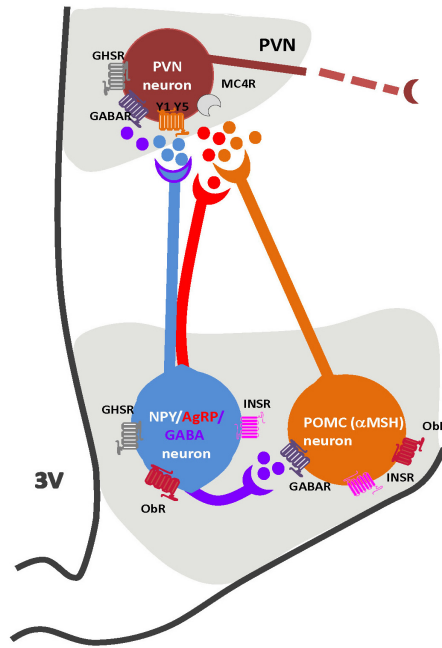
Rycina 1.2 Udział neuronów AgRP w regulacji jedzenia. Czerwonym kolorem zaznaczone są ośrodki sytości, ich projekcje (neurony POMC w ARC oraz neurony Mc4r i Sim1 w PVH projektujące do vPAG/DR i PBN) oraz hormony obniżające apetyt (leptyna, glukoza, insulina). Niebieski kolorem wyszczególniono ośrodki głodu (neurony AgRP w ARC oraz neurony TRH w PVH), a także ich projekcje. Grelina stymuluje neurony AgRP. Po aktywacji neuronów AgRP, ich hamujące projekcje działają na ośrodki takie jak: PVH, BNST, LH i PVT (znaczniki zakończone kreską). Skróty: AGRP, białko związane z Agouti; ARC, jądro łukowate; BNST, jądro łożyskowe prążka krańcowego; DR – grzbietowe jądro szwu, LH- boczne podwzgórze, Mc4r- receptor melanokortyny 4, PBN- jądro pararaszkowe, POMC- proopiomelanokortyna, PVH – przykomorowe jądro podwzgórza, PVT- wzgórze przykomorowe, Sim1- jednokierunkowy czynnik transkrypcyjny 1, TRH- hormon uwalniający tyreotropinę, vPAG- brzuszno-boczna istota szara okołowodociągowa (na podstawie Sternson i in. 2017).

Odwrotne działanie ma miejsce w przypadku dostępności pożywienia i konsumpcji, która natychmiast obniża aktywność neuronów głodu w ARC (Beutler i in. 2017; Zhenwei Su, Alhadeff, i Betley 2017; Alhadeff i in. 2019; Bai i in. 2019). To z kolei osłabia ich hamujące działanie na neurony w PVN oraz PBN. Dodatkowo komórki unerwiające żołądek i jelito, w odpowiedzi na proces trawienia, stymulują neurony w NTS, które z kolei aktywują ośrodek sytości w PBN i PVH. Ich projekcje do neuronów w jądrze łukowatym wyciszają aktywność neuronów głodu.

Nowoczesna analiza transkryptomyczna wyłania szczegółowy obraz komórek podwzgórza, identyfikując nowe grupy i porządkując typy komórek jądra łukowatego. Unaocznia istnienie wysoko wyspecjalizowanych, subtelnych frakcji neuronalnych, co w wielu przypadkach znajduje potwierdzenie w doświadczeniach funkcjonalnych. Jednak mimo złożonej tożsamości transkryptomicznej, w przypadku neuronów regulujących procesy łaknienia i sytości, podział funkcjonalny opiera się o podstawową, binarną zdolność tych populacji- do zwiększenia, bądź zmniejszenia apetytu.

1.4 System melanokortynowy

Identyfikacja dwóch głównych populacji neuronów jądra łukowatego, produkujących POMC oraz peptyd AgRP, a także wykorzystanie modeli genetycznych z nadekspresją białka AgRP (Dubé i in. 1978; Ollmann i in. 1997; Graham i in. 1997) oraz domózgowe podanie peptydów stymulujących (AgRP, NPY) bądź hamujących pobór pokarmu (α -MSH- produktu propeptydu POMC) (Bertolini, b.d.), pomogły zrozumieć ich przeciwstawną rolę w regulacji sytości i łaknienia. Obie populacje neuronalne (neurony AgRP zlokalizowane w ARC, oraz POMC umiejscowione w ARC i NTS) są elementem rozbudowanego systemu melanokortynowego (Cone 2005). Opisany jest on jako układ zdolny do zbierania i przetwarzania informacji niesionej przez wachlarz hormonów, składników odżywczych oraz neuroprzekazników. Owe sygnały mogą mieć charakter szybki, pochodzący z zakończeń wstępujących, biegnących z pnia mózgu, zasilanego zakończeniami nerwu błędnego. Mogą to być również wolne sygnały stanu metabolicznego (takie jak leptyna), rozpoznawane i przetwarzane głównie (ale nie jedynie) w podwzgórzu.



Rycina 1.3 Komunikacja ARC z PVH jako element systemu melanokortynowego. Zlokalizowane w ARC neurony głodu wydzielają neuropeptydy takie jak NPY (kolor niebieski), AgRP (kolor czerwony) oraz neuroprzekaźnik GABA (kolor fioletowy), działające na receptory zlokalizowane w PVH. Populacja neuronów POMC, zlokalizowana również w ARC (kolor pomarańczowy) wydzielają α MSH, który wiążąc się z receptorami MC4R w PVH, aktywuje je, hamując przyjmowanie pokarmu. NPY wiąże się z receptorami Y1 oraz Y5 w PVH, AgRP konkuruje o receptory MC4R, antagonizując działanie α MSH. GABA hamuje aktywność neuronów w PVH, ale działa również lokalnie, w obrębie ARC, obniżając aktywność neuronów POMC. Na neuronach AgRP/NPY oraz POMC zlokalizowane są receptory dla greliny (GHSR), leptyny (ObR) oraz insuliny (INSR), 3V- trzecia komora (na podstawie Reichenbach i in. 2012).

W neuronach budujących układ melanokortynowy występują dwa, spośród pięciu, receptory melanokortynowe (MC3R, MC4R), związane z białkiem G. Ekspresja MC3R oraz MC4R obecna jest w komórkach PVN, VMH oraz ARC, a także w odległych ośrodkach takich jak PBN czy NTS (K. Wang i in. 2020). Do neuronów wykazujących ekspresję receptorów MC3R oraz MC4R docierają zakończenia z obu przeciwstawnie działających populacji komórek- AgRP oraz POMC. Funkcja melanokortyn, takich jak α -MSH oraz ACTH (produktów transkryptu pierwotnego POMC), polega na aktywacji docelowych neuronów z ekspresją receptorów MC3R/MC4R (Aponte, Atasoy, i Sternson 2011). Neuropeptyd AgRP blokuje oba receptory wyciszając tym samym działanie docelowych neuronów systemu melanokortynowego. U myszy całkowite usunięcie genu (ang. *Knock-out*) MC4R powoduje otyłość (Huszar i in. 1997), natomiast u myszy pozbawionych genu MC3R rozwija się syndrom metaboliczny (Butler i Cone 2002).

1.4.1 Charakterystyka neuronów POMC

Ciała komórkowe neuronów POMC zlokalizowane są w ARC oraz NTS, a ich projekcje zidentyfikowano w wielu obszarach mózgu. Mapowanie całego mózgu z wykorzystaniem zmodyfikowanego wirusa wścieklizny (ang. *Rabies virus*), podlegającego transportowi wstecznemu (ang. *retrograde transport*) tzn. z zakończeń aksonu do ciała komórki, odsłoniły bogatą sieć połączeń neuronów POMC (D. Wang i in. 2015). Do neuronów ARC^{POMC} docierają głównie zakończenia z innych jąder podwzgórza oraz ośrodków przodomózgowia i tam też ARC^{POMC} wysyłają swoje zakończenia. Z kolei neurony NTS^{POMC} są miejscem, unerwionym przez zakończenia biegnące z pnia mózgu i mózdzku, a same komunikują się zwrotnie z neuronami w pniu mózgu. Analiza porównawcza wypustek neuronów ARC^{AgRP} oraz ARC^{POMC} pokazała, że sieć zakończeń wysyłanych przez anoreksygeniczne neurony ARC^{POMC} jest znacznie szersza i obejmuje więcej ośrodków niż ma to miejsce w przypadku ARC^{AgRP} (D. Wang i in. 2015).

W rozwoju zarodkowym linia neuronów POMC ma charakter prekursorowy i około połowa z nich daje początek grupie neuronów, które w życiu dorosłym nie wykazują ekspresji propeptydu POMC. Blisko ¼ dorosłych neuronów AgRP wywodzi się właśnie z progenitorowych komórek POMC i tak jak pozostałe neurony AgRP o innym pochodzeniu, wykazuje GABAergiczny fenotyp (Padilla, Carmody, i Zeltser 2010). Zatem część, kluczowych dla regulacji sytości i łaknienia, komórek o przeciwnym działaniu, posiada ten sam filogenetyczny korzeń.

Neurony POMC jako populacja komórek o działaniu hamującym pobór pokarmu, stanowią przeciwagę do oreksygenicznych neuronów AgRP. Swoją nazwę zawdzięczają obecności, wspomnianego już, neuropeptydu proopiomelanokortyny (POMC). Jest to peptyd prekursorowy, który w efekcie specyficznej tkankowo obróbki potranslacyjnej (z udziałem konwertaz PC1/3 oraz PC2, ang. *prohormone convertase*), daje neuropeptydy takie jak adrenokortykotropina (ACTH, ang. *adrenocorticotropic hormone*), melanotropiny α , β , γ (MSH, ang. *melanocyte-stimulating hormone*), peptyd kortykotropinopodobny przedniego płata przysadki (CLIP ang. *corticotropin-like intermediate peptide*), lipotropiny β , γ oraz β -endorfinę (Millington 2007). Myszy z usuniętą sekwencją kodującą genu *Pomc* manifestują zwiększoną masą ciała, która spada o ok. 40% po domózgowych podaniach α -MSH (Yaswen i in. 1999). Neurony POMC zlokalizowane w jądrze łukowatym, wykazują również ekspresję transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART, ang. *cocaine amphetamine-related*

transcript). Jest to neuropeptyd, którego funkcja związana jest z regulacją metabolizmu, jak i układem nagrody oraz odpowiedzią na stres czy ból (M. Zhang, Han, i Xu 2012). W przypadku delecji genu *CART* zwierzęta wykazywały zaburzenia w obrębie sekrecji insuliny i eliminacji glukozy, bez wpływu na pobór pokarmu, jedynie z tendencją do tycia (Wierup i in. 2005).

Obecność na neuronach POMC receptorów dla leptyny (LepR, ang. *leptin receptor*), insuliny (InsR, ang. *insulin receptor*), peptydu glukagonopodobnego 1 (GLP-1R, ang. *glucagon-like peptide receptor*), serotoniny (5-HT_{2C}, ang. *5-hydroxytryptamine receptor*) czy dopaminy (D1R/D2R, z ang. *dopamine receptor*) jest kluczowa w integracji i przetwarzaniu informacji o stanie energetycznym organizmu (Sohn i Williams 2012; Romanova i in. 2018; Biglari i in. 2021). Po aktywacji wymienione receptory uruchamiają kaskady sygnałowe prowadzące do stymulacji neuronów POMC i w konsekwencji zahamowania jedzenia i zwiększenia wydatku energetycznego. Transgeniczne modele zwierzęce z utratą w neuronach POMC genu *lepr*, czy też *insr*, w części przypadków charakteryzowały się, niezależną od jedzenia, otyłością (Hill i in. 2010; Balthasar i in. 2004). Wśród cech charakteryzujących powyższe modele pojawiło się również upośledzenie funkcji lipolitycznej w tkance tłuszczowej (Shin i in. 2017; Könnner i in. 2007) czy wątrobowego metabolizmu glukozy (Caron i in. 2018).

Próby klasyfikacji neuronów POMC rzucają światło na tą wielce zróżnicowaną grupę komórek. Większość podwzgórzowych neuronów POMC jest opisywana jako neurony glutaminianergiczne, niemniej ok. 1/3 wykazuje ekspresję dekarboksylazy kwasu glutaminowego (enzymu biorącego udział w syntezie GABA) w ciele komórkowym oraz pęcherzykowatego transportera GABA (vGAT, ang. *vesicular GABA transporter*), zlokalizowanego w odległych zakończeniach aksonalnych (Hentges 2004). Potwierdziły to badania elektrofizjologiczne na skrawkach, w których stymulacja zakończeń POMC prowadziła do uwolnienia zarówno glutaminianu jak i GABA (Dicken, Tooker, i Hentges 2012; Pennock, Dicken, i Hentges, b.d.). Pomimo to, w doświadczeniach polegających na ich optycznej chemogenetycznej stymulacji, efekt ich działania był powolny i rozciągnięty na przestrzeni godzin, a nie minut (jak ma to miejsce w przypadku neuronów AgRP). Przykładem są badania Zhan'a i in., którzy pokazali, że efekt zahamowania jedzenia był natychmiastowy jedynie w tracie stymulacji neuronów POMC zlokalizowanych w NTS (NTS^{POMC}). W przypadku komórek POMC ulokowanych w ARC (ARC^{POMC}) uzyskanie podobnego efektu wymagało stymulacji w trybie ciągłym, kilkugodzinnym. Z kolei ablacja tych podwzgórzowych neuronów POMC podaniem toksyny błoniczej zaowocowała rozwinięciem otyłości związanej ze

zwiększonym przyjmowaniem pokarmu i ograniczeniem wydatku energetycznego (Zhan i in. 2013). Ten fakt, oprócz powolnej natury odpowiedzi płynącej z ARC^{POMC} , pokazuje rozdzielność funkcji neuronów POMC w zależności od ich lokalizacji, jednocześnie podkreślając ich zaangażowanie w przetwarzanie sygnałów długofalowych mówiących o statusie energetycznym organizmu, jak i tych natychmiastowych, pochodzących z pnia mózgu. Istnienie oddzielnych frakcji neuronów POMC, wysyłających swoje zakończenia w różne obszary mózgu czy wykazujących ekspresję odmiennych białek receptorowych i tym samym pełniących nienakładające się funkcje, potwierdza również praca Biglari i in. (2021). W pierwszej kolejności określili oni oddzielne subpopulacje neuronów POMC (z ekspresją receptora leptyny- $POMC^{LEPR}$ oraz peptydu glukagonopodobnego-1- $POMC^{Glp1r}$), a następnie wykazali, że aktywacja $POMC^{Glp1r}$, w przeciwieństwie do $POMC^{LEPR}$, redukuje apetyt i jest to proces znacznie wydajniejszy niż ma to miejsce w opisywanych w literaturze przypadkach aktywacji całej grupy neuronów ARC^{POMC} (Biglari i in. 2021).

Doświadczenia mapowania połączeń z udziałem rodopsyny kanałowej, pokazały, że anoreksygeniczne neurony ARC^{POMC} znajdują się pod wpływem hamujących oreksygenicznych projekcji ARC^{AgRP} , uwalniających GABA (Deniz Atasoy i in. 2012). Punktem wyjścia był tu obraz z mikroskopu elektronowego, wykazujący wspólną ekspresję NPY oraz GABA na zakończeniach ARC^{AgRP} , tworzących funkcjonalne synapsy z sąsiadującymi, hamującymi pobór pokarmu, neuronami ARC^{POMC} (Cowley i in. 2001). Mimo to, efekt wywierany przez ARC^{AgRP} na ARC^{POMC} nie nosił znamion nagłych, szybkich reakcji związanych z modulacją apetytu. Dodatkowo, wyciszenie aktywności neuronów ARC^{POMC} było niewystarczające, żeby w przeciągu minut przyczynić się do zwiększenia poboru pokarmu. Takie działanie obserwowane było dopiero, gdy zahamowanie ARC^{POMC} trwało 24 godziny. Co więcej, wyłączenie funkcjonalnych połączeń neuronów ARC^{AgRP} do ARC^{POMC} , przy jednoczesnej optogenetycznej stymulacji obu grup neuronów, nie zaowocowało obniżonym apetytem (Deniz Atasoy i in. 2012). Zatem neurony POMC identyfikujemy jako heterogenną grupę komórek, wśród której, te umiejscowione w jądrze łukowatym, są komórkami „wolnej odpowiedzi”, regulującymi metabolizm poprzez rozciągnięte w czasie zahamowanie apetytu oraz zwiększenie wydatku energetycznego.

1.4.2 Charakterystyka neuronów AgRP

Neurony AgRP to niewielka populacja komórek, zidentyfikowana i opisana pod koniec ubiegłego wieku (Shutter i in. 1997; Ollmann i in. 1997), zlokalizowana w ARC. Mapowanie mózgu z wykorzystaniem linii transgenicznych oraz wektorów wirusowych, znakujących fluorescencyjnie wybrane grupy neuronów, odsłoniły rozbudowaną sieć połączeń między zlokalizowanymi w jądrze łukowatym neuronami AgRP, a innymi obszarami mózgu. Pomimo ogólnych podobieństw we wzorze połączeń neuronów ARC^{AgRP} biegnących z różnych rejonów mózgu do neuronów ARC^{POMC} , gęstość tych komunikujących się z neuronami ARC^{AgRP} jest mniejsza. Neurony ARC^{AgRP} są miejscem, w którym spotykają się projekcje biegnące przede wszystkim z jąder podwzgórza, m.in. PVN, DMH, LH, VMH, jądra nadwzrokowego (SO, ang. *supraoptic nucleus*), jądra przedstrzałkowego (PM, ang. *premamillary nucleus*), przysrodkowego jądra przedwzrokowego (MPO, ang. *medial preoptic nucleus*), jak i z odległych obszarów mózgu, takich jak jądro łożyskowe prążka krańcowego (BNST, ang. *bed nucleus of stria terminalis*) (D. Wang i in. 2015). Z kolei największe zagęszczenie zakończeń neuronów ARC^{AgRP} zarejestrowano w PVN oraz BNST (Betley i in. 2013), ale są one obecne również m.in. w MPO, LH, SO, VMH, PM, PBN, istocie szarej okołowodociągowej (PAG, ang. *periaqueductal grey*), ciele migdałowatym (CEA, ang. *central amygdala*) oraz jądrze przykomorowym wzgórza (PVT, ang. *paraventricular thalamus*) (D. Wang i in. 2015; Betley i in. 2013). Podobnie, jak w przypadku ARC^{POMC} , projekcje neuronów ARC^{AgRP} zidentyfikowane w innych mózgowych ośrodkach wskazują na występowanie oddzielnych frakcji komórkowych, z odmiennym potencjałem do wywołania jedzenia, co zostało zbadane w doświadczeniach funkcjonalnych (Betley i in. 2013). Mnogość ośrodków w mózgu, z którymi komunikują się neurony ARC^{AgRP} , rzuca światło na wielopoziomowy charakter regulacji zachowania, związanego z jedzeniem i gospodarką metaboliczną organizmu, choć część z tych związków wciąż wymaga jeszcze szczegółowego poznania.

Neurony ARC^{AgRP} charakteryzują się wspólną ekspresją peptydu AgRP oraz neuropeptydu Y - NPY (Hahn i in. 1998; Horvath i in. 1997). Ekspresja AgRP jest ograniczona do komórek ARC, natomiast ekspresja NPY wykracza znacznie poza obszar jądra łukowatego i rozszkana jest w różnych strukturach mózgu. Niemniej, ARC jest obszarem, w którym występowanie obu peptydów pokrywa się w znacznym stopniu. Neurony ARC^{AgRP} stanowią 95% neuronów ARC^{NPY} . Oba peptydy mają udokumentowane działanie stymulujące apetyt, choć wiążą się z odmiennymi białkami receptorowymi. Dla AgRP, składającego się (u myszy)

ze 111 aminokwasów, kodowanego przez gen *Agrp*, miejscem docelowego działania są, wspomniane już, receptory MC3R, MC4R (Fong i in., b.d.). Neuropeptyd AgRP jest odwrotnym agonistą obu tych receptorów, blokującym działanie cykazy adenylowej. Wpływ na poziom cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu- cAMP przekłada się na transdukcję sygnału w komórce (Ollmann i in. 1997). Wiążąc się z docelowymi receptorami na neuronach ARC^{POMC}, AgRP pośrednio obniża poziom syntetyzowanego przez nie α -MSH. Dodatkowo konkuruje z α -MSH o miejsce wiązania na receptorach MC3R/MC4R, zlokalizowanych w PVH. W ten sposób pośredniczy w mechanizmie hamującym działanie neuronów o charakterze anoreksygenicznym, prowadząc do zwiększania apetytu i obniżenia wydatku energetycznego. Badania poziomu mRNA dla AgRP w znanych modelach otyłości (myszy bez receptora *LepR*, *db/db*; myszy pozbawione genu leptyny *ob/ob*), ujawniły jego znacznie podwyższony poziom (Shutter i in. 1997). W jednym z pierwszych modeli transgenicznych myszy z nadekspresją AgRP opisano otyłość jako kluczową cechę fenotypową (Graham i in. 1997). Ponadto, domózgowe podanie AgRP powiązane ze zwiększoną konsumpcją (Tang-Christensen i in. 2004; Small i in. 2003), zmniejszonym zużyciem tlenu i upośledzoną funkcją brązowej tkanki tłuszczowej (BAT, ang. *brown adipose-tissue*), co przekładało się na zwiększenie masy ciała (Small i in. 2003). Częściowe (dotyczące pojedynczego allelu) usunięcie genu *Agrp* (u myszy dorosłych) manifestowało się umiarkowanym spadkiem masy ciała i popytu na pokarm (Bewick i in. 2005). Z kolei, całkowita eliminacja genu *Agrp* skutkowała skąpym fenotypem u myszy młodych, nabierając wyraźnych cech związanych ze spadkiem masy ciała i redukcją tkanki tłuszczowej, a także podwyższonym poziomem hormonów tarczycy T3 i T4, u zwierząt starszych (Wortley i in. 2005). Ciekawych obserwacji dostarczyły badania, w których usunięto geny kodujące peptydy o przeciwstawnym lub synergistycznym (w kontekście stymulacji jedzenia) działaniu. Podwójny „knock-out” genu *Pomc*, jak i *Agrp*, przypominał model z utratą jedynie genu *Pomc* i charakteryzował się znaczącym wzrostem masy ciała i zapotrzebowania na pokarm. Centralne podanie α -MSH prowadziło do obniżenia apetytu u tych zwierząt, a jednoczesne podanie AgRP znosiło ten efekt (Corander i in. 2011). Z kolei podwójny „knock-out” genu *Agrp* oraz *Npy* (*AgRP^{-/-}NPY^{-/-}*) nie objawił się fenotypem świadczącym o upośledzonym metabolizmie. Zwierzęta *AgRP^{-/-}NPY^{-/-}* nie wykazywały cech związanych ze spadkiem masy ciała czy zmniejszonym apetytem (Qian i in. 2002). Te nieoczywiste obserwacje mogą być wyjaśnione wykształceniem się mechanizmów kompensacyjnych już na etapie rozwoju zarodkowego, tak aby przeciwdziałać ubytkowi kluczowych białek dla regulacji apetytu.

Wspomniany wyżej neuropeptyd NPY, będący drugą składową charakterystyczną dla neuronów ARC^{AgRP}, jest 36-aminokwasowym, bardzo silnie konserwowanym ewolucyjnie, peptydem. W ośrodkowym układzie nerwowym występuje w wielu strukturach, pełniąc tym samym wielorakie funkcje fizjologiczne związane m.in. z aktywnością lokomotoryczną czy regulacją cyklu okołodobowego (Marchant, Watson, i Mistlberger 1997; Singh, Rihel, i Prober 2017; Gribkoff i in. 1998; Błasiak i in. 2017). W stanach patologicznych zaburzenia w funkcjonowaniu NPY kojarzono z napadami padaczkowymi, depresją czy nałogiem alkoholowym. W neuronach ARC kluczową funkcją tego neuropeptydu jest stymulacja jedzenia w obliczu deficytu energetycznego (Glenn Stanley i in. 1986). NPY działa na grupę transbłonowych receptorów Y. Spośród 6 sklasyfikowanych typów receptorów Y (u myszy i szczura), w mózgu najobficiej występuje Y2 (głównie na błonie presynaptycznej) oraz Y1, Y5 oraz Y6 (na błonie postsynaptycznej). Są to receptory związane z białkiem G. Wiązanie NPY prowadzi do zahamowania aktywności cykazy adenylowej i/lub fosfolipazy, prowadząc do wewnątrzkomórkowego zmniejszenia poziomu cAMP, co moduluje transdukcję sygnału. Działanie presynaptycznego receptora Y2 polega głównie na hamowaniu wydzielania neuroprzekazników z komórki presynaptycznej. NPY wykazuje powinowactwo do wszystkich wyżej wymienionych typów receptorów (Pedragosa-Badia, Stichel, i Beck-Sickinger 2013; Yi i in. 2018).

Pierwsze badania, bazujące na domózgowej iniekcji NPY, odsłoniły jego rolę w regulacji metabolizmu i rozwoju otyłości (Glenn Stanley i in. 1986; Zarjevski i in. 1993). Wśród transgenicznych modeli zwierzęcych z nadekspresją NPY pojawiający się fenotyp otyłości w niektórych przypadkach był warunkowany lub wzmagany dietą (Kaga i in. 2001; Bi, Kim, i Zheng 2012), w innych zwierzęta tyły niezależnie od składu pokarmu (Long i in. 2015). Zwiększeniu masy ciała towarzyszyła postępująca hiperglikemia (Kaga i in. 2001) oraz hiperinsulinemia (Kaga i in. 2001; Long i in. 2015), a także zaburzenia termogenezy w obrębie BAT, połączone z odkładaniem białej tkanki tłuszczowej (WAT, ang. *white adipose tissue*) (Billington i in. 1991). Zaangażowanie NPY w metabolizm tłuszczu i regulację termogenezy potwierdziły również badania z wykorzystaniem modeli z utratą funkcji NPY (S. Park i in. 2017; N. J. Lee i in. 2019). Co prawda modele zwierzęce z usuniętym genem *Npy* (NPY^{-/-}), pokazały brak zaburzeń w obrębie masy ciała czy zachowań żywieniowych (J. C. Erickson, Clegg, i Palmiter 1996a), zachowując jednak leptynowrażliwość, warunkującą długoterminową sygnalizację statusu metabolicznego organizmu (zwierzęta reagowały spadkiem masy ciała i ilości zjedzonego pokarmu w odpowiedzi na podanie leptyny). Ponadto, zwierzęta NPY^{-/-} były bardziej podatne na drgawki, co zarysowało rolę NPY jako modulatora hamującego transmisję

pobudzającą. Natomiast w powszechnie znanym modelu *ob/ob* z deficytem leptyny, utrata NPY pomagała zmniejszyć skalę otyłości poprzez ograniczenie apetytu i zwiększenie wydatku energetycznego (Jay C. Erickson, Hollopeter, i Palmiter 1996).

Współczesnym rozwinięciem tych badań jest stosowanie modeli z wyłączeniem ekspresji danego genu, przy jednoczesnej opto- lub chemogenetycznej manipulacji zmodyfikowanej populacji komórek. W ten sposób można wnioskować na temat kluczowej, charakterystycznej dla danego typu komórek, funkcji neuropeptydu. Przykładem są doświadczenia, polegające na opto- i chemogenetycznej stylulacji neuronów AgRP u zwierząt NPY^{-/-}. W przeciwieństwie do modelu z brakiem AgRP czy VGAT, taka stymulacja upośledzała proces jedzenia na przestrzeni pierwszych kilkudziesięciu minut, który jest przywracany po domózgowym dostarczeniu NPY. Na tej podstawie postulowano rolę NPY w podtrzymywaniu, trwającej kilkadziesiąt minut po stymulacji ARC^{AgRP}, ich oreksygenicznej aktywności (Z. Chen 2019).

Samo usunięcie genu *Agrp*, czy *Npy* nie wiąże się z rozwojem u myszy wyraźnego, spodziewanego fenotypu. Znacznie bogatsze obserwacje towarzyszą eliminacji neuronów AgRP oraz towarzyszących im, istotnych w regulacji apetytu czynników (m.in. NPY, GABA). Modele transgeniczne z całkowitą bądź częściową utratą neuronów AgRP manifestują się w diametralnie różny sposób w zależności od stadium rozwojowym, w którym zachodzi opisywana zmiana. Jeśli modyfikacja miała miejsce w mózgu zwierząt dorosłych, wówczas rozwijający się fenotyp miał poważny przebieg, prowadzący do zaniechania przyjmowania pokarmu, skrajnego wychudzenia i ostatecznie śmierci (Gropp i in. 2005; Luquet i in. 2005). Z kolei oseski, które utraciły, przynajmniej częściowo, neurony AgRP w efekcie działania toksyny błoniczej (ang. *diphtheria toxin*), w większości przeżywały, choć w początkowym etapie życia miały upośledzoną funkcję związaną z apetytem nawet w obliczu restrykcji dietetycznej. U zwierząt, które przeżywały ten krytyczny etap (ok. 70%), w życiu dorosłym zarówno masa ciała jak i pobór pokarmu nie wykazywały odchylenia od normy (Tan, Knight, i Friedman 2014). Uzasadnieniem tych rozbieżnych cech fenotypowych między młodymi i dorosłymi zwierzętami pozbawionymi neuronów AgRP, może być częściowa kompensacja wprowadzonej zmiany, dokonująca się w plastycznych mózgu intensywnie rozwijających się młodych zwierząt. Można to również uzasadnić odmienną funkcją, jaką pełnią neurony AgRP u młodych rozwijających się osobników, czy też kształtującą się w czasie, docelową funkcją oreksygeniczną, jak to zostało pokazane w badaniu Zimmer'a i in. Wzrost aktywności neuronów AgRP u osesków obserwowano w trakcie separacji od matki, a bliskość i ciepło matki (w przeciwieństwie do dostępności mleka) obniżały tę aktywność. Dopiero 15-dniowe

oseski rozwijały zwiększony pobór mleka wobec chemogenetycznej stymulacji neuronów AgRP (Zimmer i in. 2019).

Szeroko opisana w literaturze jest zdolność neuronów AgRP do odbierania i przetwarzania informacji niesionej z tkanek obwodowych przez hormony takie jak leptyna, insulina czy grelina (Morton i Schwartz, b.d.; Zigman i Elmquist 2003; Rodríguez, Blázquez, i Guerra 2010; Varela i Horvath 2012; Sohn i Williams 2012; Q. Wang i in. 2014; Steculorum i in. 2016; Flak i Myers 2016; Andermann i Lowell 2017). Leptyna jest „hormonem sytości”, uwalnianym proporcjonalnie do ilości zasobów energetycznych zgromadzonych w tkance tłuszczowej. Jej wysoki poziom odzwierciedla stan „nadwyżki energetycznej”, natomiast brak leptyny jest wyraźnym sygnałem dla organizmu do uruchomienia działań nakierowanych na uzupełnienie deficytu kalorycznego. Komunikacja leptyny z efektorowymi neuronami podwzgórza odbywa się za pomocą receptorów dla leptyny LepR, które znajdują się zarówno na powierzchni neuronów AgRP jak i POMC, a także na neuronach w innych jądrach podwzgórza i poza nim. Doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznym linii zwierząt, polegające na usunięciu *lepr* w neuronach AgRP zaowocowały spadkiem aktywności lokomotorycznej oraz umiarkowanym wzrostem masy ciała. Natomiast brak LepR zarówno na neuronach AgRP jak i POMC poszerzył spektrum dysfunkcji o masywną otyłość spowodowaną hiperfagią, która stabilizowała się do pewnego stopnia u dorosłych zwierząt po podaniu leptyny. Sugeruje to, że leptyno-zależna regulacja głodu odbywa się również z udziałem ścieżek, które omijają neurony ARC (van de Wall i in. 2008). Z kolei obserwacje Xu i in., bazujące na selektywnym usunięciu *lepr* w dojrzałych neuronach AgRP oraz POMC przy wykorzystaniu technologii CRISPR, pokazały, że to brak tych receptorów na neuronach AgRP prowadził do rozwinięcia poważnej otyłości oraz cukrzycy, która imitowała tę obserwowaną u myszy *db/db*. Niedobór leptyny „odhamowywał” aktywność neuronów AgRP, a chemogenetyczne wyciszenie ich aktywności odwracało cukrzycowy fenotyp i wzrost apetytu (J. Xu i in. 2018).

Badania sprzed blisko 20 lat pokazały, że leptyna ma właściwości hiperpolaryzujące neurony AgRP (Spanswick i in. 1997; van den Top i in. 2004) oraz depolaryzujące neurony POMC (Cowley i in. 2001). Dieta prowadząca do otyłości, również może wpływać na zależną od leptyny pobudliwość neuronów AgRP, zmniejszając zdolność odpowiedzi wolno inaktywujących się kanałów potasowych K_v , zakotwiczonych w ich błonie, w reakcji na działanie leptyny (Baver i in. 2014). Ciekawym rozwinięciem mechanizmu działania leptyny na neurony ARC są doniesienia, które podkreślają, że w obliczu braku leptyny czy hipoglikemii, aktywowana jest w pierwszej kolejności oś podwzgórzowo-przysadkowo-

nadnerczowa (HPA, ang. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*) (Perry i in. 2019). Zdaniem Perry i in. brak leptyny prowadzi do wzrostu poziomu kortykosteronu (hormonu stresu), który jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do aktywacji neuronów AgRP w obliczu deficytu kalorycznego.

Insulina działa na neurony AgRP, podobnie jak leptyna, hiperpolaryzując ich błonę. Modele zwierzęce pozbawione InsR na neuronach AgRP wskazują na kluczowe zaangażowanie tych neuronów w wątrobowym metabolizmie glukozy (Könner i in. 2007). Ponadto opto- i chemogenetyczna stymulacja zakończeń ARC^{AgRP} w PVN powodowała insulinooporność i zwiększony pobór pokarmu, a w BNST upośledzała, zależną od miostatyny, ekspresję genów w BAT, wpływając, tym samym, na poziom glukozy w organizmie (Steculorum i in. 2016).

Funkcjonalną przeciwagę dla leptyny stanowi grelina (hormon głodu), która jest wydzielana głównie przez komórki enteroendokryne trzonu i dna żołądka, w odpowiedzi na obniżony poziom glukozy we krwi, spowodowany okresami fizjologicznej głodówki. W mózgu grelina wiąże się z receptorami wydzielania hormonu wzrostu (GhsR, ang. *growth hormone secretagogue receptor*), które zlokalizowane są w różnych ośrodkach regulujących głód i sytość np. NTS. W jądrze łukowatym receptory te obecne są m.in. na oreksygenicznym neuronach ARC^{AgRP} (Zigman i in. 2006). Grelina wykazuje działanie stymulujące apetyt i wspomagające wydzielanie hormonu wzrostu (Tschöp, Smiley, i Heiman 2000; Nakazato i in. 2001). Rolę w regulacji apetytu potwierdziła elektrofizjologiczna aktywacja neuronów ARC^{AgRP} wywołania greliną (Cowley i in. 2003; van den Top i in. 2004; Kohno i in. 2003). Z kolei ablacja receptorów dla greliny GhsR w neuronach ARC^{AgRP} zaburzała stymulujący efekt greliny (S.-R. Chen i in. 2017). Badania przeprowadzone na transgenicznym zwierzętach z globalną utratą greliny czy GhsR wykazały jej rolę w regulacji poziomu glukozy i odpowiedzi na insulinę (Y. Sun i in. 2008; McFarlane i in. 2014; Shankar i in. 2020).

Właściwości neuronów AgRP można badać także poprzez wyłączenie określonych ścieżek przekazywania. Tu również, w zależności od stosowanego modelu badawczego, rozwijający się fenotyp miał różny przebieg. Meng i in., stosując indukowalny model, aktywowanej pod wpływem aminoglikozydów, rekombinazy Cre, upośledzili wybiórczo przekazywanie GABAergiczne w neuronach AgRP (F. Meng i in. 2016). W tym przypadku, zmiana okazała się znacznie bardziej dotkliwa dla zwierząt młodych niż tych w pełni rozwiniętych, dojrzałych osobników. Te pierwsze charakteryzował znaczący spadek masy ciała, spowodowany obniżeniem ilości spożywanego pokarmu, a towarzyszyły temu zaburzenia związane z gospodarką glukozy w organizmie. U zwierząt dorosłych efekt był

jedynie przejściowy. Kluczową rolę tych hamujących połączeń, tworzonych przez neurony AgRP, podkreśla również badanie Wu i in. (2009), skupiające się na GABAergicznym projekcjach ARC^{AgRP} do PBN - ośrodka silnie powiązanego z obniżeniem jedzenia w odpowiedzi na sygnalizację trzewną oraz w przebiegu mdłości. W obliczu ablacji neuronów ARC^{AgRP} myszy rozwijały anoreksję, która była odwracalna w momencie podania agonisty receptora GABA_A-bretazynilu do PBN. W przypadku takich docelowych obszarów mózgu jak PVH, NTS czy PAG terapia bretazynilem okazała się niewystarczająca. Dodatkowo, selektywne upośledzenie biosyntezy GABA w neuronach AgRP prowadziło do obniżenia poboru pokarmu poprzez zniesienie hamującego działania GABA na neurony PBN (Q. Wu, Boyle, i Palmiter 2009). Z kolei myszy, u których neurony AgRP pozbawiono pęcherzykowatego transportera GABA (VGAT, ang. *vesicular GABA transporter*) na etapie rozwojowym, były jedynie szczupłe (a nie wychudzone) i nie rozwijały otyłości po ekspozycji na dietę wysokotłuszczową (Tong i in. 2008).

Suma tych doświadczeń mówi po pierwsze o istotnym zaangażowaniu neuronów AgRP w mechanizmy związane z regulacją apetytu i sytości, które odbywają się nie tylko za pośrednictwem układu melanokortynowego, ale również za pomocą GABAergicznego przekazywania (Zhu i in. 2020). Po drugie podkreśla istotne różnice fenotypowe modeli w zależności od stosowanej strategii, która wprowadza modyfikację u dorosłych osobników bądź też na etapie rozwijającego się zarodka.

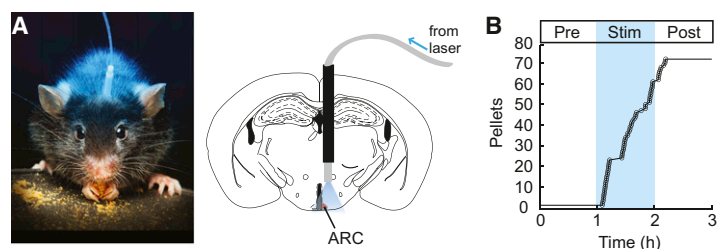
Warty podkreślenia jest również fakt, że usunięcie genu *Agrp* czy upośledzenie wybranych składowych neuronów AgRP (np. przekazywania GABAergicznego, receptorów dla leptyny, greliny czy insuliny) nie jest równoznaczne z ich ablacją, w której wszystkie funkcje tych neuronów zostają wyłączone jednocześnie. Nie należy ich traktować jako modele równoznaczne, tylko uzupełniające się, zwracając przy tym szczególną uwagę na zagadnienia związane z różną penetracją zmiany (odmienny poziom rekombinacji w poszczególnych liniach transgenicznym), a także możliwością rozwinięcia się mechanizmów kompensacyjnych, jeśli wprowadzana modyfikacja rozwija się już na etapie życia płodowego.

Identyfikacja anatomicznych połączeń neuronów ARC^{AgRP} z ośrodkami II rzędu zarysowała obraz ich funkcjonalnych powiązań. Wraz z rozwinięciem nowoczesnych opto- i chemogenetycznych technologii modulujących działanie komórek oraz możliwości badania przyżyciowej aktywności neuronów (GCaMP, ang. *GFP Calmodulin peptide*) możliwa stała się szczegółowa analiza funkcjonalna.

Jedną z pierwszych prac nakreślających synaptyczne połączenia molekularnie zdefiniowanych typów komórek w obwodach neuronalnych, sterujących zachowaniami

żywieniowymi, opisywała właśnie połączenia neuronów AgRP. W oparciu o wykorzystanie wektorów wirusowych AAV o właściwościach anterogradowych, z Cre zależną ekspresją wyznakowanych fluorescencyjnie światłoczułych białek błonowych oraz ich optogenetyczną stymulacją na skrawkach (ang. *Chr2-assisted circuit mapping CRACM*), pokazano miejsca docelowego działania ARC^{AgRP} , takie jak PVH czy PVT (D. Atasoy i in. 2008). Kolejne lata zaowocowały rozwinięciem przyżyciowej, wybiórczej, optogenetycznej (Aponte, Atasoy, i Sternson 2011; Deniz Atasoy i in. 2012; Betley i in. 2013) i chemogenetycznej (Krashes i in., b.d.; Deniz Atasoy i in. 2012; Krashes i in. 2013; Garfield i in. 2015) stymulacji bądź inaktywacji neuronów AgRP, prowadząc do wniosku, że ta grupa komórek jest konieczna i wystarczająca do zainicjowania jedzenia. Zwierzęta najedzone, u których aktywowane zostały neurony AgRP wykazywały zwiększoną motywację do poszukiwania jedzenia i zwiększony apetyt (Krashes i in., b.d.; 2013; Deniz Atasoy i in. 2012). Co więcej, doświadczenia te unaocznily, że pierwszych kilkadziesiąt minut po stymulacji neuronów ARC^{AgRP} , nagły wzrost jedzenia jest regulowany inaczej niż poprzez zahamowanie systemu melanokortynowego (Aponte, Atasoy, i Sternson 2011), z którym związana jest opóźniona, długotrwała i neuromodulująca rola peptydu AgRP w poborze pokarmu (Krashes i in. 2013). Natomiast zarówno GABA, jak i NPY są neuromediatorami uruchamianymi w krótkim czasie tuż po stymulacji ARC^{AgRP} (Krashes i in. 2013). Atasoy i in. pokazali dodatkowo, że aktywacja ARC^{AgRP} komunikujących się z ARC^{POMC} bardzo wyraźnie hamuje aktywność tych drugich. Jednak jednoczesna stymulacja obu typów neuronów, zaowocowała wzrostem jedzenia, co wspiera doniesienia opisujące powolną kinetykę działania neuronów POMC i może świadczyć o tym, że zahamowanie neuronów ARC^{POMC} nie jest warunkiem koniecznym do zainicjowania jedzenia. Ponadto, blokada receptorów dla NPY (Y1) oraz GABA ($GABA_A$) na neuronach PVH, zahamowała stymulowany optogenetycznie pobór pokarmu, wskazując przynajmniej jeden z tych neuromodulatorów jako kluczowy dla natychmiastowego wywołania jedzenia (Deniz Atasoy i in. 2012).

Rozwinięciem tych obserwacji jest doświadczenie, które opisuje, że zwierzęta pozbawione genu *Npy* ($NPY^{-/-}$) w neuronach AgRP nie wykazywały zwiększonego poboru pokarmu w obliczu optogenetycznej stymulacji, jak miało to miejsce w przypadku pobudzenia ARC^{AgRP} w modelu A^y czy $VGAT^{-/-}$, czyli zwierząt z zahamowanym (poprzez ektopowe wydzielanie białka Agouti) systemem melanokortynowym lub bez sygnalizacji GABA w neuronach AgRP (Y. Chen i in. 2019). Również ten wątek podkreśla rolę neuropeptydu NPY, a tym samym neuronów AgRP, w natychmiastowej indukcji poboru pokarmu.



Rycina 1.4 Aktywacja neuronów AgRP jest konieczna i wystarczająca do indukcji jedzenia; A) zdjęcie i schemat poglądowy umiejscowienia światłowodu do optogenetycznej stymulacji neuronów AgRP, B) schemat doświadczenia przedstawiający ilość zjedzonych peletów u zwierząt przed, w trakcie i po fotostymulacji (o częstotliwości 20Hz z 10 milisekundowymi pulsami światła, w reżimie: 1sek stymulacji, 3 sek przerwy) (na podstawie Aponte i in. 2011).

Aktywność neuronów AgRP jest związana ze statusem kalorycznym. U zwierząt najedzonych jest obniżona do minimum w porównaniu do zwierząt głodnych (Krashes i in. 2013; Takahashi i Cone 2005; Betley i in. 2015; Y. Chen i in. 2015; Mandelblat-Cerf i in. 2015; Yang i in. 2011). Udokumentowano to rosnącą ilością pobudzających prądów postsynaptycznych (EPSC, ang. *excitatory postsynaptic currents*) na neuronach ARC^{AgRP} wywołanych stanem głodu (T. Liu i in. 2012). Analogiczny obraz EPSC zarejestrowano w przypadku zwierząt najedzonych, po optogenetycznej stymulacji glutaminergicznych zakończeń, docierających do ARC^{AgRP} (Krashes i in. 2014). Jeden ze scenariuszy tłumaczy to fizjologiczne pobudzenie w stanie głodu działaniem greliny, która wywołuje na błonie presynaptycznej zakończeń docierających do ARC^{AgRP} pozytywną pętlę zwrotną, zależną od kinazy aktywowanej 5'AMP (AMPK, ang. *5'AMP-activated kinase*), utrzymującą aktywność neuronów AgRP na wysokim poziomie, rozumianą jako histereza (Yang i in. 2011).

Co ciekawe, aktywność neuronów AgRP ulega obniżeniu na sam widok jedzenia (Sternson i Eiselt 2017; Y. Chen i in. 2015). Udokumentowano, że u osobników ze swobodnym dostępem do jedzenia aktywność tych neuronów rosła gradacyjnie w miarę upływu godzin i wzmagającego się głodu. Natomiast u zwierząt poddanych restrykcji pokarmowej sam widok jedzenia obniżał tę aktywność, choć nie wygaszał jej do momentu konsumpcji (Mandelblat-Cerf i in. 2015). Na poziomie ścieżek neuronalnych, mechanizm, leżący u podstaw tej obserwacji miałby opierać się na tym, że aktywowane głodem neurony AgRP są nośnikiem awersyjnej informacji, zaangażowanej w ścieżkę powiązaną z neuronami LH^{Vglut2} (*Vglut2*, ang. *vesicular glutamate transporter isoform 2*) i DMH^{LepR} . Modulowane przez te ośrodki uczenie się, związane z sensorycznym rozpoznawaniem wskazówek jedzeniowych, prowadziło do przejściowego obniżenia aktywności neuronów AgRP, będącego informacją o pozytywnym wydzwieku (Berrios i in. 2021). Zatem naturalnym, docelowym kierunkiem wydaje się dążenie

organizmu do obniżenia aktywności neuronów AgRP. Ich chemogenetyczna stymulacja, w obliczu braku dostępnego jedzenia, odsłoniła zaangażowanie tej wąskiej grupy neuronów w powtarzalne stereotypowe zachowania związane z żerowaniem i przemieszczaniem się, a także obniżeniem poziomu lęku, które były wyciszane wraz z dostępnością pożywienia (Dietrich i in. 2015). Potwierdza to wielomodalną rolę neuronów AgRP, która z jednej strony kieruje zachowaniami związanymi z poszukiwaniem jedzenia, z drugiej zaś z samą konsumpcją. Nakłada się na to element związany z uczeniem się i pozytywnym wzmocnieniem, jakim niewątpliwie jest posiłek, w który również neurony AgRP mogą być bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane. Andermann i Lowell sugerują, że sama wielkość porcji i częstotliwość posiłków ma znaczenie dla kinetyki wyciszania aktywności neuronalnej AgRP. Ważna jest również kaloryczność posiłku, która jest często korelowana z atrakcyjnością pożywienia. Aktywność AgRP ustaje wraz z konsumpcją, aczkolwiek mniejsze porcje jedzenia wyciszają ją znacznie słabiej niż duże, kaloryczny posiłek (Andermann i Lowell 2017).

1.5 Cząsteczki mikroRNA w regulacji procesów biologicznych.

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) to krótkie (~ 18 – 24 nt), jednoniciowe, niekodujące fragmenty RNA, które dzięki swoim właściwościom wiązania się do matrycowego RNA (mRNA), regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Zakres procesów biologicznych, w których uczestniczą, obejmuje kluczowe dla przeżycia i funkcjonowania obszary zarówno życia płodowego jak i dorosłego organizmu. Dotyczą one rozwoju i różnicowania, regulacji cyklu komórkowego (związanego m.in. z proliferacją, apoptozą i autofagią), szlaków sygnałowych, angiogenezy, odpowiedzi układu odpornościowego, metabolizmu leków oraz procesów plastycznych m.in. związanych z uczeniem się (Tüfekci, Meuwissen, i Genç 2014; Nakano i Nakajima 2018; Fiorenza i in. 2016; W. Konopka i in. 2010; Witold Konopka, Schütz, i Kaczmarek 2011; Zhenyi Su i in. 2015). Nieprawidłowości w obrębie miRNA-zależnej regulacji tych procesów zaobserwowano w wielu stanach patologicznych, a niektóre miRNA, ulegające sekrecji do płynów ustrojowych, zyskały miano molekularnych biomarkerów stanów chorobowych (Almeida, Reis, i Calin 2011; Nagaraj i in. 2019; Wojda 2016).

Pierwsze doniesienia opisujące istnienie miRNA pojawiły się w 1993 roku, kiedy to dwie niezależne grupy badawcze zidentyfikowały niekodującą cząsteczkę *lin-4*. Okazała się ona negatywnie regulować ekspresję genu *lin-14* u nicienia *Caenorhabditis elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, i Ambros 1993; Wightman, Ha, i Ruvkun 1993). Niedługo potem odkryto kolejną

cząsteczkę regulatorową let-7 (Reinhart i in. 2000; Pasquinelli i in. 2000). Te wydarzenia zapoczątkowały badania skupiające się na klasyfikacji coraz to nowych endogennych cząsteczek miRNA w genomach szeregu modelowych organizmów (S.-C. Li i in. 2010; Friedländer i in. 2014), a ponadto zwróciły uwagę na znaczenie biologiczne tych cząsteczek, które nie kodują białek.

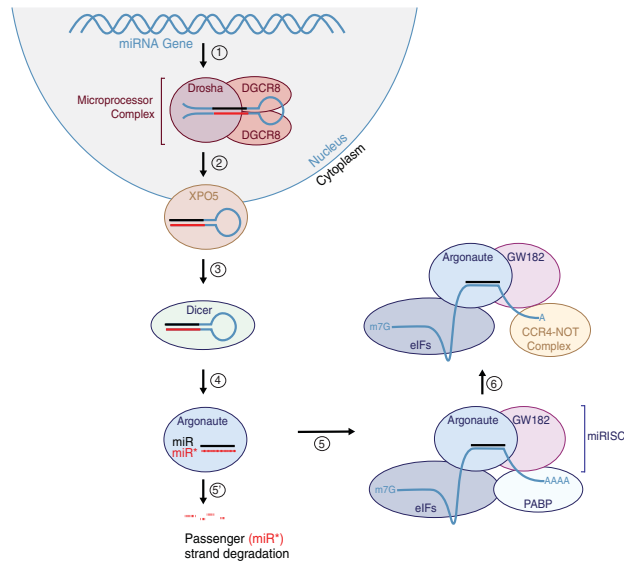
1.5.1 Biogeneza cząsteczek mikroRNA.

Powstawanie funkcjonalnych cząsteczek miRNA odbywać się może na drodze kanonicznej, charakteryzującej większość opisanych dotąd miRNA, oraz niekanonicznej, skupiającej wybrane ich przypadki. Różnice między obiema ścieżkami wiążą się m.in. z odmiennym umiejscowieniem i konfiguracją sekwencji kodującej miRNA w genomie oraz procesem ich dojrzewania, polegającym na szeregu potranskrypcyjnych modyfikacji z udziałem lub bez udziału określonych enzymów.

Genomowa lokalizacja sekwencji kodujących miRNA jest zróżnicowana. Większość stanowi oddzielne jednostki transkrypcyjne, umiejscowione w znacznej odległości do genów, posiadające własne sekwencje regulatorowe (Lagos-Quintana i in. 2001; Lau i in. 2001; Rosalind C. Lee i Ambros 2001; Zhou i in. 2007). Natomiast jest pewna frakcja miRNA, która zakodowana jest w intronach i regulowana aktywnością sekwencji promotorowych genów, w obrębie których się znajduje (Lagos-Quintana i in. 2001; Aravin i in. 2003; Lai i in. 2003). Opisano również miRNA, które zlokalizowane są w egzonach genów (Maselli, Di Bernardo, i Banfi 2008). Transkrypcja miRNA (w formie pojedynczych cistronów lub długich, policistronowych fragmentów) (Y. Lee 2002; Tanzer i Stadler 2004) ma miejsce w jądrze i uczestniczy w niej polimeraza RNA typu II (w wybranych przypadkach polimeraza typu III) (Yoontae Lee i in. 2004). Te pierwotne transkrypty, zwane pri-miRNA, mają rozbudowaną drugorzędową strukturę, złożoną z jednego lub więcej motywu typu „szpilka do włosów”, czapeczkę 7-metyloguanozyny na końcu 5' i ogon polyA na końcu 3' (Cai 2004; Yoontae Lee i in. 2004).

W przypadku ścieżki kanonicznej pri-miRNA jest rozpoznawane i cięte przez kompleks enzymów, zwany mikroprocesorem. Identyfikacja, przez wspomniany kompleks, drugorzędowej struktury pri-miRNA jest etapem krytycznym w procesie kierowania wybranych szpilek RNA na drogę biogenezy miRNA (Shomron, Golan, i Hornstein 2009; Roden i in. 2017; Creugny, Fender, i Pfeffer 2018). W skład mikroprocesora wchodzi białko

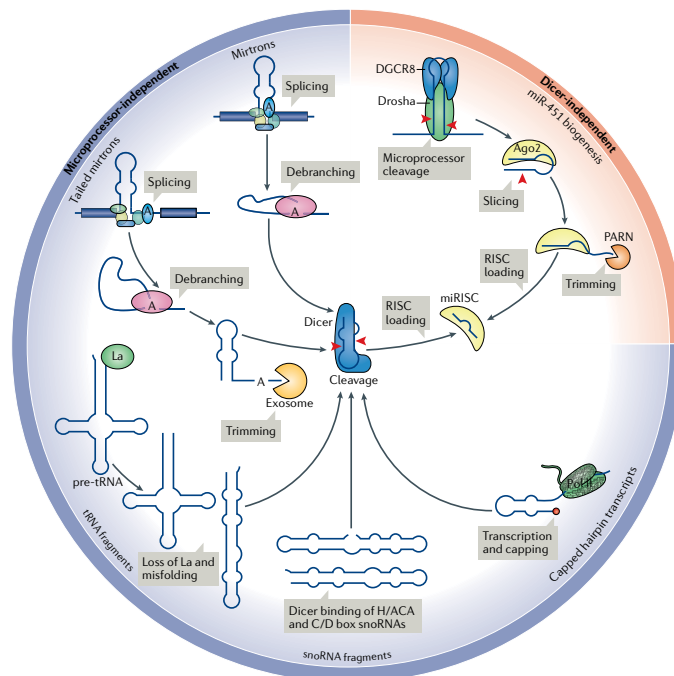
DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region 8*), identyfikujące sekwencje w strukturze „rdzenia” (zwanego „seed”) pri-miRNA, a także RNaza typu III - Drosha, która odcina ramiona nukleotydowe przy podstawie szpilki. W ten sposób cząsteczka osiąga status pre-miRNA i transportowana jest przez Eksportynę 5, w kompleksie z kofaktorem Ran-GTP, poza obszar jądra. W cytoplazmie, około 70-nukleotydowe pre-miRNA, z charakterystycznym dwunkleotydowym wolnym fragmentem na końcu 3' (Han 2004), ulega kolejnej modyfikacji, polegającej na odcięciu pętli w strukturze szpilki, osiągając formę ok. 22 nukleotydowego dupleksu miRNA. Dzieje się to za pośrednictwem endonukleazy Dicer, która jest RNazą typu III (Bernstein i in. 2001; Grishok i in. 2001; Hutvágner i in. 2001; Ketting 2001; Knight i Bass 2001; Denli i in. 2004; C. Okada i in. 2009) i działa w kompleksie m.in. z białkiem TRBP (ang. *Transactivating response RNA-binding protein*), stabilizującym wiązanie enzymu Dicer z pre-miRNA (Chendrimada i in. 2005; Förstemann i in. 2005; Haase i in. 2005; Jiang 2005; Saito i in. 2005). Dupleks miRNA składa się z nici sensownej 5p (niegdyś zwanej wiodącą) oraz nici antysensownej 3p (pasażerskiej, oznaczanej również znakiem *). Taki dwuniciowy kompleks miRNA-miRNA wchodzi w interakcję z grupą białek biorących udział w późniejszym wyciszeniu ekspresji genów w procesie interferencji RNA (RISC, ang. *RNA-induced silencing complex*). Jednym z głównych białek kompleksu RISC jest białko Argonaute (Ago), ale w jego skład wchodzi również Dicer oraz DGCR8 (Schwarz i in. 2003). W znaczącej liczbie przypadków ramię 5p dupleksu wiąże się z Ago, a nić 3p ulega degradacji. Selekcja i wiązanie odpowiedniej nici dupleksu przez Ago odbywa się na podstawie rozpoznawania zasady nukleotydowej na końcu 5' każdego ramienia miRNA (z preferencją dla uracylu) oraz określania stabilności termodynamicznej każdego z końców dupleksu (Frank, Sonenberg, i Nagar 2010). Kompleks RISC w połączeniu z dojrzałym jednoniciowym, wyselekcjonowanym przez białko Ago, miRNA, ma zdolność wiązania docelowej cząsteczki mRNA na jej końcu 3'UTR celem wyciszenia translacji (znacznie częściej) lub degradacji nici mRNA (Hutvágner i Zamore 2002).



Rycina 1.5 Biogeneza kanonicznych miRNA: 1) transkrybowane w jądrze miRNA tworzą strukturę szpilki do włosów, która 2) ulega modyfikacji przez jądrowy kompleks Drosha/DGCR8, zwany mikroprocesorem, 3) transport niedojrzałego miRNA z jądra do cytoplazmy odbywa się z udziałem Eksportyny-5 (XPO5), 4) prekursorowe miRNA ulega modyfikacji przez Dicer, a powstały dupleks miRNA kotwiczony w białku Argonaute, 5) nić wiodąca dupleksu pozostaje związana z Argonaute tworząc indukowany miRNA kompleks wyciszający (miRISC), druga nić ulega degradacji, 6) sekwencja rdzenia „seed” miRNA determinuje wiązanie się kompleksu miRISC do konkretnej cząsteczki mRNA celem wyciszenia translacji. Skróty: DGCR8- region krytyczny DiGeorge Syndrome 8, GW182- białko z powtórzeniami glicyny i tryptofanu o masie 182 kDa, CCR4-NOT- represor katabolityczny węgla 4; regulator negatywny transkrypcji, PABP- białka wiążące Poly-A, eIFs- eukariotyczne czynniki inicjacji (na podstawie Medley i in. 2021).

W przypadku obróbki miRNA na drodze niekanonicznej, można wyszczególnić ścieżkę niezależną od Drosha/DGCR8 lub białka Dicer. Ta druga dotyczy bardzo ograniczonej liczby przypadków. Większość niekanonicznych miRNA występuje w genomie w postaci mirtronów, czyli sekwencji zakodowanych w intronach genów kodujących białka. Wraz z procesem obróbki potranskrypcyjnej genu, formowane są i uwalniane z intronów cząsteczki pre-miRNA. Omijają tym samym konieczność udziału mikroprocesora, w ich dojrzewaniu. Ulegając drobnym modyfikacjom, trafiają bezpośrednio do cytoplazmy (za pomocą Eksportyny 5), poddawane są enzymatycznemu cięciu przez białko Dicer. Innym przykładem miRNA nie wymagających obecności mikroprocesora, ale zależnych od nukleazy Dicer, są te, które wywodzą się z małych jąderkowych RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*) lub tRNA, albo zlokalizowane są na końcu 5' genów regulowanych aktywnością Polimerazy II. Te ostatnie zaopatrzone są w czapkę 7-metyloguanozyny na końcu 5', która nie jest odcinana (jak ma to miejsce w przypadku ścieżki kanonicznej) i stanowi punkt rozpoznawczy dla Eksportyny 1, przenoszącej takie pre-miRNA do cytoplazmy. Po cięciu przez Dicer, wciąż obecna na końcu

5' czapeczka uniemożliwia „załadowanie” kompleksu RISC ramieniem 5p miRNA. Wpływa to na selektywne procesowanie przez Ago jedynie nici 3p danego pre-miRNA (Xie i in. 2013). Opisano również biogenezę, specyficzną dla erytrocytów, cząsteczki miRNA-451, która całkowicie omija udział białka Dicer (ze względu na niewystarczającą długość prekursora), ale ulega modyfikacji przez Ago2, który przycina jedno z ramion pre-miRNA w miejscu „seed”, a następnie cząsteczka, żeby mogła stać się w pełni funkcjonalna, jest procesowana przez PARN (ang. *Poly(A)-specific ribonuclease*) (Herrera-Carrillo i Berkhout 2017). Niekanoniczne miRNA, choć powstają na drodze zmodyfikowanej sekwencji wydarzeń i angażują nieco zmieniony zestaw enzymów, na końcowym etapie współtworzą (tak jak kanoniczne miRNA) funkcjonalny kompleks regulujący aktywność translacyjną cząsteczek mRNA.



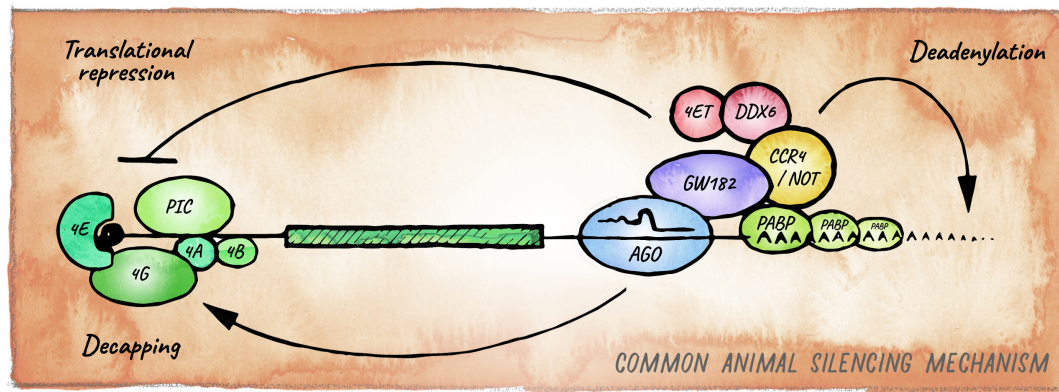
Rycina 1.6 Biogeneza niekanonicznych mikroRNA. Cząsteczki miRNA niezależne od mikroprocesora obejmują klasyczne mirtrony oraz te, z wystającym ramieniem 5' lub 3'. Oba typy mirtronów powstają na skutek splicingu. Dodatkowo, wybrane cząsteczki tRNA przyjmując strukturę szpilki do włosów, przypominają prekursorowe miRNA. Podobnie dzieje się z małymi jąderkowymi RNA (snoRNA). W obu przypadkach rozpoznawane są jako substrat dla enzymu Dicer. Również produkty Polimerazy RNA II, w kształcie spinek do włosów, mogą klasyfikować się do enzymatycznego działania białka Dicer. Transport wszystkich wymienionych prekursorowych cząsteczek miRNA z jądra do cytoplazmy odbywa się z udziałem Ekspertyny-1. Szlak biogenezy miRNA niezależny od Dicer obejmuje niezwykle krótką cząsteczkę typu spinka do włosów- miR-451. Jest ona przecięta przez Argonaute 2 i procesowana przez rybonukleazę poli(A)-specyficzną (PARN); DGCR8- region krytyczny DiGeorge 8, RISC- kompleks wyciszający indukowany RNA (na podstawie Treiber i in. 2019).

1.5.2 Funkcja mikroRNA.

Według informacji z bazy danych miRBase (v.22), będącej kolekcją wszystkich opisanych dotąd cząsteczek miRNA, u człowieka zidentyfikowano 1917 prekursorowych

cząstek miRNA, natomiast u myszy odpowiednio 1234 (Kozomara, Birgaoanu, i Griffiths-Jones 2019). Te liczby nie odzwierciedlają zakresu ich działania, ponieważ pojedyncza cząsteczka miRNA jest zdolna do regulowania wielu docelowych sekwencji informacyjnego RNA. Ponadto, jedno mRNA może być wiązane przez różne cząsteczki miRNA. Według informacji z bazy danych, będącej kolekcją interakcji miRNA-mRNA (miRTarBase), opisanych zostało ponad 13 tysięcy potwierdzonych oddziaływań między miRNA, a docelowym mRNA (H.-Y. Huang i in. 2019). To wiązanie wykorzystuje zasadę komplementarności, bądź częściowej komplementarności i dopasowania wspomnianego już fragmentu *seed* cząsteczki miRNA (obejmującego nukleotydy 2-8) (Grimson i in. 2007), z miejscem na docelowym mRNA, zwanym MRE (ang. *miRNA response elements*), zlokalizowanym najczęściej w regionie 3'UTR (ang. *3'untranslated region*). Dużo rzadziej wiązanie miRNA-mRNA odbywa się w obrębie 5'UTR i sekwencji kodujących mRNA (W. Xu i in. 2014). Gdy połączenie miRNA z docelowym mRNA, w obrębie fragmentu *seed*, jest całkowite, prowadzi to do wyciszenia translacji (scenariusz występujący znacznie częściej). Dzieje się to poprzez uformowanie podstawowej, funkcjonalnej, jednostki, zwanej miRISC (ang. *miRNA-induced silencing complex*). W jej skład, poza miRNA, wchodzi przede wszystkim białko rodziny Ago oraz GW182 (ang. *Glycine-Tryptophan-Repeat Containing Protein of 182 kDa*). Poznanie dokładnej sekwencji wydarzeń w mechanizmie zależnej od miRNA interferencji jest wciąż przedmiotem badań. Niemniej, wiadomo, że GW182 wpływa na lokalne zwiększenie stężenia deadenylaz takich jak PAN2-PAN3 (ang. *Poly-A-specific Ribonuclease*) oraz CCR4-NOT (ang. *Carbon Catabolite Repressor 4; Negative Regulator of Transcription*), a także szeregu dodatkowych czynników (Dexheimer i Cochella 2020; Kuzuoğlu-Öztürk i in. 2016). Nić mRNA, aby mogła pełnić funkcję matrycy gotowej do produkcji białka, wymaga zachowania w swojej strukturze czapeczki na końcu 5' oraz ogonu poly(A) na końcu 3'. Każdy z tych elementów jest „osłaniany” przez charakterystyczne grupy białek. Na końcu 5' mRNA są to eukariotyczne czynniki inicjujące eIFs (ang. *eukaryotic initiation factors*), a na końcu 3' - PABPs (ang. *Poly-A-Binding Proteins*). Wspólnie z mRNA tworzą one, chroniony przed degradacją, kolisty kompleks. Udokumentowana została rola miRISC w promowaniu oddysocjowywania czynników eIF od mRNA, prowadzącego do zaburzenia kolistej struktury kompleksu i destabilizacji nici (Fukao i in. 2014; Fukaya, Iwakawa, i Tomari 2014; Meijer i in. 2013). Następnie, w efekcie zależnej od PAN2-PAN3 oraz CCR4-NOT deadenylacji, odcięcia czapeczki przez enzym DCP2 (ang. *mRNA Decapping Enzyme*) następuje represja translacji (bez konieczności degradacji mRNA) (Fabian, Sundermeier, i Sonenberg 2010; Iwasaki, Kawamata, i Tomari 2009; Wakiyama i in. 2007;

Zdanowicz i in. 2009). W przypadku całkowitej komplementarności pomiędzy rejonem *seed* miRNA, a mRNA następuje degradacja mRNA, a dzieje się to za pośrednictwem białka Ago2 (Jo 2015).



Rycina 1.7 Mechanizm wyciszania translacji w organizmach zwierzęcych. Zazwyczaj jest kombinacją działań polegających na represji translacji i promocji rozpadu mRNA. Częsteczką miRNA w kompleksie z Argonaute wiąże się z docelową nicią mRNA, a po dołączeniu GW182 tworzą rdzeń kompleksu miRISC. GW182 oddziałuje z PABP i rekrutując kompleksy deadenylaz CCR4-NOT lub Pan2-Pan3 (nie pokazano) prowadząc do deadenylacji, odcięcia czapeczki i ostatecznego egzonukleolitycznego rozpadu mRNA. Hamowanie translacji ma miejsce najczęściej w początkowym etapie interferencji poprzez wpływ na czynniki eIF4F, eIF4E-T oraz DDX6 (ang. *probable ATP-dependent RNA helicase*) (na podstawie Dexheimer i in. 2020).

Ciekawej, uzupełniającej informacji na temat miRNA dostarcza coraz większa ilość publikacji, które opisują właściwość miRNA do transportu między komórkami. Ta komunikacja może się odbywać na drodze bezpośrednich, szczelinowych połączeń między sąsiadującymi komórkami lub poprzez zamykanie cząstek miRNA w pęcherzykach różnego pochodzenia. Takie pęcherzyki mogą mieć charakter lizosomalny lub być fragmentem uwypuklonej błony komórkowej (np. w postaci ciałek apoptotycznych), zabezpieczając miRNA przed degradacją przez RNazy i transportując je lokalnie, ale także na duże odległości. W ten sposób uwalniane np. przez komórki neuroendokrynne microRNA, niejednokrotnie w kompleksie z białkami hormonalnymi, może pełnić funkcje regulacyjne poza komórką, z której się wywodzi (Mussbacher i in. 2021; O'Brien i in. 2020; S. Park i in. 2017; Saliminejad i in. 2019).

1.5.3 Neurospecyficzna utrata cząsteczek mikroRNA, a fenotyp otyłości.

Pierwsze próby stworzenia modeli zwierzęcych z delecją genów regulujących formowanie dojrzałych cząsteczek miRNA, okazały się letalne (Bernstein i in. 2003; Y. Wang i in. 2007; Morita i in. 2007). Pokazano tym samym krytyczną, dla prawidłowego rozwoju, rolę

miRNA. Naturalnym krokiem było działanie polegające na wyłączeniu funkcji enzymów procesujących miRNA, ale w ściśle określonym czasie i miejscu. W ten sposób stworzono indukowalne, działające w systemie Cre-loxP (opisanym szczegółowo w podrozdziale 1.6.3) modele zwierzęce, bez wpływu na okres kształtowania się zarodka, ale z selektywną mutacją w wybranych populacjach komórek osobników dorosłych. Masywna, neurospecyficzna utrata dojrzałych cząsteczek miRNA, w odpowiedzi na upośledzenie funkcji genu *Dicer1*, została w literaturze szeroko opisana. Zawężając obszar zainteresowania do wpływu tej modyfikacji na fenotyp otyłości, należy odnieść się do kilku opisanych, do tej pory, prac. Jednego z pierwszych opisów fenotypu otyłości u myszy pozbawionych miRNA w mózgu, dokonał Konopka i inni. W doświadczeniach skupiających się na pamięci i uczeniu się, zanotował jednoczesny wzrost masy ciała w grupie mutantów pozbawionych miRNA w neuronach z aktywnym promotorem CaMKII α (Konopka i in. 2010; Vinnikov i in. 2014). Kolejne grupy badawcze rozwinęły ten model, podkreślając powtarzalny charakter wprowadzanej zmiany oraz rozwijającą się otyłość związaną ze zwiększonym poborem pokarmu (Mang i in. 2015; Fiorenza i in. 2016; Vinnikov i in. 2014). Ponadto, profile transkryptomyczne potwierdziły nadekspresję genów zaangażowanych w ścieżki związane z metabolizmem (Mang i in. 2015) oraz zmianami plastycznymi (Fiorenza i in. 2016). Fiorenza i in., zwiększoną podatność na drgawki, szybsze uczenie się oraz rozwijającą się otyłość u zwierząt pozbawionych miRNA w neuronach przodomózgowia, uzasadniła obniżonym progiem pobudliwości zmienionych neuronów (Fiorenza i in. 2016). W międzyczasie pojawiły się doniesienia na temat selektywnej utraty funkcjonalnych cząsteczek miRNA (poprzez usunięcie genu *Dicer1*) w neuronach POMC. Dwie niezależne grupy badawcze powiązały tę zmianę z rozwinięciem fenotypu otyłości, która w jednym przypadku została skorelowana ze zwiększonym apetytem (Schneeberger i in. 2013), a w drugim, przeciwnie ze zmniejszoną ilością zjedzonego pokarmu w grupie mutantów (Greenman i in. 2013). Oba doniesienia udokumentowały postępującą w czasie degenerację neuronów POMC, upatrując to za przyczynę rozwijającego się fenotypu otyłości. W każdym opisywanym przypadku zauważono ponadto obniżony poziom transkryptów *Agrp* oraz *Npy* w badanym wycinku jądra łukowatego mutantów, co implikuje, że utrata genu *Dicer1* w badanym modelu, dotknęła nie tylko neurony POMC. Uzasadnieniem tego założenia jest wykorzystany w powyższych dwóch badaniach nieindukowalny model cre-zależnych myszy transgenicznych. Postępujący w nich proces utraty miRNA rozpoczyna się już w życiu płodowym i dotyka m.in. komórki progenitorowe, które odróżnicowują się następnie w oddzielne populacje neuronalne.

Brak jest publikacji naukowych opisujących wybiórcze usunięcie genu *Dicer1*, w populacji neuronów AgRP. Wiadomo, że cząsteczki miRNA są kluczowe dla prawidłowego

rozwoju i właściwej morfogenezy w mózgu (Q. Li i in. 2011). Być może próby stworzenia transgenicznego zwierzęcia (w nieindukowalnym modelu Cre-zależnym), z masywną utratą miRNA w tej wąskiej i kluczowej dla przeżycia, populacji neuronów, okazało się technicznie niemożliwe ze względu na letalny charakter modyfikacji. Tym samym powstała przestrzeń do udoskonalenia narzędzi i metod badawczych, które pozwalają rozwinąć powyższe zagadnienie, czyli celowaną do komórek AgRP mutację genu *Dicer1* u osobników dorosłych.

1.6 Metody celowanej modyfikacji genetycznej neuronów

1.6.1 Zwierzęta transgeniczne

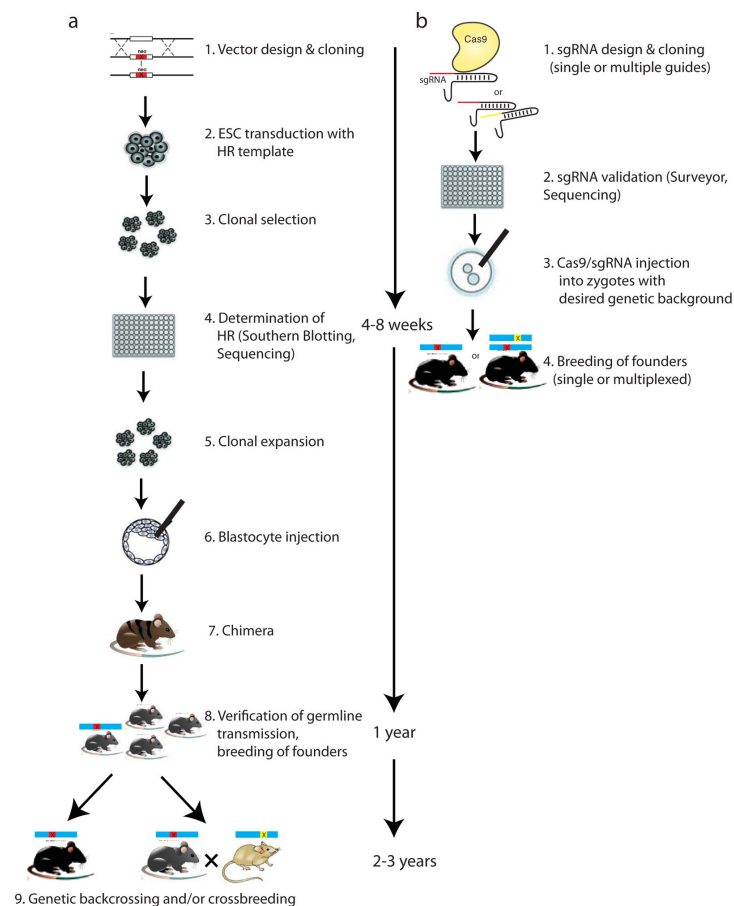
Warunkiem prowadzenia genetycznych badań funkcjonalnych w organizmach żywych, jest istnienie narzędzi i metod modyfikacji genów, dzięki którym możliwe jest wprowadzanie pożądanych zmian. Rozwój inżynierii genetycznej oraz embriologii doświadczalnej umożliwił stworzenie zwierząt transgenicznych. Jako organizmy modelowe są one nośnikiem określonych zmian. Jednocześnie ich stworzenie wymaga zastosowania innych nośników, których zadaniem jest samo wprowadzenie modyfikacji do genomu. Zwierzęta transgeniczne są jednym z podstawowych modeli badania funkcji genów i ich produktów, w procesach fizjologicznych, w rozwoju i przebiegu chorób, a także w testowaniu potencjalnych rozwiązań terapeutycznych. Dzieje się to poprzez utratę (całkowitą bądź częściową) funkcji danego genu i jego produktu białkowego (ang. *loss of function*), jak i poprzez modyfikację czy aktywację genu (ang. *gain of function*). Ten drugi przypadek dotyczy zarówno powstawania zmutowanego białka o alternatywnej funkcji, jak i nadekspresji niezmiennego genu, prowadzącego do syntezy właściwego białka w ilości нефизjologicznej. Jednym z najszerszej wykorzystywanych gatunków do tworzenia modeli zwierząt transgenicznych jest mysz domowa *Mus musculus*. Decyduje o tym m.in. fakt relatywnie dużego filogenetycznego podobieństwa między myszą a człowiekiem. Pozwala to na odtworzenie i badanie skomplikowanych zależności, z możliwością translacji uzyskanych wyników na organizm ludzki. Ponadto, koszt wytworzenia i utrzymania transgenicznych myszy jest stosunkowo niski, ich cykl rozrodczy jest krótki, a potomstwo w miocie stosunkowo liczne. Dodatkowo, dostępny jest dobrze rozwinięty wachlarz technologii, który pozwala na względnie proste wprowadzanie modyfikacji genetycznych (Huijbers, b.d.; Gama Sosa, De Gasperi, i Elder 2010; Picciotto i Wickman 1998; Shrock i Güell 2017; Ahmad i in. 2018; Bouabe i Okkenhaug 2013; Watson, Paxinos, i Puelles 2012).

Istnieje kilka wyjściowych metod tworzenia transgenicznych myszy oraz wiele ich odmian. Do tych podstawowych metod należą m.in. mikroiniekcja obcego DNA do przedjądrzy zapłodnionej komórki (PI, ang. *pronuclear injection*) lub celowana modyfikacja zarodkowych komórek macierzystych (ESC, ang. *embryonic stem cells*), które następnie wprowadzane są do blastocysty, implantowanej u samicy biorkzyni. W uproszczeniu, wybór odpowiedniej metody zależy od tego, czy badany ma być efekt utraty (KO, ang. *knock-out*) czy nadekspresji danego genu. PI wykorzystywana jest przede wszystkim w tworzeniu modeli z nadekspresją genu. Wprowadzany w ten sposób obcy materiał integruje do genomu różną ilość kopii, najczęściej w losowe miejsca. Z kolei modyfikacje ESC stosuje się tam, gdzie wprowadzana zmiana (usunięcie genu lub jego modyfikacja) dedykowana jest ściśle określone miejsce w genomie. Dzieje się to przy zastosowaniu wektorów o dużej pojemności, zawierających sekwencje niezbędne do zajścia rekombinacji homologicznej. W ten sposób tworzone są modele typu KO czy KI (ang. *knock-in*). Dodatkowe znaczenie, dla obu metod, ma etap rozwoju zarodkowego, na którym następuje integracja obcego DNA. Im wcześniej w rozwoju nastąpi, tym większa szansa, że modyfikacja znajdzie się w linii komórek zarodkowych, z możliwością przekazania jej potomstwu. Z kolei integracja na etapie wielokomórkowego zarodka może skutkować powstaniem genetycznej chimery.

Krokiem milowym w rozwoju metod transgenezy celowanej było odkrycie i zastosowanie technologii CRISPR/Cas9 (opisana szczegółowo w podrozdziale 1.6.4). Dzięki niej, możliwa stała się szybka i precyzyjna edycja genomu, zarówno w kierunku tworzenia myszy typu KO, jak i KI. Technologia ta znalazła zastosowanie na różnych etapach transgenizacji, poczynając od wprowadzania modyfikacji w zapłodnionej komórce, poprzez zarodkowe komórki macierzyste wstrzykiwane do blastocysty, czy wreszcie interwencję lokalną w dojrzałym organizmie (Shrock i Güell 2017).

Wprowadzane zmiany genetyczne mogą mieć charakter stabilny, mogą być uruchamiane warunkowo (w obecności konkretnych białek enzymatycznych) lub indukowane w określonym czasie i przestrzeni (Huijbers, b.d.). Modyfikacja stabilna nie podlega zmianie, raz wprowadzona pozostaje aktywna. Przykładem może być usunięcie genu w linii zarodkowej. Z kolei zmiany warunkowe (ang. *conditional*), choć wprowadzane są na stałe, to uruchamiane są jedynie w obecności miejscowo-specyficznych rekombinaz. Usunięcie wybranego genu następuje wtedy jedynie w obecności rekombinazy Cre. W tym przypadku wzór ekspresji Cre dyktuje typ komórek, w których zachodzi pożądana modyfikacja. Zmiana indukowalna oznacza, natomiast, że można ją w określonych warunkach czasu i przestrzeni włączyć i niekiedy wyłączyć. Tak działa system tetracyklinowy oraz ten, ze zmodyfikowaną rekombinazą

CreERT2 (opisany szczegółowo w podrozdziale 1.6.3). Jego działanie bazuje na obecności liganda, który aktywuje translokację CreERT2 z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie wprowadzone są cięcia w genomie. Również w tym przypadku wzór ekspresji rekombinazy determinuje pulę zmodyfikowanych komórek, ale dodatkową funkcjonalnością jest regulacja w czasie. O uruchomieniu mutacji decyduje moment dostarczenia do układu liganda.



Rycina 1.8 Porównanie na osi czasu dwóch różnych metod tworzenia zwierząt transgenicznych. A) klasyczna rekombinacja homologiczna (HR) w embrjonalnych komórkach macierzystych (ESC). Wymaga zaprojektowania i klonowania docelowego wektora (1), transdukcji ESC (2), selekcji klonów (3) potwierdzenia tożsamości genetycznej (4) generowania i weryfikacji chimer (5-8), kojarzenia/kojarzenia wstecznego w celu uzyskania pożądanego tła genetycznego, B) metodologia CRISPR/Cas9 w zarodkach jednokomórkowych. Wymaga projektowania i klonowania sgRNA (single guide RNA) (1), weryfikacji wydajności celowania sgRNA (2), mikroiniekcji Cas9/sgRNA do zygoty (3), potwierdzenia modyfikacji genetycznej u założycieli i kojarzenia ich bez konieczności długotrwałego kojarzenia wstecznego (4) (na podstawie Heidenreich i in. 2016)

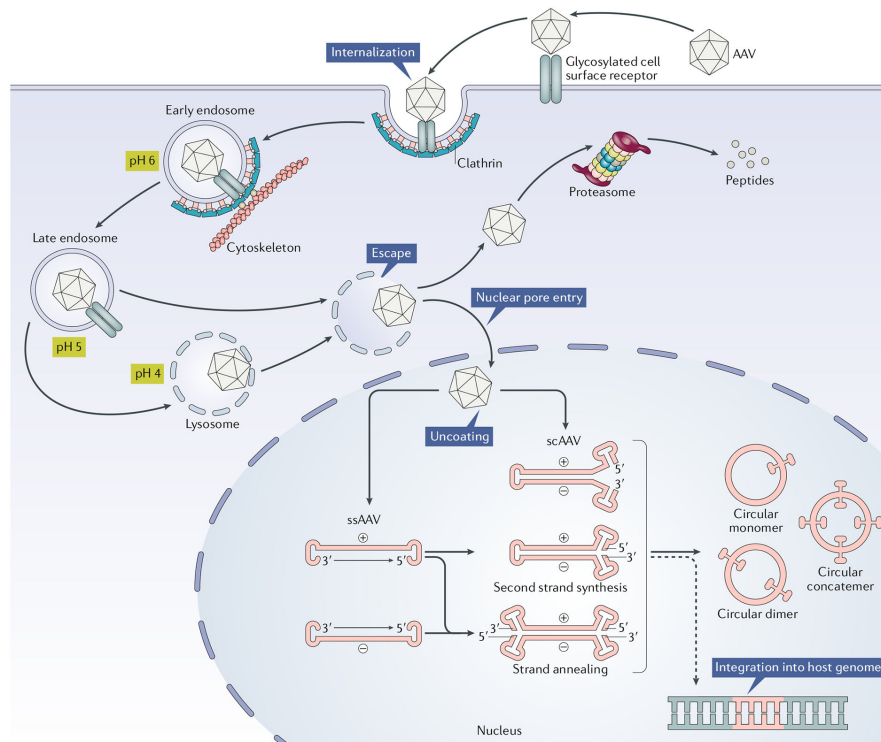
Zastosowanie tak zaprojektowanych modeli zwierzęcych, pozwala na wprowadzenie pożądaney zmiany, w zdefiniowanym *locus* genomu, w określonych typach komórek i tkanek (lub ich części) oraz w ściśle określonym czasie.

1.6.2 Rekombinowane wektory wirusowe AAV

Spośród wielu dostępnych wektorów wirusowych, wykorzystywanych jako narzędzie do wprowadzania modyfikacji genetycznych w mózgu, jednym z najbardziej rozpowszechnionych są dependowirusy (AAVs, ang. *Adeno-associated viruses*). Są to niewielkie wektory nie posiadające otoczek, których matrycę stanowi jednoniciowe DNA (ssDNA, ang. *single-strand DNA*). Na obu jego końcach znajdują się 145-nukleotydowe sekwencje ITR (ang. *inverted terminal repeat*), które formują II-rzędową strukturę w kształcie litery „T”. W środowisku naturalnym, genom wirusów AAV koduje informację o białkach niezbędnych do budowy kapsydu (gen *cap*) oraz białek replikacyjnych (gen *rep*). Mimo to, zarówno wirusy AAV, jak i rekombinowane wektory AAV, do namnożenia się, potrzebują dodatkowych białek dostarczanych *in trans*. Są to produkty genów pochodzących z adenowirusów. Narzędzia biologii molekularnej pozwoliły na modyfikację genomu AAV w taki sposób, by zastąpić geny *rep* i *cap*, sekwencją kodującą pożądaną gen wraz z elementem promotorowym, o sumarycznej długości nie przekraczającej 4,4 tysięcy par zasad. Usunięcie genów *rep* i *cap* upośledza funkcję replikacyjną rekombinowanych wirusów. Choć pojemność AAV jest pewnym ograniczeniem (Dong, Fan, i Frizzell 1996), to ta grupa wektorów jest powszechnie wykorzystywana ze względu na niski stopień immunogenności w porównaniu z innymi stosowanymi wektorami wirusowymi. Wyjątek stanowią prace opisujące stany zapalne czy toksyczne działanie wektorów AAV przy bardzo dużym, lokalnie stosowanym, mianie wektorów (Rezai Amin i in. 2019; Hordeaux i in. 2020). Kolejną ich korzystną cechą jest to, że w warunkach laboratoryjnych i modelach zwierzęcych funkcjonują głównie w formie episomalnej, uruchamiając, trwającą wiele tygodni, a nawet miesięcy, ekspresję docelowego genu. Odsetek tych, które integrują (zazwyczaj w losowe miejsca genomu) to zaledwie 0,1%. W środowisku naturalnym z kolei, wirusy AAV infekujące komórki ludzkie, mogą integrować w określone miejsce na chromosomie 19 (zwane AAVS1), funkcjonując w formie latentnej (McCarty, Young, i Samulski 2004; Deyle i Russell 2010).

Szeroki tropizm (powinowactwo) wektorów AAV do różnych typów komórek, determinowany jest ich serotypem, czyli unikatowym składem, proporcją i modyfikacjami na N-końcu 60 cząsteczek białkowych budujących kapsyd AAV (VP, ang. *viral proteins*). Jest to mieszanina 3 białek VPs (VP1, VP2, VP3), których zróżnicowane stechiometryczne stosunki wpływają na heterogenność kapsydu (Wörner i in. 2021). VP1 oraz VP2 oprócz wspomnianych modyfikacji na N-końcu, zawierają w swojej strukturze sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*), która pomaga cząsteczkom wirusowym wnikać do jądra. Jak

dotąd zidentyfikowano 11 naturalnie występujących serotypów AAV. Receptorami pierwszego wyboru są dla nich ugrupowania glikanu na powierzchni komórek, takie jak proteoglikany siarczanu heparanu, N-końcowa galaktoza, ugrupowania N- o O-kwasu sialowego (Summerford i Samulski 1998; Shen i in. 2011; L.-Y. Huang, Halder, i Agbandje-McKenna 2014; Z. Wu i in. 2006; Kaludov i in. 2001; Seiler i in., b.d.).



Rycina 1.9 Cykl infekcji komórki przez rekombinowane wektory AAV. Po związaniu wektorów AAV z glikozylowanymi receptorami na powierzchni komórki następuje ich internalizacja na drodze endocytozy. Wczesny endosom opłaszczony klatryną przemieszcza się w cytozolu za pośrednictwem cytoszkieletu. Niskie pH endosomu powoduje zmiany konformacyjne białek kapsydu VP1/VP2. Po uwolnieniu z endosomu AAV może ulec proteolizie przez proteasom lub zostać przetransportowany do jądra, w którym następuje rozpad białek kapsydu. Stosowane są dwie klasy rekombinowanych AAV: jednocieniowy (ssAAV ang. *single-strand AAV*) oraz samokomplementarny (scAAV, ang. *self-complementary AAV*). ssAAV do zajęcia transkrypcji wymagają uzyskania formy dwuniciowej poprzez syntezę brakującej nici przez polimerazę DNA komórki gospodarza lub połączenie nici sensownych i antysensownych, pochodzących od innych współobecnych w jądrze rAAV. scAAV jest dwuniciową formą gotową do transkrypcji. Wirusowe sekwencje ITR mogą prowadzić do rekombinacji wewnątrzcząsteczkowych oraz między cząsteczkowych, prowadząc do wytworzenia form episomalnych. Niekiedy genom wektorowy może ulegać integracji z genomem gospodarza (na podstawie Wang i in. 2019).

Pilley i in., zidentyfikowali ponadto receptor AAV (AAVR), znany jako KIAA0319L, który rozpoznawany jest przez większość serotypów AAV i pełni kluczową rolę w procesie internalizacji wektora do wnętrza komórki, wpływając na wydajność transdukcji (Pillay i in. 2016).

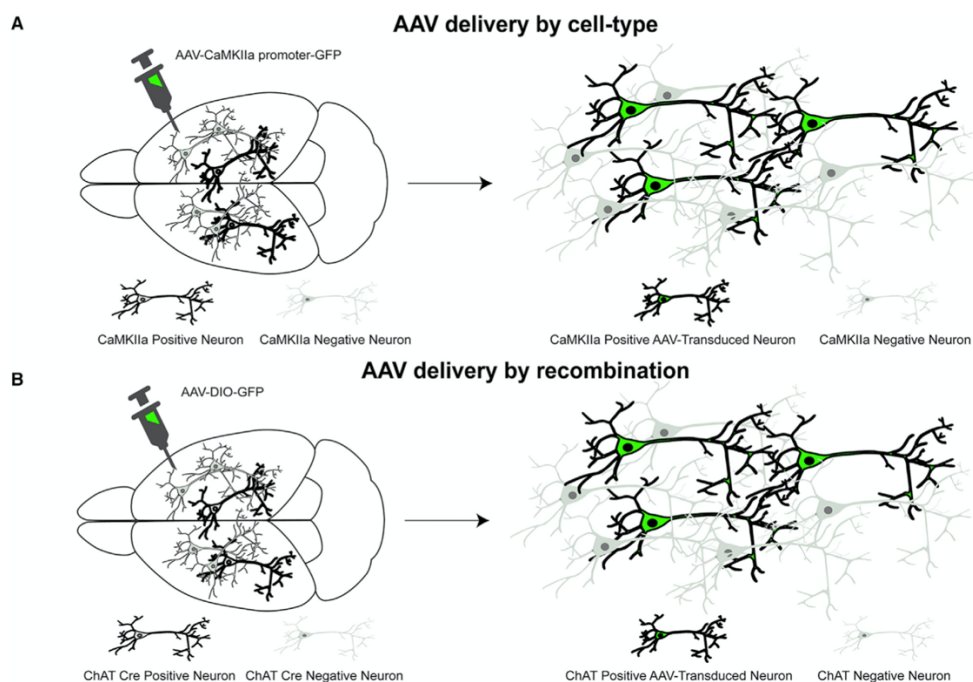
W badaniach mózgu wykorzystywane są właściwości poszczególnych serotypów AAV zarówno do infekowania wybranych typów komórek (neuronów, astrocytów, oligodendrocytów, komórek macierzystych etc.), jak i do dwukierunkowego transportu. Szeroko udokumentowane są właściwości anterogradywne i retrogradywne większości serotypów (Tervo i in. 2016), a w przypadku AAV1 i AAV9 również transsynaptyczne (Castle, Perlson, i in. 2014; Castle, Gershenson, i in. 2014; Hutson, Kathe, i Moon 2016; Zingg i in. 2017; Haery i in. 2019). Warta uwagi jest obserwacja, że kierunek transportu danego serotypu zależy może od stosowanego miana (Zingg i in. 2017) lub czasu, który upłynął od iniekcji wektora (Kaspar i in. 2002; Sondhi i in. 2007).

Serotype	Transport Direction		Expression by Brain Region			Cell-Type Expression		
	Anterograde	Retrograde	Striatum	Hippocampus	Cortex	Neurons	Astrocytes	Microglia
rAAV1	+	+	*	*	*	***	*	**
rAAV2	+	+	*	*	*	*		
rAAV5	+		***	***	*	**	*	
rAAV6	-	+	*	*	**	**		
rAAV7	+	+	**	**	***	**	**	**
rAAV9	+	+	**	*	***	***		

Tab 1.1 Porównanie właściwości serotypów AAV. Gwiazdką * oznaczono relatywny poziom ekspresji transgenu wprowadzanego na poszczególnych wektorach AAV: * niski, ** pośredni, *** wysoki; znakiem + oznaczono zdolność do transportu we wskazanym kierunku (na podstawie Haggerty i in. 2020).

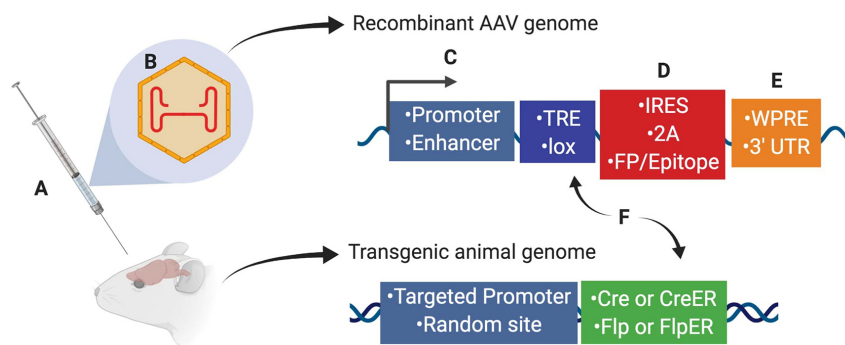
Stosując odpowiedni serotyp lub jego modyfikacje (mozaika co najmniej dwóch lub więcej serotypów), uwzględniając dodatkowo promotor sterujący ekspresją transgenu oraz sekwencje regulujące stabilność RNA i późniejszą translację, można modulować specyficzność działania wektorów (Haery i in. 2019; Haggerty i in. 2020).

Wektory AAV w połączeniu z system Cre-loxP (opis w podrozdziale 1.6.3) (Sengupta i in. 2017) oraz transgenicznymi liniami reporterowymi (z Cre-zależną ekspresją fluorescencyjnych białek reporterowych), umożliwiają manipulację wyselekcjonowaną grupą komórek. W ten sposób badano zarówno funkcję wybranej populacji neuronów, jak i mapowano połączenia rozbudowanej sieci neuronalnej (Winnubst i in. 2019; Tervo i in. 2016; M. He i in. 2016; Wickersham i in. 2007; Gradinaru i in. 2010; K. T. Beier i in. 2011; Kevin T. Beier 2019; Nassi i in. 2015; Luo, Callaway, i Svoboda 2018). W powyższej kombinacji wektory AAV mogą dostarczać Cre-zależne (otoczone fragmentami loxP) sekwencje reporterowe lub efektorowe, a obecna w transgenicznym zwierzęciu rekombinaza Cre, warunkuje uruchomienie ekspresji danego genu w wybranej grupie komórek (Lu i in. 2013). Innym stosowanym układem jest domózgowa iniekcja wektorów AAV, niosących sekwencję Cre, która modyfikuje *in vivo* fragment genomu, pomiędzy odcinkami loxP (Ahmed i in. 2004; Abdallah i in. 2018).



Rycina 1.10 Przykład wykorzystania rAAV w celowanej modyfikacji neuronów. A) wykorzystując wektory AAV z promotorem specyficznym dla typu komórki, można uzyskać ekspresję transgenu ograniczoną do specyficznej populacji neuronów; w przykładzie pokazano wektor AAV kodujący GFP pod kontrolą promotora zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny kinazy białkowej II α (CaMKII α); B) ekspresja wektora AAV może być ograniczona do określonych populacji neuronów przy użyciu zwierząt transgenicznnych z ekspresją Cre w określonych typach komórek (w powyższym przykładzie Cre ulega ekspresji w komórkach z aktywnością acetylotransferazy cholinowej ChAT). W tym przypadku wprowadzany wektor AAV ma sekwencję kodującą GFP w podwójnie floksowej orientacji odwrotnej (DIO, ang. *double-floxed inverse orientation*). Dzięki temu obecna w neuronach ChAT rekombinaza wycina i odwraca orientację sekwencji DIO uruchamiając ekspresję GFP (strategia „Cre-on”). Alternatywnie, w strategii „Cre-off”, Cre może odwracać orientację sensowną transgenu powodując brak jego ekspresji (na podstawie Haggerty i in. 2020).

Literatura bogata jest w przykłady będące rozwinięciem opisywanego układu, które nadają dodatkową funkcjonalność w postaci aktywacji bądź zahamowania aktywności neuronalnej. Dzieje się to za sprawą opto- (Tye i Deisseroth 2012; Yizhar i in. 2011; Boyden i in. 2005; Boyden 2011; Deisseroth 2015) i chemogenetycznych narzędzi (Armbruster i in. 2007; Roth 2016). Wektory AAV w obu przypadkach są najczęściej nośnikami Cre-zależnych genów kodujących zmodyfikowane receptory DREADD czy światłoczułe kanały jonowe takie jak ChR2 lub eNpHR.



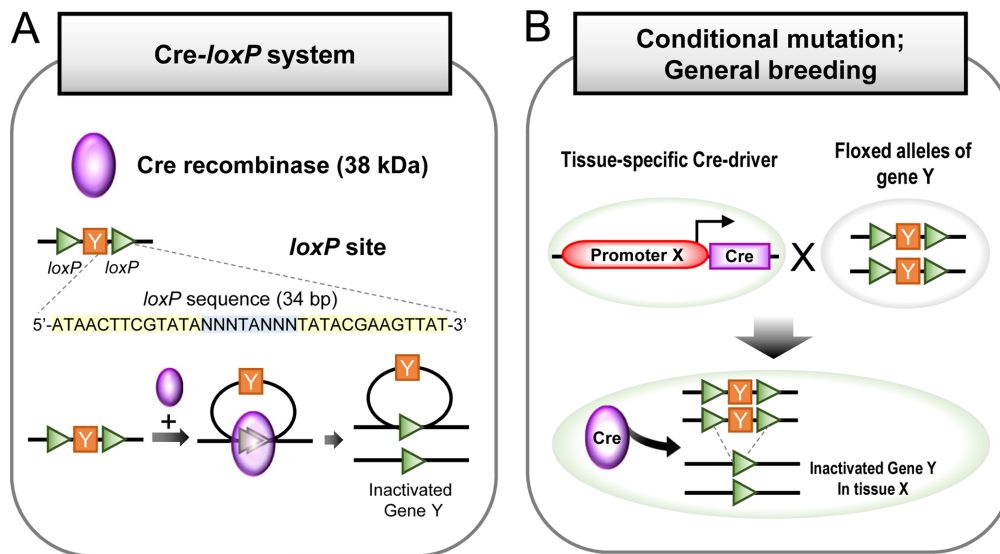
Rycina 1.11 Wybrane aspekty projektu eksperymentalnego przy wykorzystaniu modeli zwierząt transgenicznych oraz wektorów AAV jako nośników A) sposób dostarczenia wektora, B) kompozycja białek kaspidy, C) promotory i/lub wzmacniacze kierujące ekspresją genu D) elementy IRES lub 2A do ekspresji wielocistronowej z białkami fluorescencyjnymi (FP) lub epitopami białkowymi, E) potranslacyjne elementy regulatorowe, takie jak WPRE lub 3'UTR F) ekspresja rekombinazy (Cre, CreERT2, Flp, FlpER) pochodząca z transgenicznych linii, regulowana aktywnością określonego promotora (wbudowana na drodze ukierunkowanej lub losowej integracji) oraz elementy ekspresji zależne od niej (lox) lub liganda (TRE); skróty: TRE- element odpowiedzi na tetracyklinę, lox- sekwencja loxP, IRES- wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu, 2A- sekwencja do samorozszczepienia, FP- białko fluorescencyjne, WPRE- posttranskrypcyjny element regulacyjny wirusa zapalenia wątroby świstaka (na podstawie Haery i in. 2019).

1.6.3 System Cre-loxP

Pierwsza udokumentowana obserwacja modyfikacji genetycznej z udziałem rekombinazy Cre oraz sekwencji loxP, dotyczyła bakteriofaga P1 (Yarmolinsky i Hoess 2015; Sauer i Henderson 1988; N. Sternberg i Hamilton 1981). Kolejne lata przyniosły iteracje systemu w komórkach ssaczy oraz zaowocowały stworzeniem zwierząt transgenicznych, wykorzystywanych przede wszystkim do badania funkcji genów poprzez ich delecję (Zheng i in. 2000; Arakil, Araki, i Yamamura, b.d.; Tsien i in. 1996; Orban, Chui, i Marth 1992; Sauer i Henderson 1988; Lakso i in. 1992).

Funkcjonalność opisywanego systemu opiera się na dwóch elementach: obecności w DNA 34-nukleotydowych sekwencji loxP (**l**ocus **o**f **x**-**o**ver, **P**1) oraz rekombinazy Cre (**c**yclization **r**ecombinase). Fragmenty loxP składają się z 8 nukleotydowego „rdzenia”, który z każdej strony otoczony jest 13-nukleotydową odwróconą, palindromiczną sekwencją. Rozpoznawane są one przez rekombinazę Cre, która należy do rodziny tyrozynowych rekombinaz miejscowo-specyficznych (podobnie jak flipaza Flp oraz rekombinaza D6 Dre). Cre, identyfikując charakterystyczne odcinki loxP, wycina (lub odwraca- w zależności od orientacji fragmentów loxP) sekwencję znajdującą się pomiędzy nimi, generując dwa

fragmenty DNA (kolisty, z wyciętym fragmentem oraz docelowy, z pozostałą po rekombinacji fuzyjną sekwencją loxP).

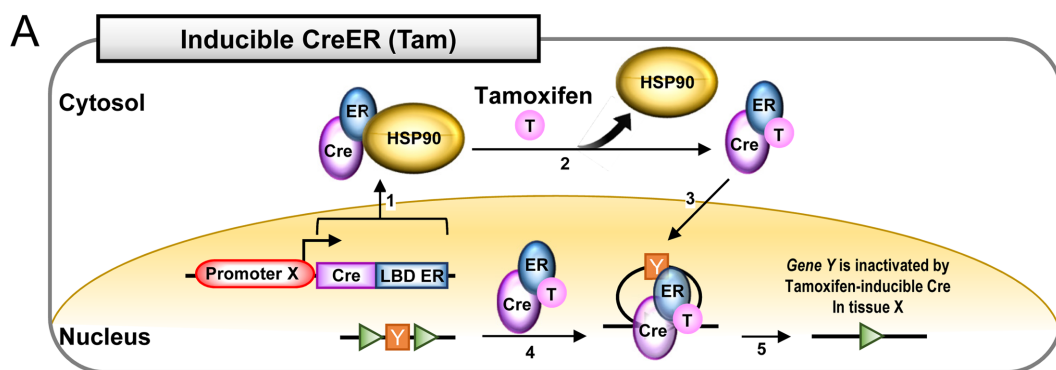


Rycina 1.12 System Cre-loxP. A) Rekombinaza Cre rozpoznaje miejsca loxP i wycina sekwencję znajdującą się pomiędzy nimi, B) strategia hodowlana dla warunkowej mutacji polegająca na skojarzeniu zwierząt z tkankowo specyficzną ekspresją Cre z osobnikami, których docelowy fragment otoczony jest sekwencjami loxP. U potomstwa ekspresja Cre będzie ograniczona do określonego typu komórek i wytnie odcinek pomiędzy sekwencjami loxP tylko w wybranych neuronach (na podstawie Kim i in. 2018).

Aby mówić o regulacji systemu Cre-loxP w dedykowanym czasie i przestrzeni, powyższy układ należy uzupełnić o specyficzny tkankowo lub komórkowo promotor. W takim przypadku ekspresja Cre jest warunkowana aktywnością określonego promotora, wobec czego rekombinacja ograniczona jest do wybranej grupy komórek. W modelach zwierzęcych taki układ uzyskuje się dwuetapowo, poprzez łączenie zwierząt ze specyficzną tkankowo ekspresją Cre z osobnikami, u których fragment do wycięcia otoczony jest sekwencjami loxP. Potomstwo zawiera wówczas wszystkie składowe systemu, niezbędne do ograniczonej w przestrzeni rekombinacji. To na co należy zwrócić uwagę, to fakt, że u potomnych osobników Cre uruchamiana jest już w życiu płodowym, zatem modyfikacja, choć zawężona do wybranej populacji komórek, nie ma wyznaczonych ram czasowych i dotyczy każdego etapu rozwojowego, na którym aktywny jest promotor regulujący Cre. Wzór rekombinacji u osobników dorosłych odzwierciedla wówczas aktywność promotora kierującego Cre również z etapu rozwojowego.

Rozwinięciem powyższego systemu jest uzupełnienie go o komponentę precyzyjnie regulowaną w czasie. Dzieje się to poprzez modyfikację rekombinazy Cre w taki sposób, żeby

uruchamiana tylko poprzez aktywację ligandem. Można w ten sposób uzyskać rekombinację w wybranych komórkach dopiero postnatalnie, u rozwiniętych osobników, pozostawiając badaną sekwencję nienaruszoną podczas całego rozwoju zarodkowego. Modyfikacja Cre polega na stworzeniu fuzyjnego wariantu rekombinazy z receptorem estrogenowym (CreERT2)(Feil i in. 1996; Brocard i in. 1997), zawierającym zmutowaną, udoskonaloną domenę wiążącą ligand ER-LBD (ang. *estrogen receptor ligand binding domain*). To udoskonalenie domeny receptora estrogenowego polega na właściwości selektywnego wiązania syntetycznego liganda - tamoksyfenu, a nie endogennych hormonów (Feil i in. 1996; Brocard i in. 1997). CreERT2 przebywa w cytoplazmie, w formie związanej z białkiem szoku cieplnego 90 HSP90 (ang. *heat shock protein 90*) do czasu pojawienia się syntetycznego steroidowego liganda dla ER-LBD (jak tamoksyfen czy 4-hydroksytamoksyfen). Wiązanie tamoksyfenu, a dokładnie jego aktywnej metabolicznie formy, z domeną receptora estrogenowego w białku fuzyjnym, powoduje translokację CreERT2 do jądra, a następnie jej interakcję z sekwencjami loxP. W tym układzie warunkiem zajścia rekombinacji jest uzyskanie odpowiedniej ilości funkcjonalnej rekombinazy w jądrze komórkowym poprzez kilkudniową ekspozycję zwierząt na tamoksyfen podawany dootrzewnowo. Ten indukowalny system pozwala na badanie wpływu utraty genów w selektywnej grupie komórek u osobników dorosłych.



Rycina 1.13 Indukowany Tamoksyfenem system CreER. Rekombinaza Cre transkrybowana jest jako białko fuzyjne ze zmodyfikowaną domeną receptora estrogenowego (ER) wiążącą ligand- Tamoksyfen. Pod nieobecność Tamoksyfenu ekspresjonowane białko CreER oddziałuje z białkiem szoku cieplnego 90 (HSP90) i występuje w cytoplazmie (1), podawanie Tamoksyfenu zakłóca interakcję CreER-HSP90 (2) i w postaci związanej z domeną ER indukuje translokację CreER do jądra (3). W jądrze CreER rozpoznaje miejsca loxP i dezaktywuje docelową sekwencję „Y” w tkance „X” (na podstawie Kim i in. 2018).

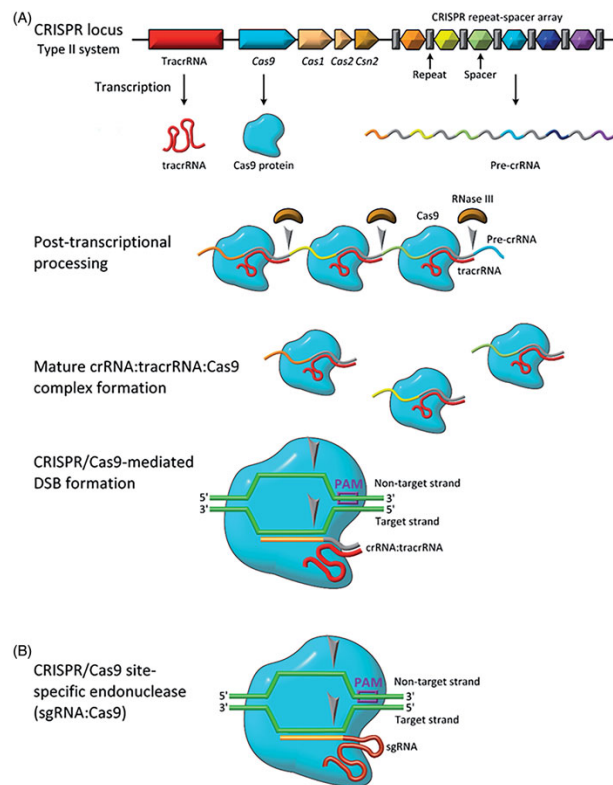
Warto wspomnieć, że poza oczywistym zastosowaniem przy tworzeniu linii z utratą danego genu, system Cre-loxP jest również wykorzystywany w modelach z nadekspresją. W tym wypadku przed genem, którego ekspresja ma zostać uruchomiona, znajduje się, otoczona sekwencjami loxP, kasetą STOP (zawierającą miejsce terminacji transkrypcji). Po zadziałaniu

rekombinazy i wycięciu kasety STOP, odblokowana zostaje ekspresja badanego genu. W ten sposób działają transgeniczne linie z ekspresją białek reporterowych, które służą do mapowania aktywności Cre.

1.6.4 System CRISPR/Cas9

Wśród technik miejscowo-specyficznej edycji genomu, wykorzystujących nukleazy takie jak ZFN (ang. *zinc finger nucleases*) czy TALEN (transcription activator-like effector nucleases), jedną z najszerzej stosowanych metod modyfikacji jest technologia CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Bazuje ona na, zależnej od RNA, endonukleolitycznej aktywności białka Cas9. Historia odkrycia nawiązuje do grup badawczych, które zidentyfikowały nietypowe, powtarzające się sekwencje w genomie bakterii i archeonów, oddzielone krótkimi, prawie idealnie palindromicznymi, segmentami DNA (Ishino i in. 1987; F. J. M. Mojica, Juez, i Rodriguez-Valera 1993; van Soolingen i in. 1993; Francisco J. M. Mojica i in. 2000; Francisco J.M. Mojica i in. 2005). Obserwacja ta określiła skomplikowaną nazwę zjawiska i powszechnie używany jej akronim - CRISPR. Kolejne doświadczenia pogłębiły zrozumienie struktury *locus* CRISPR, opisując geny do niego przylegające, oznaczone jako Cas (CRISPR-associated system) (Jansen i in. 2002). Następne doniesienia, ujawniły wirusowe pochodzenie sekwencji (ang. *spacers*), zlokalizowanych w *locus* CRISPR (Francisco J.M. Mojica i in. 2005; Pourcel, Salvignol, i Vergnaud 2005; Bolotin i in. 2005). Dodatkowo, bakterie, będące nosicielami tych obcych fragmentów DNA, wykazywały odporność na infekcje konkretnymi fagami. To pozwoliło nakreślić funkcję systemu w rozwijaniu adaptacyjnego układu odpornościowego organizmów prokariotycznych (Barrangou i in. 2007; Lander 2016). Mechanizm polega na wbudowywaniu do własnego genomu, wcześniej rozpoznanych i pociętych fragmentów wirusów, działających jako forma pamięci immunologicznej. Przy powtórny kontakt z danym wirusem, powstający długi transkrypt, z wbudowanymi fragmentami obcego pochodzenia (pre-crRNA, ang. *pre-CRISPR RNA*), jest cięty przez RNazę III na krótsze odcinki zawierające pojedynczy wirusowy fragment „spacer”, tzw. crRNA (ang. *CRISPR-RNA*). Ten z kolei służy jako matryca dla białka Cas9, do rozpoznania, związania i pocięcia „nacierającego” materiału genetycznego bakteriofaga. Za każdą z tych funkcji odpowiada inna wyspecjalizowana w tym domena białka Cas9 (Makarova i in. 2011; S. H. Sternberg i in. 2015). Do prawidłowego działania endonukleaza ta potrzebuje jednak krótkiego, aktywującego fragmentu RNA (tracrRNA, trans-activating RNA), którego sekwencja również zakodowana jest w *locus* CRISPR (Chylinski i in. 2014). Powstający

kompleks crRNA:tracrRNA:Cas9 wiąże się, a następnie rozplata podwójną nić DNA obcego pochodzenia w rejonie „seed”, tuż za charakterystycznym motywem PAM (ang. *proto-spacer adjacent motif*) 5'-NGG-3' (Szczelkun i in. 2014). Jeśli obca sekwencja jest identyczna lub prawie identyczna z sekwencją crRNA, wówczas Cas9 dokonuje cięcia obu docelowych nici (Chylinski, Le Rhun, i Charpentier 2013).

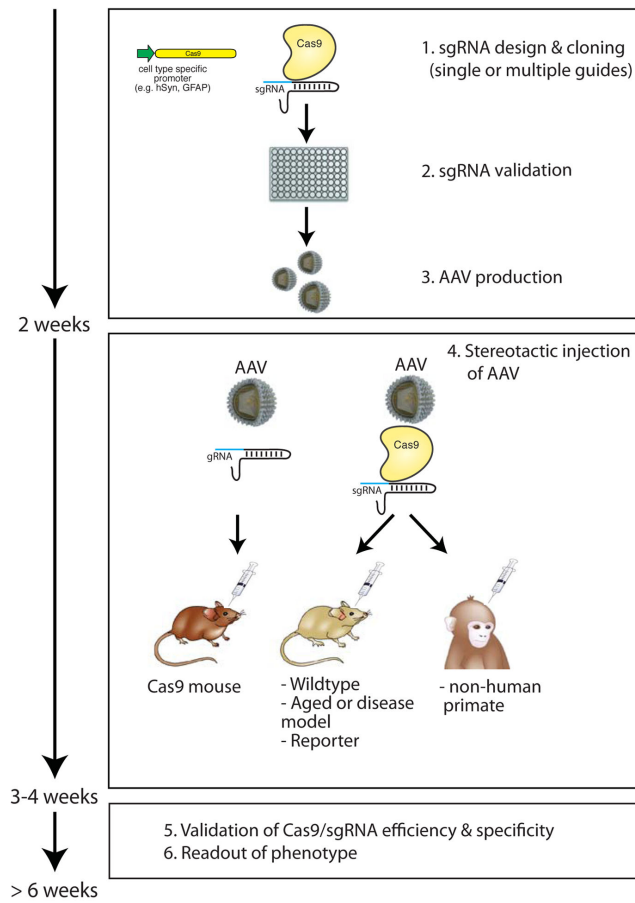


Rycina 1.14 System CRISPR/Cas9: A) genomowa reprezentacja system CRISPR/Cas9 wraz z jego produktami; w locus CRISPR (tam, gdzie wbudowany został pofragmentowany materiał genetyczny faga), w procesie transkrypcji powstaje aktywujący fragmentu RNA (tracrRNA), Cas9 oraz pre-crRNA (pierwotny transkrypt CRISPR-RNA); kompleksy tracrRNA:Cas9 wiążą się z pre-crRNA, a RNaza III rozcina długi transkrypt na krótsze fragmenty (zaznaczone szarą strzałką) prowadząc do powstania kompleksów crRNA:tracrRNA:Cas9. W obrębie pojedynczego kompleksu następuje rozplecenie nici DNA i dochodzi do przecięcia obydwóch nici (DSB, ang. *double strand breaks*) (szara strzałka), B) zaprojektowane narzędzia CRISPR/Cas9 (sgRNA:Cas9) do wprowadzenia miejscowo-specyficznej mutacji w docelowym miejscu DNA; pojedyncze naprowadzające RNA (sgRNA) jest zmodyfikowaną jednoniciową cząsteczką o właściwościach kompleksu crRNA:tracrRNA: PAM (ang. *protospacer adjacent motif*) - specyficzna sekwencja DNA, znajdująca się tuż za miejscem cięcia Cas9 i wymagana do endonukleolitycznej aktywności Cas9 (na podstawie Lino i in. 2018).

Pionierskie próby wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 do edycji genomu zostały opisane blisko 10 lat temu (Jinek i in. 2012; Francisco J. M. Mojica i in. 2000; Cong i in. 2013; Mali i in. 2013). Zaprojektowano skróconą, fuzyjną cząsteczkę tracrRNA:crRNA, zwaną pojedynczym, wiodącym RNA (sgRNA ang. *single guide RNA*). Fragment crRNA pełni w niej rolę matrycy, a tracrRNA rusztowania. Tym samym, cały system został uproszczony do postaci

dwuelementowej, a do przeprowadzenia modyfikacji docelowego fragmentu DNA niezbędny stał się jedynie kompleks sgRNA:Cas9. Po powstaniu dwuniciowych nacięć w docelowych miejscach genomu, uruchamiany jest jeden z dwóch procesów łączenia przeciętych końców DNA. W obecności, dostarczonej egzogenicznie, matrycy naprawczej, możliwa jest naprawa homologiczna (HDR, ang. *homology-directed repair*). Matryca naprawcza zawiera bowiem sekwencję komplementarną do miejsca, w którym doszło do pęknięcia nici DNA. Ten mechanizm umożliwia wprowadzenie zdefiniowanej sekwencji w określone miejsce genomu. Funkcjonuje przede wszystkim w określonych typach komórek aktywnie dzielących się. Wykorzystywany jest do tworzenia modeli typu „knock-in” oraz zastępujących wadliwy gen jego poprawnym wariantem. W przypadku braku matrycy naprawczej, wolne końce DNA są ze sobą łączone za pomocą odpowiednich białek. Ten niehomologiczny typ naprawy (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) prowadzi do losowych zmian typu insercja/delecja (zwanymi „indel”). Jeżeli miejsce cięcia zostało zaprojektowane w egzonie, wówczas zmiany te powodować mogą zaburzenia ramki odczytu, powstanie przedwczesnego kodonu STOP i formowanie dysfunkcyjnego białka. Ten scenariusz jest pożądany w przypadku tworzenia modeli typu „knock-out” (Ran i in. 2013).

W literaturze obecne są przykłady, które łączą technologię CRISPR/Cas9, system Cre-loxP oraz rekombinowane wektory wirusowe w najnowszych metodach transgenezy zwierzęcej (Quadros i in. 2017; Ohtsuka i in. 2018; Heidenreich i Zhang 2016) i modelowaniu chorób (Boddu i in. 2021; H. Li i in. 2020). Część z nich znajduje zastosowanie w obszarze badań nad mózgiem (Kumar i in. 2018; H. Sun i in. 2020; Bäck i in. 2019; Carullo i in. 2021). Celowane modyfikacje neuronów są przedmiotem intensywnych badań. Jest to wyzwanie ze względu na mnogość różnych typów komórek w mózgu, post-mitotyczny charakter neuronów, ich złożone powiązania oraz ograniczoną dostępność. Narzędzia współczesnej inżynierii genetycznej wychodzą naprzeciw temu zagadnieniu (Sandoval, Elahi, i Płoski 2020). Oprócz miejscowo-specyficznej, regulowanej w czasie i przestrzeni, edycji genomu w wybranych komórkach, możliwe stało się przyżyciowe śledzenie powstających w genomie zmian (Gendron i in. 2021; Fang i in. 2021). Sun i in., dzięki zastosowaniu kombinacji CRISPR/Cas9 i Cre-loxP z dwukierunkowymi wektorami AAV, nie tylko wyciszył aktywność genu *cbp* (CREB-binding protein), ale zdołał zmodyfikować i wyznakować, zależne od aktywności i funkcji, projekcje, uzyskując efekt behawioralny (H. Sun i in. 2020). Z kolei Carullo i inni, stworzył system Cre-zależnej aktywacji (CRISPRa) bądź wyciszenia (CRISPRi) transkrypcji za pośrednictwem systemu CRISPR (Carullo i in. 2021).



Rycina 1.15 Strategie edycji genomu *in vivo*, z wykorzystaniem wirusowego dostarczenia elementów systemu CRISPR/Cas9. Kolejne etapy strategii zakładają 1) projektowanie i klonowanie sgRNA, walidację *in vitro* sgRNA (2), przygotowanie wektorów AAV kodujących wybrane sgRNA lub kompleks sgRNA/Cas9 (3), iniekcję stereotaktyczną AAV (4), ocenę skuteczności i specyficzności działania sgRNA/Cas9 *in vivo* (5), obserwację fenotypu (6) (na podstawie Heidenreich i in. 2016).

2. Cele pracy

Punktem wyjścia do rozwinięcia opisanego w niniejszej pracy projektu, była obserwacja towarzysząca indukcji mutacji u zwierząt z warunkowym usunięciem genu *Dicer1* w neuronach przodomózgowia. Zwierzęta te, pozbawione miRNA w komórkach z aktywnym promotorem CaMKII α , charakteryzował przyrost masy ciała, któremu towarzyszył zwiększony apetyt. Wzór rekombinacji objął m.in. neurony podwzgórza, którego integralną część stanowią jądra regulujące procesy głodu i sytości oraz towarzyszące im zachowania żywieniowe. Nadrzędną rolę w tej regulacji odgrywa jądro łukowate, składające się z dwóch typów przeciwstawnie działających komórek - AgRP stymulujących apetyt oraz POMC wykazujących działanie hamujące. Oba typy neuronów umiejscowione są szerzej w dwóch nadrzędnych systemach determinujących działanie sieci neuronów: pobudzającym (neurony glutaminianergiczne) i hamującym (neurony GABAergiczne).

Głównym celem pracy było określenie roli oreksygenicznego neuronów AgRP/NPY w rozwoju miRNA-zależnej otyłości. Realizacja nadrzędnego celu wymagała uzyskania modelu o wysokiej specyficzności wprowadzanej zmiany, polegającej na utracie dojrzałych miRNA w dedykowanych neuronach jądra łukowatego. Wykorzystano do tego zestaw narzędzi opartych na systemie Cre-loxP, CRISPR/Cas9 oraz wektorach AAV będących nośnikami genów.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- określenie znaczenia neuronów AgRP w rozwoju miRNA-zależnej otyłości u myszy w oparciu o dobór najbardziej selektywnego systemu usunięcia genu *Dicer1*
- wykazanie roli genu oreksygenicznego neuropeptydu *Npy* w rozwoju otyłości u myszy pozbawionych genu *Dicer1* w neuronach jądra łukowatego
- określenie ogólnej funkcji neuronów GABAergicznych i glutaminianergicznych w systemie kontroli głodu i sytości w mózgu, w kontekście regulacji aktywności neuronów przez miRNA

3. Materiały i Metody

3.1 Mysie modele badawcze

Wszystkie wykorzystane w pracy zwierzęta doświadczalne hodowane były w pomieszczeniach zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Zwierzęta zapewnione miały podstawowe warunki bytowania, spełniające zgodnie z odpowiednimi przepisami normy, takie jak utrzymanie temperatury na poziomie 21-23°C, wilgotności w zakresie 50-60%, 10-15 wymian powietrza na godzinę, 12-godzinny cykl dobowy oraz wzbogacone środowisko. Zarówno zwierzęta będące w trakcie eksperymentu, jak i te w warunkach hodowli, miały stały dostęp do pokarmu i wody. Doświadczenia wykonane były zgodnie z procedurami opisanymi w dwóch wnioskach (147/2016, 713/2018) zatwierdzonych przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie.

3.1.1 Linie myszy doświadczalnych stosowane w badaniach wstępnych (bez wywołania mutacji w genie *Dicer1*)

Linia C57Bl/6J

Do realizacji wstępnych doświadczeń, sprawdzających charakterystykę wektorów wirusowych AAV (podrozdział 4.5.1., 4.5.3.) oraz usprawniających warunki ich domózgowej iniekcji (podrozdział 4.6.1., 4.6.2.) wykorzystano myszy typu dzikiego, szczep C57Bl/6J. Badania prowadzono na osobnikach w przedziale wiekowym 3-5 miesięcy.

Linia NPY-GFP

Jest to linia myszy transgeniczných, która wykazuje stałą ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) w neuronach z aktywnym promotorem dla genu Neuropeptydu Y (NPY) (Jax #006417; Tg(Npy-hrGFP)1Low1). Myszy tej linii wykorzystano w doświadczeniu sprawdzającym specyficzność wektora wirusowego AAV-AgRPmCherry (podrozdział 4.5.2.) oraz jako linię wyjściową do przygotowania zwierząt wielokrotnie transgeniczných, niezbędnych do badania przeżywalności neuronów AgRP/NPY po wywołaniu mutacji (podrozdział 4.7.4.).

Linia STOPtdTomato

Linia transgeniczna szczegółowo opisana w pracy Madisen i in. (Madisen i in. 2010). Posiada Cre-zależną kasetę STOP tuż przed sekwencją tdTomato. Po wycięciu przez rekombinazę Cre kasety STOP uruchamiana jest ekspresja tdTomato z promotora CAG. Sekwencja CAG-STOPtdTomato wprowadzona została w genomowe miejsce Rosa26 locus (*Gt(ROSA)26Sor*). Linie wykorzystano w pracy do śledzenia wzoru rekombinacji (podrozdział 4.3, 4.6.3).

3.1.2 Linie myszy doświadczalnych poddanych warunkowemu wywołaniu mutacji za pomocą Tamoksyfenu

Linia DicerCKO

Jest to indukowalna, Cre-zależna linia transgeniczna, którą otrzymano z Niemieckiego Centrum badań nad Rakiem - German Cancer Research Center (DKFZ) w Heidelbergu. Linia została szczegółowo opisana w pracy (Cobb i in. 2005; Erdmann, Schütz, i Berger 2007). Egzony 20-21 genu *Dicer1* otoczone są, rozpoznawanymi przez rekombinazę CreERT2, sekwencjami loxP. Ekspresja CreERT2 (postać cytoplazmatyczna) ma miejsce w neuronach z aktywnym promotorem CaMKII α . Po indukcji mutacji Tamoksyfenem następuje translokacja CreERT2 do jądra, gdzie wycięciu ulega fragment między sekwencjami loxP. Była to linia wyjściowa do kojarzeń z liniami NPY-GFP oraz NPY-KO. Ponadto, została użyta jako kontrola pozytywna doświadczenia badającego zaangażowanie NPY w fenotyp otyłości (podrozdział 4.1, 4.7.4).

Linia NPY-KO/DicerCKO

Linia transgeniczna powstała z kojarzenia linii DicerCKO (opis wyżej) z linią NPY-KO (Jax #004545; 129S-Npy^{tm1Rpa/J}). Zwierzęta NPY-KO mają usunięte oba allele genu NPY. Potomstwo wykazuje globalny „knock-out” genu NPY, a po indukcji mutacji usuwany jest również fragment genu *Dicer1* w neuronach CaMKII α (podrozdział 4.1).

Linia NPY-GFP/STOPtdTomato/AgRPCreERT2Dicer

Linia transgeniczna z neuronami NPY, wyznakowanymi białkiem zielonej fluorescencji GFP oraz Cre-zależną ekspresją tdTomato. Ekspresja CreERT2 zachodzi w neuronach AgRP. Dootrzewnowe iniekcje Tamoksyfenem aktywują CreERT2, która usuwa gen *Dicer1* oraz kasetę STOP uruchamiając ekspresję tdTomato. Neurony, które uległy rekombinacji mają kolor czerwony (tdTomato), a neurony NPY, które uległy modyfikacji - kolor żółty, wynikający z

nałożenia się sygnału GFP oraz tdTomato. Linia posłużyła do określenia zakresu rekombinacji (podrozdział 4.3).

Linia AgRPCreERT2Dicer

Linia transgeniczna będąca wynikiem kojarzenia linii AgRPCreERT2 z linią Dicer fl/fl. Linię AgRPCreERT2, stworzoną w zespole Jeffrey'a Zigman'a (The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) (Q. Wang i in. 2014) otrzymano grzecznościowo na potrzeby realizowanego projektu. Charakteryzuje ją ekspresja CreERT2 ograniczona do neuronów AgRP. Po aktywacji CreERT2 wycina gen *Dicer1* w neuronach AgRP. Linia była podstawą do weryfikacji hipotezy o udziale neuronów AgRP w fenotypie otyłości (podrozdział 4.2).

3.1.3 Linie myszy doświadczalnych poddanych wywołaniu mutacji za pomocą iniekcji wektorów AAV

Linia Dicer fl/fl

Cre-zależna linia transgeniczna charakteryzująca się umiejscowieniem sekwencji loxP wokół egzonów 20-21 genu *Dicer1*, które to ulegają wycięciu w obecności Cre. Linia wykorzystana została w kombinacji z wektorem AAV-AgRPCre (podrozdział 4.6.3, 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3, 4.7.5).

Linia Cas9

Linia transgeniczna typu „knock-in”, która posiada Cre-zależną kasetę STOP-Cas9-GFP wbudowaną w Rosa26 locus (*Gt(ROSA)26Sor*) (Jax #024857; B6;129-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-cas9*,-EGFP)}F_zh/J). W obecności rekombinazy Cre wycięciu ulega kasetka STOP i uruchamiana jest (z promotora CAG) ekspresja białka fuzyjnego Cas9-GFP (ulega rozcięciu po translacji dzięki sekwencji 2A). Linia jest składową systemu CRISPR/Cas9 do wprowadzania celowanych modyfikacji genomu. Posłużyła jako linia wyjściowa do kojarzenia z liniami Gad2Cre, Vglut2Cre oraz AgRPCre. Z jej udziałem badano poziom wyciszenia *Dicer1 in vitro* (podrozdział 4.8.1) oraz dokonano sprawdzenia systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* (podrozdział 4.8.2).

Linia Gad2CreCas9

Linia transgeniczna ze stabilną ekspresją Cre w komórkach z ekspresją dekarboksylazy glutaminianowej 2 (Gad2), będącej znacznikiem neuronów GABAergicznym (Jax #028867;

B6J.Cg-Gad2^{tm2(cre)Zjh}/MwarJ). Ekspresja Cre uruchamia ekspresję Cas9 w neuronach Gad2. Linię wykorzystano do badania wpływu utraty *Dicer1* w neuronach GABAergicznym na fenotyp otyłości (podrozdział 4.8.3, 4.8.6).

Linia Vglut2CreCas9

Linia transgeniczna ze stabilną ekspresją Cre w komórkach z ekspresją pęcherzykowego transportera glutaminianu (Vglu2), będącej znacznikiem neuronów glutaminianergicznym (Jax #016963; Slc17a6^{tm2(cre)Lowl}/J). Ekspresja Cre uruchamia ekspresję Cas9 w neuronach Vglut2. Linię wykorzystano do badania wpływu utraty *Dicer1* w neuronach glutaminianergicznym na fenotyp otyłości (podrozdział 4.8.4, 4.8.4).

Linia AgRPCreCas9

Linia transgeniczna ze stabilną ekspresją Cre w neuronach AgRP, regulowana aktywnością endogennego promotora AgRP (Jax #012899; Agrp^{tm1(cre)Lowl}/J). Ekspresja Cre uruchamia ekspresję Cas9 w neuronach AgRP. Linię wykorzystano do badania wpływu utraty *Dicer1* w neuronach AgRP na fenotyp otyłości (podrozdział 4.8.5, 4.8.6).

3.1.4 Warunki genotypowania poszczególnych linii myszy

Wszystkie wykorzystane w pracy linie transgeniczne weryfikowano w reakcji PCR (ang. *Polimerase chain reaction*) celem wyselekcjonowania osobników o pożądanym genotypie.

Etap ten poprzedzony był wyizolowaniem materiału DNA z pobranego fragmentu ogona. Wykorzystano do tego komercyjny zestaw Genomic Mini (A&A Biotechnology, nr kat. 116-250) działając zgodnie z protokołem producenta. W pierwszej kolejności tkanka zawieszana była w mieszaninie roztworu TRIS (100 µl), roztworu lizującego (50 µl) i Proteinazy K (20 µl) i trawiono ją przez noc w temperaturze 50°C. Kolejne etapy polegały na wykorzystaniu kolumniek ze złożem wiążącym DNA i naprzemiennej sekwencji przepłukiwania i wirowania kolumniek z kolejnymi roztworami płuczającymi. Końcowym etapem izolacji była elucja DNA w roztworze TRIS. Tak wyizolowane DNA stanowiło matrycę do reakcji PCR.

Do amplifikacji docelowych fragmentów w reakcji PCR wykorzystano zestaw Gold Taq DNA Polymerase PLUS (Syngen, nr kat. SY550111P) według zestawienia w Tabeli 3.1. W kolejnych Tabelach umieszczono informacje dotyczące sekwencji starterów wykorzystywanych dla każdej z linii, wielkości produktów PCR (Tabela 3.2), liczby reakcji

niezbędnych do zgenotypowania każdej z linii (Tabela 3.3), a także warunków reakcji PCR dla poszczególnych linii transgeniczných (Tabela 3.4).

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stężenie końcowe w reakcji
Gold Taq (5U/μl)	1 U
10X Bufor Gold	1 X
25 mM MgCl ₂	2,5 mM
10 mM dNTP	200 μM
10 μM starter F *	0,3 μM
10 μM starter R *	0,3 μM
Matrycowe DNA	< 10ng/μl
dH ₂ O miliQ	dopełnić do 20 μl
objętość reakcji	20 μl

Tabela 3.1 Skład mieszaniny do reakcji PCR; * w przypadku wykorzystania do reakcji PCR więcej niż dwóch starterów, ich ilości były odpowiednio redukowane, tak by utrzymać właściwe stężenie końcowe.

Po amplifikacji produktu przeprowadzano rozdział mieszaniny poreakcyjnej z roztworem bromku etydydy EtBr (Sigma-Aldrich), na 2% żelu agarozowym (100V, 30 min). Kontrolą pozytywną reakcji był materiał genetyczny założyciela, kontrolą negatywną - próbka z mieszaniną reakcyjną, pozbawiona matrycy DNA. Stosowany marker wielkości (O'GeneRuler 1KB DNA Ladder, Thermo Scientific, nr kat. SM0311) pozwalał na ocenę wszystkich amplifikowanych prążków.

Reakcja	Nazwa i sekwencja starterów	Wielkość produktu	Ilość reakcji
NPY-GFP	NPY GFP F: TAT GTG GAC GGG GCA GAA GAT CCA GG	IPC 500 pz transgen 400 p	1
	NPY GFP mut R: GGT GCG GTT GCC GTA CTG GA		
	NPY GFP wt R: CCC AGC TCA CAT ATT TAT CTA GAG		
tdTomato	Tom mut F: GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC	mutant 200 pz	1
	Tom mut R: CTG TTC CTG TAC GGC ATG G		
	Tom wt R: CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	WT 300 pz	
	Tom wt F: AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA		
Dicer	Dicer7: CCA TTT GCT GGA GTG ACT CTG	mutant 500 pz WT 300 pz	1
	Dicer8: TAA ATC TGG CAA GCG AGA CG		
Cre	CreERT2-F: GGC TGG TGT GTC CAT CCC TGA A	mutant 400 pz	1
	CreERT2-R: GGT CAA ATC CAC AAA GCC TGG CA		
Vglut2Cre	VC MUT R: ACA CCG GCC TTA TTC CAA G	mutant 124 pz WT 245 pz	1
	VC common: AAG AAG GTG CGC AAG ACG		
	VC WT R: CTGCCA CAG ATT GCA CTT GA		
GadCre	GC MUT F: CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TG	mutant 176 pz WT 225 pz	2
	GC common R: AAC AGT TTG ATG AGT GAG GTG A		
	GCWTF:TCGTTGCACTGACGTGTTCT		
Cas9	E (WT) Cas9: CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	mutant 300 pz WT 300 pz	2
	B (MUT) Cas9: CGG GCC ATT TAC CGT AAG TTA T		
	D (com) Cas9: AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA		
AgRPCre	AgRP-Cre F: GCT TCT TCA ATG CCT TTT GC	mutant 280 pz WT 199 pz	1
	AgRP-Cre R ic: GTG TGT GGT TCC AGC ATG AC		
	AgRP-Cre: AGG AAC TGC TTC CTT CAC GA		
AgRPCreERT2	AGRP-CreER-F: CAG ATA CCA TCA TCT CTC CC	transgen 323 pz IPC 514 pz	1
	AGRP-CreER-R: CCT TAA ACT CGC CCA TAT ATG TGG		
	CreER: GCT CTA CTT CAT CGC ATT CCT TG		
NPY KO	MUT F: GCA ACT GTT GGG AAG GGC G	mutant 390 pz WT 136 pz	2
	MUT R: GAG CGG CAG TGG CTC CAG		
	WT F: TGC TAG GTA ACA AGC GAA TGG		
	WT R: TAG TGT CGC AGA GCG GAG TA		

Tabela 3.2 Zestawienie sekwencji starterów wykorzystanych do genotypowania poszczególnych linii myszy.

Linia transgeniczna	Reakcja
NPY-GFP	NPY-GFP
STOPtdTomato	tdTomato
DicerCKO	Dicer
	Cre
NPY-KO/DicerCKO	NPY KO
	Dicer
	Cre
NPY-GFP/STOPtdTomato/AgRPCreERT2Dicer	NPY-GFP
	tdTomato
	AgRPCreERT2
	Dicer
AgRPCreERT2Dicer	AgRPCreERT2
	Dicer
Dicer fl/fl	Dicer
Cas9	Cas9
Gad2CreCas9	Gad2Cre
	Cas9
Vglut2CreCas9	Vglut2Cre
	Cas9
AgRPCreCas9	AgRPCre
	Cas9

Tabela 3.3 Zestawienie niezbędnych reakcji do zgenotypowania każdej z linii myszy.

	Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	Liczba cykli
NPY GFP	1. wstępna denaturacja	94	03:00	1
	2. denaturacja	94	00:30	
	3. przyłączenie starterów	55	00:30	35
	4. elongacja	72	01:00	
	5. końcowa elongacja	72	02:00	1
	6. schłodzenie	10	∞	1
tdTomato Dicer Cre AgRPCre	1. wstępna denaturacja	95	07:00	1
	2. denaturacja	95	00:30	
	3. przyłączenie starterów	60	01:00	35
	4. elongacja	72	01:30	
	5. końcowa elongacja	72	10:00	1
	6. schłodzenie	4	∞	1
Vglut2Cre	1. wstępna denaturacja	95	05:00	1
	2. denaturacja	95	00:30	
	3. przyłączenie starterów	49	00:30	30
	4. elongacja	72	00:40	
	5. końcowa elongacja	72	02:00	1
	6. schłodzenie	10	∞	1
GadCre	1. wstępna denaturacja	95	02:00	1
	2. denaturacja	95	00:45	
	3. przyłączenie starterów	52,2	00:30	30
	4. elongacja	72	01:00	
	5. końcowa elongacja	72	10:00	1
	6. schłodzenie	4	∞	1
Cas9	1. wstępna denaturacja	94	05:00	1
	2. denaturacja	94	02:00	
	3. przyłączenie starterów	57	00:45	30
	4. elongacja	72	00:40	
	5. końcowa elongacja	72	10:00	1
	6. schłodzenie	4	∞	1
AgRPCreERT2	1. wstępna denaturacja	94	03:00	1
	2. denaturacja	94	00:30	
	3. przyłączenie starterów	62	01:00	29
	4. elongacja	72	02:00	
	5. końcowa elongacja	72	10:00	1
	6. schłodzenie	10	∞	1
NPY KO	1. wstępna denaturacja	94	03:00	1
	2. denaturacja	94	00:30	
	3. przyłączenie starterów	67	01:00	30
	4. elongacja	72	00:45	
	5. końcowa elongacja	72	10:00	1
	6. schłodzenie	4	∞	1

Tabela 3.4 Warunki reakcji PCR dla poszczególnych reakcji.

3.2 Przygotowanie plazmidowych wektorów ekspresyjnych z promotorem specyficznym dla neuronów AgRP

Na potrzeby realizacji niniejszego projektu przygotowano trzy wektory plazmidowe, z których każdy kierował ekspresję transgenu promotorem AgRP. Postępując zgodnie z poniższym schematem uzyskano dwa kontrolne wektory z ekspresją białek fluorescencyjnych (EYFP oraz mCherry) oraz jeden o znaczeniu funkcjonalnym z ekspresją rekombinazy Cre.

3.2.1 Dobór odpowiedniej sekwencji promotorowej *in silico*

Punktem wyjścia do wyboru odpowiedniej sekwencji mysiego promotora AgRP, była praca opisująca szczegółowo ludzki promotor AgRP (Brown i in. 2001). Na jej podstawie oraz z uwzględnieniem informacji dostępnych w bazach danych (NCBI nucleotide, Ensemble) i narzędziach bioinformatycznych (Mouse Blat Search Genome), ustalono poziom zakonserwowania w sekwencji ludzkiej i mysiej. Zidentyfikowano lokalizację sekwencji promotorowej w obrębie genu, który składa się z 5 egzonów. Egzon 1 i 2 nie kodują białka, a wraz z rozdzielającym je intronem stanowią element minimalnego promotora, posiadającego charakterystyczne sekwencje promotorowe i potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych w genomie mysim. Ustalono, że fragment, który wyselekcjonowano do amplifikacji na matrycy genomowego mysiego DNA, ze starterami wprowadzającymi miejsca restrykcyjne, składa się z 645 pz.

3.2.2 Klonowanie molekularne

Cały proces składał się z dwóch rund klonowania. Pierwsza zakładała wklonowanie powielonej wstawki do plazmidu pCONST-Cre, jako etap pośredni. Druga, polegała na przeniesieniu wstawki do plazmidów docelowych (pAAV), będących częściami składowymi systemu do produkcji rekombinowanych wektorów AAV.

Wyjściowym etapem przygotowania pożądaných wektorów plazmidowych była amplifikacja sekwencji mysiego promotora AgRP. Wykorzystano do tego startery (mAgRPprom F, mAgRPprom R) wprowadzające miejsca restrykcyjne dla enzymów **NruI** i **SacI**, celem późniejszego wklonowania tego fragmentu do plazmidu biorcy pCONST-Cre.

mAgRPprom F: 5'-CATCAGTCGCGATGGAAATAGGTGTAGGGGGG-3'

mAgRPprom R: 5'-ACGTCAGAGCTCAGATGCTCCCAGAAAGTCCC-3'

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific, nr kat. F553L). W Tabeli 3.5 opisany jest skład mieszaniny, a w Tabeli 3.6 warunki reakcji PCR.

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stężenie końcowe w reakcji
Pol Phusion (2U/μl)	1 U
5X Phusion Bufor	1 X
10 mM dNTP	200 μM
50 μM mAgRPprom F	0,5 μM
50 μM mAgRPprom R	0,5 μM
Matrycowe DNA	6 ng/μl
dH ₂ O miliQ	dopełnić do 50 μl
objętość reakcji	50 μl

Tabela 3.5 Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	Liczba cykli
1. wstępna denaturacja	98	00:30	1
2. denaturacja	98	00:10	
3. przyłączenie starterów	60	00:20	30
4. elongacja	72	00:40	
5. końcowa elongacja	72	05:00	1
6. schłodzenie	16	∞	1

Tabela 3.6 Warunki reakcji PCR.

Po reakcji PCR kolejnym etapem było przygotowanie końców wstawki (promotora AgRP) i plazmidu biorcy (pCONST-Cre) poprzez trawienie restrykcyjne enzymami NruI i SacI (Thermo Scientific, nr kat. ER0111, ER1131) zgodnie z protokołem producenta. Do trawienia użyto 1 μg DNA wstawki oraz 5 μg DNA plazmidu biorcy (1U enzymu/1 μg DNA, inkubacja w 37°C przez 1 godz., inaktywacja- w 65°C przez 5 min.). W następstwie rozdziału elektroforetycznego na 1% żelu agarozowym (100V, 1 godz.) w roztworze TBE (90 mM Tris Base, 90 mM kwas borowy, 2mM EDTA pH 8,0) z dodatkiem bromku etydy (EtBr, Sigma-Aldrich) uwidoczniony został prążek o wielkości 645 pz (promotor AgRP) oraz prążki będące

produktami trawienia plazmidu pCONST-Cre o wielkości 610 pz (wycięty promotor CMV) oraz 4058 pz (zlinearyzowany szkielet pCONST-Cre z usuniętym promotorem CMV). Zarówno prążek będący wstawką (645 pz), jak i plazmidem biorcą (4058 pz) wycięto z żelu, a następnie oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, nr kat. 28706X4) zgodnie ze wskazaniami producenta. Po pomiarze stężenia DNA oczyszczonego z żelu, przystąpiono do etapu ligacji, czyli enzymatycznego połączenia wstawki z wektorem biorcą. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała roztwór reakcyjny, wstawkę (w stosunku molowym 3:1 względem wektora), wektor oraz ligazę (T4 DNA Ligase, NewEngland BioLabs, nr kat. M0202S). Materiał inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej (w objętości końcowej 10 μ l). Po tym czasie próbki z mieszaniną ligacyjną umieszczono w lodzie i rozpoczęto etap transformacji bakterii kompetentnych TOP10 (One Shot TOP10 chemically competent *E.coli*, Invitrogen, nr kat. C4040-06) mieszaniną ligacyjną z uwzględnieniem wszystkich niezbędnych kontroli (kontrola negatywna: mieszanina strawionego pCONST-Cre bez wstawki oraz mieszanina ligacyjna bez materiału DNA, kontrola pozytywna: kolisty pCONST-Cre). Wszystkie etapy pracy z bakteriami odbywały się w warunkach sterylnego powietrza, w bliskości palnika. Transformowano każdorazowo 50 μ l bakterii kompetentnych (2 μ l mieszaniny ligacyjnej, 1/5 całości). Po bardzo delikatnym dodaniu mieszaniny ligacyjnej (strawionego/niestrawionego plazmidu pCONST-Cre, dH₂O - w zależności od typu kontroli) bakterie kompetentne inkubowano przez kolejnych 30 minut na lodzie. Po tym czasie próbki umieszczono na 30 sekund w temperaturze 42°C po czym dodano do każdej z nich 200 μ l medium S.O.C. (Invitrogen, nr kat. 15544034) i wytrząsano przez kolejną godzinę w 37 °C. Następnie całość mieszaniny wysiano na uprzednio przygotowane szalki Petriego z agarem LB (BioShop, nr kat. LBL406-1) i ampicyliną w stężeniu końcowym 100 μ g/ml (Sigma-Aldrich, nr kat. A0166) jako antybiotykiem selekcyjnym. Szalki inkubowały się w 37 °C przez noc, a kolejnego dnia wyselekcjonowane klony bakterii weryfikowane były metodą PCR (z wykorzystaniem starterów mAgRPprom F, mAgRPprom R oraz Taq DNA Polymerase, Qiagen, nr kat. 201203) w mieszaninie o zredukowanej objętości (12,5 μ l) i bez uprzedniej izolacji plazmidowego DNA (zanurzano w mieszaninie reakcyjnej końcówkę tipsa, którym wcześniej pobrano fragment pojedynczej kolonii). Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 3.7.

Etap	Temperatura	Czas trwania etapu	Liczba cykli
	[°C]	[mm:ss]	
1. wstępna denaturacja	95	10:00	1
2. denaturacja	95	00:30	
3. przyłączenie starterów	60	00:30	39
4. elongacja	72	01:30	
5. końcowa elongacja	72	05:00	1
6. schłodzenie	4	∞	1

Tabela 3.7 Warunki reakcji PCR.

Po weryfikacji ponad 20 klonów, do dalszego procedowania wybrano te, które w reakcji PCR i po rozdiale elektroforetycznym dały docelowy prążek o wielkości 645 pz, będący wstawką (minimalnym promotorem AgRP). Kolejne kroki obejmowały namnożenie klonów bakterii w trakcie hodowli nocnej w ilości 5ml pożywki płynnej LB Luria-Bertani (Sigma-Aldrich, nr kat. L3022-6X1KG) z dodatkiem ampicyliny w stężeniu końcowym 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). Tak przygotowane hodowle wybranych klonów wytrząsano przez noc w temperaturze 37 °C (wytrząsarka KS 4000, IKA). Część namnożonych przez noc bakterii z plazmidem pCONST-AgRPCre posłużyła do przygotowania zawiesiny bakterii w glicerolu (150 µl 100% glicerolu, 850 µl hodowli bakteryjnej). Z pozostałej ilości wyizolowano plazmidowe DNA wykorzystując do tego zestaw QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, nr kat. 27106X4). Około połowa wyizolowanego materiału (15 µl, ~100ng/µl) została przeznaczona do sekwencjonowania. Z pozostałej części przygotowano mieszaninę do trawienia enzymatycznego, weryfikującego tożsamość uzyskanego plazmidu. Materiał DNA z każdego z klonów sprawdzano stosując dwa podejścia. Jedno zakładało wykorzystanie pary enzymów NruI oraz SacI, drugie enzymu Fast Digest NcoI (Thermo Scientific, nr kat. FD0573). Przy założeniu o wyizolowaniu właściwie zredagowanego plazmidu cięcie restrykcyjne parą enzymów NruI/SacI powinno dać 2 prążki (o wielkości 645 pz oraz 4058 pz). Trawienie pCONST-AgRPCre enzymem NcoI zakładało uzyskanie 3 prążków (296 pz, 1008 pz, 3364 pz). Otrzymane wyniki potwierdziły właściwą tożsamość uzyskanego plazmidu pCONST-AgRPCre, dodatkowo zweryfikowaną w reakcji sekwencjonowania.

Powyższy etap kończył pierwszą część klonowania promotora AgRP do wektora pośredniego pCONST-Cre. Kolejne podjęte czynności były analogiczne do wymienionych

dotychczas kroków i miały na celu przeniesienie samego promotora AgRP do docelowych plazmidów pAAV z ekspresją białek fluorescencyjnych (EYFP, mCherry) bądź promotora AgRP z sekwencją Cre do wektora biorcy pAAV bez ekspresji białek reporterowych.

Plasmid pCONST-AgRPCre posłużył jako matryca do amplifikacji fragmentu AgRPCre z jednoczesnym wprowadzeniem dodatkowych miejsc restrykcyjnych tuż przed promotorem AgRP (MluI) oraz tuż za sekwencją kodującą Cre (EcoRI), umożliwiając wycięcie i przeklonowanie całej wstawki AgRPCre do plazmidu biorcy.

Sekwencje starterów:

AgRP MluI F: 5'-TCAGATACGCGTCTTAGGGTTAGGCGTTTGC-3'

Cre EcoRI R: 5'-ACTACTGAATTC AACAGATGGCTGGCAACTAG-3'

Równolegle na matrycy pCONST-AgRPCre amplifikowano sam promotor AgRP wprowadzając miejsca restrykcyjne tuż przed sekwencją promotora (MluI) oraz tuż za nią (BamHI).

Sekwencje starterów:

AgRP MluI F: 5'-TCAGATACGCGTCTTAGGGTTAGGCGTTTGC-3'

AgRP BamHI R: 5'-ACTACTGGATCCCAGTAAGCAGTGGGTTCTC-3'

Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, nr kat. M0491S) według schematu umieszczonego w Tabeli 3.9 i warunkami reakcji opisanymi w Tabeli 3.8.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	Liczba cykli
1. wstępna denaturacja	98	00:30	1
2. denaturacja	98	00:10	
3. przyłączenie starterów	65	00:20	35
4. elongacja	72	00:35	
5. końcowa elongacja	72	02:00	1
6. schłodzenie	4	∞	1

Tabela 3.8 Warunki reakcji PCR.

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Stężenie końcowe w reakcji
Q5 Pol (2U/ μ l)	0,02 U/ μ l
5X Q5 Bufor	1 X
10 mM dNTP	200 μ M
50 μ M mAgRPprom F	0,5 μ M
50 μ M mAgRPprom R	0,5 μ M
Matrycowe DNA	50 ng
dH ₂ O miliQ	dopełnić do 25 μ l
objętość reakcji	25 μ l

Tabela 3.9 Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR.

Powielone wstawki z nowymi miejscami restrykcyjnymi zostały zweryfikowane rozdziałem w 1% żelu agarozowym. Dla starterów AgRPMluI F oraz CreEcoRI R wielkość prążka wynosiła 1973 pz, a dla pary AgRPMluI F i AgRPBamHI R – 706 pz.

W ramach przygotowania wstawek oraz docelowych plazmidów biorców przeprowadzono trawienie restrykcyjne enzymami typu Fast Digest (Thermo Sientific, nr kat. FD0564, FD0054, FD0274) (1U enzymu/1 μ g DNA, inkubacja w 37°C przez 1 godz., inaktywacja- w 65°C przez 5 min.) wg poniższego schematu:

1) Wstawka AgRPCre: MluI, EcoRI

Plazmid pAAV-CaMKII α -EYFP: MluI, EcoRI (wycięcie fragmentu CaMKII α -EYFP)

2) Wstawka AgRP: MluI, BamHI

Plazmid pAAV-CaMKII α -EYFP: MluI, BamHI (wycięcie fragmentu CaMKII α)

3) Wstawka AgRP: MluI, BamHI

Plazmid pAAV-EF1 α -mCherry: MluI, BamHI (wycięcie fragmentu EF1 α)

Rozdzielone w żelu agarozowym właściwe prążki wycięto i oczyszczono jak poprzednio. Po przeprowadzeniu etapu ligacji (T4 DNA Ligase, NewEngland BioLabs, nr kat. M0202S) stansformowano bakterie kompetentne TOP10, a następnie wysiano je na płytce z podłożem stałym oraz antybiotykiem selekcyjnym, którym w tym przypadku była również ampicylina w stężeniu 100 μ g/ml. Spośród widocznych na drugi dzień kolonii bakterii wybrano przedstawicieli dla każdego z trzech wariantów, przeprowadzono szybki, przesiewowy PCR,

założono dla nich hodowlę płynną LB, a po osiągnięciu przez bakterie odpowiedniej gęstości optycznej ($OD_{600} \sim 0,8$), wyizolowano z nich plazmidowe DNA. Wszystkie te etapy działały się w sposób analogiczny do opisanego wyżej procesu klonowania. Analiza restrykcyjna z wykorzystaniem enzymów MluI, BamHI, EcoRI w układzie przewidzianym dla każdego z warunków, potwierdziła właściwą tożsamość docelowych plazmidów.

- 1) pAAV-AgRPCre (MluI, EcoRI): 1973 pz + 4109 pz
- 2) pAAV-AgRPYFP (MluI, BamHI): 706 pz + 4782 pz
- 3) pAAV-AgRPmCherry (MluI, BamHI): 706 pz + 4767 pz

Ostateczna weryfikacja każdego z uzyskanych plazmidów potwierdzona została również w reakcji sekwencjonowania.

Tym samym, przystąpiono do etapu namnożenia hodowli bakteryjnej na dużą skalę, tak by otrzymana ilość wyizolowanego plazmidowego DNA była wystarczająca do przeprowadzenia potrójnej transfekcji komórek pakujących rekombinowane wektory AAV.

3.2.3 Izolowanie plazmidowego DNA jako etap wstępny przygotowania wektorów wirusowych AAV

Izolację plazmidowego DNA poprzedzał etap hodowli bakteryjnej. Do 250 ml sterylnej płynnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100 $\mu\text{g/ml}$) dodano bakterie z zamrożonej, przygotowanej na wcześniejszym etapie, zawiesiny bakterii w glicerolu (zeskrobując ich niewielką ilość końcówką tipsa). Kolby z pożywką zaszczepioną bakteriami wytrząsano przez noc w temperaturze 37°C. Kolejnego dnia odwirowywano hodowle bakteryjne, zatrzymując osad, który był materiałem wyjściowym do izolacji plazmidowego DNA na dużą skalę. Wykorzystano do tego zestaw Syngen Endofree Plasmid MAXI (Syngen, nr kat. SY101032), który jest dedykowany do izolacji plazmidów o wysokim standardzie czystości (wolnych od endotoksyn). Metoda izolacji opiera się na lizie alkalicznej, prowadzącej do odwracalnej zmiany konformacji plazmidowego DNA. Produktem końcowym procedury było uzyskanie 300 μl zawiesiny o stężeniu DNA plazmidowego mieszczącym się w przedziale 1- 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. W ten sposób powielono i oczyszczono plazmidy kodujące transgen, jak i te będące nieodzownymi elementami procesu pakowania funkcjonalnych cząsteczek rekombinowanych wektorów AAV:

pAAV-AgRPCre (6082 pz)

plazmid posiadający sekwencje ITR (ang. *inverted terminal repeats*), między którymi znajduje się wklonowany fragment AgRPCre oraz sekwencja regulatorowa WPRE (ang. *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*). Elementy nieujęte między sekwencjami ITR, stanowią podstawę do namnożenia plazmidu w komórkach bakteryjnych.

pAAV-AgRPEYFP (5488 pz)

plazmid posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się wklonowany promotor AgRP oraz znajdujący się tuż za nią fragment kodujący EYFP, a także sekwencja regulatorowa WPRE oraz hGH PolyA

pAAV-AgRPmCherry (5473 pz)

plazmid posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się wklonowany promotor AgRP oraz znajdujący się tuż za nią fragment kodujący mCherry, a także sekwencja regulatorowa WPRE oraz hGH PolyA

pAAV-CaMKII α (6533 pz)

plazmid posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się promotor CaMKII α , kierujący ekspresją Cre. Za genem rekombinazy znajdują się sekwencje regulatorowe WPRE oraz hGH PolyA

pAAV-guide1Dicer (5736 pz)

plazmid pAAV-px552Tom, posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się wiodący RNA komplementarny do fragmentu sekwencji *Dicer1* (guide1Dicer), kierowany promotorem U6. Ponadto, tuż za nim znajduje się promotor SynapsynyI (hSyn) oraz sekwencja reporterowego białka czerwonej fluorescencji tdTomato. Analogicznie do powyższych wektorów plazmidowych między fragmentami ITR znalazły się również sekwencje regulatorowe WPRE oraz hGH PolyA.

pAAV-guide2Dicer (5736 pz)

plazmid pAAV-px552Tom, posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się wiodący RNA komplementarny do alternatywnego fragmentu sekwencji *Dicer1* (guide2Dicer), kierowany promotorem U6. Ponadto, tuż za nim znajduje się promotor SynapsynyI (hSyn) oraz sekwencja reporterowego białka czerwonej fluorescencji tdTomato. Analogicznie do

powyższych wektorów plazmidowych między fragmentami ITR znalazły się również sekwencje regulatorowe WPRE oraz hGH PolyA.

pAAV-guideScramble (5736 pz)

plazmid pAAV-px552Tom, posiadający sekwencje ITR między którymi znajduje się promotor U6 oraz wiodący RNA, będący losowo zestawioną sekwencją nukleotydów (scramble), stanowiącym kontrolę dla guide1Dicer oraz guide2Dicer. Ponadto, tuż za nim znajduje się promotor ludzkiej SynapsynyI (hSyn) oraz sekwencja reporterowego białka czerwonej fluorescencji tdTomato. Analogicznie do powyższych wektorów plazmidowych między fragmentami ITR znalazły się również sekwencje regulatorowe WPRE oraz hGH PolyA.

pRC (7300 pz)

plazmid kodujący białka funkcjonalne Rep oraz białka strukturalne Cap, budujące kapsyd AAV. Oba geny pochodzą od wirusowego serotypu 2. Każdy z nich ulega ekspresji z oddzielnej sekwencji promotorowej, a ich właściwa ekspresja warunkuje proces składania się wektora wirusowego.

pDP1rs (23 700 pz)

plazmid będący nośnikiem genów kodujących białka kapsydu serotypu AAV1 oraz zawierający białka funkcjonalne, pochodzenia adenowirusowego (VA, E2A, E4), a także gen kodujący białko czerwonej fluorescencji RFP (ang. *red fluorescent protein*).

3.3 Przygotowanie wektorów wirusowych AAV

Składowe do produkcji rekombinowanych wektorów AAV (komórki pakujące oraz plazmidy pAAV) są elementami zestawu AAV Helper-free System (Agilent, nr kat. 240071). Przygotowanie rekombinowanych wektorów AAV jest procesem kilkietapowym, który opiera się na wykorzystaniu komórek pakujących AAV293. Jest to linia wywodząca się z embrionalnych ludzkich komórek nerki HEK293 (ang. *Human Embryonic Kidney 293 Cells*), która została zmodyfikowana w taki sposób by zapewniać stabilną ekspresję genów adenowirusowych E1A, E1B, niezbędnych do procesu składania wektorów AAV. Po transfekcji komórek pakujących następuje proces aktywnego formowania się cząstek wektorów AAV. W kapsydzie zamykane są cząsteczki ssDNA (ang. *single strand DNA*) zawierające na każdym z końców sekwencje ITR oraz zakodowane między nimi geny. Kolejne etapy

uwzględniają wyizolowanie wektorów AAV z komórek pakujących, ich oczyszczanie oraz określenie miana cząsteczek wirusowych. Szczegółowe kroki omówiono w kolejnych podrozdziałach.

3.3.1 Hodowla komórek AAV293

Komórki linii AAV293, będące elementem zestawu AAV Helper-free System (Agilent) zostały rozpropagowane zgodnie z protokołem producenta. Część komórek posłużyła do przygotowania zbankowanego materiału, utrzymywanego w oparach ciekłego azotu, zabezpieczając linię komórkową na bardzo wczesnych pasażach. Hodowlę tych adherentnych komórek utrzymywano w inkubatorze (Binder) w temperaturze 37 °C, atmosferze 5% CO₂ oraz wilgotności powietrza na poziomie 95%. Komórki hodowano w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma-Aldrich, nr kat. 6429), charakteryzującej się podwyższoną zawartością glukozy (4500 mg/L) i uzupełnionej 10% (v/v) płodową surowicą bydlęcą FBS (ang. *fetal bovine serum*, Biowest, nr kat. S1810-500) oraz 2% (v/v) roztworem 200mM L-glutaminy (Gibco, nr kat. A29168-01). Krytyczne dla utrzymania „pakujących” właściwości komórek AAV293 jest utrzymywanie ich w hodowli w konfluencji nie przekraczającej 50% powierzchni płytki. Dlatego też schemat pasażowania komórek (na butelki o powierzchni 175 cm²) i przesiewania ich na płytki do transfekcji (średnica 15 cm) został podporządkowany temu wymogowi.

3.3.2 Transfekcja komórek AAV293

Do wyprodukowania jednej porcji wektora AAV (50-70 µl o mianie >10⁸ gc/µl) niezbędna była transfekcja 10 płytek o średnicy 15 cm (Falcon, nr kat. 353025). Komórki przesiewano z butelek o powierzchni 175 cm² (Cell Star, nr kat. 660175) na wspomniane płytki w standardowej pożywce, po ich uprzedniej trypsynizacji (Trypsin-EDTA, Biowest, L0940) oraz odwirowaniu (5 min, 1000rpm). Wysiane komórki po ok. 48 godzinach i osiągnięciu konfluencji 70-80% poddawano potrójnej transfekcji z wykorzystaniem polietylenoiminy PEI (1mg/ml, Sigma-Aldrich, nr kat 919012), jako nośnika plazmidowego DNA. Współczynnik R, oznaczający stosunek µl PEI/µg DNA wynosił 3. Do produkcji AAV o serotypie mozaikowym 2/1 niezbędne było użycie plazmidu pRC (koduje białka Cap AAV2) oraz pDP1rs (koduje białka Cap AAV1). Trzecim kluczowym plazmidem był ten z wprowadzonym transgenem i sekwencjami ITR. Mieszanka plazmidów komponowana była w równomolowych stosunkach

(1:1:1), a podstawą do wyliczenia odpowiedniej ilości DNA (μg) poszczególnych plazmidów była ich wielkość i założenie, że 1 płytka może być transfekowana 50 μg DNA. Wszystkie ilości przeskalowano na 10 płytek uwzględniając 10% nadmiar. Mieszaninę 3 plazmidów zawieszano w pożywce DMEM bez dodatku surowicy i L-glutaminy, a następnie bardzo delikatnie nakropiono zawiesinę PEI spokojnie mieszając probówkę. W czasie 20 minutowej inkubacji w 37 °C, pożywkę na płytkach z komórkami wymieniono na taką ze zredukowaną ilością FBS (DMEM, 2% (v/v) FBS, 2% (v/v) 200mM L-glutamina). Po zakończeniu inkubacji mieszaninę DNA z PEI наносzono na płytki, pozostawiając je na kolejnych 8 godzin w inkubatorze. Następnie uzupełniano pożywkę na płytkach celem wyrównania ilości surowicy w medium do 10%. Skład pożywki kształtował się następująco: DMEM, 18% (v/v) FBS, 2% (v/v) 200mM L-glutamina. Po upływie 72 godzin komórki weryfikowano w obrazie mikroskopowym oceniając wydajność transfekcji na podstawie intensywności fluorescencji, pochodzącej od białka RFP (zakodowanego na plazmidzie pDP1rs). Ponadto istotnym wskaźnikiem wydajnej produkcji wektorów AAV jest zmiana morfologii komórek pakujących - pojawiające się na nich koliste uwypuklenia błony widoczne jako drobne „kuleczki”.

3.3.3 Izolowanie i oczyszczenie wektorów AAV

Pierwszym etapem izolacji wektorów AAV jest liza komórek. Po uważnym odciążeniu pożywki z nad komórek, zeszkrobywano komórki zawieszane w 1 x PBSie (BioShop, nr kat. L0615) przeznaczoną do tego celu jednorazową szpatułką, a następnie odwirowano tak zebrane osady komórkowe (8 min, 1000 rpm). Po zlaniu supernatantu z nad komórek osad zawieszano w roztworze do lizy (25 ml/osad z 5 płytek), którego skład przedstawiono w Tabeli 3.10.

Do komórek zawieszonych w roztworze do lizy dodano 10% roztwór deoksycholenu sodu (0,5% (v/v), Sigma-Aldrich, nr kat. D6750) oraz Benzonazę (Sigma-Aldrich, E1014-25KU) (50U/ml). Po godzinnej inkubacji w łaźni wodnej, w temperaturze 37 °C, próby wirowano przez 25 min. z prędkością 3000xg. Supernatant zawierał wyizolowane cząstki wirusowe.

Tak przygotowany lizat wirusowy był wstępnie oczyszczany z większych zanieczyszczeń z użyciem filtrów o zmniejszającej się średnicy porów (0,8 μm , 0,45 μm , 0,22 μm , Roth, nr kat. P820.1, KH55.1, KH54.1). Przefiltrowany lizat wirusowy przepuszczano następnie przez, zrównoważoną roztworem nr 1 (skład w Tabeli 10), kolumnę chromatograficzną ze złożem heparynowym (HiTrap Heparin HP 1ml, GE Healthcare, nr kat. 17-0406-01). Kolumna podłączona była systemem wężyków do strzykawki z lizatem wirusowym, a ruch płynu

napędzany był pompą perystaltyczną. Przesączenie się lizatu wirusowego przez kolumnę było równoznaczne ze związaniem się cząsteczek wirusowych do złoża na zasadzie powinowactwa między białkami kapsydu, a heparyną opłaszczającą agarozę, będącą składnikiem złoża. Następujące później etapy polegały na sekwencyjnym przepłukiwaniu kolumny roztworami o zwiększającym się stężeniu soli (roztwory 2-7, skład w Tabeli 3.10), przy czym trzy ostatnie służyły do elucji cząsteczek AAV w końcowej objętości 6 ml. Eluat następnie zagęszczano w trakcie kolejnych rund wirowania (2 min., 3000 x g) na kolumnach Amicon Ultra-4 z regenerowaną celulozą (Ultracel 50K NMWL, Millipore, nr kat. UFC805024) przeznaczonych do filtracji membranowej. Kończącą objętość zagęszczonego roztworu z wektorami AAV rozpipetowywano na małe porcje, wykorzystywane do późniejszych operacji stereotaktycznych. Choć wektory AAV należą do tych o wysokiej stabilności w każdych warunkach temperaturowych, to przy cyklach zamrażania i rozmrażania mogą tracić swoje właściwości do wydajnej transdukcji docelowych komórek.

Numer roztworu	Przeznaczenie
1	roztwór lizujący 150 mM NaCL, 20 mM TRIS
2	roztwór płuczący 100 mM NaCL, 20 mM TRIS
3	roztwór płuczący 200 mM NaCL, 20 mM TRIS
4	roztwór płuczący 300 mM NaCL, 20 mM TRIS
5	roztwór do elucji 400 mM NaCL, 20 mM TRIS
6	roztwór do elucji 450 mM NaCL, 20 mM TRIS
7	roztwór do elucji 500 mM NaCL, 20 mM TRIS

Tabela 3.10 Skład roztworów do izolacji AAV.

Tabela 3.11 przedstawia zestawienie wektorów AAV przygotowanych na cele niniejszego projektu.

Nazwa	Miano [gc/ul]
AAV-AgRPCre	1,35*10 ⁹
AAV-AgRPEYFP	6,08*10 ⁹
AAV-AgRP mCherry	3,15*10 ⁸
AAV-CaMKIICre	6,0*10 ⁹
AAV-guide1Dicer	7,5*10 ¹⁰
AAV-guide2Dicer	8,02*10 ¹¹
AAV-guideScramble	8,88*10 ¹⁰

Tabela 3.11 Wektory AAV oraz ich miana.

3.3.4 Oznaczanie miana wektorów AAV w reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Każdy wykorzystany w doświadczeniu roztwór AAV poddany był ocenie ilościowej za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR/quantitative PCR*) na przeznaczonym do tego aparacie StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Oznaczanie liczby cząstek AAV odbywało się w oparciu o krzywą standardową, sporządzoną z dziesięciokrotnych rozcieńczeń plazmidu użytego do produkcji określonego wektora. Każdy z punktów krzywej reprezentował ściśle określoną liczbę cząstek, która przeliczana była w oparciu o wielkość i stężenie plazmidowego DNA, z wykorzystaniem dostępnego kalkulatora on-line (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). W obliczeniach należało uwzględnić, że cząsteczki krzywej są reprezentacją dsDNA, a cząstki wektora to ssDNA. Odczynniki wykorzystane do pomiaru qPCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, nr kat. 4309155) oparte były na technologii emisji sygnału fluorescencyjnego w trakcie interkalowania między syntetyzowaną dwuniciową strukturę DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.12, wykorzystane pary starterów w Tabeli 3.13, a warunki reakcji w Tabeli 3.14. Miano było wynikiem uśrednienia wartości przeliczonych z trzech przygotowanych rozcieńczeń wektora (1:100, 1:1000, 1:10000), z których każde powtórzone zostało trzykrotnie. Reakcję każdorazowo przygotowywano na płycie 96-dołkowej (Applied Biosystems), którą wirowano (2 min., 2000 rpm) tuż przed rozpoczęciem reakcji.

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość w reakcji
SYBRGreen Master Mix	10 µl
10 µM starter F	1 µl
10 µM starter R	1 µl
dH2O miliQ	7 µl
Matrycowe DNA	1 µl
Objętość końcowa	20 µl

Tabela 3.12 Skład mieszaniny reakcyjnej.

Plazmid	Startery do reakcji qPCR
pAAV-AgRPCRE	qL-ITR F: 5' CACTGAGGCCGCCCG 3' qPromAgRP R: 5' GCAGCAGTGAAGTGAAAAAC 3'
pAAV-AgRPEYFP	
pAAV-AgRpmCherry	
pAAV-CaMKIIαCre	polyA_For: 5' AGTTGTTGGGATTCCAGGCATGC 3' polyA_Rev: 5' ACCAGCCTGGCCAATATGGTGAA 3'
pAAV-guide1Dicer	
pAAV-guide2Dicer	
pAAV-guideSramble	

Tabela 3.13 Sekwencje starterów do reakcji qPCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	Liczba cykli
1. wstępna denaturacja	50	02:00	
2. wstępna denaturacja	95	05:00	1
3. denaturacja	95	00:20	
4. przyłączenie starterów	60	00:40	40
5. elongacja	72	01:00	
6. generowanie krzywej topnienia	95	00:15	1
6. generowanie krzywej topnienia	60	01:00	1
6. generowanie krzywej topnienia	95	00:15	1

Tabela 3.14 Warunki reakcji qPCR. Kolorem niebieskim zaznaczono etap zbierania danych ilościowych.

3.4 Metody wprowadzenia mutacji w obrębie genu *Dicer1*

Wykorzystane w projekcie metody wprowadzania mutacji w obrębie genu *Dicer1* opierały się na technologii Cre-loxP. Polega ona na właściwościach rekombinazy Cre do rozpoznawania w genomie krótkich sekwencji loxP oraz wycinania, znajdującego się między nimi, fragmentu DNA. Nukleolityczna aktywność Cre była regulowana poprzez zastosowanie wariantu CreERT2, uruchamianego przez iniekcję Tamoksyfenu (opis w podrozdziale 3.4.2) lub poprzez dostarczenie Cre na nośniku (wirusowym) (opis w podrozdziale 3.4.1 oraz 3.4.3). Kolejną stosowaną strategią była stabilna ekspresja Cre w zwierzęciu transgenicznym (opis w podrozdziale 3.4.3) przy jednoczesnym dostarczaniu na nośnikach wirusowych elementów systemu CRISPR/Cas9 do precyzyjnej edycji genomu w obrębie genu *Dicer1*.

Zróżnicowanie wymienionych strategii opierało się również na prostym podziale, związanym z metodą dostarczania elementów systemu Cre-loxP i CRISPR/Cas9 do docelowych komórek. Uwzględniał on podania wektorów wirusowych *in vitro* do pierwotnych hodowli komórek hipokampalnych oraz *in vivo* do mózgu. Ponadto, zakładał dodatkowo indukcję mutacji *in vivo* poprzez dootrzewnowe zastrzyki z Tamoksyfenu.

3.4.1 Infekcja neuronalnej hodowli *in vitro* zawiesiną wektorów AAV

Wykorzystanie w pracy technologii CRISPR/Cas9 do doświadczeń funkcjonalnych poprzedzone było sprawdzeniem wydajności działania zaprojektowanych wariantów wiodącego RNA (AAV-guide1Dicer, AAV-guide2Dicer). W tym celu pierwotną hodowlę komórek hipokampalnych (wysianych na płytkach 24-dołkowych), wyprowadzoną z osesków linii Cas9, infekowano mieszankami odpowiednio rozcieńczonych w wodzie dH₂O miliQ wektorów wirusowych. Każde warunki eksperymentalne oraz całe doświadczenie powtórzono 3-krotnie. Zainfekowane komórki inkubowano przez około tydzień do czasu zebrania materiału do dalszej analizy (procedura opisana w podrozdziale 3.5).

Przygotowana mieszanka wektorów zakładała jednakowe ilości cząsteczek AAV dla każdego użytych wektorów, które kształtowały się jak poniżej:

- 1) AAV-CaMKII α Cre (1,6*10¹⁰ gc/dołek) + AAV-guide1Dicer (1,6*10¹⁰ gc/dołek)
- 2) AAV-CaMKII α Cre (1,6*10¹⁰ gc/dołek) + AAV-guide2Dicer (1,6*10¹⁰ gc/dołek)
- 3) AAV-CaMKII α Cre (1,6*10¹⁰ gc/dołek) + AAV-guideScramble (1,6*10¹⁰ gc/dołek)

- 4) AAV-CaMKII α Cre ($1,6 \cdot 10^{10}$ gc/dołek)
- 5) AAV-guide1Dicer ($1,6 \cdot 10^{10}$ gc/dołek)
- 6) AAV-guide2Dicer ($1,6 \cdot 10^{10}$ gc/dołek)
- 7) AAV-guideScramble ($1,6 \cdot 10^{10}$ gc/dołek)

Liczba kopii cząsteczek wektora (gc, ang. *genome copies*) ustalana była na podstawie ilości wysianych na każdy dołek komórek. Przyjęte MOI (ang. *multiplicity of infection*), czyli ilość cząsteczek AAV przypadająca na jedną komórkę w hodowli, wynosiło 100 000.

3.4.2 Dootrzewnowe podawanie Tamoksyfenu

Zwierzęta z indukowalną aktywnością CreERT2 (linia opisana w podrozdziale 3.1.2) poddawane były dootrzewnowym iniekcjom Tamoksyfenu (Sigma-Aldrich, nr kat. T5648), który przygotowywany był (w ilości na jedno zwierzę) według poniższego zestawienia:

- 10 mg Tamoksyfenu
- 100 μ l etanolu 99,8% Pure PA (Polskie Odczynniki Chemiczne)
- 900 μ l oleju słonecznikowego (Sigma-Aldrich)

Protokół zakładał 5-dniowy cykl iniekcji dootrzewnowych, dwa razy w ciągu dnia, w odstępie 8-12 godzin. Roztwór Tamoksyfenu przetrzymywano w lodówce, a przed podaniem każdorazowo ogrzewano go do temperatury pokojowej.

3.4.3 Domózgowe podania wektorów AAV

Większość przeprowadzonych doświadczeń opierała się na domózgowych, precyzyjnych iniekcjach wektorów AAV, z wykorzystaniem aparatu do podań stereotaktycznych (Stoelting). Wszystkie zwierzęta poddane operacjom były starannie przygotowywane do zabiegu. W stan głębokiej narkozy wprowadzane były dootrzewnowym zastrzykiem z mieszaniną ketaminy (Ketamidol, 50-75 mg/kg) i wodorotlenku medetomidyny (Cepetor, 0,5-1 mg/kg). Śpiące i znieczulone zwierzę poddawane było serii podskórnych zastrzyków o silnym działaniu analgetycznym, zabezpieczającym mysz w trakcie zabiegu (opiod: butorfanol winianu, Butomior, 3.3 mg/kg), jak i na wiele godzin po jego zakończeniu (lek z grupy NLPZ: kwas tolfenamowy, Tolfedine, 2.0 mg/kg). Dodatkowo zwierzęta

otrzymały osłonowo antybiotyk (enrofloksacyna, Baytril, 2,5 mg.kg). Sierść na skórze głowy usuwano, a po upewnieniu się, że zwierzę jest głęboko znieczulone (brak odruchów po ściśnięciu łap czy ogona, brak odruchu rogówkowego, równomierny, spokojny oddech), umieszczano je w aparacie stereotaktycznym unieruchamiając głowę. Skórę głowy traktowano jodyną i żelem znieczulającym miejscowo (Lidokaina, Polfa). Oczy zwierząt zabezpieczano przed wysychaniem maścią Vita-Pos (Ursapharm). Po przecięciu skóry głowy, usunięciu z pola operacyjnego opony twardej, wypoziomowaniu głowy, ustalano na podstawie współrzędnych z atlasu mózgu (Allen Brain Atlas) oraz punktów przecięcia szwów na czaszce (Bregmy i Lambda) punkty do nawiercenia otworów. W kolejnym kroku, wcześniej przygotowaną na wyciągarce do minipipet (Sutter P-87), szklaną kapilarę (Blaubrand intraMark, nr kat. 7087-07) wprowadzano do mózgu na odpowiednią głębokość. Jej zawartość, stanowiącą roztwór wektorów AAV, powoli wypuszczano do docelowej struktury (w objętości ok. 125 nl/stronę), odczekując każdorazowo 15 min. przed wysunięciem kapilary. Wyznaczone dla jądra łukowego koordynaty nieznacznie różniły się między kohortami zwierząt lub szczepami (-1,46 w płaszczyźnie przód/tył (A/P), +/- 0,20 w płaszczyźnie lewo/prawo (L), -5,6 w płaszczyźnie brzusznej/grzbietowej (D/V)). Zwierzętom w trakcie zabiegu podawano podskórnie roztwór glukozy i/lub soli fizjologicznej ogrzane do temperatury ciała, co miało chronić je przed wychłodzeniem i odwodnieniem. Końcowym etapem zabiegu było założenie rozpuszczalnych szwów Vicryl 4,0 (B.Braun Novosyn, nr kat. C0068029) na skórze głowy, ponowne zabezpieczenie skóry głowy żelem z lidokainą i podanie dootrzewnowe zastrzyku z chlorowodorku atypamezolu (Revertor, 0,5-1 mg/kg). Jest to substancja, która znosi działanie wodorotlenku medetomidyny. Zwierzęta wybudzały się w pojedynczych klatkach, ustawionych na płycie grzewczej. Dodatkowo do środka klatki wkładano namoczoną karmę i zapewniano zwierzętom wzbogacone środowisko, dbając o ich dobrostan.

Wszystkie wykorzystywane w trakcie zabiegów narzędzia (F.S.T oraz B.Braun CHIFA) były sterylizowane w temperaturze 120°C.

Podania domózgowe wektorów AAV obejmowały:

- 1) Iniekcje AAV-AgRPCre, AAV-AgRPYFP, AAV-AgRPMCherry do zwierząt Dicer fl/fl oraz Dicer fl/fl STOP-tdTomato
- 2) Iniekcje AAV-AgRPCre, AAV-guide1Dicer, AAV-guide2Dicer, AAV-guideScramble do zwierząt Cas9 (system CRISPR/Cas9)

- 3) Iniekcje AAV-guide2Dicer, AAV-guideScramble do zwierząt GadCreCas9, Vglut2CreCas9, AgRPCreCas9 (system CRISPR/Cas9)

3.5 Badanie poziomu ekspresji genu *Dicer1* w hodowli neuronalnej *in vitro*

Opisana w podrozdziale 3.4.1 metoda infekcji pierwotnej hodowli hipokampalnej składowymi systemu CRISPR/Cas9 miała na celu weryfikację skuteczności wyciszania ekspresji *Dicer1*. Oparta została o pomiar względnego poziomu ekspresji genu *Dicer1* (fold-change) w reakcji qPCR. Wymagała wyizolowania materiału RNA z zainfekowanych komórek, zsyntetyzowania cDNA na matrycy RNA, czyli reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie oceny wspomnianego poziomu ekspresji w reakcji qPCR, z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych sond.

3.5.1 Izolowanie RNA

Etap zbierania zainfekowanych komórek odbywał się na lodzie, a wszystkie kolejne kroki pod laminarem oczyszczonym z RNaz (RNaseZAP, Sigma-Aldrich, nr kat. R2020), z wykorzystaniem zestawu do izolacji RNA (Rneasy Mini Kit, Qiagen, nr kat. 74004), zgodnie ze wskazaniem producenta. Metoda ta jest zmodyfikowaną wersją izolacji RNA metodą Chomczyńskiego, która opiera się na rozdziale frakcji poprzez ekstrakcję fenolowo-chloroformową, a następnie filtrowanie lizatu na kolumnach ze złożem z włókna szklanego. Produktem końcowym było 30 µl RNA zawieszono w wodzie wolnej od RNaz (DEPC H₂O). RNA przechowywano w -80°C.

Do pomiaru stężenia próbek RNA, a także wszystkich innych prób z kwasami nukleinowymi wykorzystywanymi w niniejszej pracy (cDNA, DNA), użyto spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific).

3.5.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do syntezy cDNA na matrycy RNA użyto 100 ng RNA dla każdej próbki oraz zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, nr kat. 4368814). W Tabeli 3.15 zestawiono skład mieszaniny reakcyjnej (w przeliczeniu na 1 dołek), w Tabeli 3.16 warunki reakcji.

Składniki mieszanki reakcyjnej	Objętość w reakcji
10X RT Bufor	2 µl
25X dNTP miks (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe RT	1 µl
Inhibitor RNaz	1 µl
H ₂ O wolna od RNaz	3,2 µl
RNA	100 ng/10 µl
objętość reakcji	20 µl

Tabela 3.15 Skład mieszanki reakcyjnej.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]	Liczba cykli
1	25	10:00	1
2	37	02:00:00	1
3	85	05:00	1
4	4	∞	1

Tabela 3.16 Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

3.5.3 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym z użyciem cDNA jako matrycy

Pomiar poziomu ekspresji genu *Dicer1* odbywał się z wykorzystaniem komercyjnych sond molekularnych (Applied Biosystems) oraz odczynnika TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, nr kat. 4369542). Sondy wykorzystane do pomiaru wiązały się z sekwencją genu *Hprt* (Mm03024075_m1), będącego genem referencyjnym oraz w obrębie egzonów 14-15 genu *Dicer1* (Mm00521722_m1). Sondy molekularne działają odmiennie niż wspomniany odczynnik SYBRGreen. Specyfika ich budowy (znacznik fluorescencyjny na końcu 5' oraz niwelator sygnału MGB-NFQ na końcu 3') uniemożliwia świecenie w momencie związania się sondy z docelową sekwencją. Dopiero w trakcie polimeryzacji nici fluorochrom z końca 5' uwalnia się emitując sygnał rejestrowany przez aparat (OneStepPlus, Applied Biosystems).

Badania względnego poziomu ekspresji między próbkami badanymi (guide1Dicer, guide2Dicer), a próbką zwaną kalibratorem (guideScramble) dokonano w oparciu o metodę

$\Delta\Delta Ct$. Wyniki ekspresji dla genu *Dicer1* dla każdej z badanych prób były normalizowane względem genu *Hprt*. Każda próba miała 3 techniczne powtórzenia. Do każdej z reakcji użyto 250 ng matrycy cDNA.

3.6 Badanie przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy

Wszystkie funkcjonalne doświadczenia uwzględnione w niniejszej pracy zakładały pomiar masy ciała zwierząt, a także ilości zjedzonego przez nie pokarmu. Pomiary odbywały się w cyklu cotygodniowym, zawsze na tej samej wadze, począwszy od pierwszego dnia badania. W przypadku doświadczeń z indukcją mutacji za pomocą Tamoksyfenu, pierwszy pomiar masy ciała wyznaczony był na trzeci dzień (spośród pięciu) w tygodniu dootrzewnowych iniekcji. U zwierząt poddawanych zabiegom operacyjnym moment ważenia przy doborze dawki leków anestetycznych był pierwszym pomiarem masy ciała. W obu przypadkach traktowano to jako „pomiar 0” (oznaczony na wykresach pomiaru masy ciała jako T0). Pomiar ilości zjedzonej karmy odbywał się z tygodniowym opóźnieniem. W punkcie czasowym T0 odważano 100g karmy, a liczbę zjedzonych gramów mierzono w kolejnym tygodniu (T1), jednocześnie uzupełniając ilość karmy ponownie do 100g. Cotygodniowych pomiarów dokonywano do końca trwania doświadczenia.

3.7 Utrwalanie i przygotowanie tkanek do dalszych analiz

3.7.1 Utrwalanie perfuzyjne

W celu przygotowania tkanek do późniejszych analiz mikroskopowych, przeprowadzano perfuzję, będącą metodą utrwalającą. Polega ona na wymianie płynów ustrojowych zwierzęcia na roztwór 4% paraformaldehydu (PFA).

Zwierzęta wprowadzano w stan głębokiej narkozy poprzez dootrzewnową iniekcję mieszaniny ketaminy z wodorotlenkiem medetomidyny (opis w podrozdziale 3.4.3), a następnie podawano im Morbital (Pentobarbital sodowy 133,3 mg/ml, Pentobarbital 26,7 mg/ml, 1-2 ml/kg). Po sprawdzeniu braku reakcji odruchowych zwierząt na bodźce oraz ustaniu oddechu, przystępowano do dalszej procedury. Klatkę piersiową nacinano tak, aby uwidocznić serce, a następnie do lewej komory serca wbijano igłę, podłączoną do systemu wężyków, napędzanych pompą perystaltyczną. Jednocześnie, poprzez nacięcie prawego przedsionka serca, przerywano

ciągłość naczyń krwionośnych. W pierwszej kolejności do krwioobiegu włączano 1 x PBS (tabletki PBS, BioShop, nr kat. PBS404.100), wypłukując tym samym płyny ustrojowe. Następnie roztwór 1 x PBS zastępowano 4% roztworem formaliny buforowanej pH 7,4 (Chempur, 114321729). Po osiągnięciu pożądanego efektu utrwalenia izolowano mózg, który przez kolejne 24 godziny zanurzony był w roztworze 4% paraformaldehydu, po czym zastępowano go 1 x PBS z dodatkiem azydku sodu (0,001%) i tak przechowywano w temperaturze 4°C.

3.7.2 Przygotowanie skrawków tkankowych przy użyciu vibratomu

Analizę immunohistochemiczną poprzedzało pocięcie utrwalonych mózgow na skrawki grubości 50 µm. Wykorzystano do tego vibratom (Leica). Procedura odbywała się w temperaturze pokojowej. Preparatyka polegała na odcięciu mózdzku, przyklejeniu mózgu (za pomocą kleju typu SuperGlue) do ruchomej platformy, którą następnie mocowano w wanience wypełnionej roztworem 1 x PBSu. Naczynie to kotwiczono na zautomatyzowanym elemencie zapewniającym ruchomość wanienki w płaszczyźnie góra/dół. Mózgi krojono z częstotliwością pracy ostrza na poziomie 85 w skali 100 Hz, oraz z prędkością cięcia ok. 1,23 mm/s (na podziałce jest to wartość 5 w skali 10). Skrawki cięto w przekroju czołowym. Zbierano wszystkie skrawki będące reprezentacją jądra łukowatego. Przechowywano je w 1 x PBSie z dodatkiem azydku sodu (0,001%, Sigma-Aldrich, nr kat. 71289), w temperaturze 4°C.

3.8 Analiza biochemiczna skrawków tkanki mózgowej z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych (IHC)

Do oceny poziomu ekspresji białek funkcjonalnych (Cre, Cas9) oraz wzmocnienia sygnału niektórych białek reporterowych (GFP) z zastosowaniem skrawków tkanki mózgowej wykorzystano techniki immunohistochemiczne, bazujące na reakcji specyficznego rozpoznawania przez przeciwciało konkretnego antygenu i wiązania się z nim.

3.8.1 Znakowanie immunohistochemiczne z użyciem 3'3'- diaminobenzyny (DAB)

Obecność rekombinazy Cre w doświadczeniach opartych na domózgowych podaniach AAV-AgRPCre do jądra łukowatego, w modelach myszy C57Bl/6 oraz Dicer fl/fl oceniano na podstawie barwienia immunohistochemicznego, wykorzystującego 3'3'- diaminobenzynę

DAB (Sigma-Aldrich, nr kat. D4293-50SET). Protokół obejmował czynności podzielone na dwa dni. Wszystkie etapy (poza całonocną inkubacją z przeciwciałem I-rzędowym) miały miejsce w temperaturze pokojowej.

Pierwszego dnia blokowano endogenną aktywność peroksydazy poprzez inkubację skrawków w mieszaninie 1 x PBS/Metanol/30% H_2O_2 w stosunku 1:1:0,01 (15 min.), po czym skrawki płukano (2 x 5 min.) roztworem 1 x PBSu z dodatkiem Triton-X-100 0,1% (v/v). Blokowanie niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał miało miejsce w trakcie inkubacji (30 min.) skrawków w 5% roztworze świńskiego osocza NSS (ang. *normal swine serum*) (Vector Laboratories, nr kat. S4000). Pierwszorzędowe królicze przeciwciało rozpoznające Cre (wyprodukowane w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki I, DKFZ), rozcieńczono (1:3000) w roztworze 1 x PBST z dodatkiem 5% NSS i inkubowano w jego obecności skrawki umieszczone w przeznaczony do tego celu kołyszce, na noc w 4°C.

Kolejnego dnia płytkę ze skrawkami płukano 1 x PBST (3 x 5min.), po czym inkubowano ją z II-rzędowym biotynylowanym przeciwciałem, skierowanym odpowiednio przeciwko antygenom króliczym (Vector Laboratories, nr kat. BA-1000), które rozcieńczono w stosunku 1:400. Po etapie płukania w 1 x PBST (3 x 5min.), skrawki inkubowano (30 min.) z roztworem ABC przygotowanym według zaleceń producenta (Vector Laboratories, nr kat. PK-4000). Potem następowało kolejne płukanie z 1 x PBST (1 x 5min.) oraz 1 x PBS (2 x 5min.). Ostatnim etapem była ekspozycja skrawków na roztwór DAB. Czas inkubacji ustalany był indywidualnie w zależności od szybkości wysycania się skrawków intensywnym kolorem. Reakcję blokowano dodatkiem wody z kranu, bogatej w minerały.

Skrawki nakładano na szkiełka podstawowe (SuperFrost Plus, Thermo Scientific, nr kat. 631-0848) i pozostawiano na kilka godzin do wyschnięcia, a następnie zatapiano je w preparacie Entellan (Sigma-Aldrich, nr kat. 107960), przykrywając szkiełkami nakrywkowymi (Menzel Glaser, Thermo Scientific, nr kat. B-1220). Skrawki po barwieniu DAB przechowywano w temperaturze pokojowej.

3.8.2 Znakowanie immunofluorescencyjne

Barwienia immunofluorescencyjne wykonano na potrzeby wzmocnienia sygnału pochodzącego od białka GFP, będącego markerem Cas9, celem oceny poziomu rekombinacji linii transgenicznym GadCreCas9, Vglut2CreCas9 oraz AgRPCreCas9.

Ponadto, zwizualizowano poziom ekspresji Cre, Cas9 oraz tdTomato w tych samych liniach, po domózgowej iniekcji AAV-guide2Dicer/AAV-guideScramble.

Analogicznie do barwienia opisanego w podrozdziale 3.8.1, wszystkie kroki (poza całonocną inkubacją z przeciwciałem I-rzędowym) miały miejsce w temperaturze pokojowej. Etap wstępnego płukania skrawków w roztworze 1 x PBST (2 x 5min.) poprzedzał blokowanie niespecyficznych wiązań (5% NSS/PBST, 30 min.). Kolejną czynnością była całonocna inkubacja skrawków z I-rzędowym przeciwciałem (w roztworze 5% NSS/PBST), delikatnie kołyszących się w temperaturze 4°C.

Następnego dnia płytkę ze skrawkami płukano 1 x PBST (3 x 5min.), po czym inkubowano ją (przez 1 godzinę) z II-rzędowym przeciwciałem fluorescencyjnym, odpowiednio rozcieńczonym (zestawienie wykorzystanych przeciwciał i ich rozcieńczeń znajduje się w Tabeli 3.17).

W przypadku pojedynczego barwienia, po czasie inkubacji z II-rzędowym przeciwciałem, skrawki płukano jednokrotnie w 1 x PBST, dwukrotnie w 1 x PBS, po czym nakładano je na szkiełka (SuperFrost Plus, Thermo Scientific). Nie pozwalając im całkowicie wyschnąć, zatapiano je w medium Vectashield Vibrance with DAPI (VectorLabs, nr kat. 1800-10).

W momencie, gdy kontynuowano barwienie podwójne, po etapie jednokrotnego płukania skrawków w 1 x PBST, наносono na skrawki roztwór z kolejnym rozcieńczeniem I-rzędowego przeciwciała, pozostawiając je do inkubacji na kolejną noc. Wszystkie etapy następujące kolejnego dnia powtarzały się, aż do momentu przygotowania preparatów mikroskopowych. Brzegi szkiełek nakrywkowych zabezpieczano lakierem do paznokci, a skrawki przechowywano w zaciemnieniu, w 4°C.

Typ	Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie
I-rzędowe	wykrywające Cre	królicze	1:3000
I-rzędowe	wykrywające GFP (MBL, nr kat. 598)	królicze	1:1000
II-rzędowe	biotynylowane wykrywające królicze IgG (Vector Laboratories, nr kat. BA-1000)	owcze	1:400
II-rzędowe	wykrywające królicze IgG (AlexaFluor 647) (Life Technologies, nr kat. A21244)	owcze	1:200
II-rzędowe	przecwykrywające królicze IgG (AlexaFluor 488) (Life Technologies, nr kat. A11073)	owcze	1:500

Tabela 3.17 Zestawienie przeciwciał użytych do barwień.

3.9 Analiza mikroskopowa wyznakowanych skrawków tkanek mózgu

Przedstawione w pracy zdjęcia mikroskopowe zostały wykonane z użyciem mikroskopu konfokalnego Zeiss800 LSM oraz mikroskopu fluorescencyjnego Olympus Fluoview FV3000. Do analizy obrazu zastosowano program FIJI ImageJ (wersja 2.1.0/1.53c).

3.10 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem programu GraphPad Prism 9 (wersja 9.3.1). Do badań przyrostu masy ciała i oraz ilości zjedzonego pokarmu przedstawionego na wykresie kumulatywnym zastosowano test 2-czynnikowej analizy wariancji ANOVA z powtarzalnymi pomiarami i odpowiednimi testami post-hoc do porównań wielokrotnych (zastosowane testy opisano szczegółowo w opisach rycin). Z kolei znamienność statystyczna dla ilości zjedzonego pokarmu, przedstawionego na wykresie jako średnia z trzech tygodni, sprawdzana była testem t-studenta lub 1-czynnikową analizą wariancji ANOVA.

4. Wyniki

4.1 Analiza znaczenia genu NPY dla rozwinięcia fenotypu otyłości u myszy

DicerCKO

Opisane w niniejszej pracy doświadczenia, są rozwinięciem badań prowadzonych na modelu Dicer fl/fl CaMKII α CreERT2, zwanego w skrócie DicerCKO (CKO, ang. *conditional knock-out*) (W. Konopka i in. 2010; Vinnikov i in. 2014). W modelu tym rekombinacja indukowana jest podaniem Tamoksyfenu, który aktywuje CreERT2 w neuronach przodomózgowia, z aktywnym promotorem kinazy II zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny (CaMKII α). Egzony 20-21 genu *Dicer1* otoczone są, rozpoznawanymi przez rekombinazę CreERT2, sekwencjami loxP (Cobb i in. 2005), dzięki temu możliwe jest ich wycięcie. Fragment ten koduje domenę z aktywnością kluczową dla dojrzewania cząsteczek miRNA. Zatem usunięcie tych egzonów równoznaczne jest z utratą dojrzałych miRNA w neuronach, w których aktywowana została CreERT2.

Obserwowany wzrost masy ciała i konsumpcji jedzenia, charakterystyczny dla myszy DicerCKO, opisany został w doniesieniach niezależnych grup badawczych (Vinnikov i in. 2014; Fiorenza i in. 2016; Mang i in. 2015). Ponadto, Vinnikov i in. udokumentowali w tym modelu wzrost poziomu zarówno mRNA jak i białka dla oreksygenicznych neuropeptydów AgRP oraz *Npy*. To stało się punktem wyjścia do stworzenia modelu, który odpowiadałby na pytanie o udział NPY w rozwinięciu fenotypu otyłości u myszy z dysfunkcyjnym genem *Dicer1* w neuronach CaMKII α . Tym samym, wykonując serię krzyżówek myszy, uzyskano zwierzęta pozbawione zarówno obydwu alleli genu *Npy*, jak i z sekwencjami loxP, otaczającymi wybrany fragment genu *Dicer1* oraz z ekspresją rekombinazy CreERT2 w neuronach CaMKII α (NPY-KO/DicerCKO).

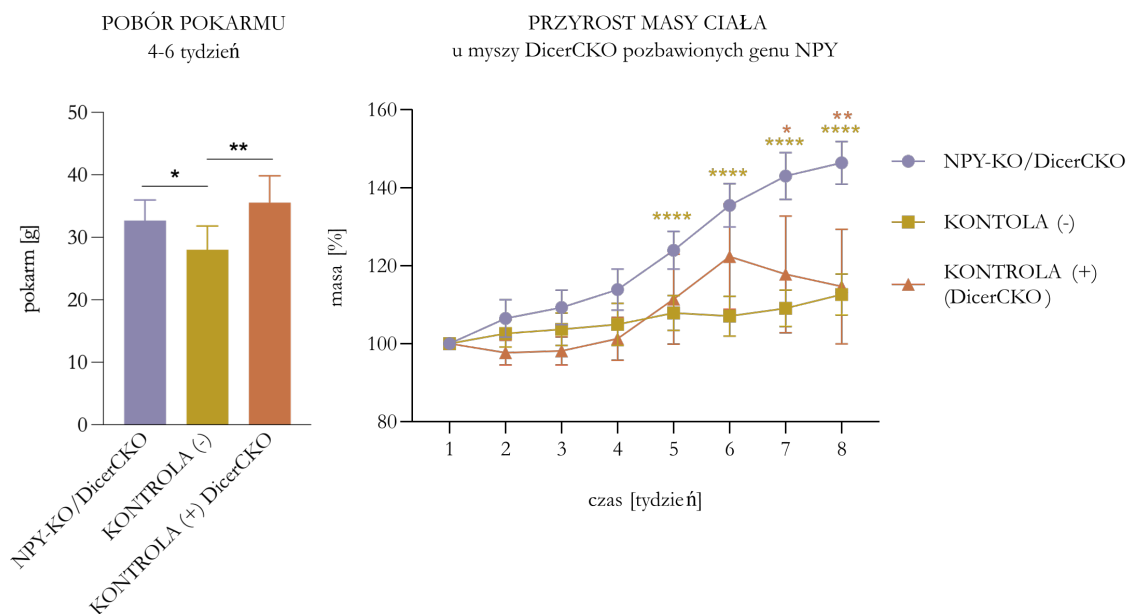
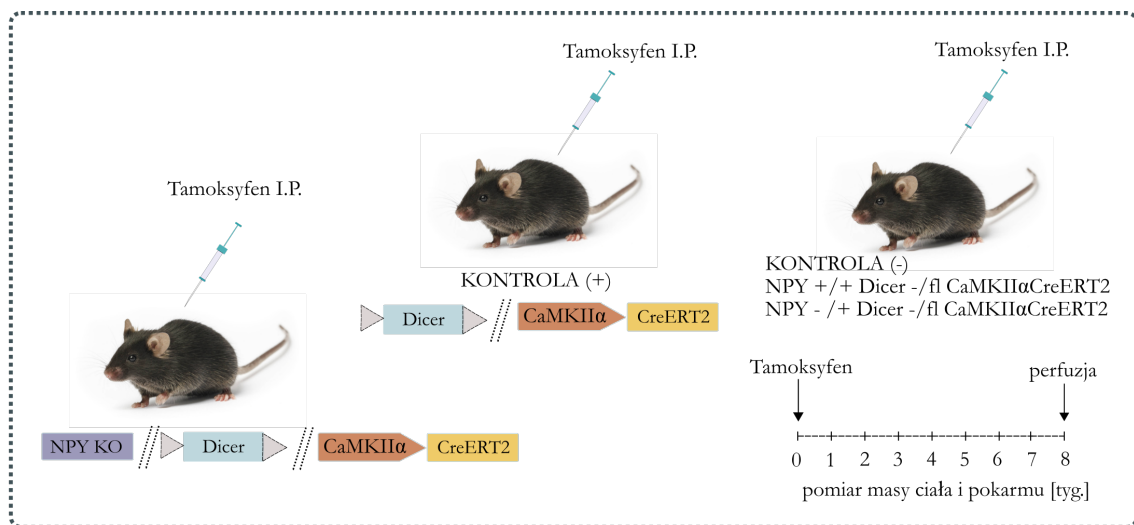
Ocena zaangażowania genu *Npy* i jego białkowego produktu w fenotyp otyłości wymagała w pierwszej kolejności indukcji mutacji. Myszy DicerCKO, z całkowitą utratą genu *Npy* (NPY-KO) poddane zostały, dootrzewnowej iniekcji Tamoksyfenem (w reżimie: 2 iniekcje dziennie przez 5 kolejnych dni). W jego obecności zmodyfikowana rekombinaza CreERT2, ulegając translokacji do jądra, wycinała sekwencje loxP, otaczające fragment genu *Dicer1*. W ten sposób otrzymano myszy pozbawione *Npy* oraz genu *Dicer1* a w konsekwencji większości cząsteczek dojrzałych miRNA w neuronach CaMKII α (grupa badana NPY-KO/DicerCKO, N=10). Grupę kontrolną stanowiły osobniki heterozygotyczne bądź niezmienione pod względem mutacji w

genie *Npy* oraz *Dicer1* oraz te bez obecności CreERT2 (kontrola negatywna (-), N=9). Ponadto, w badaniu wykorzystano scharakteryzowaną wcześniej linię DicerCKO, która stanowiła kontrolę pozytywną doświadczenia (N=6). Przez kolejnych osiem tygodni od momentu indukcji mutacji (T0) dokonywano pomiaru masy ciała zwierząt oraz ilości zjedzonego pokarmu z częstotliwością raz na tydzień. Na Rycinie 4.1, w ramce, przedstawiony jest schemat doświadczenia. Poniżej znajdują się dwa wykresy. Jeden obrazuje średni przyrost masy ciała dla każdej z badanych grup (wyrażony w procentach), w kolejnych punktach czasowych (\pm SD). Kolejny, to uśredniona wartość dla sumy poboru pokarmu (wyrażona w gramach) z tygodnia czwartego, piątego i szóstego. Wybór tygodni do pomiaru pokarmu podyktowany został wcześniejszymi obserwacjami, prowadzonymi na linii DicerCKO, które pokazały, że jest to okres, w którym rozwija się u mutantów hiperfagia.

Na wykresie opisującym przyrost masy ciała, uwidaczniają się istotne statystycznie różnice ($p < 0,0001$) między grupą badaną NPY-KO/DicerCKO, a grupą kontrolną, począwszy od piątego tygodnia po indukcji mutacji. W piątym tygodniu średnia wartość procentowa masy ciała dla grupy badanej wynosiła $123,9 \pm 6,7$ % oraz $107,8 \pm 5,7$ % dla kontroli negatywnej. Średnia masa ciała mutantów NPY-KO/DicerCKO wykazywała stały przyrost, by w ostatnim tygodniu badania osiągnąć wartość $146,3 \pm 7,6$ %. Poczynając od siódmego tygodnia różnicuje się w sposób istotny również przyrost masy ciała między grupą badaną NPY-KO/DicerCKO, a kontrolą pozytywną DicerCKO ($p < 0,05$ dla 7 tygodnia, $p < 0,01$ dla 8 tygodnia). Choć brak istotnych statystycznie różnic w przyroście masy ciała między kontrolą pozytywną DicerCKO, a kontrolą negatywną, to wyraźnie zaznacza się tendencja wzrostowa dla grupy DicerCKO, z obserwowaną wcześniej kinetyką przyrostu masy ciała. Charakteryzuje się ona nagłym wzrostem masy ciała między czwartym, a szóstym tygodniem po indukcji mutacji i umiarkowanym jej spadkiem po szóstym tygodniu. Nieoczekiwaną obserwacją w tej grupie był delikatny spadek masy ciała w pierwszych 3 tygodniach po indukcji mutacji.

Wykres odnoszący się do ilości zjedzonego pokarmu pokazuje, że największą ilość pokarmu w zakładanym przedziale czasowym zjadły osobniki z grupy DicerCKO, a wartość ta wynosiła średnio $35,5 \pm 4,2$ grama. Dla grupy badanej było to średnio $32,5 \pm 3,3$ grama, a osobniki kontrolne zjadły średnio $28,0 \pm 3,7$ grama. Tym samym uwidoczniły się istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą DicerCKO, a kontrolą negatywną ($p < 0,01$) oraz grupą NPY-KO/DicerCKO, a kontrolą negatywną ($p < 0,05$). Podsumowując powyższe obserwacje można stwierdzić po pierwsze, że myszy w grupie DicerCKO zachowują się w sposób oczekiwany tj. zwiększają masę ciała, co ma bezpośredni związek ze zwiększoną ilością spożywanego pokarmu. Po drugie, brak genu *Npy* nie wygasza fenotypu otyłości u zwierząt

pozbawianych miRNA w neuronach CaMKII α . Wręcz przeciwnie, myszy z grupy NPY-KO/DicerCKO znacząco zwiększają swoją masę, rozwijając fenotyp otyłości. Zwierzęta te zjadły istotnie więcej niż myszy kontrolne, choć bez znaczącej różnicy z grupą DicerCKO. Ich masywna otyłość pozostała bez liniowego związku z ilością spożytego pokarmu. Choć zjadły porównywalne, do grupy DicerCKO, ilości karmy, to osiągnęły znacznie wyższą średnią masę ciała. Wyniki tego doświadczenia są podstawą do wniosku, że ani gen *Npy*, ani jego białkowy produkt nie są kluczowe w rozwinięciu otyłości u myszy z neurospecyficzną delecją *Dicer1* w neuronach przodomózgowia.



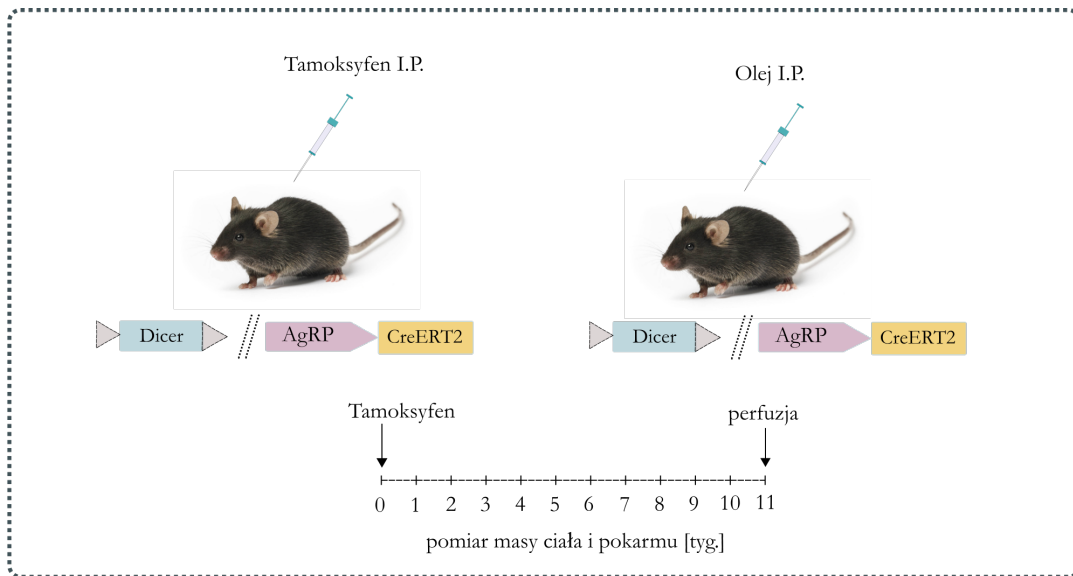
Rycina 4.1 (opis na kolejnej stronie)

Rycina 4.1 Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości spożytego pokarmu między 4 a 6 tygodniem u myszy NPY-KO/DicerCKO (N=10), DicerCKO (N=6) oraz w grupie kontrolnej (N=9). Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia. Indukcja mutacji nastąpiła poprzez dootrzewnowe podanie Tamoksyfenu w tygodniu poprzedzającym pierwszy pomiar (T0). Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD; ilość zjedzonego pokarmu to uśredniony wynik dla tygodnia 4, 5 oraz 6 \pm SD; Analiza statystyczna: pomiar masy- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych. pobór jedzenia- jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych.

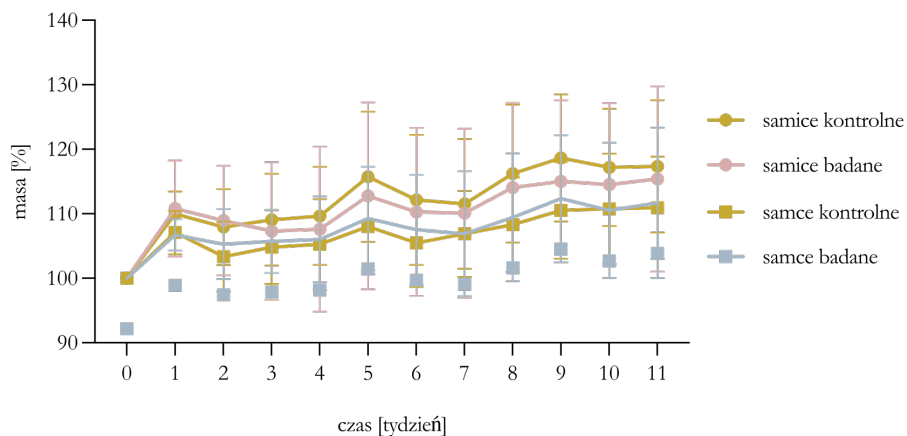
4.2 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy AgRPCreERT2Dicer

Rekombinacja w wyjściowym modelu otyłości w linii myszy DicerCKO, ma miejsce m.in. w jądrach podwzgórza, z których jądro łukowate jest kluczowym ośrodkiem regulującym pobór pokarmu (Vinnikov i in. 2014). Obserwowana u zwierząt DicerCKO rozwijająca się hiperfagia (podparta podwyższonym poziomem czynników oreksygeniczných), wskazuje na aktywność neuronów oreksygeniczných podwzgórza, z których główną grupę stanowią neurony AgRP. Usunięcie miRNA w tych neuronach, u osobników dorosłych, pozwoliłoby z dużą precyzją ocenić ich zaangażowanie w obserwowany fenotyp. Po serii kojarzeń zwierząt Dicer fl/fl z indukowalną linią, w której ekspresja CreERT2 uruchamiana jest jedynie w obecności Tamoksyfenu, w neuronach AgRP, otrzymano ostateczną grupę eksperymentalną AgRPCreERT2Dicer. Zwierzęta podzielono na dwie grupy, z których jedna otrzymała dootrzewnowe iniekcje z Tamoksyfenu (grupa badana: $N_{samice}=11$, $N_{samce}=7$), a druga- z oleju, w którym Tamoksyfen jest rozpuszczany (grupa kontrolna: $N_{samice}=11$, $N_{samce}=8$). Od momentu indukcji mutacji (T0) zwierzęta były poddawane cotygodniowym pomiarom masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu przez kolejnych jedenastu tygodni. Na Rycinie 4.2, pierwszy wykres przedstawia średni przyrostu masy ciała dla każdej z badanych grup (z podziałem na płeć), wyrażony w procentach. Dwa kolejne to uśredniona, kumulatywna ilość zjedzonego pokarmu (oddzielnie dla każdej z płci), wyrażona w gramach.

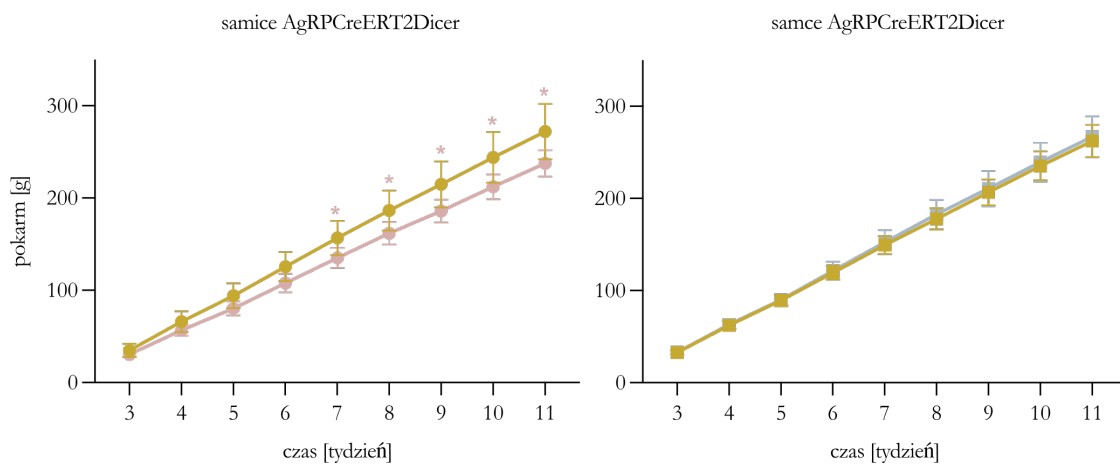
W żadnej z badanych grup nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic w przyroście masy ciała. Żadna z płci w grupie badanej nie rozwinęła fenotypu otyłości, a średnia względna masa nie przekroczyła 120% masy początkowej w jedenastym tygodniu badania. Kumulatywny wykres zjedzonego pokarmu w grupie samców odsłonił brak jakichkolwiek różnic między grupą badaną, a kontrolną. Z kolei samice z grupy badanej, począwszy od siódmego tygodnia po indukcji mutacji, jadły istotnie mniej niż grupa kontrolna ($p<0,05$). Powyższe niespodziewane obserwacje uzasadniły podjęcie działań mających na celu sprawdzenie wzoru i wydajności rekombinacji w linii AgRPCreERT2Dicer.



PRZYROST MASY CIAŁA
AgRPCreERT2Dicer po iniekcji Tamoksyfenem



POBÓR POKARMU WYKRES KUMULATYWNY



Rycina 4.2 (opis na kolejnej stronie)

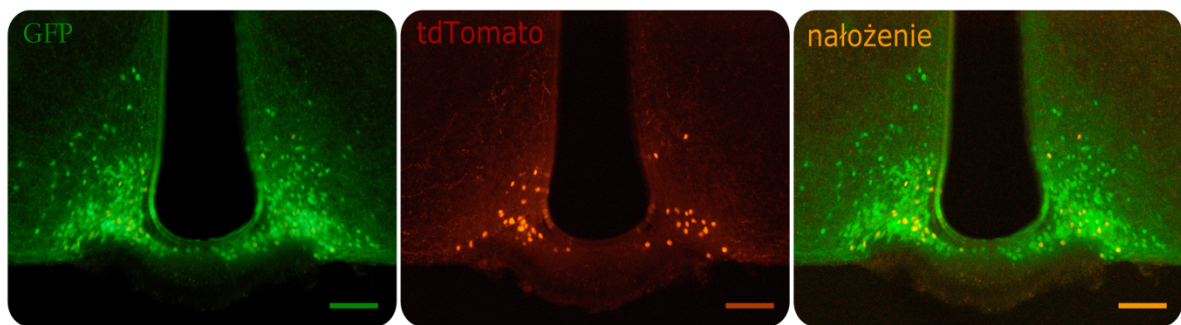
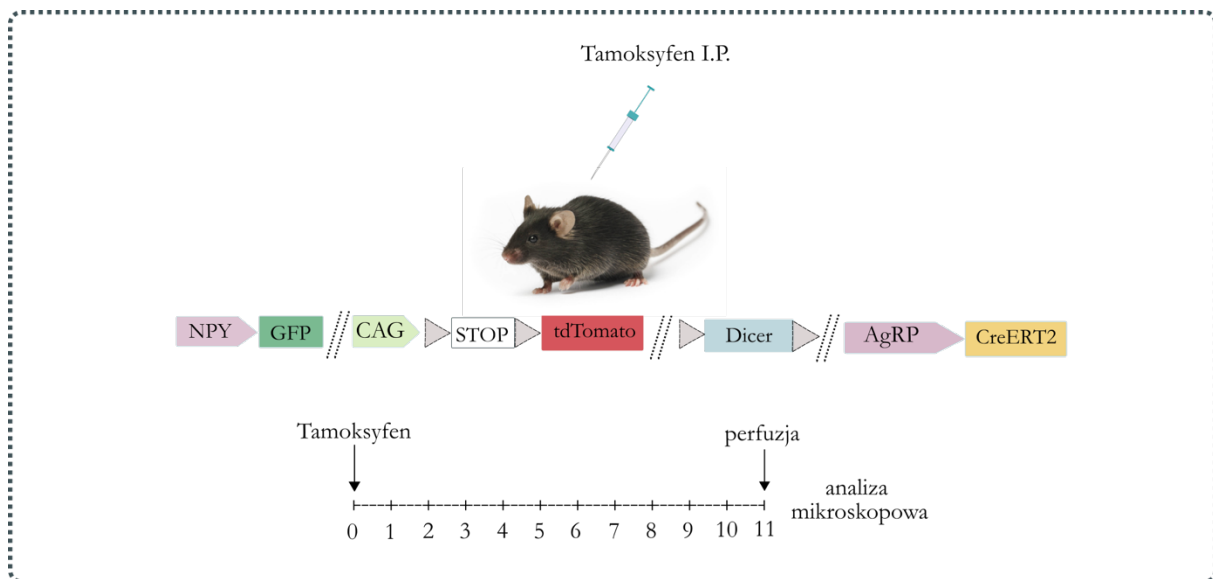
Rycina 4.2 Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości spożytego pokarmu w linii AgRPCreERT2Dicer, po indukcji mutacji poprzez dootrzewnowe podanie Tamoksyfenu (grupa badana: $N_{samice}=11$, $N_{samce}=7$) lub oleju (grupa kontrolna: $N_{samice}=11$, $N_{samce}=8$). Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia. Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD; ilość zjedzonego pokarmu przedstawiona jest na wykresie kumulatywnym, sumującym gramy zjedzonego pokarmu z każdego poprzedzającego tygodnia \pm SD; Analiza statystyczna: pomiar masy ciała- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych, pobór pokarmu- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak's dla porównań wielokrotnych.

Dopiero weryfikacja zakresu i liczby komórek, w których rekombinaza CreERT2 dokonuje modyfikacji daje możliwość wyciągnięcia wniosków na temat udziału neuronów AgRP w fenotypie miRNA-zależnej otyłości.

4.3 Analiza wzoru rekombinacji u myszy NPY-GFP/STOPtdTomato

AgRPCreERT2Dicer

Weryfikacja poziomu rekombinacji w linii AgRPCreERT2Dicer, pozbawionej Cre-zależnego fluorescencyjnego znacznika, wymagała dodatkowych kojarzeń. Ich celem było stworzenie zwierzęcia, które oprócz dotychczasowych modyfikacji, wykazywałoby jednocześnie stałą ekspresję znacznika fluorescencyjnego (białko zielonej fluorescencji GFP) w interesujących nas neuronach AgRP/NPY oraz Cre-zależną ekspresję innego fluorescencyjnego znacznika (białko czerwonej fluorescencji tdTomato). Dzięki temu możliwe stało się oszacowanie, ile neuronów AgRP/NPY uległo modyfikacji przez rekombinazę CreERT2 (nakładające się sygnały fluorescencji). Ostateczną grupę stanowiły zwierzęta NPY-GFP/STOPtdTomato/AgRPCreERT2Dicer ($N=4$), które poddano iniekcjom z Tamoksyfenem, a po jedenastu tygodniach uśmiercono i poddano analizie mikroskopowej. Na Rycinie 4.3 w ramce zaznaczony jest schemat eksperymentalny, a poniżej uwidoczniono zdjęcia będące wizualizacją mikroskopową przekrojów poprzecznych mózgu jednego z omawianych zwierząt. Sygnał zielonej fluorescencji pochodzi od neuronów NPY, a sygnał czerwonej fluorescencji (po wycięciu przez CreERT2 kasety STOP znajdującej się przed sekwencją tdTomato) ukazuje liczbę zrekombinowanych neuronów. Uzyskany obraz mikroskopowy pozwala wnioskować na temat bardzo niskiego poziomu rekombinacji w linii AgRPCreERT2Dicer. Zaledwie około 20 neuronów (co stanowi niecałe 10 % widocznych na skrawkach neuronów NPY-GFP) po każdej ze stron jądra łukowatego, charakteryzuje się ekspresją tdTomato. To z kolei prowadzi do konkluzji, że obserwowany poziom rekombinacji może być niewystarczający dla wywołania funkcjonalnego efektu w tej linii.



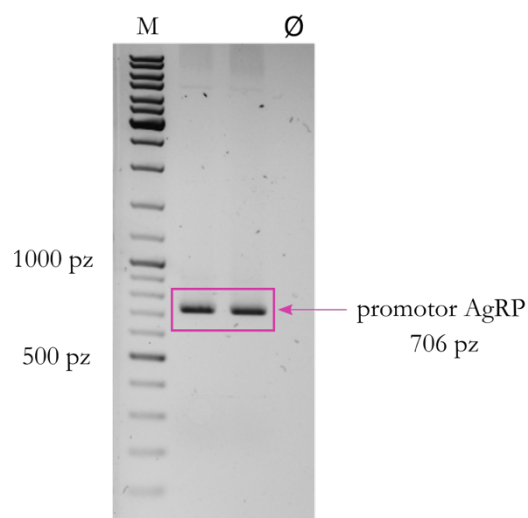
Rycina 4.3 Mikroskopowy obraz rekombinacji w linii NPY-GFP/STOPtdTomato/AgRPCreERT2Dicer; ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; sygnał zielonej fluorescencji (GFP) wyznakowuje neurony NPY, sygnał czerwonej fluorescencji (tdTomato) jest markerem komórek, w których zaszła rekombinacja; zdjęcie z prawej strony panelu jest nałożeniem obu kolorów i wskazuje na neurony NPY, w których zaszła rekombinacja (pokrywa się ze wzorem ekspresji tdTomato); sygnał niewzmocniony barwieniem IHC; skala 100 μm .

4.4 Przygotowanie plazmidowych wektorów ekspresyjnych z promotorem specyficznym dla neuronów AgRP/NPY

W alternatywnym podejściu do systemu Cre/lox, w celu uzyskania, specyficznego dla neuronów AgRP, wyciszenia ekspresji *Dicer1*, zaprojektowana została seria wektorów plazmidowych, a na ich podstawie wirusowych, regulujących ekspresję wprowadzanych transgenów aktywnością promotora AgRP. Po ich wprowadzeniu do mózgow zwierząt transgenicznym możliwe jest wycięcie fragmentu *Dicer1*. Jego usunięcie pozwala uzyskać funkcjonalny efekt utraty dojrzałych miRNA w neuronach AgRP.

4.4.1 Dobór odpowiedniej sekwencji promotorowej *in silico*

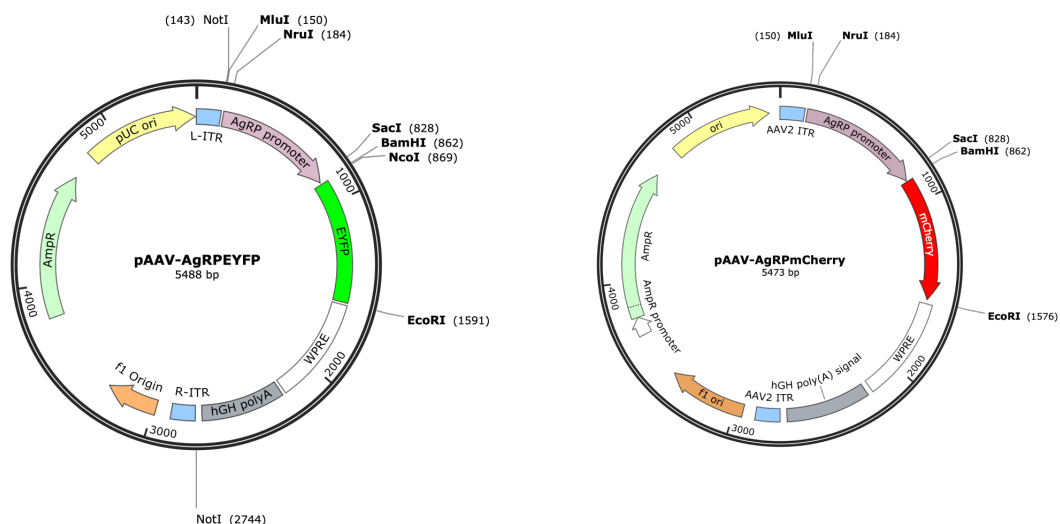
Brak w literaturze szczegółowych informacji na temat mysiej sekwencji promotora AgRP. Jak dotąd niedostępne są również komercyjne wektory kodujące transgeny pod tym promotorem. Dość dobrze, natomiast opisana jest sekwencja ludzkiego promotora AgRP (Ilnytska i in. 2011; Brown 2001). Jej analiza była punktem wyjścia do syntezy mysiego odpowiednika. Mysi gen *Agrp* regulowany aktywnością promotorową znajduje się na nici komplementarnej do wiodącej, na chromosomie 8. Posiada 5 egzonów, z czego dwa pierwsze nie kodują sekwencji białka AgRP. W sekwencji intronowej, między egzonem 1 i 2 zidentyfikowano część elementów minimalnego promotora, takich jak TATA-box, czy CACCC-box, będącego miejscem wiązania aktywatora Klf4 (ang. *Krüppel-like factor 4*) w przypadku ludzkiego odpowiednika genu *AGRP* (Ilnytska i in. 2011). Na matrycy genomowego mysiego DNA, namnożono fragment sekwencji zawierający intron między egzonem 1 i 2 oraz egzon 2. Zsyntetyzowany fragment (645 par zasad) miał wprowadzone miejsca restrykcyjne (NruI oraz SacI), tak, aby możliwe było wklonowanie go do plazmidu biorcy (pCONST), z którego wcześniej wycięto promotor CaMKII α , pozostawiając sekwencję kodującą Cre. Tym samym uzyskano wektor pCONST-AgRPCre, który wykorzystano na dalszych etapach klonowania molekularnego.



Rycina 4.4 Produkt reakcji PCR z użyciem starterów do amplifikacji sekwencji promotorowej AgRP na matrycy pCONST (wielkość produktu- 706 pz, powiększona o fragmenty wprowadzające miejsca restrykcyjne dla MluI oraz BamHI, zob.podrozdział 4.4.2); różową ramką zaznaczone są docelowe prążki uwidocznione na 1,5% żelu agarozowym.

4.4.2 Wektory plazmidowe z fluorescencyjnym genem reporterowym: pAAV-AgRPEYFP, pAAV-AgRPmCherry

Oba wektory reporterowe regulowane aktywnością mysiego promotora AgRP przygotowano w analogiczny sposób. Na matrycy wektora pCONST-AgRPCre zamplifikowano promotor AgRP (wielkość produktu 706 pz) wprowadzając nowe miejsca restrykcyjne (MluI oraz BamHI). Po trawieniu enzymatycznym (MluI oraz BamHI) wstawki AgRP oraz wektorów biorców i kolejnych krokach procesu klonowania, otrzymano docelowe produkty (pAAV-AgRPYFP oraz pAAV-AgRPmCherry), będące składową do systemu produkcji wektorów wirusowych AAV. Weryfikacja obecności wstawki polegała na przeprowadzeniu trawienia restrykcyjnego wyizolowanych plazmidów i analizie wzoru rozdzielonych na żelu agarozowym prążków.

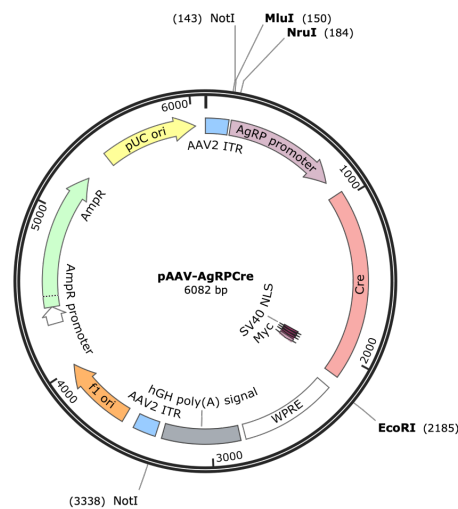


Rycina 4.5 Mapa wektora plazmidowego pAAV-AgRPEYFP oraz pAAV-AgRPmCherry; zaznaczone elementy: wirusowe sekwencje *inverted terminal repeats* pochodzące z serotypu 2 wirusa AAV (AAV2 ITR), promotor AgRP, białko żółtej fluorescencji (EYFP), białko czerwonej fluorescencji mCherry, sekwencje pomocnicze i stabilizujące (WPRE, hGH polyA), miejsca inicjacji replikacji (f1 Ori oraz pUC Ori), a także gen odporności na ampicylinę (AmpR).

4.4.3 Przygotowanie wektora plazmidowego z rekombinazą Cre: pAAV-AgRPCre

Wektor plazmidowy pAAV-AgRPCre otrzymano w przebiegu poniższych kroków. W pierwszej kolejności, na matrycy pCONST-AgRPCre zamplifikowano fragment AgRPCre, przy jednoczesnym wprowadzeniu miejsc restrykcyjnych dla enzymów MluI oraz EcoRI (wielkość produktu 1973 pz). Następnie, w efekcie trawienia enzymatycznego (MluI oraz

EcoRI) wektora pAAV-CaMKII α -YFP wycięto z niego wstawkę CaMKII α -YFP wprowadzając w to miejsce, uprzednio wycięty, fragment AgRPCre. Poprawność nowo powstałego wektora plazmidowego pAAV-AgRPCre potwierdzono przeprowadzając jego analizę restrykcyjną.



Rycina 4.6 Mapa wektora plazmidowego pAAV-AgRPCre; zaznaczone elementy: wirusowe sekwencje *inverted terminal repeats* pochodzące z serotypu 2 wirusa AAV (AAV2 ITR), promotor AgRP, sekwencja kodująca rekombinazy Cre, sekwencje pomocnicze i stabilizujące (WPRE, hGH polyA), miejsca inicjacji replikacji (f1 Ori oraz pUC Ori), a także gen odporności na ampicylinę (AmpR).

4.5 Neuronalna charakterystyka wektorów AgRP-specyficznych w modelu *in vivo*

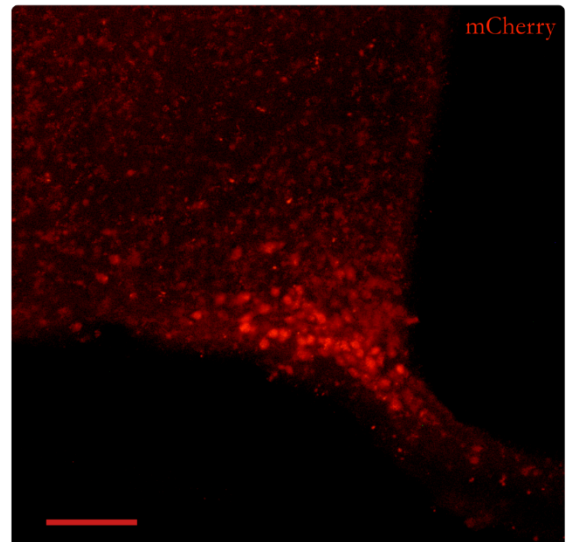
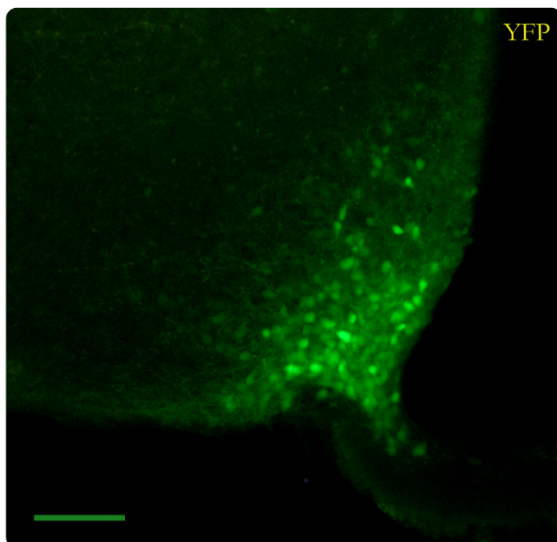
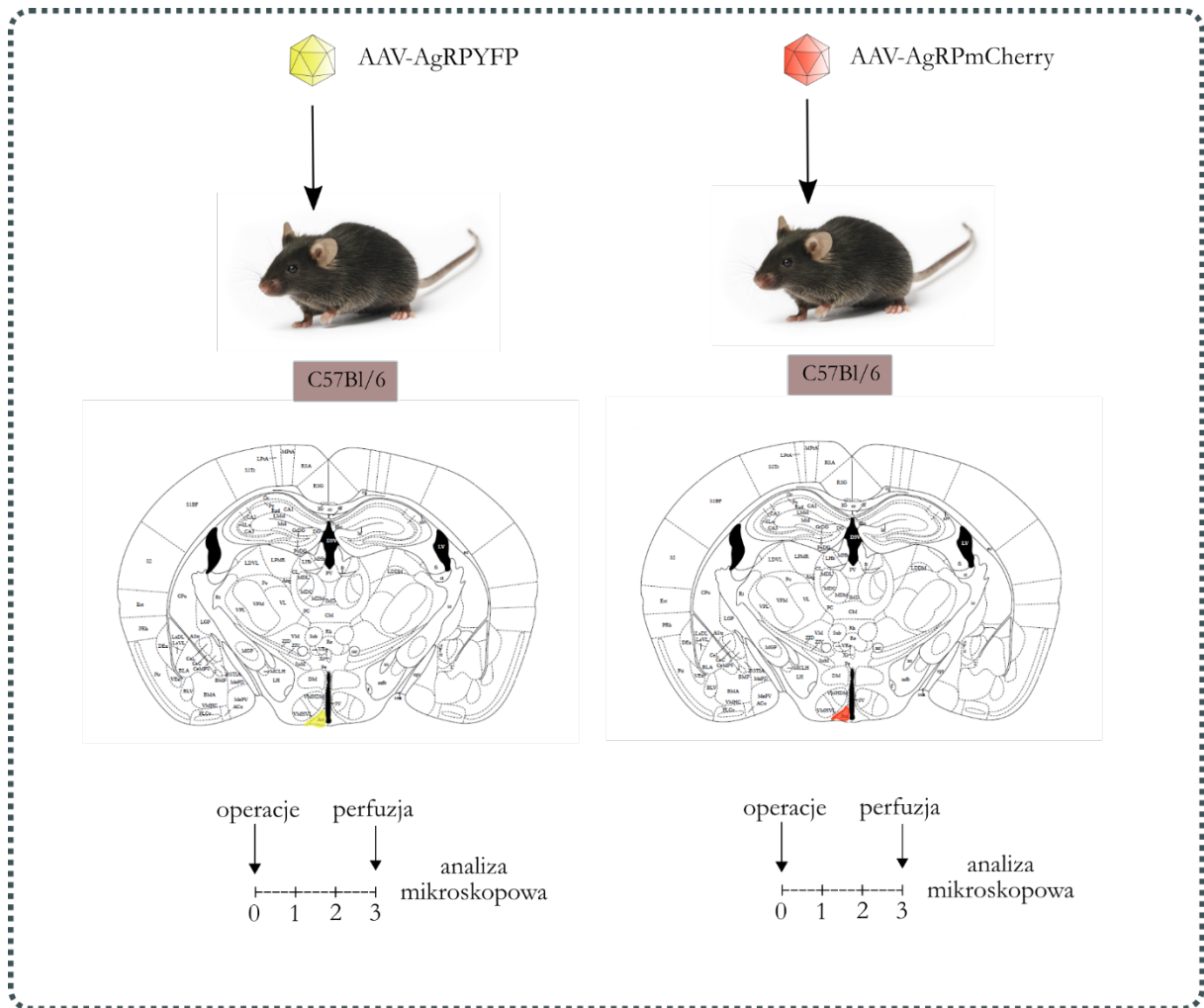
Pierwszym krokiem po uzyskaniu wektorów plazmidowych, w których ekspresja transgenu warunkowana jest aktywnością promotora AgRP, było przygotowanie wektorów wirusowych AAV metodą potrójnej transfekcji komórek pakujących AAV293 (szczegółowo opisanej w podrozdziale 3.3.2). Wyprodukowano w warunkach *in vitro* wektory AAV o serotypie mozaikowym 2/2/1. Oznacza to, że charakterystyczne dla wirusów AAV fragmenty ITR pochodzą od wirusa AAV o serotypie 2, a jego kapsyd jest kompozycją białek charakterystycznych dla serotypów 1 i 2 (w stosunku 1:1). Dane literaturowe potwierdzają, że taka kompozycja białek kapsydu wektora AAV wykazuje tropizm tkankowy do neuronów (Haery i in. 2019). Kolejnym etapem było sprawdzenie ich działania w modelu *in vivo*.

4.5.1 Analiza wzoru ekspresji AAV-AgRPYFP oraz AAV-AgRPMCherry u myszy C57Bl/6

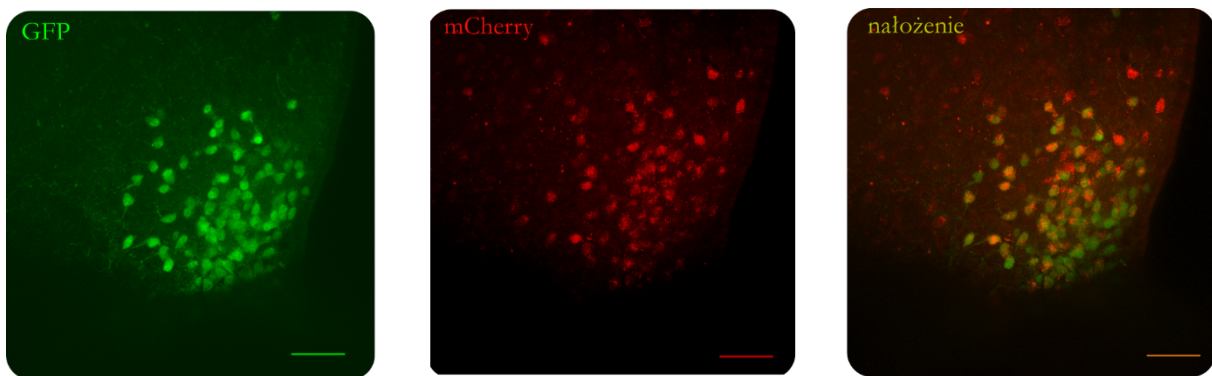
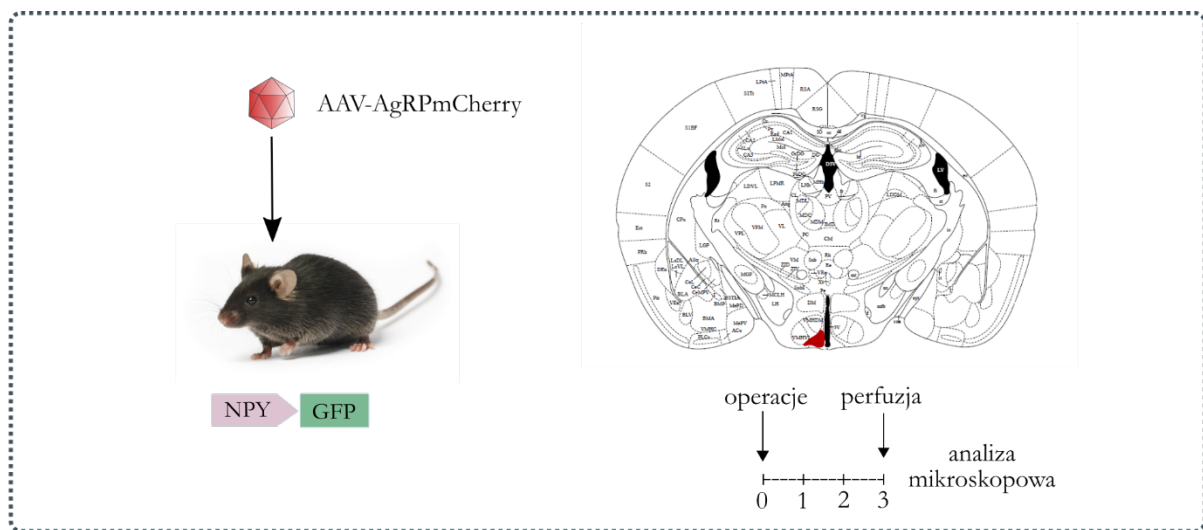
Wektory wirusowe, kodujące białka żółtej (YFP) oraz czerwonej (mCherry) fluorescencji przetestowano w warunkach *in vivo*, w myszach typu dzikiego C57Bl/6 (N=4/grupę). Po trzech tygodniach od momentu stereotaktycznej iniekcji wektorów AAV-AgRP-YFP ($3,8 \times 10^7$ gc/stronę) oraz AAV-AgRP-mCherry ($3,9 \times 10^7$ gc/stronę), myszy poddano perfuzji, a ich mózgi analizie mikroskopowej. W każdym z dwóch wariantów zaobserwowana została obecność fluorescencyjnych białek reporterowych w komórkach jądra łukowatego (Rycina 4.7) - struktury, w której jedną z dwóch głównych populacji stanowią neurony AgRP, będące przedmiotem tej rozprawy.

4.5.2 Analiza wzoru ekspresji AAV-AgRP-mCherry u myszy transgenicznej NPY-GFP

Celem potwierdzenia specyficznej, dla neuronów AgRP, obecności białek czerwonej fluorescencji, myszy ze stałą ekspresją GFP w neuronach NPY (opis linii transgenicznej w podrozdziale 3.1.1) zainfekowano wektorem AAV-AgRP-mCherry ($3,9 \times 10^7$ gc/stronę). Po trzech tygodniach od zabiegu stereotaktycznego przeanalizowano obraz mikroskopowy. Na Rycinie 4.8 uwidocznił się częściowo nakładający się sygnał zielonej, pochodzącej od neuronów NPY, jak i czerwonej, wprowadzanej na nośniku wirusowym, fluorescencji. Jest to informacja, że rekombinowany wektor AAV-AgRP-mCherry infekuje m.in. neurony AgRP (żółty sygnał obserwowany na zdjęciu mikroskopowym). Ta jakościowa obserwacja uzasadnia kolejny krok- weryfikację wektora, który miałby być wykorzystany do zniesienia funkcji genu *Dicer1* oraz eliminacji cząsteczek miRNA w tych neuronach.



Rycina 4.7 Mikroskopowy obraz ekspresji transgenów żółtej (YFP) oraz czerwonej (mCherry) fluorescencji, w jądrze łukowatym myszy C57Bl/6 (N=4/grupę), po upływie 3 tygodni od jednostronnej iniekcji wektorów AAV-AgRPYFP ($3,8 \times 10^7$ gc/str gc/stronę) oraz AAV-AgRpmCherry ($3,9 \times 10^7$ gc/str gc/stronę). Kolor zielony-ekspresja transgeny YFP, kolor czerwony- ekspresja transgeny mCherry, sygnał niewzmocniony barwieniem IHC, skala 100 μ m.

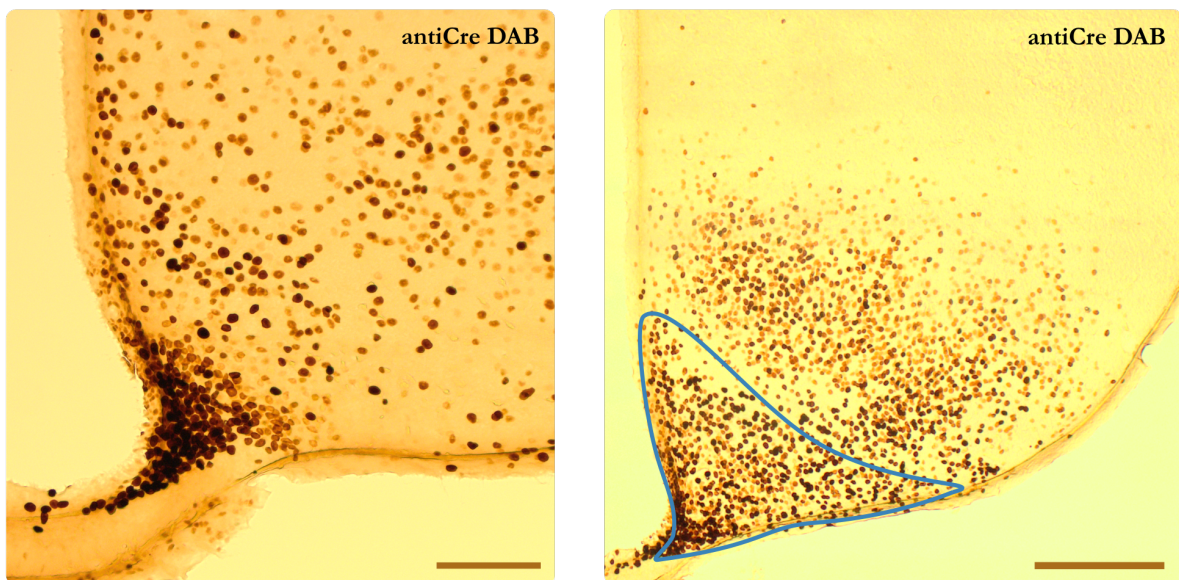
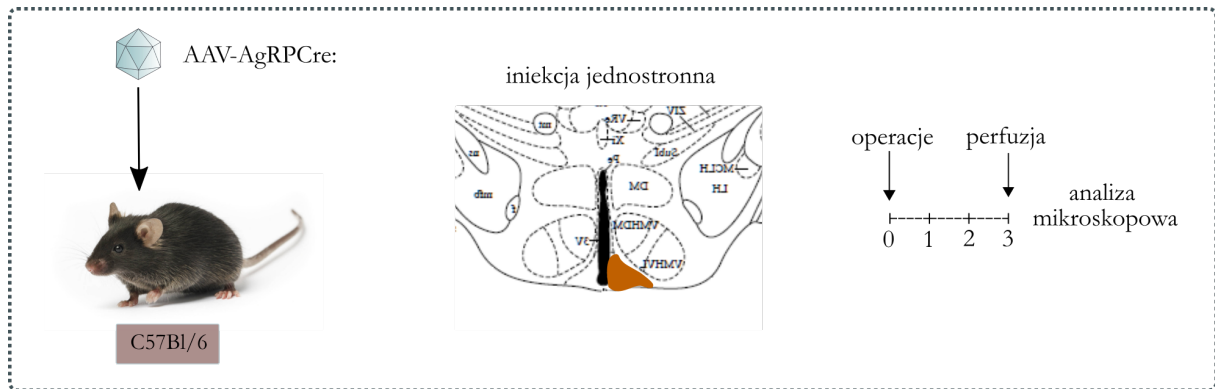


Rycina 4.8 Wzór ekspresji genu czerwonej fluorescencji, pochodzący z konstruktu AAV-AgRP-mCherry. Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia. Na zdjęciu mikroskopowym widoczny jest jednostronny obraz jądra łukowatego myszy transgenicznej NPY-GFP, po iniekcji konstruktom AAV-AgRP-mCherry ($3,3 \times 10^7$ gc/str). Kolor zielony- ekspresja transgenu GFP w neuronach NPY myszy transgenicznej, kolor czerwony- ekspresja transgenu mCherry wprowadzanego na nośniku AAV; kolor żółty jest efektem nałożenia obu obrazów i jest miarą liczby zainfekowanych wektorem AAV-AgRpmCherry, neuronów NPY; obraz niewzmocniony barwieniem IHC; skala 100 μ m, obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss 800 LSM (fot. dr Marzena Stefaniuk).

4.5.3 Analiza wzoru ekspresji AAV-AgRP-Cre u myszy C57Bl/6

Przygotowany wektor wirusowy AAV, będący narzędziem do wywołania zmian fenotypowych u myszy transgenicznych, między odcinkami ITR zawiera sekwencję kodującą rekombinazę Cre, regulowaną promotorem AgRP. W celu sprawdzenia funkcjonalności wektora na poziomie ekspresji rekombinazy Cre, myszy typu dzikiego C57Bl/6 (N=4) poddano jednostronnej, stereotaktycznej iniekcji wspomnianym wektorem AAV-AgRP-Cre ($5,6 \times 10^7$ gc/stronę). Po upływie trzech tygodni przeanalizowana została ekspresja transgenu, uwidoczniła w reakcji immunohistochemicznej (IHC) z użyciem 3,3'-diaminobenzyny

(DAB). Na rycinie 4.9, widoczny obraz mikroskopowy pokazuje ekspresję transgenu Cre typową dla neuronów AgRP, umiejscowioną w jądrze łukowatym oraz nieoczekiwaną, zlokalizowaną poza obszarem jądra łukowatego. Ta obserwacja poddana została dalszej weryfikacji, na kolejnych etapach projektu.



Rycina 4.9 Mikroskopowy obraz ekspresji rekombinazy Cre, w jądrze łukowatym myszy C57Bl/6, 3 tygodnie po jednostronnej domózgowej iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($5,6 \times 10^7$ gc/stronę); ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; ekspresja została uwidoczniiona barwieniem IHC DAB z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko Cre, skala 100µm (lewa str.) oraz 250µm (prawa str.).

4.6 Optymalizacja warunków domózgowej iniekcji wektorów AgRP-specyficznych

Trzonem powyższej rozprawy są badania skupiające się wokół fenotypowego obrazu myszy pozbawionych miRNA w neuronach jądra łukowatego. Przygotowaniem do przeprowadzenia tych badań były kroki mające na celu usprawnienie technicznych aspektów

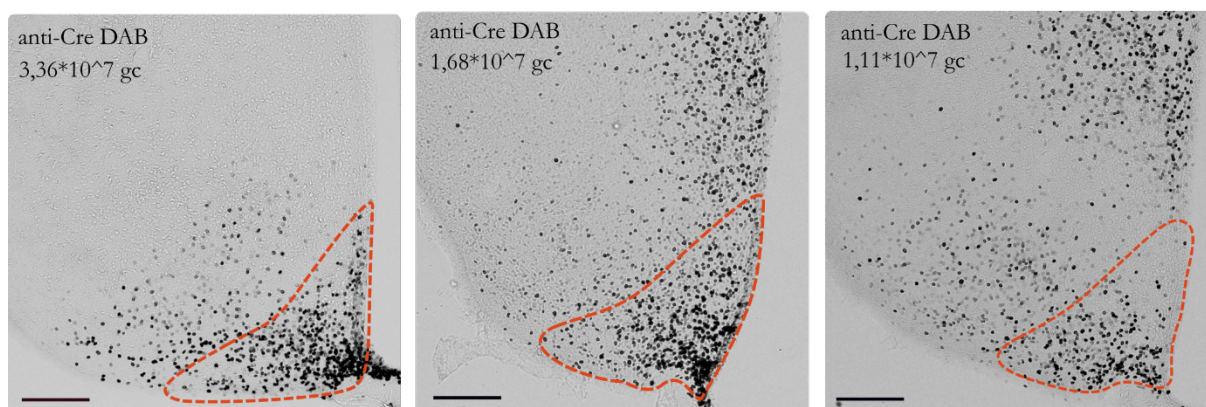
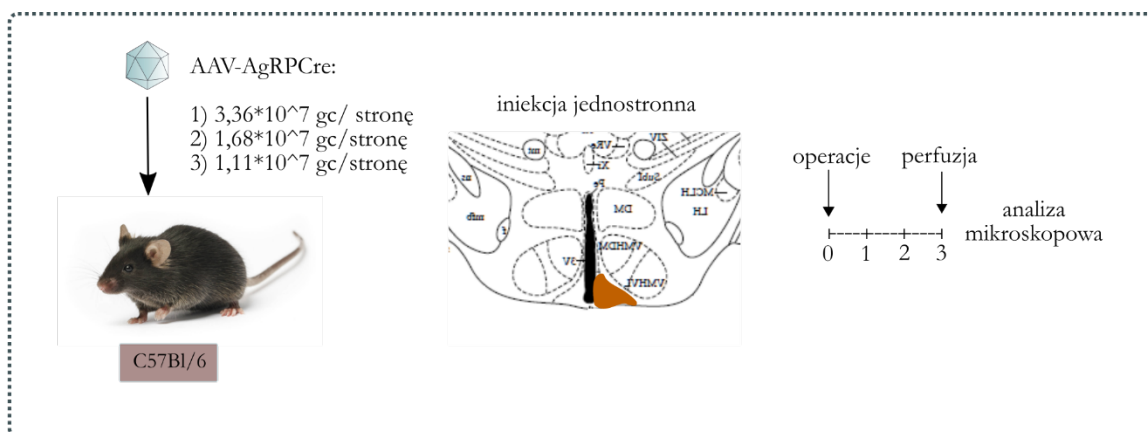
operacji stereotaktycznych z udziałem wspomnianych wektorów wirusowych, tak aby uzyskać wysoce specyficzną rekombinację w neuronach AgRP. W ramach podjętych działań spróbowano w sposób empiryczny odpowiedzieć kolejno na poniższe pytania:

- jakie miano wektora wirusowego stosować do uzyskania ekspresji transgenu na odpowiednim (obserwowanym w docelowej grupie neuronów) poziomie?
- Jak kształtuje się profil ekspresji transgenu w czasie?
- Czy dla wywołania efektu biologicznego ma znaczenie typ podania wektora (jednostronny/dwustronny/do trzeciej komory)?

Na dwa pierwsze pytania odpowiedziano wykorzystując do tego myszy typu dzikiego C57Bl/6. Z kolei zdefiniowanie odpowiedzi na trzecie postawione pytanie wymagało użycia modelu myszy transgenicznym Dicer fl/fl.

4.6.1 Analiza ekspresji rekombinazy Cre u myszy C57Bl/6, po iniekcji różną liczbą cząstek wektora AAV-AgRPCre.

Badanie wzoru ekspresji rekombinazy Cre, pochodzącej z wektora AAV-AgRPCre, przeprowadzone na myszach C57Bl/6 (podrozdział 4.5.3.) pokazało, że Cre jest obecna w neuronach jądra łukowatego. Dodatkowo jej obecność została uwidoczniła poza wskazanym obszarem, w sąsiednich jądrach podwzgórza. Chcąc sprawdzić czy stosowanie niższego miana wektora AAV wpłynie na ograniczenie ekspresji rekombinazy Cre do kluczowego obszaru (jądra łukowatego), myszy C57Bl/6 (N=3/grupę) poddano jednostronnej iniekcji wektora wirusowego AAV-AgRPCre w trzech różnych stężeniach (odpowiednio: $3,36 \times 10^7$, $1,68 \times 10^7$ oraz $1,11 \times 10^7$ gc/stronę). Po upływie trzech tygodni od momentu domózgowej iniekcji, przeprowadzono analizę mikroskopową (Rycina 4.10). Na jej podstawie stwierdzono, że osobniki, poddane iniekcji większą liczbą kopii wektora AAV-AgRPCre, mieszczącą się w zakresie $3,36-1,68 \times 10^7$ gc/stronę, wykazują silniejszą ekspresję rekombinazy Cre w neuronach jądra łukowatego. W każdej z trzech badanych grup obserwowana jest jednocześnie ekspresja transgenu poza obszarem jądra łukowatego. Wizualna ocena stosunku liczby zainfekowanych neuronów jądra łukowatego względem neuronów znajdujących się, poza tym obszarem, prowadzi do konkluzji, że nawet przy malejącej ilości podawanego wektora AAV-AgRPCre nie uzyskuje się efektu większej specyficzności.

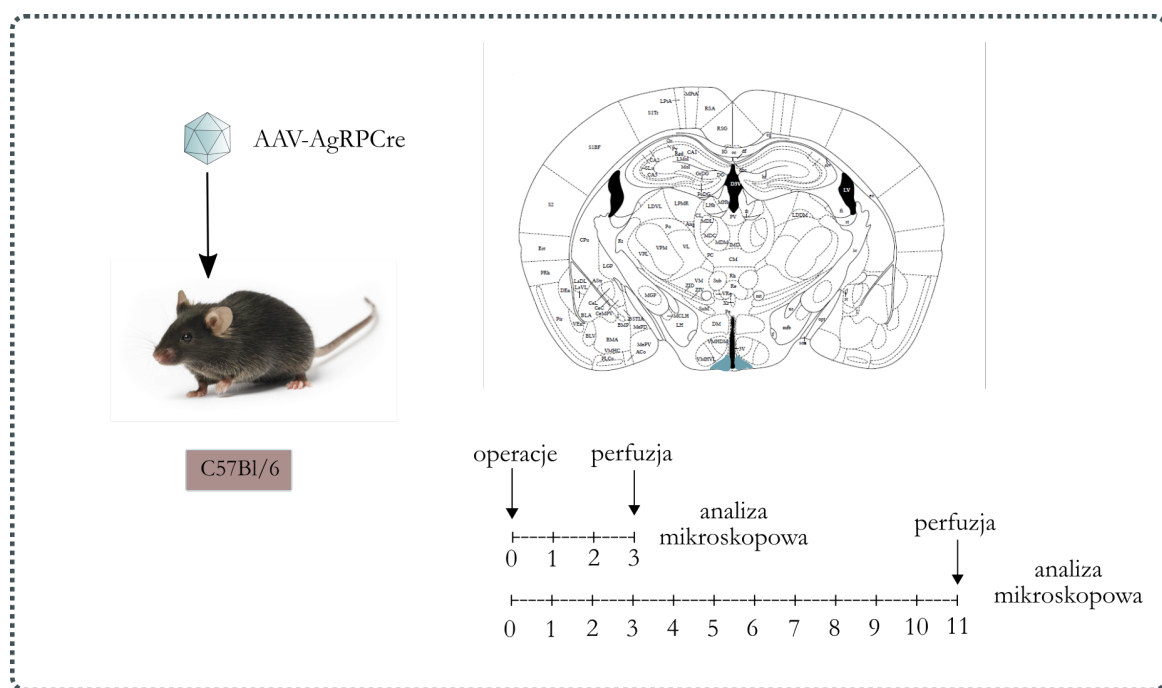


Rycina 4.10 Mikroskopowy obraz ekspresji rekombinazy Cre, w jądrze łukowatym myszy C57Bl/6, 3 tygodnie po jednostronnej domózgowej iniekcji różnych ilości wektora AAV-AgRPCre (grupa I: $3,36 \cdot 10^7$ gc/stronę, grupa II: $1,68 \cdot 10^7$ gc/stronę, grupa III: $1,1 \cdot 10^7$ gc/stronę); ekspresja została uwidoczniła barwieniem IHC DAB z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko Cre, ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; skala $100\mu\text{m}$.

4.6.2 Analiza zmiennego w czasie profilu ekspresji rekombinazy Cre u myszy C57Bl/6 po iniekcji wektorem AAV-AgRPCre.

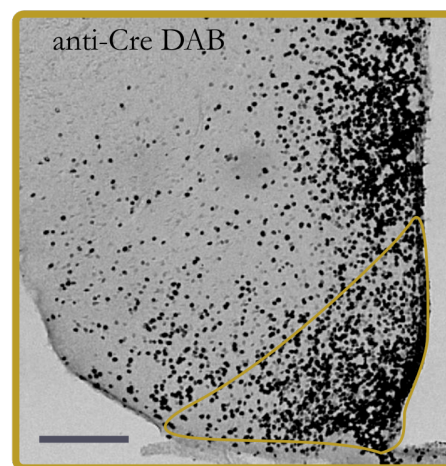
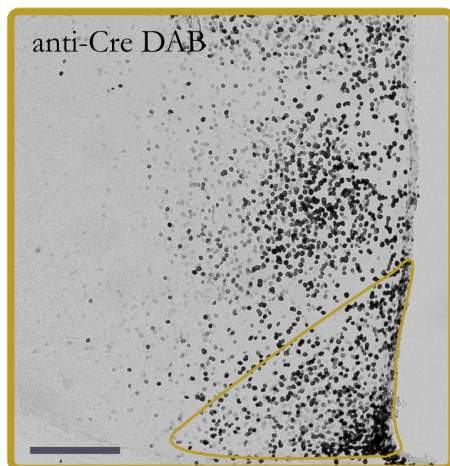
Próba odpowiedzi na pytanie dotyczące zaangażowania neuronów AgRP w zależną od utraty miRNA otyłość wymaga przyjęcia założenia o wielotygodniowym czasie trwania doświadczenia. Wynika to z faktu, że obserwowany fenotyp jest sumą złożonych, wieloetapowych zmian na poziomie neuronalnym i metabolicznym. Zgodnie z danymi literaturowymi, opisującymi pierwotny model otyłości u myszy DicerCKO (Vinnikov et al. 2014) można przyjąć, że do zaobserwowania dynamiki zmian fenotypowych, wymagany jest co najmniej siedmiotygodniowy czas trwania doświadczenia. Zatem naturalnym kolejnym krokiem wydaje się sprawdzenie jak i czy zmienia się wzór ekspresji rekombinazy Cre po czasie dłuższym niż stosowany do tej pory - trzytygodniowy. W tym celu myszy C57Bl/6 (N=4/grupę) poddano obustronnej iniekcji wektorem AAV-AgRPCre ($1,68 \cdot 10^7$ gc/stronę).

Pierwsza grupa została poddana perfuzji po trzech tygodniach od czasu operacji stereotaktycznych, kolejna po jedenastu. W obrazie mikroskopowym (Rycina 4.11) cechą charakterystyczną jest obecność transgenu w neuronach jądra łukowatego w obu badanych grupach. Jednak u myszy, u których poziom ekspresji transgenu badany był po jedenastu tygodniach, widać znaczny wzrost liczby neuronów z ekspresją rekombinazy Cre, obecny również poza obszarem jądra łukowatego. W świetle doniesień na temat siły i długości trwania ekspresji transgenów, wprowadzanych do organizmu na nośnikach wirusowych AAV, ta obserwacja wydaje się być uzasadniona (Sumner-Jones i in. 2006; H. Okada i in. 2013; Duan i in. 1998).



3 TYGODNIE

11 TYGODNI



Rycina 4.11 (opis na kolejnej stronie)

Rycina 4.11 Mikroskopowy obraz ekspresji rekombinazy Cre, w jądrze łukowatym myszy C57Bl/6, 3 oraz 11 tygodni po jednostronnej domózgowej iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($1,68 \times 10^7$ gc/stronę); ekspresja została uwidoczniła barwieniem IHC DAB z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko Cre; ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; skala 100 μ m.

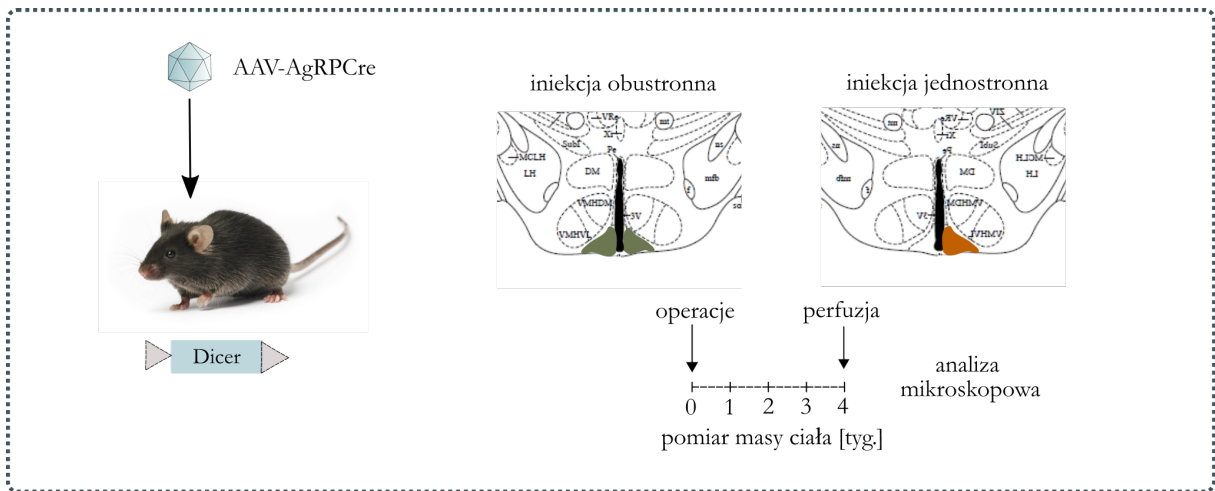
4.6.3 Analiza ekspresji rekombinazy Cre oraz przyrostu masy ciała u myszy Dicer fl/fl, w zależności od rodzaju iniekcji wektora AAV-AgRPCre (podanie jednostronne, obustronne, do trzeciej komory)

Wprowadzeniem do doświadczeń funkcjonalnych, opierających się na obserwacji zmian w przyroście masy ciała oraz ilości spożywanego pokarmu u myszy z wywołaną mutacją, były badania weryfikujące optymalny typ podania wektora wirusowego. Jądro łukowate w mózgu gryzoni ma szczególną lokalizację- jego prawa i lewa część oddzielone są trzecią komorą (3V), a u podstawy połączone są wyniosłością pośrodkową. Tym samym zasadne było sprawdzenie czy podanie jednostronne pozwoli na infekcję obu części ARC oraz czy pojedyncza iniekcja wektora do 3V da podobny efekt. Właściwy typ podania może mieć kluczowe znaczenie w ocenie minimalnej, niezbędnej do wywołania oczekiwanego efektu, ekspresji rekombinazy Cre. Każdy wariant, który ogranicza ilość domózgowych iniekcji wpływa korzystnie na stan zwierzęcia, zwiększając szansę powodzenia doświadczenia. Sprawdzone czy jednostronna iniekcja wektora AAV-AgRPCre do myszy Dicer fl/fl pozwoli zaobserwować ekspresję transgenu po obu stronach jądra łukowatego. Dodatkową weryfikacją była możliwość zaobserwowania zmian fenotypowych, poprzez cotygodniowy pomiar masy ciała badanych osobników. Cztery tygodnie po przeprowadzeniu operacji stereotaktycznych z jednostronnym lub dwustronnym podaniem wektora AAV-AgRPCre ($5,6 \times 10^7$ gc/stronę), myszy Dicer fl/fl uśmiercono i poddano perfuzji. Następnie, celem uwidocznienia ekspresji rekombinazy Cre, mózgi wybarwiono wykorzystując technikę IHC z użyciem DAB. W obrazie mikroskopowym [Rycina 4.12, ●] widać, że jednostronna iniekcja wektora skutkuje obszerną infekcją, w obrębie jądra łukowatego, po stronie podania wektora oraz infekcją pojedynczych komórek po drugiej stronie omawianej części podwzgórza. W przypadku podania obustronnego [Rycina 4.12, ■] ekspresja transgenu obecna jest zarówno w prawej jak i lewej części jądra łukowatego. Ponadto w obu opisywanych przypadkach wyznakowane komórki uwidocznione zostały również w innych, sąsiadujących jądrach podwzgórza (brzuszo-przyśrodkowym- (VMH) oraz grzbietowo-przyśrodkowym- (DM) jądrze podwzgórza). Potwierdzeniem obserwacji mikroskopowych jest informacja na temat przyrostu masy ciała u badanych osobników. Widać korelację między typem podania wektora, ekspresją rekombinazy Cre oraz

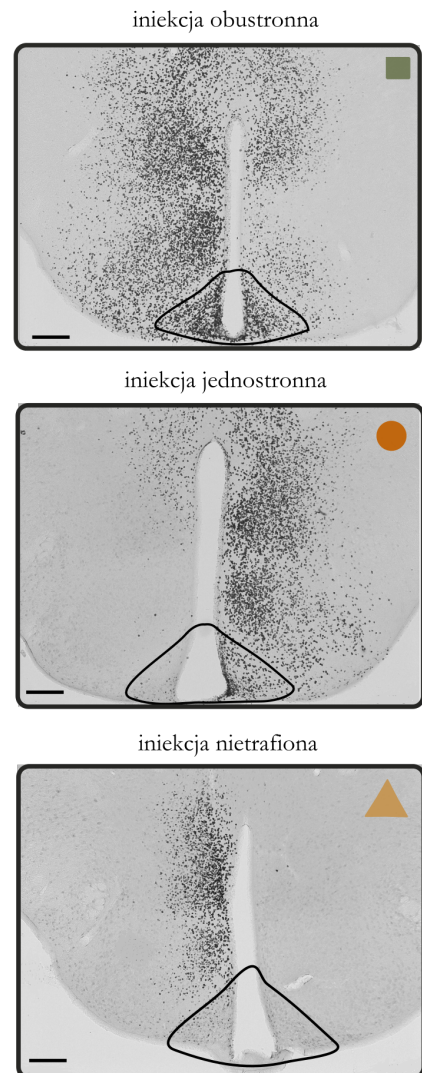
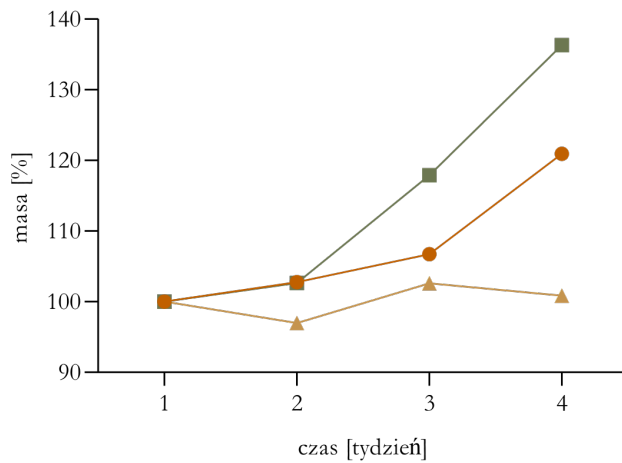
przyrostem masy ciała. Iniekcja obustronna zaowocowała największym przyrostem masy ciała – powyżej 136,3 % masy wyjściowej w ciągu czterech tygodni od zabiegu. Mysz po iniekcji jednostronnej osiągnęła 120,9 % masy wyjściowej w tym samym czasie. Uzupełnieniem tych obserwacji jest obraz mikroskopowy mózgu myszy, u której iniekcja nie powiodła się. W tym przypadku, ekspresja rekombinazy Cre obecna jest poza obszarem jądra łukowego (DM) i nie skutkowała przyrostem masy ciała [Rycina 4.12, ▲].

Kontynuacją tego doświadczenia, było sprawdzenie czy iniekcja wektora AAV-AgRPCre do 3V pozwoli na uzyskanie rekombinacji w neuronach jądra łukowego, na poziomie zbliżonym do tego po iniekcji obustronnej. Tym samym technika ta mogłaby stać się alternatywą dla tego wariantu, redukując jednocześnie liczbę niezbędnych iniekcji domózgowych. Uwidocznienie na Rycinie 4.13 3V, jest efektem iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($2,2 \times 10^7$ gc/podanie) do zwierzęcia z Cre-zależną ekspresją tdTomato (linia transgeniczna opisana w podrozdziale 3.1.1). Pozwala to na zobrazowanie miejsc aktywnego działania rekombinazy Cre, która wycinając kasetę STOP, umiejscowioną przed transgenem tdTomato, umożliwia jego ekspresję. Przedstawiona fotografia mikroskopowa pokazuje rekombinację, która zaszła nie tylko w neuronach jądra łukowego, co w tanocytach, czyli komórkach glejowych, pochodzących z nabłonka cewy nerwowej, wyściełających układ komorowy mózgowia, w tym 3V.

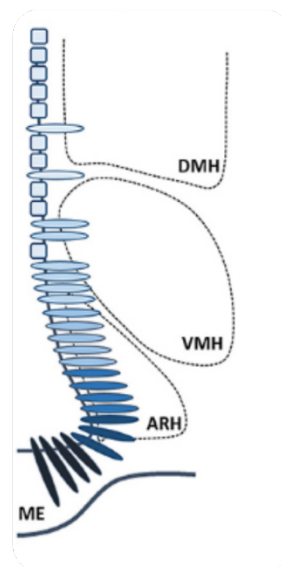
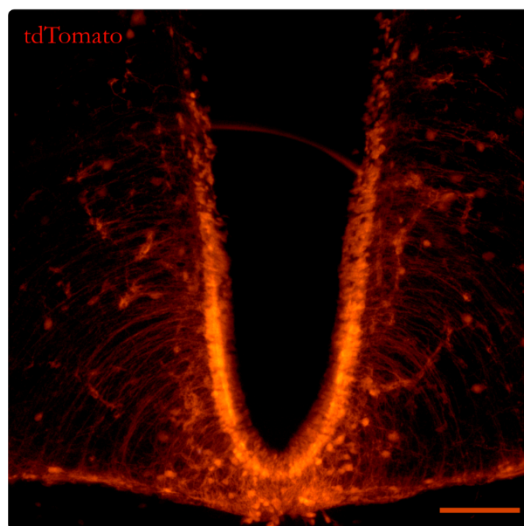
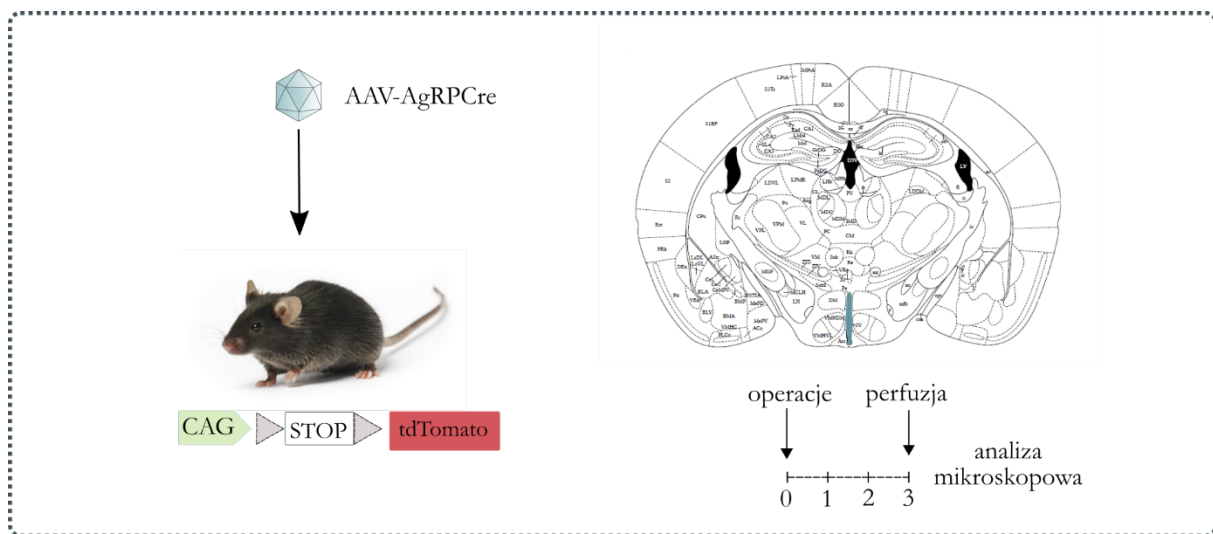
Powyższe doświadczenie pozwoliło na wyciągnięcie wniosków o zasadności przeprowadzenia badań funkcjonalnych w systemie iniekcji obustronnych wektora AAV-AgRP-Cre.



PRZYRÓST MASY CIAŁA
u myszy Dicer fl/fl w zależności od rodzaju iniekcji



Rycina 4.12 Mikroskopowy obraz ekspresji rekombinazy Cre, w jądrze łukowatym myszy Dicer fl/fl, 4 tygodnie po jednostronnej bądź obustronnej domózgowej iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($5,6 \cdot 10^7$ gc/stronę); ekspresja została uwidoczniiona barwieniem IHC DAB z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko Cre; ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; skala 250 μ m.

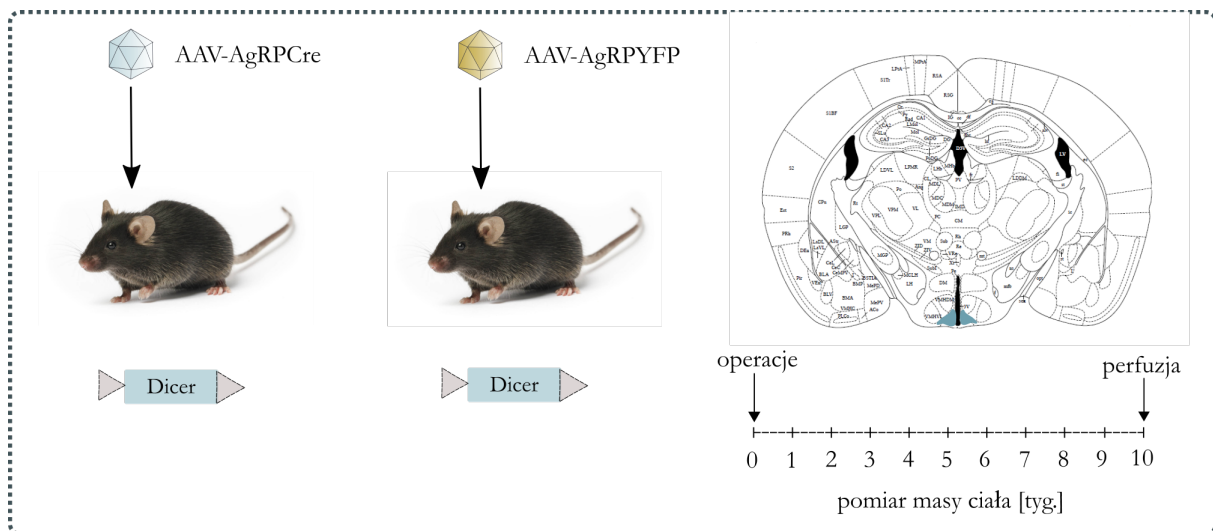


Rycina 4.13 Wzór rekombinacji po iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($2,2 \cdot 10^7$ gc/podanie) do trzeciej komory myszy transgenicznej STOPtdTomato; kolor czerwony pochodzi od ekspresji tdTomato w komórkach, w których doszło do wycięcia przez rekombinazę Cre kasety STOP znajdującej się tuż za promotorem CAG, który kieruje ekspresją tdTomato. Rekombinaza obecna była w tanycytach (na schemacie zaznaczone kolorem niebieskim)-komórkach ependymalnych wyściełających trzecią komorę, skala $100\mu\text{m}$ (schemat 3V na podstawie Langlet 2019).

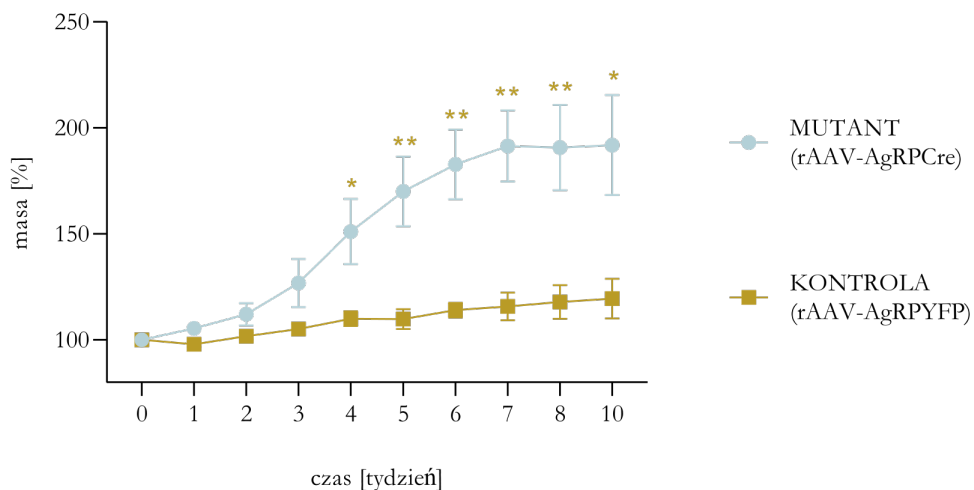
4.7 Funkcjonalny efekt usunięcia w neuronach jądra łukowatego cząsteczek miRNA z wykorzystaniem wektora AAV-AgRPCre

4.7.1 Analiza przyrostu masy ciała u myszy Dicer fl/fl po domózgowej iniekcji wektora AAV-AgRPCre

Przejsięcie kolejnych opisanych wyżej kroków, mających na celu usprawnienie procesu doświadczalnego, zapoczątkowało cykl badań funkcjonalnych. Ich przedmiotem była próba odpowiedzi na pytanie czy to neurony AgRP odpowiedzialne są za fenotyp otyłości u myszy pozbawionych enzymu Dicer i cząsteczek miRNA w mózgu. Pierwsza próba odpowiedzi na to pytanie polegała na iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($5,6 \times 10^7$ gc/stronę, N=5) oraz wektora kontrolnego AAV-AgRPYFP ($1,9 \times 10^7$ gc/stronę, N=5) do jądra łukowatego myszy Dicer fl/fl. W trakcie dziesięciu kolejnych tygodni po zabiegu, zwierzęta były regularnie ważone. Przedstawione na Rycinie 4.14 wyniki są funkcją, wyrażonego w procentach, przyrostu masy ciała w czasie. Każdy z punktów czasowych jest uśrednioną reprezentacją wartości dla danej grupy (\pm SD). Obserwowana różnica w przyroście masy ciała pomiędzy grupą badaną i kontrolną jest znamienna statystycznie od czwartego tygodnia badania. Dynamika wzrostu masy ciała kształtuje się tak, że w czwartym tygodniu po zabiegu, u myszy z wprowadzoną mutacją, wartości przyrostu masy ciała zaczynają w sposób wyraźny odbiegać od tych w grupie kontrolnej. Poczynając od piątego pomiaru, odnotowywana masa ciała między grupami różniła się o ponad połowę. U mutantów uśrednione wartości masy ciała osiągnęły w tym punkcie wartości $170,0 \pm 16,4$ %, a u myszy kontrolnych $109,8 \pm 4,6$ %, przy poziomie istotności $p < 0,001$. Ta obserwacja pozwala sformułować wniosek na temat zaangażowania neuronów jądra łukowatego w fenotyp zależnej, od utraty miRNA w mózgu, otyłości.



PRZYROST MASY CIAŁA
myszy Dicer fl/fl



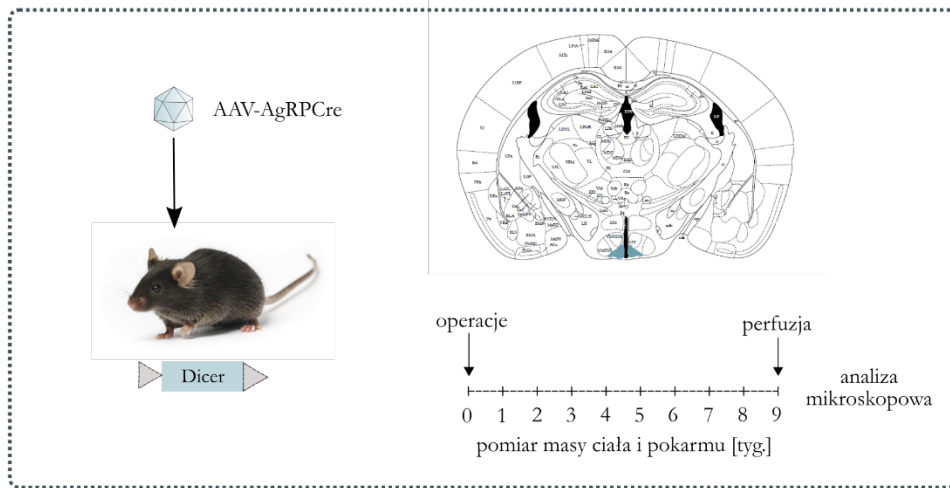
Rycina 4.14 Analiza przyrostu masy ciała u myszy linii Dicer fl/fl, po obustronnej iniekcji wektora wirusowego AAV-AgRPCre ($5,6 \cdot 10^7$ gc/stronę; N=5) do jądra łukowatego; grupę kontrolną stanowiły myszy linii Dicer fl/fl po iniekcji AAV-AgRPYFP ($1,9 \cdot 10^7$ gc/stronę; N=5). Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD; Analiza statystyczna: dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak's dla porównań wielokrotnych.

4.7.2 Analiza przyrostu masy ciała, poboru pokarmu oraz ekspresji rekombinazy Cre, u myszy Dicer fl/fl po iniekcji różną liczbą cząsteczek wektora AAV-AgRPCre

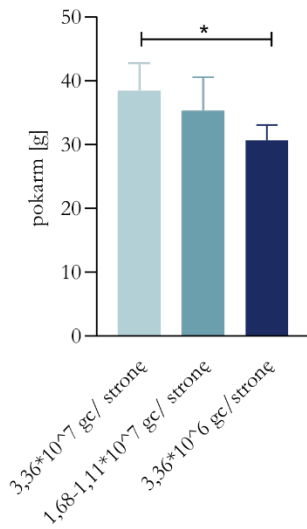
Naturalną konsekwencją powyższej obserwacji, jest próba odpowiedzi na pytanie o możliwość regulowania przyrostu masy ciała u mutantów jako efekt wprowadzenia mutacji w mniejszej lub większej liczbie neuronów jądra łukowatego, stanowiących element ośrodka głodu i sytości. Miałoby to zostać osiągnięte poprzez iniekcję różnych ilości wektora AAV-AgRPCre i tym samym różny zakres neuronów jądra łukowatego uległby infekcji i modyfikacji. W następstwie obserwowalibyśmy proporcjonalny do ilości wprowadzonego wektora wirusowego oraz zainfekowanych przez niego neuronów AgRP, przyrost masy ciała. Celem sprawdzenia tego założenia, myszy Dicer fl/fl podzielono na trzy grupy i poddano obustronnej iniekcji wektorem AAV-AgRPCre w ilościach $3,36 \times 10^7$ gc/stronę (grupa I), $1,11-1,68 \times 10^7$ gc/stronę (grupa II) oraz $3,36 \times 10^6$ gc/stronę (grupa III). Na Rycinie 4.15, jeden z wykresów przedstawia średni przyrostu masy ciała dla każdej z badanych grup (wyrażony w procentach) w kolejnych punktach czasowych (\pm SEM). W czasie trwania doświadczenia uwidoczniły się spodziewane różnice w przyroście masy ciała. Osobniki, które w trakcie obustronnej iniekcji otrzymały największą ilość wektora AAV-AgRPCre (Rycina 4.15, grupa I, ●), wykazały przyrost masy ciała na poziomie $153,0 \pm 9,2$ % masy początkowej, poczynając od piątego tygodnia badania. Z kolei te myszy, u których ilość wprowadzonego wektora wirusowego mieściła się w środkowym zakresie wartości (Rycina 4.15, grupa II, ■), charakteryzowały się przyrostem masy, mieszczącym się, pomiędzy dwiema skrajnymi grupami i osiągały średnie wartości na poziomie oscylującym wokół $126,3 \pm 3,5$ % masy początkowej w 6 tygodniu od momentu wywołania mutacji. Grupa po iniekcji AAV-AgRPCre w ilości najmniejszej (Rycina 4.15, grupa III, ▲), praktycznie nie wykazała przyrostu masy ciała w trakcie prowadzonego doświadczenia. Pojawiające się na wykresie istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$, przedstawione są jako znamienność względem grupy, która nie wykazała przyrostu masy ciała. Na wykresie obrazującym ilość spożytego pokarmu, wyniki przedstawiono jako uśrednioną wartość dla sumy poboru pokarmu z tygodnia czwartego, piątego oraz szóstego w poszczególnych grupach (\pm SD). W grupie I, zainfekowanej największą ilością wektora AAV-AgRPCre, odnotowany poziom poboru karmy wyniósł $38,4 \pm 4,2$ grama. Był on istotnie większy ($p < 0,05$) niż w grupie zwierząt zainfekowanych najniższą ilością tegoż wektora (grupa III), u której osiągnął wartość $30,7 \pm 2,0$ grama. Natomiast zwierzęta ze środkowym przedziałem wartości wektora (grupa II), podanego w trakcie domóżgowej iniekcji, zjadły

średnio $35,3 \pm 5,2$ grama karmy między czwartym, a szóstym tygodniem eksperymentu. Widać zatem korelację między ilością zjedzonego pokarmu, a przyrostem masy ciała. Pobór pokarmu osiąga najwyższe wartości w momencie najbardziej intensywnego wzrostu masy ciała u myszy z mutacją, czyli między czwartym, a szóstym tygodniem badania. To powiązanie między fenotypem otyłości u myszy pozbawionych miRNA w mózgu, a zwiększonym zapotrzebowaniem pokarmowym, jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, prowadzonymi na modelu myszy DicerCKO (Vinnikov i in. 2014).

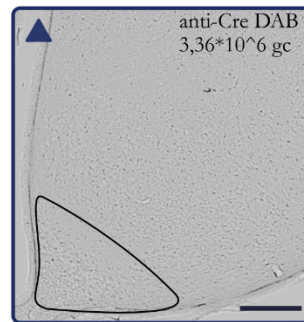
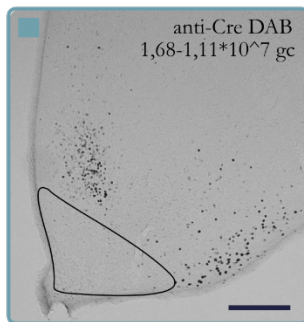
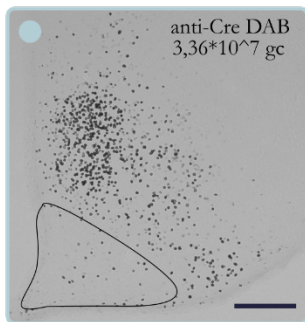
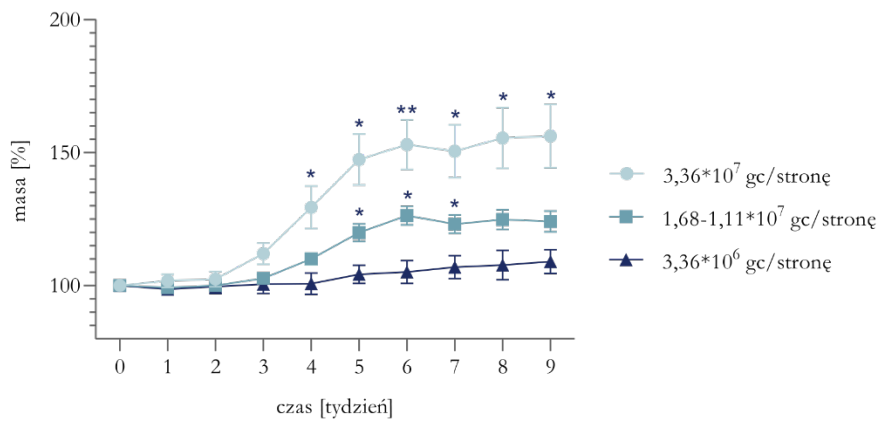
Niespodziewanym efektem omawianego doświadczenia był obraz mikroskopowy mózgow myszy, po uwidocznieniu ekspresji transgeny rekombinazy Cre. W grupie I, poziom ekspresji obecny był w pojedynczych neuronach jądra łukowatego. W pozostałych dwóch grupach zwierząt nie było go wcale w tym obszarze. Dodatkowo zarówno w grupie I jak i II rekombinaza Cre została uwidoczniła poza obszarem ARC, w VMH, z tym, że w odpowiednio mniejszej ilości u osobników z grupy II. Choć ekspresja transgeny obserwowana jest w obszarze innym niż ARC, to jednak jej intensywność koreluje dodatnio z krzywą przyrostu masy ciała. Brak jakiegokolwiek sygnału w grupie III, w uzupełnieniu o brak przyrostu masy ciała, dowodzi, że istnieje minimalna krytyczna ilość wektora wirusowego, która jest niezbędna do wywołania odpowiedzi na poziomie molekularnym i biochemicznym, a następnie metabolicznym. Brak ekspresji rekombinazy Cre w jądrze łukowatym, po upływie dziewięciu tygodni od indukcji mutacji w każdej z grup, wymagał weryfikacji czy jest to efekt charakterystyczny dla myszy pozbawionych miRNA w mózgu w badanym modelu.



POBÓR POKARMU
4-6 tydzień

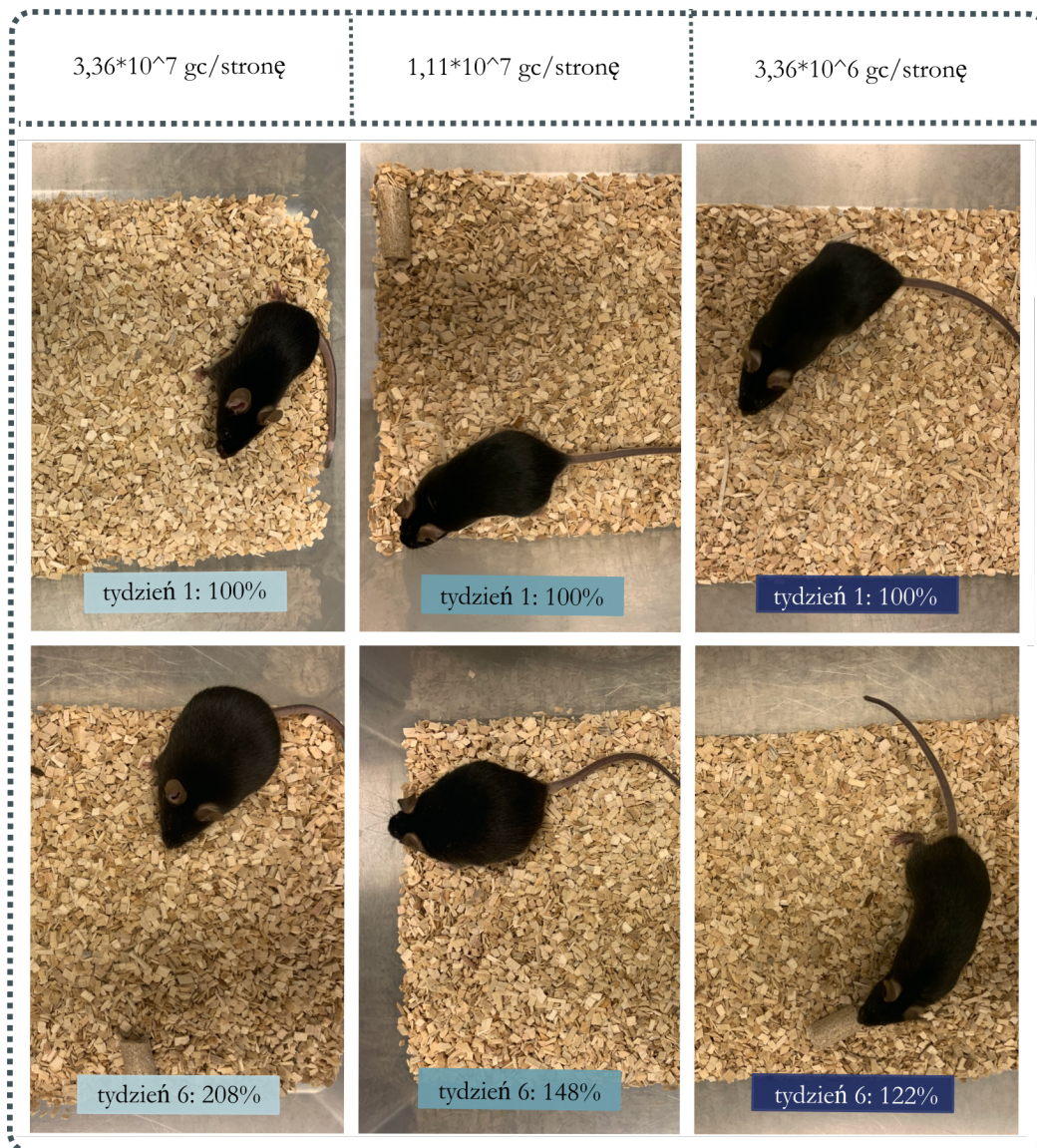


PRZYROST MASY CIAŁA
myszy Dicer fl/fl; iniekcja AAV-AgRPCre



Rycina 4.15 (opis na kolejnej stronie)

Rycina 4.15 Analiza przyrostu masy ciała zależnie od dawki wprowadzanego wektora AAV-AgRPCre oraz ilości zjedzonego pokarmu (jako efekt skumulowany w tygodniu 4,5,6), u myszy linii Dicer fl/fl, po obustronnej iniekcji do jądra łukowatego; grupa 1) $3,36 \times 10^7$ gc/stronę N=5, grupa 2) $1,11-1,68 \times 10^7$ gc/stronę N=12, grupa 3) $3,36 \times 10^6$ gc/stronę N=4. W ramce znajduje się schemat doświadczenia. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SEM; Analiza statystyczna: dla przyrostu masy ciała- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych, dla poboru pokarmu- jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych; gwiazdkami oznaczono poziom istotności * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, kolor gwiazdek mówi o tym, względem której grupy istotnie statystyczne różnice mają miejsce. Obraz mikroskopowy przedstawia fragment skrawka po barwieniu IHC DAB z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko rekombinazie Cre z zaznaczeniem jądra łukowatego; skala $100 \mu\text{m}$.

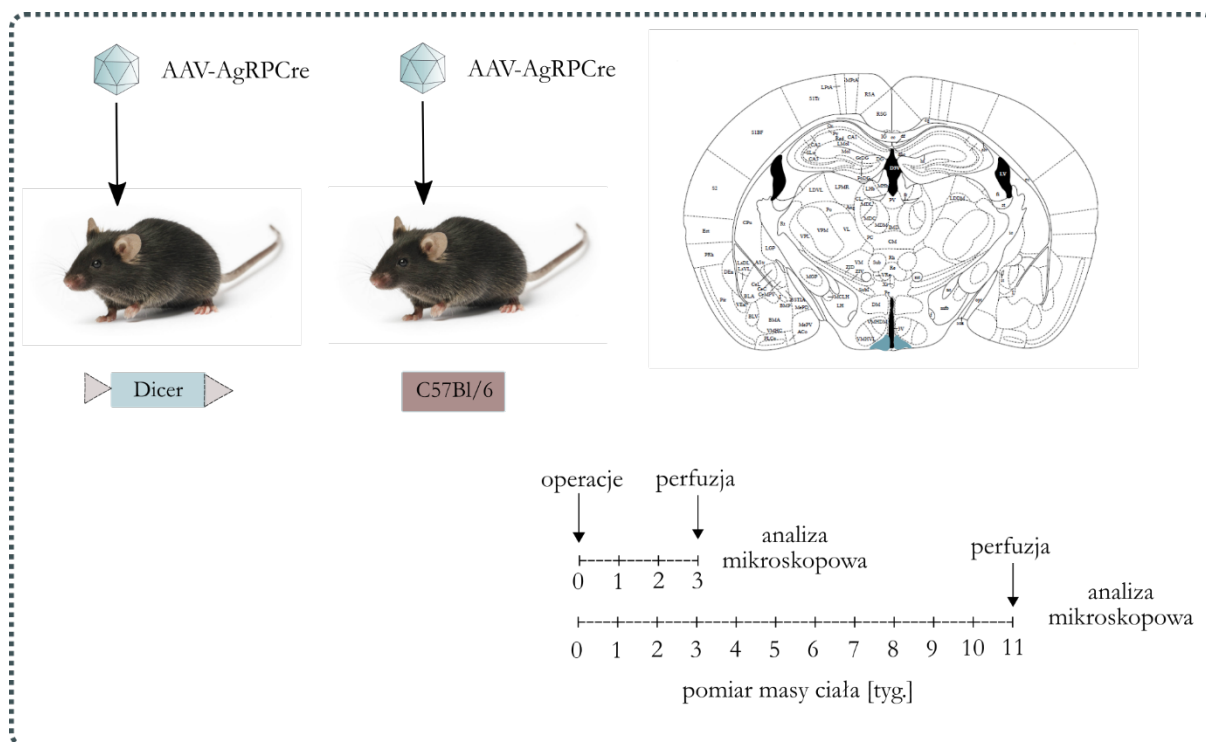


Rycina 4.16 Zdjęciowa reprezentacja wybranych osobników Dicer fl/fl, po indukcji mutacji różną ilością wektora AAV-AgRPCre; kolumny obrazują to samo zwierzę, reprezentujące jedną z trzech grup (I: $3,36 \times 10^7$ gc/stronę; II: $1,11 \times 10^7$ gc/stronę; III: $3,36 \times 10^6$ gc/stronę); górny panel to zwierzęta w pierwszym tygodniu doświadczenia, dolny panel- te same zwierzęta w szóstym tygodniu doświadczenia; kolorowe prostokąty na zdjęciach wskazują procentowe wartości masy ciała w danym tygodniu pomiarowym.

4.7.3 Analiza porównawcza zmiennego w czasie profilu ekspresji rekombinazy Cre u myszy C57Bl/6 oraz Dicer fl/fl po iniekcji wektorem AAV-AgRPCre

Brak obecności transgeny Cre na skrawkach, w obszarze jądra łukowatego myszy Dicer fl/fl, dziewięć tygodni po indukcji mutacji, miał charakter niespodziewany. Głównie ze względu na wynik wcześniejszego doświadczenia (podrozdział 4.6.2), będącego analizą porównawczą, opisującą poziom ekspresji transgeny u myszy typu dzikiego C57Bl/6, po upływie trzech oraz jedenastu tygodni od momentu operacji. Jego celem było sprawdzenie długofalowego działania rekombinazy Cre, poprzez utrzymującą się przez kilka tygodni ekspresję transgeny, a jego wynik to potwierdził. Był to warunek konieczny do zaobserwowania, w późniejszych badaniach z udziałem modeli transgenicznych, zmian fenotypowych rozwijających się na przestrzeni tygodni.

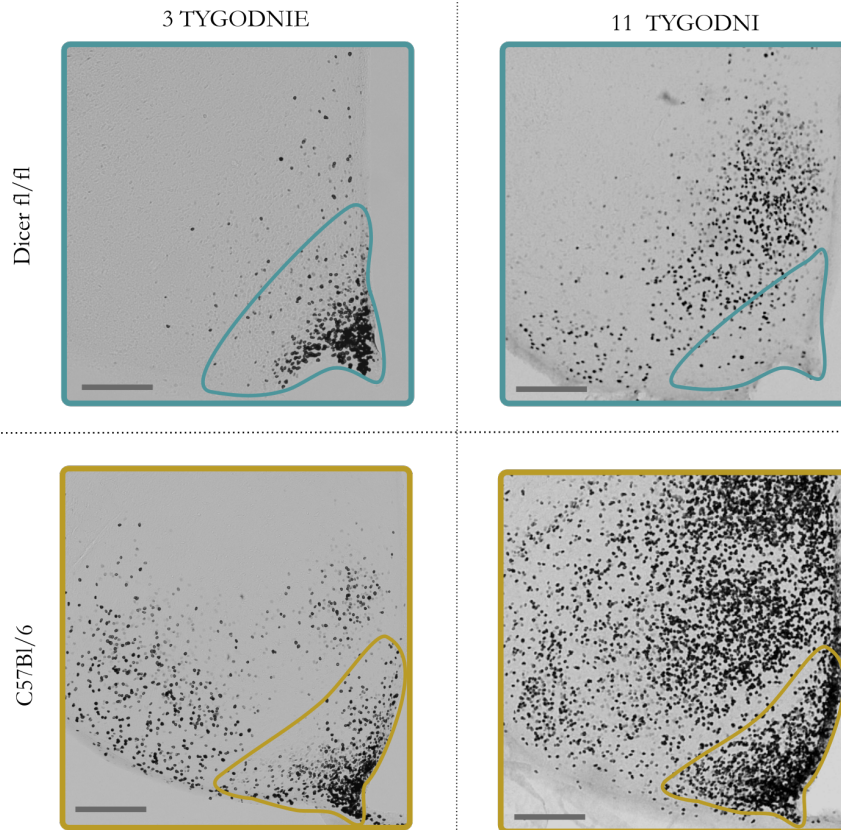
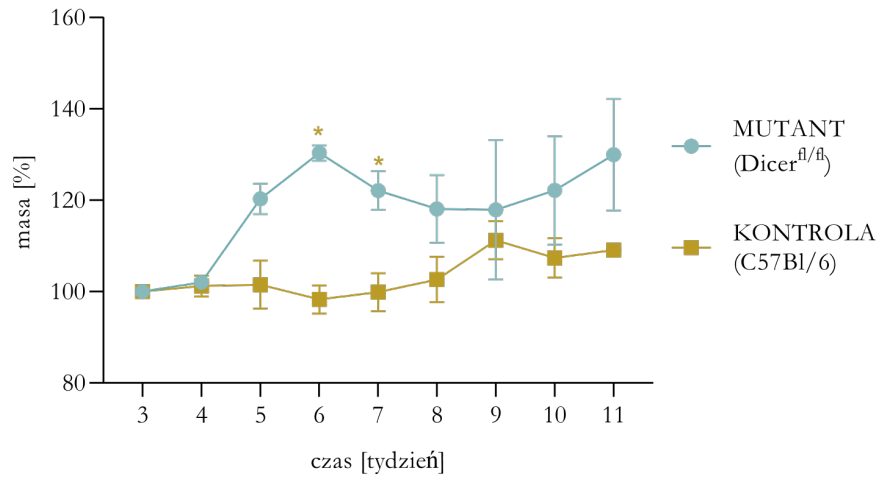
W odpowiedzi na obserwację opisaną w poprzednim podrozdziale (4.7.2), przeprowadzono doświadczenie, w którym ocenie poddano poziom ekspresji transgeny rekombinazy Cre zarówno u myszy C57Bl/6 (N=4), jak i Dicer fl/fl (N=4). W każdej z grup miało to miejsce po upływie trzech oraz jedenastu tygodni od momentu przeprowadzenia obustronnej iniekcji wektora AAV-AgRPCre ($1,68 \times 10^7$ gc/stronę) do jądra łukowatego. Po wskazanym czasie zwierzęta uśmiercono, a skrawki mózgow wybarwiono metodą IHC z użyciem DAB i przeciwciała skierowanego przeciwko rekombinazie Cre. Przedstawione na Rycinie 4.17, w części II, wyniki są wizualną reprezentacją poziomu ekspresji transgeny w każdej z badanych grup. Dodatkowo uzupełnione są o analizę przyrostu masy ciała w grupie myszy, będących przedmiotem badań przez jedenaste tygodni. Wynik na wykresie przedstawiony jest jako średnia (\pm SD) w każdej z grup, mierzona w kolejnych punktach czasowych oraz wyrażona w procentach. Dynamika przyrostu masy ciała pokrywa się ze spodziewanym efektem. Myszy Dicer fl/fl w czwartym tygodniu po indukcji mutacji zaczynają wyraźnie zwiększać masę ciała, aby w szóstym tygodniu osiągnąć wartość średnią $130,3 \pm 1,7$ % swojej masy początkowej. Wynik w szóstym i siódmym tygodniu pomiaru jest znamienne statystycznie na poziomie $p < 0,05$. Z kolei u osobników C57Bl/6 dopiero po upływie dziewięciu tygodni odnotowano nieznaczny przyrost masy ciała do poziomu $111,2 \pm 4,1$ %, co jest w zgodzie z naturalną tendencją myszy do zwiększania masy ciała w okresie dojrzałości i starzenia się.



Rycina 4.17, część I- schemat doświadczenia

Obraz mikroskopowy ujawnił wyraźne różnice w poziomie ekspresji rekombinazy Cre, zarówno między myszami C57Bl/6 i Dicer fl/fl, jak i w obrębie każdej z tych grup w zależności od czasu trwania eksperymentu. Trzy tygodnie po iniekcji wektora AAV-AgRPCre, ekspresja rekombinazy Cre w każdej z grup była najsilniejsza w neuronach jądra łukowatego. Po upływie jedenastu tygodni, u mutantów zaobserwowano pojedyncze neurony z ekspresją Cre w ARC oraz znacznie ich większą liczbę w VMH. W przypadku myszy C57Bl/6 ekspresja transgenu rozwijała się w trakcie eksperymentu i po upływie jedenastu tygodni była znacznie silniejsza niż w tej grupie myszy po trzech tygodniach, zarówno w ARC, jak i w pozostałych jądrach podwzgórza. Czynnikiem różnicującym opisane grupy był genotyp zwierząt, przekładający się na możliwość usunięcia w neuronach podwzgórza/jądra łukowatego cząsteczek miRNA. Myszy Dicer fl/fl z wyindukowaną mutacją, pozbawione miRNA w neuronach ARC, wraz z rozwijającym się fenotypem otyłości, utraciły ekspresję rekombinazy Cre w tym obszarze. Jednym z rodzących się wobec powyższej obserwacji pytań jest to, co dzieje się u badanych mutantów, z zainfekowanymi neuronami, w kluczowym, z punktu widzenia regulacji głodu i sytości, obszarze mózgu. Ponadto, znamieną wydaje się, obserwowana u większości badanych mutantów, ekspresja rekombinazy Cre w VMH oraz DMH. Rodzi to pytanie o zaangażowanie tej populacji neuronów w obserwowany, u myszy pozbawionych miRNA, fenotyp otyłości.

PRZYROST MASY CIAŁA
iniekcja AAV-AgRPCre



Rycina 4.17, część II. Zależna od genotypu (myszy typu dzikiego C57Bl/6 vs linia Dicer fl/fl) analiza obrazu mikroskopowego mózgow, po obustronnej iniekcji AAV-AgRPCre do jądra łukowatego (ilość gc/stronę); na zdjęciach uwidoczniło ekspresję rekombinazy Cre po barwieniu IHC DAB. Przedstawiciele każdej z linii podzieleni zostali na dwie grupy tak, żeby uwidocznić zmiany na przestrzeni czasu (po 3 tygodniach oraz po upływie 11 tygodni), N=4/grupę. Obszary zaznaczone na zdjęciach skrawków obejmują obszar jądra łukowatego. Dodatkowa analiza zawiera informacje na temat przyrostu masy ciała (wyrażona w %) w grupach myszy będących w eksperymencie 11 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych ± SD; Analiza statystyczna: dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Fisher'a LSD; gwiazdkami oznaczono poziom istotności * p < 0,05; skala 100µm.

4.7.4 Analiza liczebności neuronów AgRP u myszy DicerCKO po indukcji mutacji

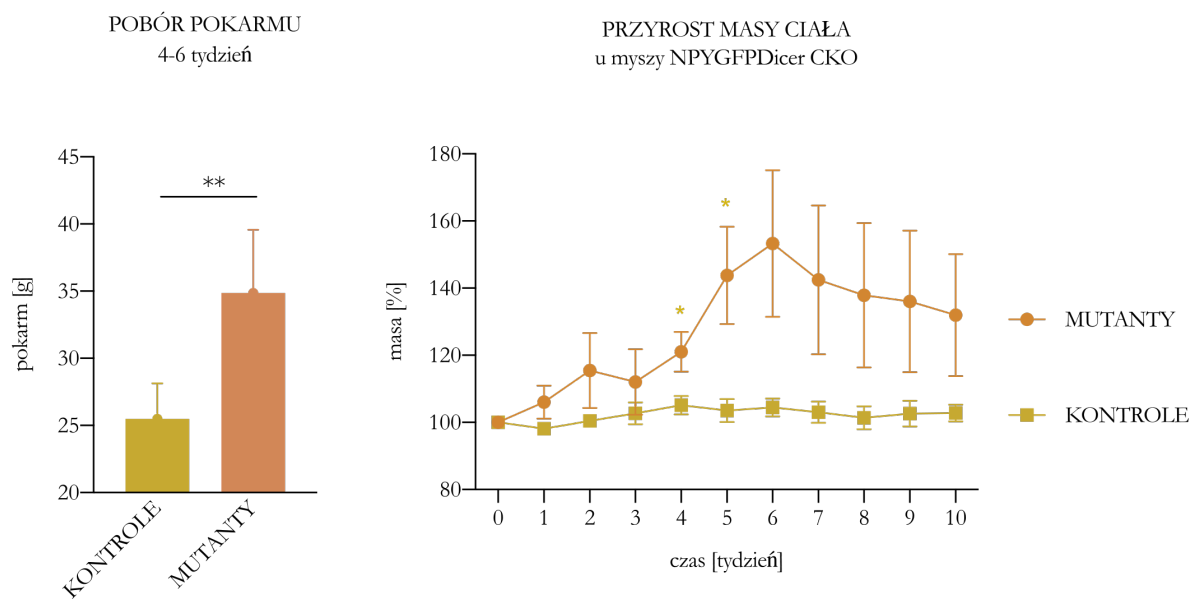
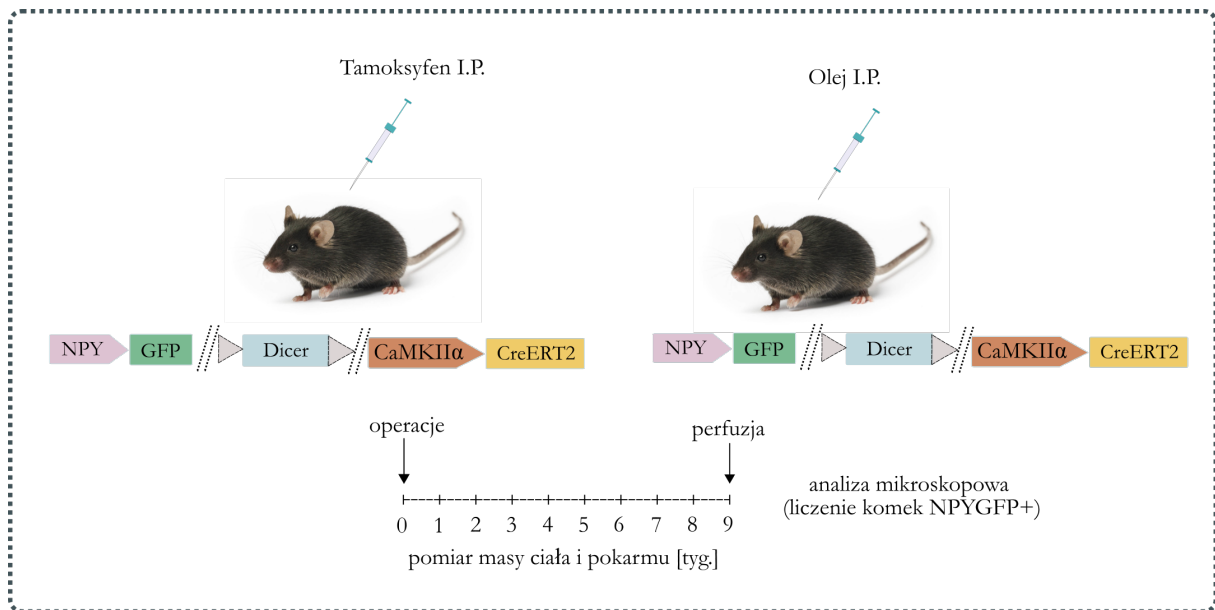
Jednym z kluczowych zjawisk do wyjaśnienia jest opisany brak ekspresji rekombinazy Cre w jądrze łukowatym mutantów, po czasie potrzebnym do rozwinięcia pełnego fenotypu. Intuicyjne wydaje się pytanie o losy zainfekowanych neuronów. Fundamentalne założenie tej rozprawy opiera się na zaangażowaniu neuronów AgRP/NPY w fenotyp otyłości. Naturalnym zatem krokiem jest chęć sprawdzenia jak te neurony jądra łukowatego reagują na utratę miRNA, a dokładnie czy w odpowiedzi na znaczące zmiany na poziomie molekularnym, ich liczebność ulega zmianie.

W tym celu scharakteryzowane wcześniej (Vinnikov i in. 2014) myszy DicerCKO skojarzono ze zwierzętami, których neurony NPY są wyznakowane białkiem zielonej fluorescencji GFP (linia NPY-GFP). Zwierzęta linii NPY-GFP/DicerCKO, poddano pięciodniowej iniekcji Tamoksyfenem (grupa badana, N=5) lub olejem (grupa kontrolna, N=6). Przez kolejnych dziewięć tygodni po indukcji mutacji, zwierzęta były ważone oraz szacowano tygodniową ilość zjedzonej przez nie karmy. W dziesiątym tygodniu obie grupy poddano eutanazji i przeprowadzono analizę ilościową komórek NPY-GFP w obrazie mikroskopowym.

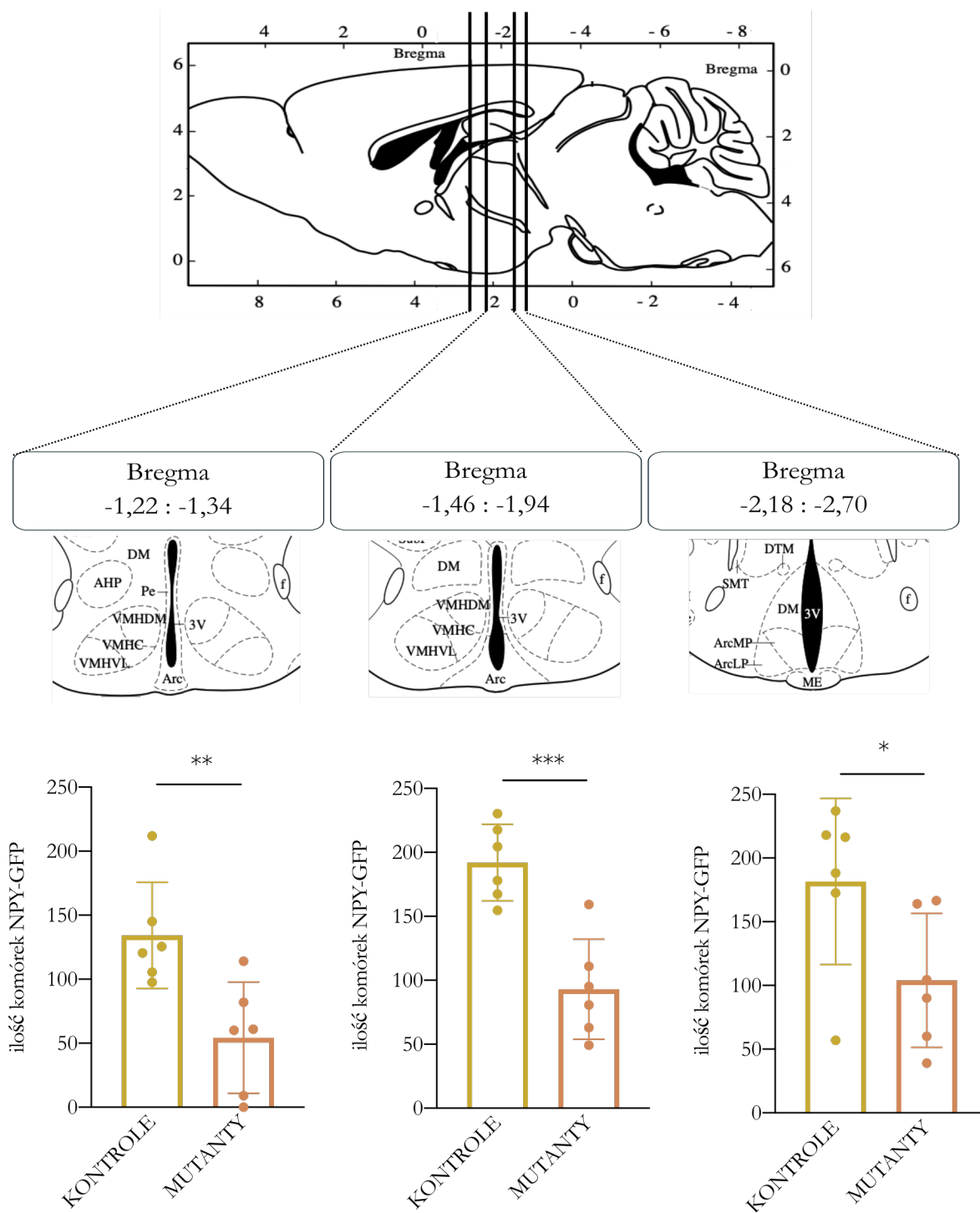
Wykres przyrostu masy ciała (Rycina 4.18, część I), wyrażający w procentach uśrednione wartości masy w danym tygodniu, ujawnił charakterystyczne różnice, z intensywnym jej wzrostem u mutantów DicerCKO, między czwartym, a szóstym tygodniem. W czwartym tygodniu masa w grupie mutantów wyniosła $121,0 \pm 5,9$ % ($p < 0,05$) w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej, z masą ciała na poziomie $105,1 \pm 2,7$ % masy początkowej. Piąty tydzień dał już przyrost masy ciała u mutantów do wartości $143,7 \pm 14,5$ % ($p < 0,05$), a szósty $153,2 \pm 21,8$ %. Ponadto, mutanty DicerCKO zjadły istotnie więcej jedzenia ($p < 0,01$) między czwartym, a szóstym tygodniem badania ($34,8 \pm 3,9$ g), w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ($25,4 \pm 2,6$ g).

W celu dokonania dokładnych obliczeń ilościowych, obszar ARC podzielono na trzy części wyznaczone różnymi zakresami pozycji w stosunku do Bregmy: I- przednią (-1,33 do -1,34), II-środkową (-1,46 do -1,94), III-tylną (-2,18 do -2,7). Każda z nich charakteryzuje się odmienną liczbą neuronów AgRP. Poszczególne wykresy w części II Ryciny 4.18, są reprezentacją uśrednionej liczby neuronów NPY-GFP w badanych grupach, dla wyznaczonych części jądra łukowatego. W każdym z wyznaczonych przedziałów liczba wyznakowanych białkiem zielonej fluorescencji neuronów NPY była około dwukrotnie niższa w grupie mutantów niż u myszy z grupy kontrolnej. W przedniej części ARC wyniosła $134,3 \pm 41,4$ u myszy kontrolnych i $54,3 \pm 43,3$ w grupie mutantów ($p < 0,01$), w środkowej- odpowiednio

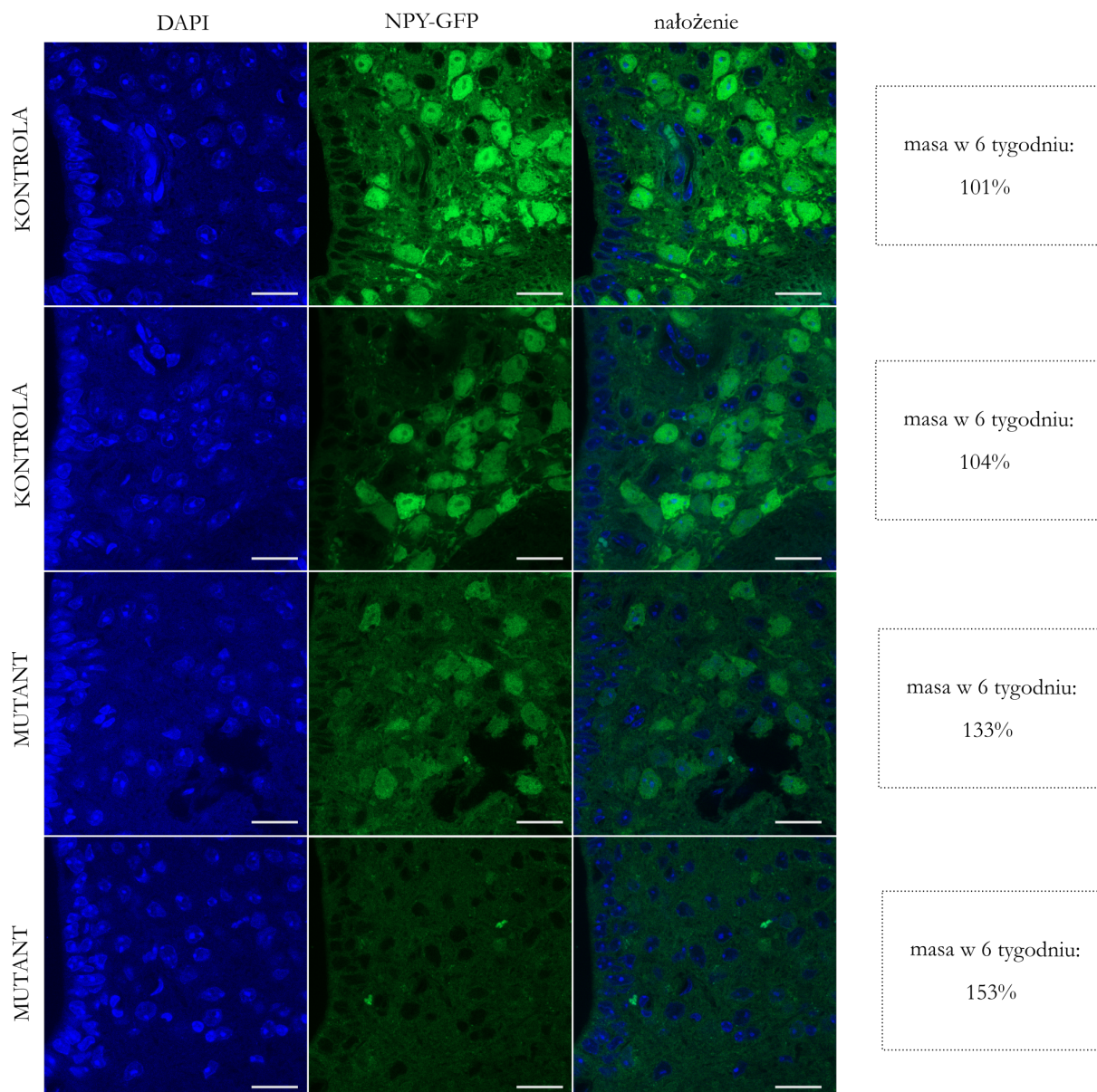
192,0 ± 29,9 i 93,0 ± 39,1 (p<0,001), a w tylnej części jądra łukowatego- 181,5 ± 65,2 oraz 104,0 ± 52,6 (p<0,05).



Rycina 4.18, część I- Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu u myszy NPY-GFP/DicerCKO po dootrzewnowej iniekcji Tamoksyfenu (N=5) lub oleju (N=6); ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; procentowy przyrost masy ciała wyrażony został jako średnia dla grup w kolejnych punktach czasowych ± SD, pomiar ilości zjedzonego pokarmu to uśredniona wartość dla każdej z grup z tygodnia 4,5 i 6 ± SD; Analiza statystyczna: dla przyrostu masy- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzalnymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych, dla poboru pokarmu- test T-studenta dla prób niezależnych; * p<0,05, ** p<0,01



Rycina 4.18, część II- analiza ilościowa komórek NPY-GFP u zwierząt NPY-GFP/DicerCKO po indukcji mutacji (Tamoksyfenem); górny panel to schematyczne przedstawienie przyjętego podziału jądra łukowatego na trzy części, w obrębie których analizowana była liczebność komórek NPY-GFP; wykresy w dolnym panelu są graficznym przedstawieniem uśrednionej liczby neuronów NPY-GFP ± SD, dla każdej z trzech części jądra łukowatego; Analiza statystyczna: test T-studenta dla grup niezależnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

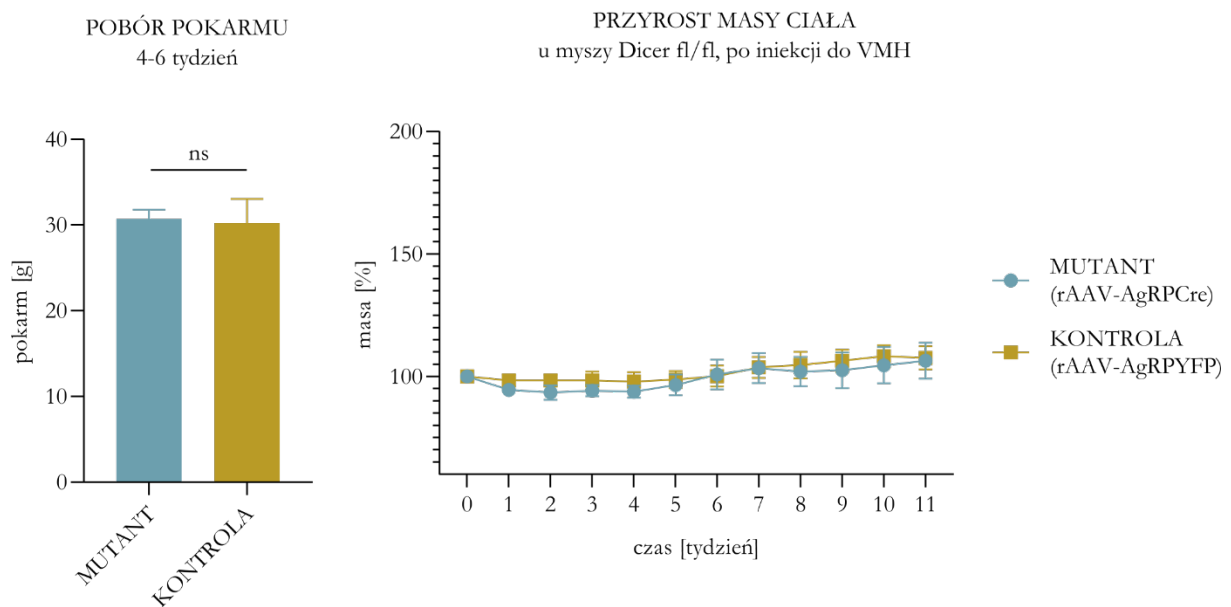
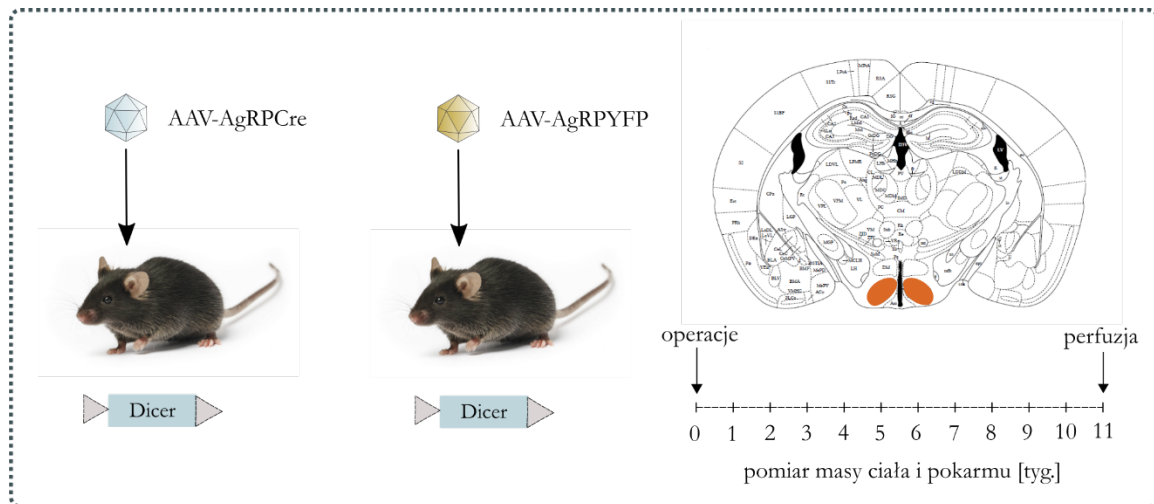


Rycina 4.18, część III- mikroskopowy obraz wycinka jądra łukowatego dla wybranych osobników (2 kontrole, 2 mutanty) NPY-GFP/DicerCKO dziesięć tygodni po indukcji mutacji; kolor niebieski- znakowanie jąder przy użyciu barwnika DAPI, kolor zielony- neurony NPY wyznakowane białkiem GFP; w ramach po prawej stronie zdjęć mikroskopowych znajdują się procentowe wartości masy ciała w szóstym tygodniu badania, odpowiadające danemu osobnikowi; skala 25 μ m, obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss 800 LSM.

Omawiane różnice ilościowe przedstawiono na zdjęciach mikroskopowych skrawków (Rycina 4.18, część III), będących reprezentacją grupy mutantów (N=2) oraz zwierząt kontrolnych (N=2). Na Rycinie 4.18 część III widać obniżoną fluorescencję komórek NPY na skrawkach mutantów. Efekt ten koreluje ze zwiększającym się przyrostem masy ciała. Natomiast nie obserwuje się różnic między grupami w obrazie DAPI. Na żadnym ze skrawków nie uwidoczniło zmian w morfologii jąder komórkowych, które wskazywałyby na zachodzący proces apoptozy.

4.7.5 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy Dicer fl/fl po iniekcji wektora AAV-AgRPCre do brzuszno-przyśrodkowego jądra w podwzgórzu (VMH)

W odpowiedzi na obserwowaną, u myszy Dicer fl/fl z wyindukowaną mutacją, ekspresją rekombinazy Cre w VMH, przy jednoczesnym jej braku w neuronach ARC, przeprowadzono kolejne badanie. Jego celem było sprawdzenie czy neurony VMH, klasyfikowane w znacznej większości jako glutaminianergiczne, biorą udział w rozwinięciu otyłości w opisywanym modelu. Myszy Dicer fl/fl podzielono na dwie grupy. Grupę badaną stanowiły osobniki, które w trakcie operacji stereotaktycznej poddane były iniekcji wektorem AAV-AgRPCre ($1,13 \cdot 10^7$ gc/stronę, N=5) zaś grupa kontrolna otrzymała wektor AAV-AgRPEYFP ($1,9 \cdot 10^7$ gc/stronę, N=5). Odmienne niż w poprzednich badaniach, było miejsce iniekcji, bowiem w tym przypadku wektor wprowadzany był do VMH (koordynaty: AP:-1,46/LM: $\pm 0,25$ /DV:-5,29). Przez kolejnych jedenaście tygodni, od momentu iniekcji wspomnianych wektorów AAV, zwierzęta poddane były cotygodniowym pomiarom masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu. Wyniki doświadczenia przedstawiono na dwóch oddzielnych wykresach (Rycina 4.19). Pomiar masy zobrazowano jako średni przyrost masy ciała w danej grupie (\pm SD), w kolejnych punktach czasowych. Z kolei wykres poboru pokarmu jest uśrednieniem wyniku zbiorczego z czwartego, piątego i szóstego tygodnia pomiarów (\pm SD) dla każdej z grup oddzielnie. Żadna z grup nie wykazała znaczącego przyrostu masy ciała związanego ze wzrostem zapotrzebowania na pobór pokarmu. Brak obserwowanych różnic między grupami pozwala na sformułowanie wniosku o braku zaangażowania neuronów znajdujących się w VMH w rozwój otyłości u myszy Dicer fl/fl.



Rycina 4.19 Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu (jako efekt skumulowany w tygodniu 4,5 i 6) u myszy linii Dicer fl/fl, po obustronnej iniekcji wektora wirusowego AAV-AgRPCre ($1,13 \cdot 10^7$ gc/stronę, N=5) do VMH; grupę kontrolną stanowiły myszy linii Dicer fl/fl po iniekcji AAV-AgRPYFP ($1,9 \cdot 10^7$ gc/stronę, N=5). Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD; Analiza statystyczna: dla pomiaru masy ciała- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzаныmi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych, dla zjedzonego pokarmu- test T-studenta dla prób niezależnych.

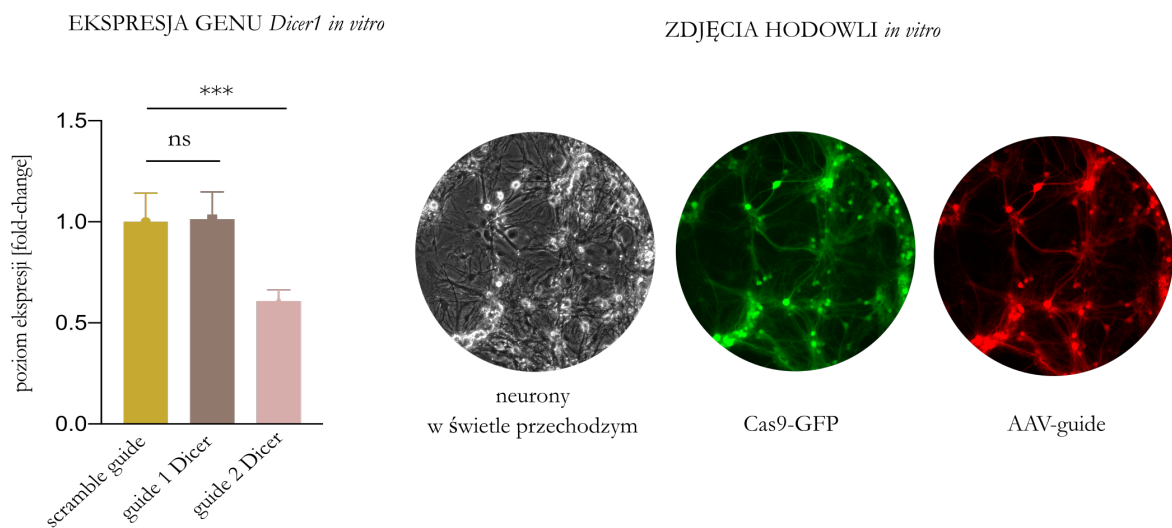
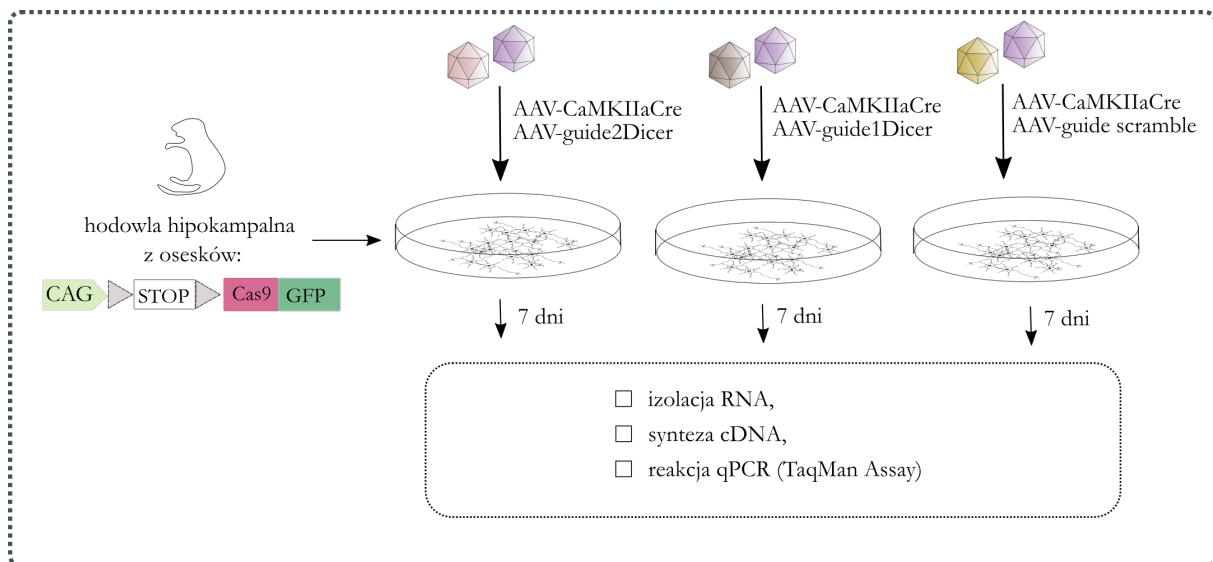
4.8 Funkcjonalny efekt usunięcia w neuronach ARC cząsteczek miRNA z wykorzystaniem narzędzi systemu CRISPR-Cas9

Badania z wykorzystaniem myszy *Dicer* fl/fl oraz podaniami wektora AAV-AgRP Cre do jądra łukowatego pozwoliły zaobserwować rozwijający się w obliczu mutacji fenotyp otyłości związanej z hiperfagią. Niemniej, z powodu braku całkowitej specyficzności ograniczonej wyłącznie do neuronów AgRP, zastosowano alternatywny model. Doświadczenia opisane w kolejnych podrozdziałach wykorzystują technologię CRISPR/Cas9, jako narzędzie do celowanej modyfikacji genu *Dicer1* w neuronach ARC. Dzięki swoim właściwościom do wysoce precyzyjnej edycji genomu, zastosowanie jej pozwala na osiągnięcie celowanej modyfikacji w obrębie neuronów AgRP.

Poniższe układy doświadczalne bazują na zwierzętach transgenicznym z komórkowo-specyficzną ekspresją Cre i jednoczesną Cre-zależną ekspresją Cas9. Sekwencje guideRNA dostarczane są z wykorzystaniem rekombinowanych wektorów wirusowych AAV. W przypadku doświadczenia przeprowadzanego na hodowli hipokampalnej *in vitro*, Cre dostarczana była również na nośniku AAV. Celem efektywnego wyciszenia ekspresji *Dicer1* zaprojektowane zostały dwa warianty guideRNA, nazwane- guide1Dicer oraz guide2Dicer. Sekwencję kontrolną stanowił guideScramble, który podobnie jak wymienione wyżej sekwencje o znaczeniu funkcjonalnym, znakowany był białkiem czerwonej fluorescencji tdTomato, znajdującym się pod promotorem ludzkiej synapsyny I hSyn. Nie zawierał jednak żadnego fragmentu komplementarnego do genu *Dicer1*. Obydwie funkcjonalne cząsteczki guideRNA- guide1Dicer i guide2Dicer wykazują komplementarność w egzonie dziesiątym genu *Dicer1*, z tym, że guide1Dicer na nici wiodącej, a guide2Dicer na nici komplementarnej. Ich działanie zostało następnie zweryfikowane *in vitro* oraz *in vivo*.

4.8.1 Analiza poziomu ekspresji genu *Dicer1* *in vitro* w dysocjowanej hodowli neuronów hipokampalnych myszy Cas9, po infekcji mieszaną wektorów AAV kodujących składowe systemu CRISPRCas9.

Wykorzystanie systemu CRISPR/Cas9 w modelu zwierzęcym wymagało sprawdzenia jego komponentów w warunkach *in vitro*. W tym celu, założona została hodowla z komórek hipokampa, wyizolowanych od transgenicznych osesków z Cre-zależną ekspresją endonukleazy Cas9. Wizualizacja Cas9 jest możliwa dzięki jednoczesnej ekspresji z białkiem zielonej fluorescencji GFP. Cas9 syntetyzowane jest jako białko fuzyjne z GFP (z jednego wspólnego transkryptu), a następnie rozdzielająca je sekwencja P2A jest rozpoznawana i rozcinana przez endogenne peptydazy, pozostawiając białka w równomolowym stosunku. Zatem sygnał fluorescencyjny pochodzący od GFP jest miarą ekspresji Cas9. Z kolei w przypadku sekwencji guideRNA, ich ekspresja (regulowana aktywnością promotora U6) obrazowana jest sygnałem czerwonej fluorescencji tdTomato, białka pochodzącego z wektora AAV. Aby zweryfikować skuteczność działania zaprojektowanych wariantów guideRNA, hodowlę zainfekowano trzema mieszaninami wektorów wirusowych (I. AAV-CaMKII α Cre + AAV-guide2Dicer, II. AAV-CaMKII α Cre + AAV-guide1, III. AAV-CaMKII α Cre + AAV-guideScramble). W każdym z przypadków Cre dostarczana była na wektorze wirusowym i regulowana sekwencją promotora CaMKII α , który jest aktywny w neuronach hipokampa. Uzyskane, w reakcji qPCR (ang. *quantitative PCR*), relatywne poziomy ekspresji *Dicer1* w poszczególnych wariantach wskazują, że jedynie sekwencja guide2Dicer okazała się skuteczna w jego obniżeniu, osiągając wartość $0,60 \pm 0,05$ w porównaniu do guide1Dicer $1,01 \pm 0,13$ ($p < 0,001$) (Rycina 4.20).



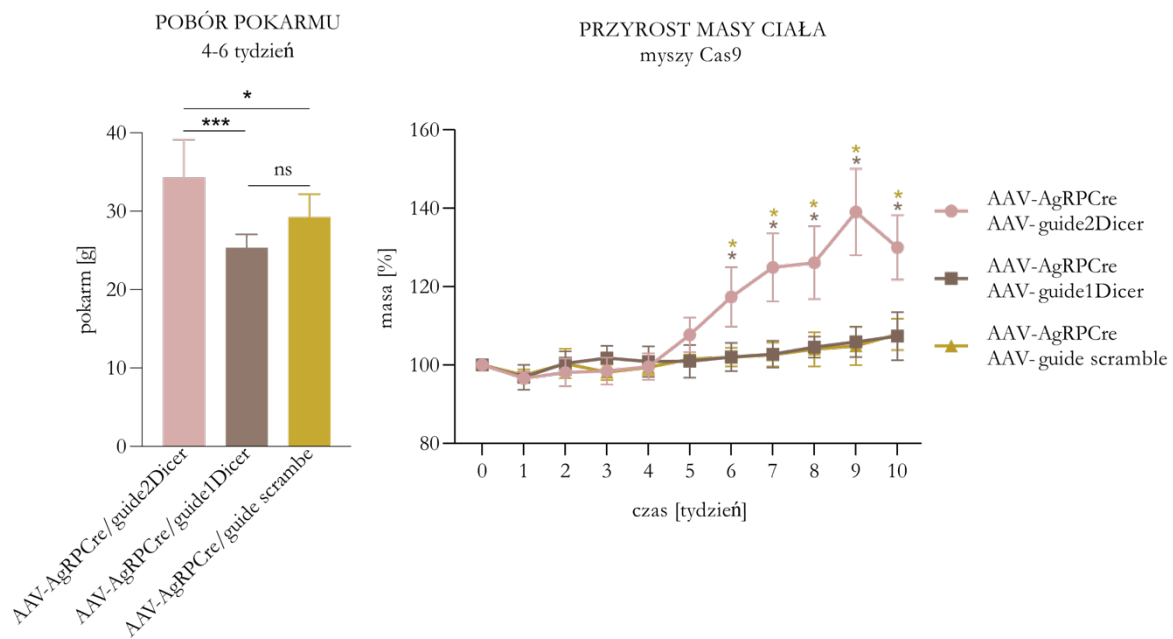
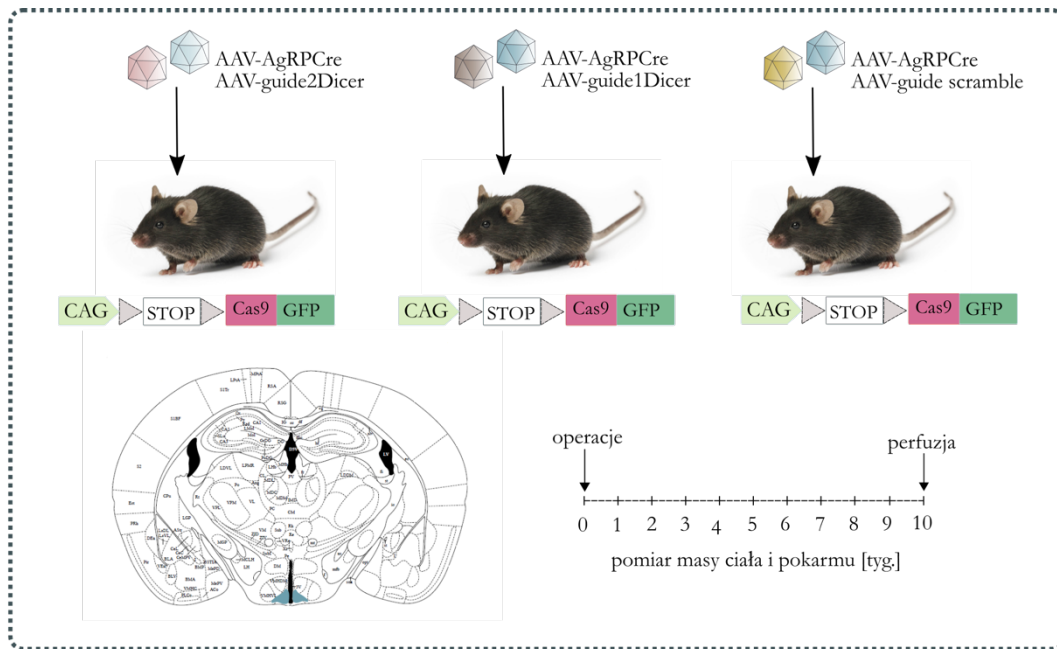
Rycina 4.20 Poziom ekspresji *Dicer1* w dysocjowanej hodowli hipokampalnej *in vitro*. Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia. Zdjęcia mikroskopowe obrazują zainfekowaną hodowlę hipokampalną neuronów z myszy Cas9; kolor zielony- białko fluorescencyjne GFP jako marker Cas9, kolor czerwony- znacznik tdTomato jako marker AAV-guide1Dicer/guide2Dicer/guideScramble; wykres przedstawia relatywny poziom ekspresji genu *Dicer1* \pm SD, znormalizowany względem poziomu ekspresji genu *Hprt*, zarówno dla próbek badanych (guide1Dicer, guide2Dicer), jak i dla kalibratora (guideScramble). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a; *** $p < 0,001$;

4.8.2 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy Cas9, po domózgowej iniekcji wektorów AAV-AgRPCre/AAV-guide.

Wynik badania poszczególnych składowych systemu CRISPR-Cas9 w warunkach *in vitro*, uzasadnił podjęcie analogicznej próby na modelu mysim *in vivo*. Celem sprawdzenia działania poszczególnych wektorów wirusowych, potencjalnie wyciszających ekspresję genu

Dicer1, myszy Cas9GFP poddano obustronnej iniekcji wektorami AAV. Grupa I otrzymała mieszaninę AAV-AgRPCre+AAV-guide2Dicer ($4,0 \cdot 10^7 + 4,15 \cdot 10^{10}$ gc/stronę), grupa II- AAV-AgRPCre+AAV-guide1Dicer ($4,0 \cdot 10^7 + 1,06 \cdot 10^{10}$ gc/stronę), grupę III natomiast stanowiły myszy kontrolne, które poddane były iniekcji AAV-AgRPCre+AAV-guideScamble ($4,0 \cdot 10^7 + 1,95 \cdot 10^{10}$ gc/stronę). Przez kolejnych dziesięć tygodni od momentu przeprowadzonego zabiegu, dokonywano cotygodniowych pomiarów masy ciała i ilości zjedzonego pokarmu. Wyniki opisujące przyrost masy ciała w czasie, przedstawiono jako średnia dla każdej z grup (\pm SD) w kolejnych tygodniach trwania badania. Z kolei pobór pokarmu jest uśrednioną wartością dla każdej z grup (\pm SD), zsumowaną z tygodnia czwartego, piątego i szóstego. Wyniki z obu wykresów, przedstawione na Rycinie 4.21, uzupełniają się wzajemnie, opisując efekt działania poszczególnych mieszanin konstruktów typu guide z wektorem dostarczającym rekombinazę Cre do neuronów AgRP. Zwierzęta z grupy I (N=4), poddane iniekcji AAV-AgRPCre+guide2Dicer, wykazały istotny statystycznie przyrost masy ciała począwszy od szóstego pomiaru, choć tendencja wzrostowa masy ciała utrzymywała się już od tygodnia czwartego. We wspomnianym szóstym tygodniu wartość średnia masy ciała wyniosła $117,3 \pm 7,5$ %, osiągając wartości maksymalne w tygodniu dziewiątym $139,0 \pm 11,0$ %. Jest to odmienna niż w poprzednich badaniach, opisujących tę cechę u mutantów pozbawionych miRNA, kinetyka przyrostu masy ciała. Obserwacja dotycząca masy ciała uzupełniała się z obserwacją opisującą ilość zjedzonego pokarmu, która dla wskazanej grupy myszy była znacząco ($p < 0,001$) wyższa niż dla tych z grupy II (AAV-AgRPCre+AAVguide1Dicer) (N=7) oraz z grupy kontrolnej (AgRPCre+AAVguideScramble) ($p < 0,05$). Dla myszy z dwóch pozostałych grup nie odnotowano znaczącego wzrostu masy ciała.

Powyższe doświadczenie jest kolejnym dowodem na działanie tylko jednego, z dwóch weryfikowanych, wariantów guideRNA. Jedynie AAV-guide2Dicer, lokalizujący sekwencję *Dicer1* na nici odwróconej, „naprowadza” białko Cas9 wskazując miejsce modyfikacji, odpowiadając za wyciszenie ekspresji genu *Dicer1*. Kolejne doświadczenia zostały przeprowadzone w oparciu o ten właściwy konstrukt.



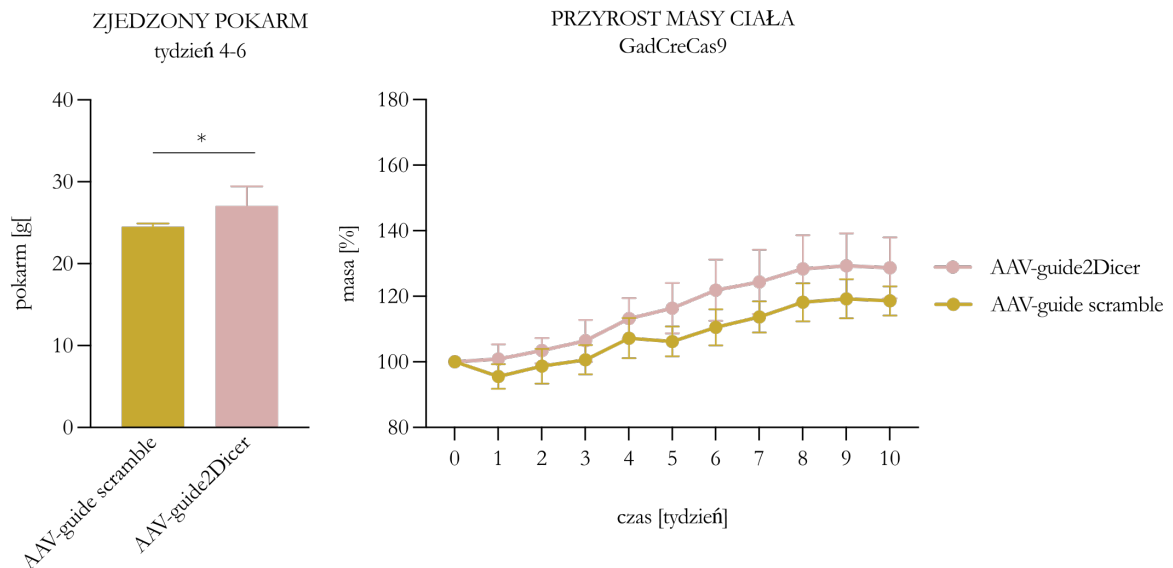
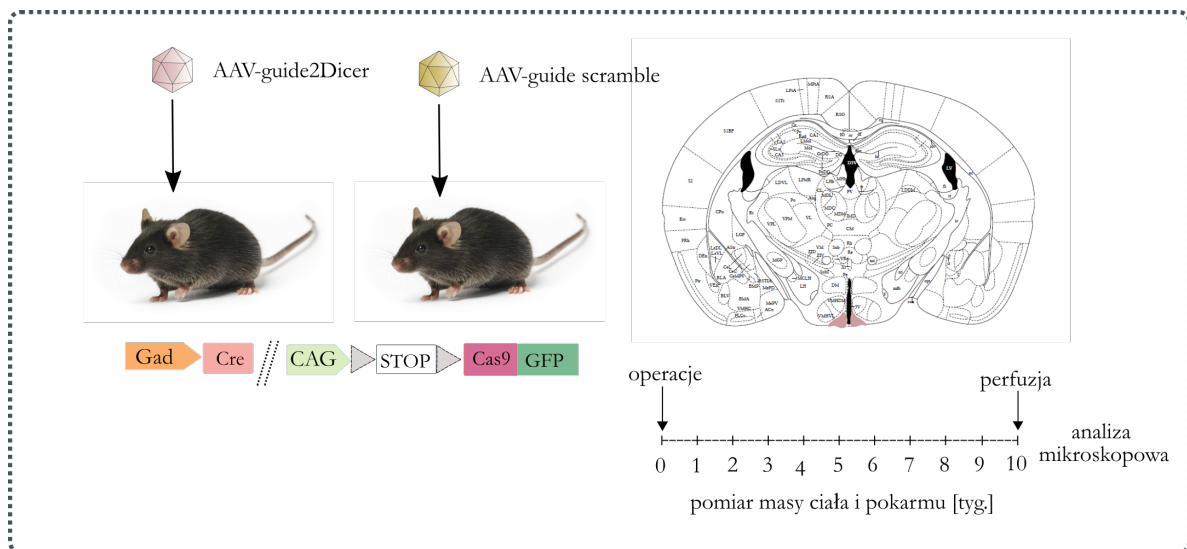
Rycina 4.21 Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu (jako efekt skumulowany w tygodniu 4,5 i 6 trwania eksperymentu) u myszy linii Cas9, po obustronnej iniekcji mieszanki wektorów wirusowych do jądra łukowatego; Ramką zaznaczony jest schemat doświadczenia; grupa 1) AAV-AgRPCre/AAV-guide1Dicer ($4 \cdot 10^7/1,06 \cdot 10^{10}$ gc/stronę), grupa 2) AAV-AgRPCre/AAV-guide2Dicer ($4 \cdot 10^7/4,15 \cdot 10^{10}$ gc/stronę), grupa 3) (kontrolna) AAV-AgRPCre/guide Scramble ($4 \cdot 10^7/1,95 \cdot 10^{10}$ gc/stronę). Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD, wyniki poboru pokarmu są uśrednieniem dla każdej z grup z tygodnia 4, 5 i 6 \pm SD; Analiza statystyczna: dla pomiaru masy ciała- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych, dla zjedzonego pokarmu- jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukey'a dla porównań wielokrotnych; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, kolor gwiazdek mówi o tym, względem której grupy istotnie statystyczne różnice mają miejsce.

4.8.3 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy GadCreCas9, po domózgowej iniekcji wektora AAV-guide2Dicer.

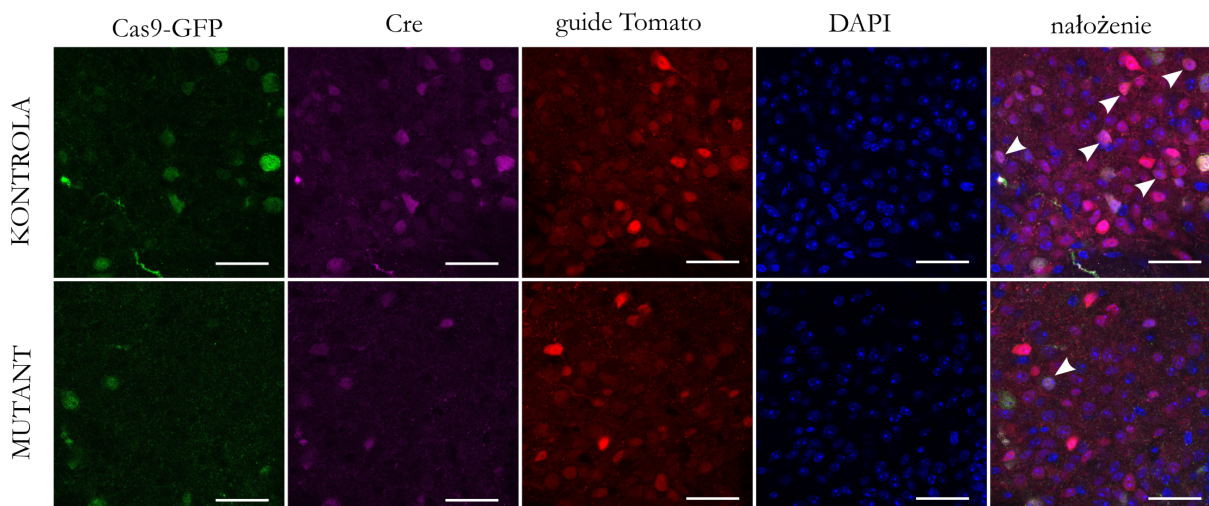
Przesłanką do przeprowadzenia doświadczeń na kolejnej linii transgeniczej była chęć porównania fenotypu z dotychczas omawianymi, poznanymi modelami. Identyfikacja wzorca fenotypowego, będącego częścią wspólną w badanych modelach, wsparłaby dodatkowo hipotezę o zaangażowaniu GABAergicznych neuronów AgRP w rozwój miRNA-zależnej otyłości. W efekcie szeregu kojarzeń uzyskano linię transgeniczną GadCreCas9. Charakterystyka tej linii opiera się o Cre-zależną ekspresję Cas9, w neuronach z aktywnością promotora dekarboksylazy 2 kwasu glutaminowego (GAD2 lub GAD65, ang. *glutamic acid decarboxylase 2*). Zatem wyciszenie genu *Dicer1* ograniczone zostało do neuronów GAD2, w których możliwa była aktywność sekwencji guide2Dicer. Jedną z kluczowych, w ARC, populacji komórek są właśnie neurony o charakterze GABAergicznym. Należą do nich oreksygeniczne neurony AgRP/NPY, jak i pewna frakcja anoreksygenicznych neuronów POMC, a także dodatkowe populacje o odmiennej peptydergicznym charakterystyce (Marshall i in. 2017). Z kolei wyjściowy model utraty miRNA (DicerCKO), zakłada, że utrata miRNA ma miejsce w neuronach CaMKII α , które obejmują przede wszystkim neurony glutaminianergiczne, ale również frakcję neuronów GABAergicznych. Wykorzystując system CRISPR/Cas9, selektywnie w neuronach z ekspresją GAD2, wyciszono dojrzewanie cząsteczek miRNA, poszukując wzorca, który nawiązywałby fenotypem do któregoś ze zbadanych modeli. Zwierzęta linii GadCreCas9, obu płci, poddane zostały stereotaktycznym iniekcjom do jądra łukowatego, wektora AAV-guide2Dicer ($1 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=8) oraz AAV-guideScramble ($1,11 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=7). W trakcie dziesięciu tygodni trwania doświadczenia przeprowadzono cotygodniowe pomiary masy ciała i ilości zjedzonego pokarmu. Po zakończeniu doświadczenia przeprowadzona została analiza mikroskopowa skrawków mózgow.

Na wykresie obrazującym uśredniony dla danego punktu czasowego, przyrost masy ciała (wyrażony w procentach \pm SD) (Rycina 4.22, część I), brak istotnych różnic między badanymi grupami. Zarysowuje się natomiast tendencja wzrostowa w grupie mutantów, która koreluje ze zwiększoną ilością zjedzonego pokarmu (wyrażonego w gramach \pm SD) między czwartym, a szóstym tygodniem badania. Uśredniona z trzech tygodni konsumpcja w grupie mutantów wyniosła $27,0 \pm 2,4$ g, a w grupie kontrolnej- $24,5 \pm 0,4$ g ($p < 0,05$).

W obrazie z mikroskopu konfokalnego (Rycina 4.22, część II), natomiast, widoczna jest niewielka liczba komórek z aktywnością endonukleazy Cas9 (mierzona siłą sygnału fluorescencji pochodzącego od GFP) w obszarze ARC, zarówno w grupie myszy kontrolnych, jak i u mutantów. Niski wyjściowy poziom Cas9-GFP w obserwowanym fragmencie podwzgórza jest dodatkowo zredukowany w grupie mutantów, pozbawionych miRNA w tych komórkach. Bezpośrednim odwzorowaniem obecności Cas9-GFP w mózgu, jest wzorzec ekspresji rekombinazy Cre (kolor magenta). Ekspresja Cas9 oraz Cre nakładają się. Sygnał czerwonej fluorescencji pochodzący od tdTomato i znakujący aktywność cząsteczek guide2Dicer oraz guideSramble jest podobny w obu grupach. Barwienie DAPI nie wykazało cech charakterystycznych dla procesu apoptozy. W obrazie nakładających się sygnałów dla wszystkich czterech kanałów (Rycina 4.22, część II „nałożenie”), pojawia się różnica w liczbie komórek. Na przykładowym skrawku myszy z grupy kontrolnej było ich 5cio krotnie więcej niż na skrawku pochodzącym z mózgu mutantu. Jednym z możliwych uzasadnień jest efekt zanikającej, w neuronach z rekombinacją, fluorescencji, jak miało to miejsce w modelu NPY-GFP/DicerCKO. Ponadto, wyjściowy poziom intensywności świecenia GFP jest dość niski w wyznakowanych neuronach GAD2. Innym możliwym uzasadnieniem jest to, że ekspresja GAD2 i AgRP u myszy dorosłych nie pokrywa się i z tego powodu brak jest obserwowanego pełnego fenotypu otyłości u tych myszy.



Rycina 4.22, część I. Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu (jako efekt skumulowany w tygodniu 4,5 i 6) u myszy linii GadCreCas9, po obustronnej iniekcji wektorów AAV-guide2Dicer ($1 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=8) oraz AAV-guideScramble ($1,11 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=7) do jądra łukowatego; Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD, wyniki poboru pokarmu są uśrednieniem dla każdej z grup z tygodnia 4, 5 i 6 \pm SD; Analiza statystyczna: dla masy ciała- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych, dla poboru pokarmu- test T-studenta dla prób niezależnych; * $p < 0,05$



Rycina 4.22, część II. Mikroskopowy obraz jądra łukowatego wybranych przedstawicieli linii GadCreCas9 po iniekcji AAV-g2Dicer oraz AAV-guideScramble; wykonano barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciała przeciwko białku GFP (marker Cas9) - kolor zielony, przeciwko Cre- kolor magenta, wyznakowano jądra barwnikiem DAPI- kolor niebieski, sygnał tdTomato nie był wzmocniony barwieniem (marker AAV-guide2Dicer/guide Scramble); skala 25 μm .

4.8.4 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy Vglut2CreCas9, po domózgowej iniekcji wektora AAV-guide2Dicer

Kontynuując doświadczenie porównawcze, naturalnym wyborem było wykorzystanie linii, u której usunięcie miRNA miałyby miejsce w neuronach glutaminianergicznych. Przy założeniu, że zasadniczą rolę w rozwoju otyłości związanej z niepohamowanym apetytem, odgrywają neurony AgRP, linia z dysfunkcją *Dicer1* w neuronach glutaminianergicznych posłużyłaby jako kontrola negatywna. Kojarzenie linii z Cre-zależną ekspresją Cas9 (wyznakowaną białkiem GFP) z osobnikami, u których obecność Cre warunkowana jest aktywnością promotora dla pęcherzykowego transportera glutaminianu (Vglut2, ang. *vesicular glutamate transporter*), pozwoliło na uzyskanie grupy doświadczalnej zwierząt Vglut2CreCas9. Myszy podzielono na dwie grupy, z których jedna poddana została stereotaktycznym iniekcjom do jądra łukowatego, z wektorem indukującym mutację- AAV-guide2Dicer ($N_{\text{samice}}=8$, $N_{\text{samce}}=7$), a druga otrzymała wektor kontrolny- AAV-guide Scramble ($N_{\text{samice}}=10$, $N_{\text{samce}}=7$). Zwierzęta pozostawiono w eksperymencie przez kolejnych osiemnaście tygodni, ponieważ w okresie przewidzianym do jego zakończenia, fenotyp zaczął się rozwijać, ujawniając istotne statystycznie różnice. Dokonano dziewiętnastu pomiarów masy ciała zwierząt oraz ilości zjedzonego pokarmu z częstotliwością raz na tydzień. Po eutanazji zwierząt

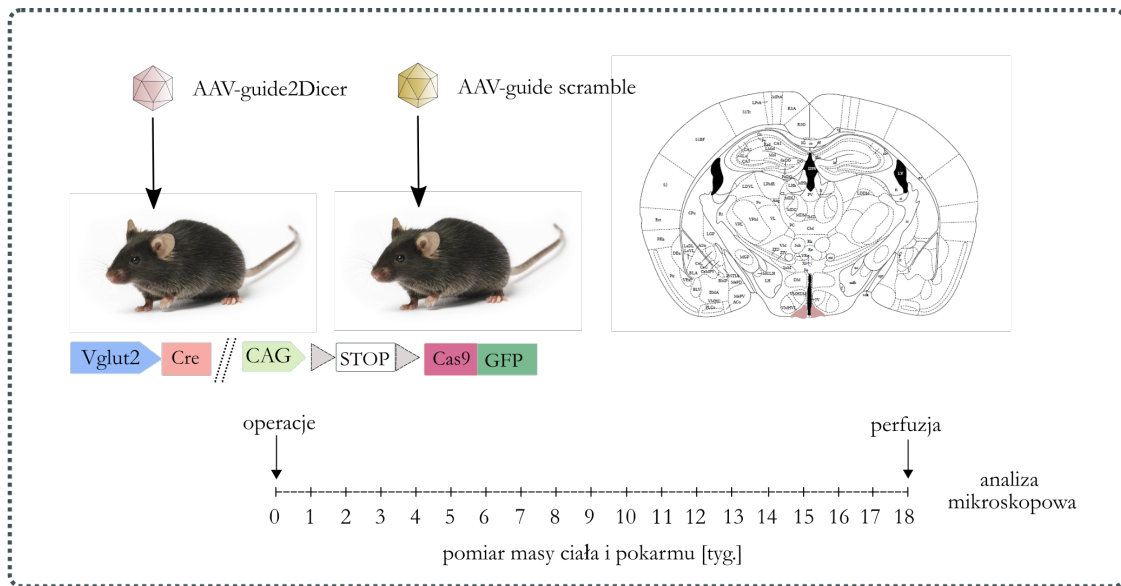
i przeprowadzeniu szeregu barwień immunofluorescencyjnych, dokonano analizy skrawków przy pomocy mikroskopii konfokalnej.

Uśredniona dla grupy (wyrażona w procentach \pm SD) masa ciała, ujawniła rozwijający się powoli umiarkowany fenotyp otyłości u myszy mutantów obu płci (Rycina 4.23, część I- samice, Rycina 4.23, część II- samce). Niemniej, kinetyka przyrostu masy ciała nie naśladowała żadnej wcześniej opisaney linii transgenicznej. W grupie samców dopiero siódmy tydzień po indukcji mutacji przyniósł istotnie statystycznie różnice ($p < 0,01$) w masie ciała między mutantami ($118,4 \pm 6,7$ %), a osobnikami kontrolnymi ($102,0 \pm 4,6$ %). W grupie samic ten efekt opóźniony był o tydzień ($115,4 \pm 4,5$ % vs $105,3 \pm 3,9$ %), ale za to w kolejnych tygodniach w grupie samic odnotowano wyższą znamienność. Warty podkreślenia jest fakt, że procentowe wartości masy ciała w grupie mutantów nawet po uzyskaniu istotnych różnic w porównaniu do kontroli, nadal oscylowały na relatywnie niskim poziomie, który w dziesiątym tygodniu nie przekroczył wartości 127%.

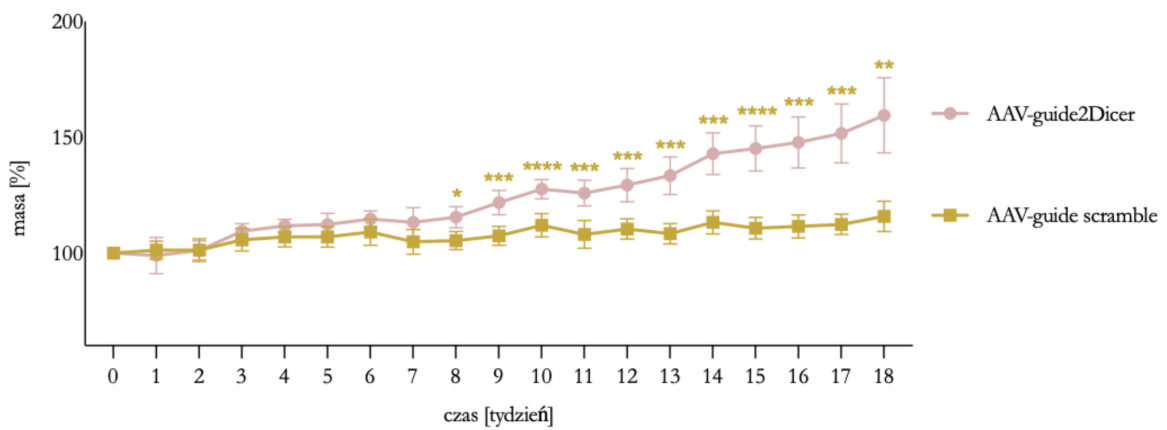
Kolejnym czynnikiem różnicującym, rozwijający się u mutantów *Vglut2creCas9* fenotyp, od tych opisanych wcześniej, jest brak jakichkolwiek różnic w ilości spożytego pokarmu na przestrzeni trwania doświadczenia. Pobór pokarmu przedstawiony na Rycinie 4.23, część I (dla samic) i część II (dla samców) jest obrazem kumulatywnym, czyli uśrednioną dla grupy sumą spożytego pożywienia z każdego poprzedzającego tygodnia, wyrażoną w gramach (\pm SD).

Powyzsze obserwacje implikują, że przyrost masy ciała u mutantów nie był warunkowany zwiększonym apetytem i charakteryzował się odmiennym, od wcześniejszych, tempem wzrostu.

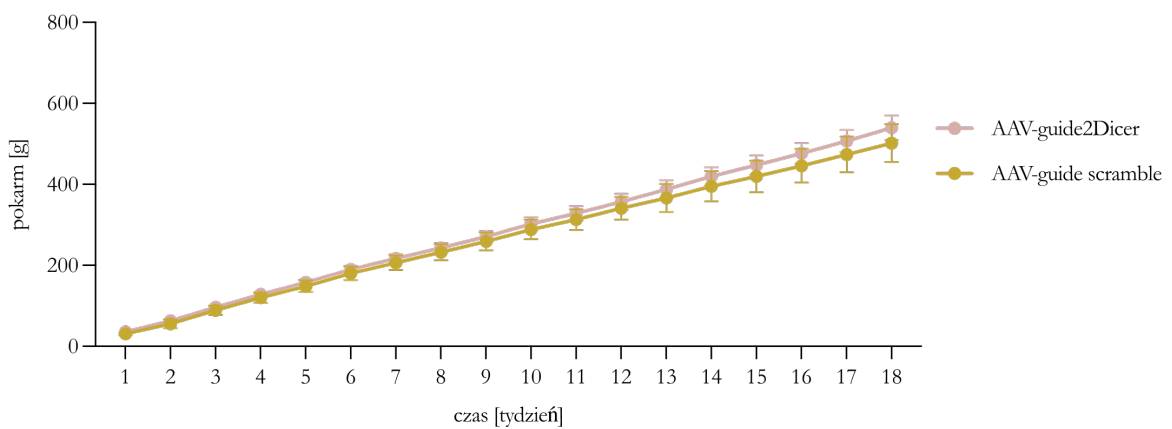
Obraz mikroskopowy (Rycina 4.23, część III) pokazuje porównywalną liczbę komórek Cas9-GFP (kolor zielony) oraz Cre (kolor magenta) w grupie mutantów i kontroli, choć intensywność fluorescencji w grupie mutantów jest nieco niższa. Liczba, komórek z poczwórnym sygnałem (kolor zielony, magenta, czerwony, niebieski) na skrawku „nałożenie” jest porównywalna w obu grupach. Zatem mutacja *Dicer1* w neuronach *Vglut2* nie przekłada się bezpośrednio na ich liczbę, jak miało to miejsce w modeli NPY-GFP/*DicerCKO*.



PRZYROST MASY CIAŁA
samice Vglut2CreCas9

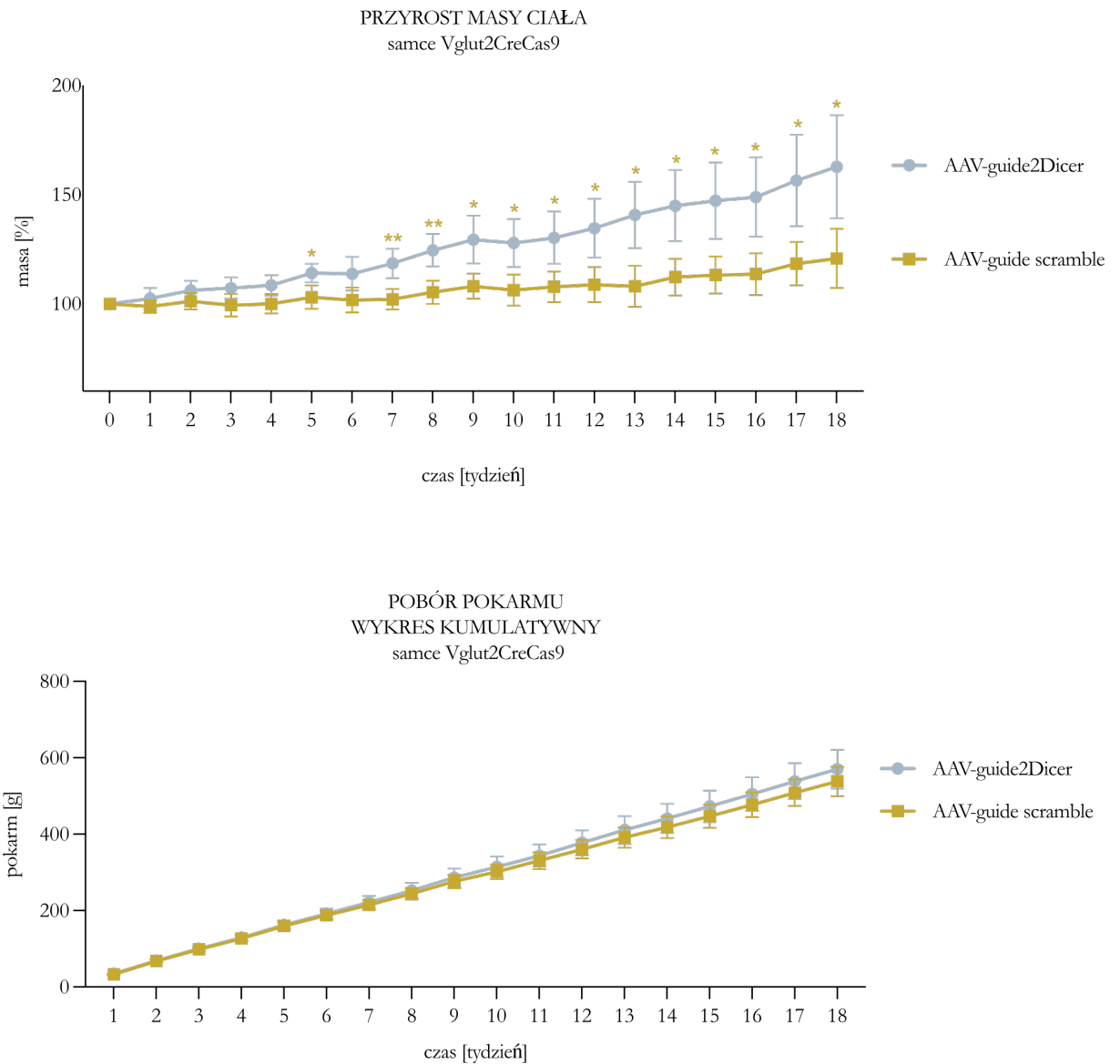


POBÓR POKARMU
WYKRES KUMULATYWNY
samice Vglut2CreCas9

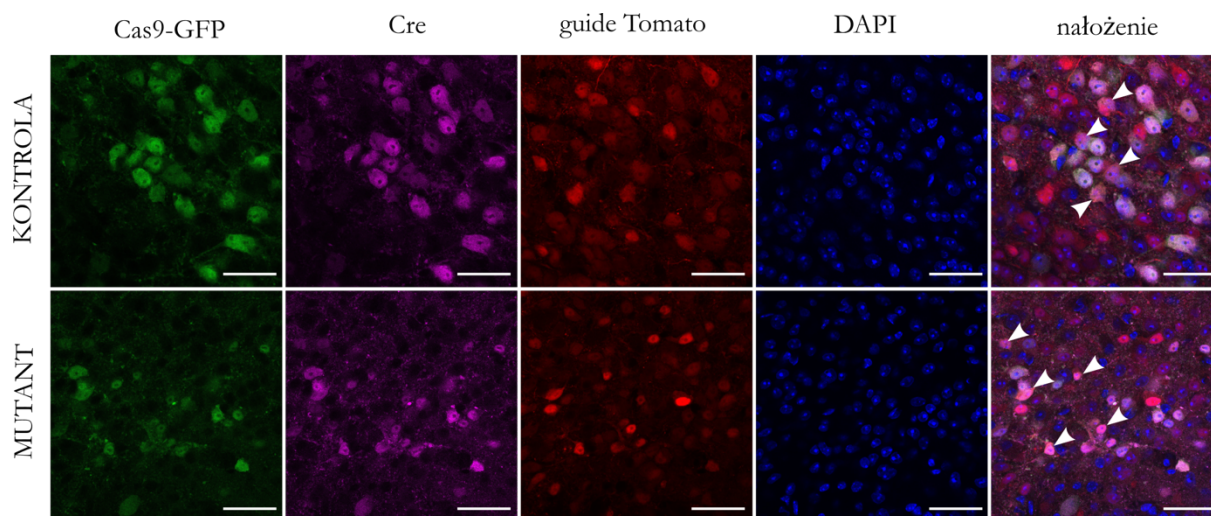


Rycina 4.23, część I (opis na kolejnej stronie)

Rycina 4.23, część I. Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu (wykres kumulatywny z 18 tygodni) u samic linii Vglut2CreCas9, po obustronnej iniekcji wektorów AAV-guide2Dicer ($1 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=8) oraz AAV-guideScramble ($1,11 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=10) do jądra łukowatego; Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD, wyniki poboru przedstawiono na wykresie kumulatywnym, sumującym (uśrednione dla grupy) gramy zjedzonego pokarmu z każdego poprzedzającego tygodnia \pm SD; Analiza statystyczna: dla masy ciała oraz zjedzonego pokarmu- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.



Rycina 4.23, część II. Analiza przyrostu masy ciała oraz ilości zjedzonego pokarmu (wykres kumulatywny z 18 tygodni) u samców linii Vglut2CreCas9, po obustronnej iniekcji wektorów AAV-guide2Dicer ($1 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=7) oraz AAV-guideScramble ($1,11 \cdot 10^{10}$ gc/stronę, N=7) do jądra łukowatego; Wyniki masy ciała przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm SD, wyniki poboru przedstawiono na wykresie kumulatywnym, sumującym (uśrednione dla grupy) gramy zjedzonego pokarmu z każdego poprzedzającego tygodnia \pm SD; Analiza statystyczna: dla masy ciała oraz zjedzonego pokarmu- dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.



Rycina 4.23, część III. Mikroskopowy obraz jądra łukowatego wybranych przedstawicieli linii Vglut2CreCas9 po iniekcji AAV-g2Dicer oraz AAV-guideScramble; wykonano barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciała przeciwko białku GFP (marker Cas9) - kolor zielony, przeciwko Cre- kolor magenta, wyznakowano jądra barwnikiem DAPI- kolor niebieski, sygnał tdTomato nie był wzmocniony barwieniem (marker AAV-guide2Dicer/guide Scramble); skala 25 μm .

4.8.5 Analiza przyrostu masy ciała oraz poboru pokarmu u myszy AgRPCreCas9, po domózgowej iniekcji wektorów AAV-guide2Dicer oraz AAV-guideScramble

Sprawdzenie działania poszczególnych elementów systemu CRISPR-Cas9, zarówno w dysocjowanej hodowli hipokampalnej, jak i na modelu mysim, było wprowadzeniem do doświadczenia z wykorzystaniem bardziej precyzyjnych narzędzi molekularnych. Fundamentem dla tego działania, była obserwacja niepełnej specyficzności w przypadku stosowania wektora AAV-AgRPCre. W założeniu miał on infekować jedynie neurony AgRP w ARC. Natomiast powtarzający się wzór ekspresji rekombinazy Cre poza obszarem ARC, przekierował działania w stronę poszukiwania modelu, który opisywałby udział wyłącznie neuronów AgRP w fenotypie otyłości.

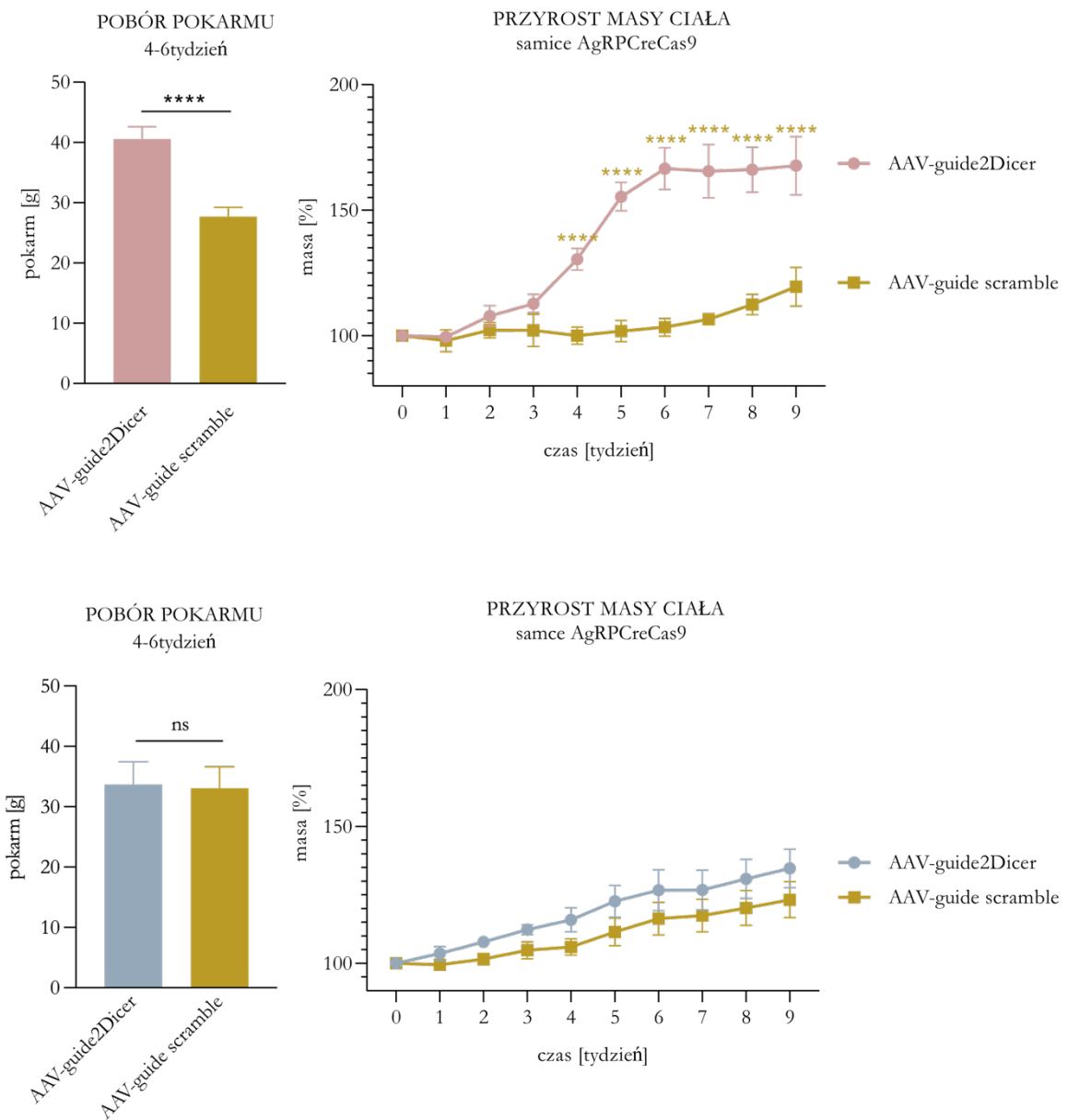
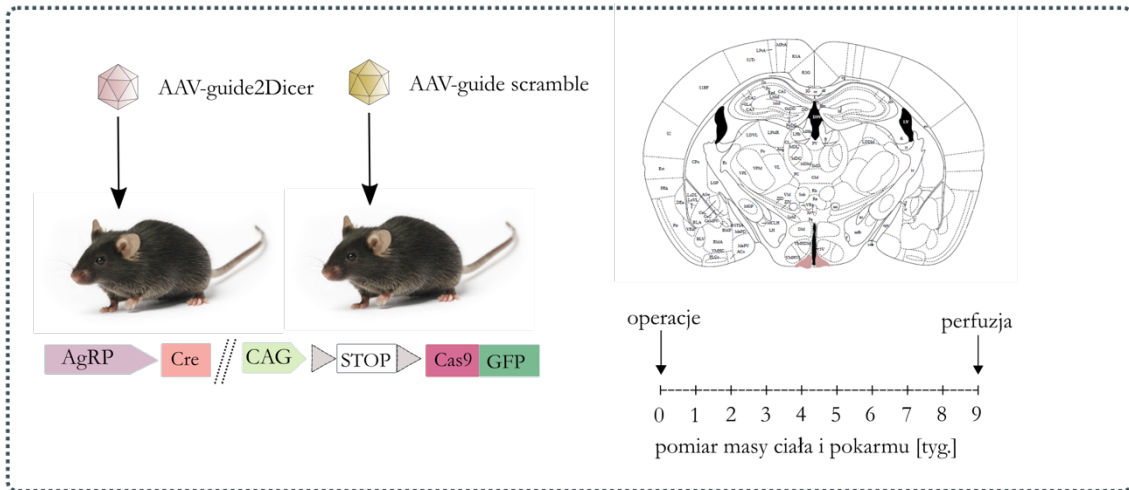
W doświadczeniu użyto myszy AgRPCreCas9, które otrzymano analogicznie do wcześniejszych modeli, z tą różnicą, że stabilna ekspresja Cre w tym przypadku, miała miejsce w neuronach AgRP. Zatem u potomstwa, w obecności Cas9 i po dostarczeniu do obszaru ARC sekwencji guideRNA, wskazującej konkretne miejsce modyfikacji genu *Dicer1*, możliwe było masowe usunięcie miRNA w populacji neuronów AgRP.

Zwierzęta podzielono na 2 grupy. Pierwszą stanowiła grupa badana, poddana iniekcji wektorem AAV-guide2Dicer (1×10^{10} gc/stronę, $N_{\text{samice}}=6$, $N_{\text{samce}}=4$). Grupa druga to myszy kontrolne, które w domózgowej obustronnej iniekcji otrzymały wektor AAV-guideScamble (1×10^{10}

gc/stronę, $N_{\text{samice}}=4$, $N_{\text{samce}}=6$). Analogicznie do wcześniejszych doświadczeń funkcjonalnych, zwierzęta poddane były cotygodniowym pomiarom masy ciała oraz poboru pokarmu. Krzywa przyrostu masy ciała jest wynikiem uśrednionym (wyrażonym w procentach) dla każdej z grup (\pm SD), w kolejnych tygodniach badania. Pobór pokarmu przedstawiono jako uśrednioną (wyrażoną w gramach) dla każdej z grup (\pm SD), wartość zjedzonego pożywienia między czwartym, a szóstym tygodniem trwania eksperymentu.

Większość dotychczasowych doświadczeń przeprowadzana była na grupach zwierząt o mieszanej płci. W przypadku tego doświadczenia założenie było podobne. Niemniej, w trakcie doświadczenia uwidoczniły się tak znaczące różnice w obrębie płci, że zwierzęta podzielono na grupy również pod względem tej cechy (Rycina 4.24, część I). Analizując przyrost masy ciała w grupie myszy badanych (po iniekcji AAV-guide2Dicer), w grupie samic, począwszy od czwartego punktu pomiarowego, odnotowany istotny statystycznie ($p<0,001$) wpływ mutacji na rozwinięcie otyłości. W punkcie szóstym uzyskał wartość szczytową na poziomie $166,5 \pm 8,3$ % początkowej masy ciała, utrzymując poziom plateau do końca trwania doświadczenia. Obserwowany wzrost masy ciała miał bezpośrednie przełożenie na zwiększony pobór pokarmu w tej grupie myszy ($40,5 \pm 2,0$ grama w grupie badanej, $27,6 \pm 1,5$ grama w grupie kontrolnej). Odpowiednio, w grupie badanej u samców nie odnotowano, żadnego istotnego statystycznie wzrostu masy ciała, co było bezpośrednio powiązane z brakiem zwiększonego popytu na jedzenie. Zatem powyższa obserwacja pozwala na sformułowanie dwóch wniosków. Po pierwsze neurony AgRP, które uległy modyfikacji, są zaangażowane w rozwinięcie otyłości związanej ze zwiększonym popytem na jedzenie. Po drugie ten efekt jest silnie związany z płcią, bowiem jedynie samice pozbawione miRNA w neuronach AgRP, rozwijają charakterystyczny fenotyp.

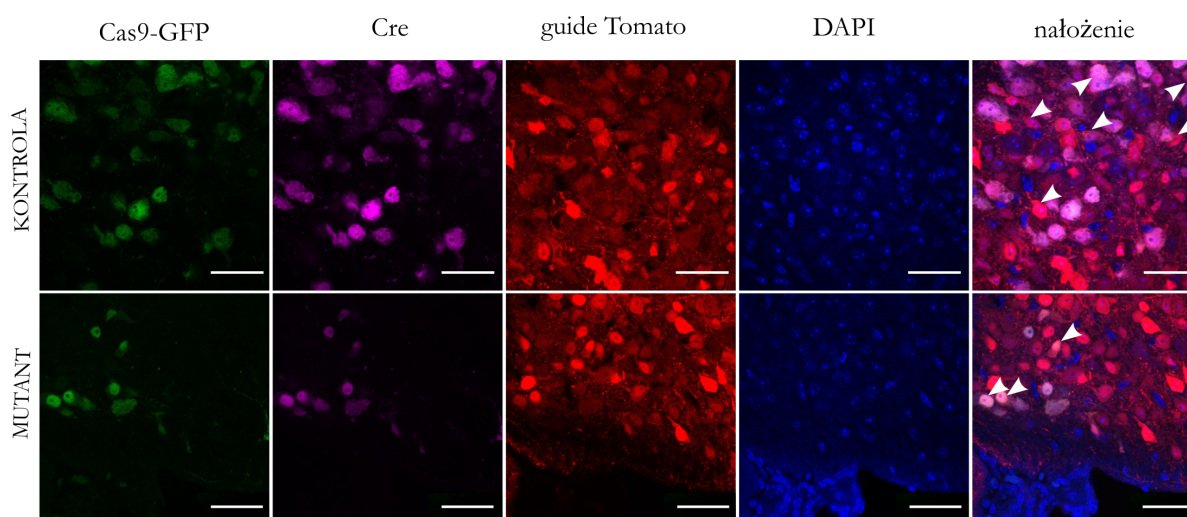
W obrazie spod mikroskopu konfokalnego (Rycina 4.24, część II), widać obniżoną intensywność fluorescencji dla Cas9-GFP (kolor zielony) oraz Cre (kolor magenta) w grupie samic mutantów w porównaniu z samicami kontrolnymi. Choć barwienie DAPI nie ujawniło obecności ciałek apoptotycznych na skrawkach pochodzących od mutantów, to zauważalny jest zredukowany poziom intensywności świecenia DAPI, który udało się zwizualizować, kosztem utrzymania odpowiedniego kontrastu. Ponadto, po nałożeniu na siebie sygnałów fluorescencyjnych, pochodzących ze wszystkich czterech kanałów (zielony-Cas9, magenta-Cre, czerwony-guide2Dicer/guide Scramble, niebieski-DAPI), liczba pozytywnych komórek u mutantów była ponad dwukrotnie niższa, niż na skrawku pochodzącym od kontroli.



Rycina 4.24, część I (opis na kolejnej stronie)

Rycina 4.24, część I. Analiza przyrostu masy ciała (wyrażona w %) oraz ilości zjedzonego pokarmu (jako efekt skumulowany w tygodniu 4,5 i 6 trwania eksperymentu) u myszy linii AgRPCreCas9, po obustronnej iniekcji wektora AAV-guide2Dicer do jądra łukowatego (N samice=6, N samce=4); grupę kontrolną stanowiły myszy AgRPCreCas9 po iniekcji guideSramble (N samice=4, N samce= 6). Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup w kolejnych punktach czasowych \pm odchylenie standardowe; Analiza statystyczna: dla pomiaru masy ciała-dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, z testem post-hoc Sidak'a dla porównań wielokrotnych, dla zjedzonego pokarmu- test t-studenta dla grup niezależnych; gwiazdkami oznaczono poziom istotności **** $p < 0,0001$.

Można zatem wyciągnąć wniosek, że wraz ze zmianami fenotypowymi samic AgRPCreCas9 zachodzą zmiany obserwowane na poziomie komórkowym. Polegają one na znaczącym obniżeniu poziomu intensywności/ekspresji białek fluorescencyjnych oraz funkcjonalnych (takich jak Cre), nie mając jednoznacznego związku ze śmiercią neuronów.



Rycina 4.24, część II. Mikroskopowy obraz jądra łukowatego wybranych przedstawicieli linii AgRPCreCas9 po iniekcji AAV-g2Dicer oraz AAV-guideScramble; wykonano barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciała przeciwko białku GFP (marker Cas9) - kolor zielony, przeciwko Cre- kolor magenta, wyznakowano jądra barwnikiem DAPI- kolor niebieski, sygnał tdTomato nie był wzmocniony barwieniem (marker AAV-guide2Dicer/guide Scramble); skala 25 μ m.

4.8.6 Wzór rekombinacji w mysich liniach GadCreCas9, Vglut2CreCas9 oraz AgRPCreCas9.

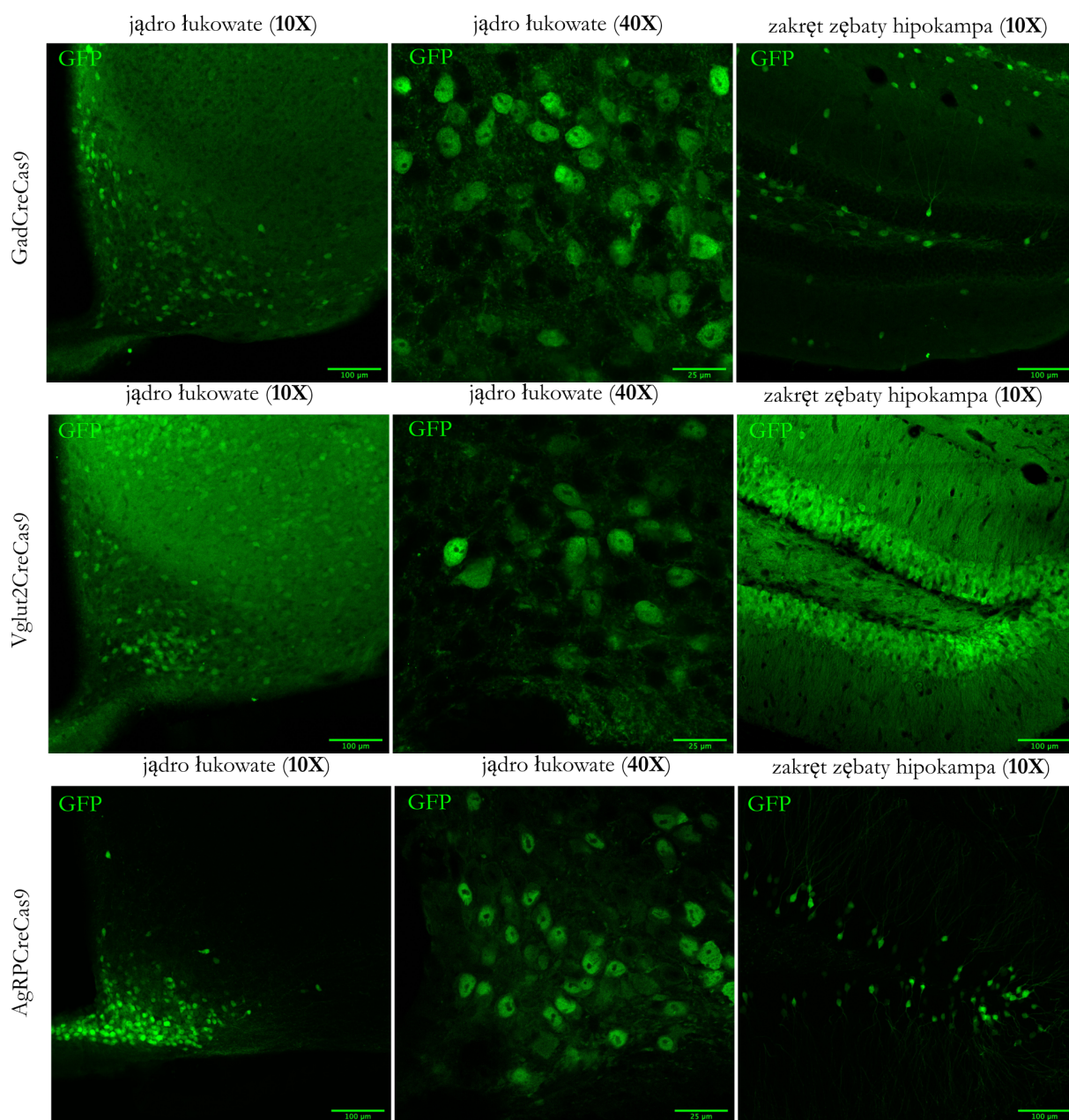
Uzupełnieniem charakterystyki wykorzystanych linii zwierzęcych, będących składową systemu CRISPR/Cas9, było sprawdzenie i porównanie ich poziomu i wzoru rekombinacji. W tym celu wybranych przedstawicieli linii GadCreCas9 (N=4), Vglut2CreCas9 (N=4) oraz AgRPCreCas9 (N=4) poddano perfuzji, a po uprzedniej preparatyce, dokonano barwienia immunofluorescencyjnego z użyciem przeciwciała przeciwko białku GFP, jednocześnie wskazującego na obecność Cas9. Oceny intensywności fluorescencji i tym samym poziomu

rekombinacji dokonano z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, przy wizualizacji jądra łukowatego (obiektyw 10x, 40x) oraz hipokampa (obiektyw 10x).

W każdej z trzech linii transgenicznych rekombinacji ulegają neurony w ARC, z zaznaczeniem wyraźnych różnic we wzorze rekombinacji. Na zdjęciach ARC w powiększeniu dziesięciokrotnym (Rycina 4.25, lewa kolumna) widać wyraźnie, że linia AgRPCreCas9 wykazuje największą liczbę neuronów Cas9-GFP w obrębie ARC. W przypadku dwóch pozostałych linii transgenicznych zarówno intensywność, jak i lokalizacja zrekombinowanych neuronów w ARC są odmienne od linii AgRPCreCas9. W przypadku linii GadCreCas9 dystrybucja wyznakowanych neuronów w ARC jest dość równomierna, a ich największa koncentracja lokalizuje się wysoko, przyśrodkowo, w bezpośredniej bliskości 3V. Z kolei zrekombinowane neurony w linii Vglut2CreCas9 charakteryzuje bardziej boczne usytuowanie w ARC. Wszystkie trzy linie rekombinują w obrębie hipokampa (na Rycinie 4.25, prawa kolumna, powiększenie 10X), z tym, że w linii Vglut2CreCas9 uwidocznione zostały neurony glutaminianergiczne warstwy molekularnej zakrętu zębatego, a w linii GadCreCas9 pojedyncze neurony we wnęce zakrętu zębatego (hilus). Co ciekawe, linia AgRPCreCas9 również rekombinowała w hipokampie, choć ekspresja Cre kierowana jest promotorem AgRP i powinna być ograniczona do obszaru ARC. Ponadto, hipokampalny wzór rekombinacji w tej linii pokrywa się ze wzorem glutaminianergicznych neuronów Vglut2, choć są to neurony o charakterze GABAergicznym. Dodatkowo, liczba wyznakowanych na zielono komórek jest bliższa tej obecnej w hilusie, wśród przedstawicieli linii GadCreCas9.

LINIA TRANSGENICZNA	METODA INDUKCJI	POZIOM APETYTU	PRZYRÓST MASY CIAŁA	CZAS DO OSIĄGNIĘCIA MAX. MASY CIAŁA	EKSPRESJA TRANSGENU
NPY-KO/DicerCKO	Tamkoksyfen I.P.	+	++	8 tygodni	brak danych
(NPY-GFP) DicerCKO	Tamkoksyfen I.P.	++	+	6 tygodni	brak
AgRPCreERT2Dicer	Tamkoksyfen I.P.	-	-	-	obecna
Dicer fl/fl	AAV-AgRPCre	+++	++++	7 tygodni	brak
Cas9	AAV-AgRPCre+ AAV-guide2Dicer	++	+	9 tygodni	brak
GadCreCas9	AAV-guide2Dicer	+	-	-	brak
Vglut2CreCas9	AAV-guide2Dicer	-	+++	18 tygodni	obecna
AgRPCreCas9	AAV-guide2Dicer	+++	++++	6 tygodni	brak

Tabela 4.1 Zestawienie linii transgenicznych wraz z ich fenotypami, apetyt oceniano w skali 3-stopniowej, gdzie + oznacza najniższy wzrost, a +++ najwyższy, wzrost masy ciała oceniono analogicznie, tylko w skali 4-stopniowej, - oznacza brak wzrostu.



Rycina 4.25 Mikroskopowy obraz rekombinacji w linii GadCreCas9, Vglut2CreCas9 oraz AgRPCreCas9; sygnał zielonej fluorescencji (GFP) wyznakowuje neurony, w których uruchomiona została ekspresja Cas9- jest miarą rekombinacji, sygnał wzmocniony barwieniem IF; skala na fotografiach: z obiektywem 10x- 100 μm, z obiektywem 40X- 25 μm.

5. Dyskusja

Podstawowym założeniem niniejszej rozprawy było określenie roli neuronów AgRP/NPY w fenotypie otyłości zależnym od utraty cząsteczek miRNA w mózgu. Podstawowa przesłanka do przyjęcia założenia o zaangażowaniu neuronów AgRP/NPY w miRNA-zależny fenotyp otyłości oparta została o obserwacje wyjściowego modelu. Zakładał on, że utrata miRNA następuje poprzez usunięcie fragmentu genu *Dicer1* w neuronach z aktywnym promotorem dla genu *CaMKII α* , u osobników dorosłych (model indukowalny DicerCKO). Zwierzęta te charakteryzował czasowy przyrost masy ciała i ilości zjedzonego pokarmu, a na poziomie molekularnym podwyższony poziom mRNA oraz białka dla neuropeptydów oreksygeniczych, takich jak AgRP czy NPY (Vinnikov i in. 2014).

Próba odpowiedzi na postawione pytanie badawcze wymagała użycia transgenicznych modeli zwierzęcych oraz narzędzi biologii molekularnej, które pozwoliłyby na selektywną modyfikację tej niewielkiej populacji komórek jądra łukowego, którą stanowią neurony AgRP/NPY. Jeden z pierwszych zastosowanych układów polegał na aktywacji CreERT2 i wycięciu genu *Dicer1* w neuronach AgRP jedynie u osobników dorosłych, po indukcji Tamoksyfenem. Z powodu niewystarczającego poziomu rekombinacji w tej linii niemożliwe było wnioskowanie na temat udziału badanych neuronów w fenotypie otyłości. Stworzony alternatywny model wektora wirusowego AAV, kodujący rekombinazę Cre, regulowaną promotorem AgRP, wprowadzał modyfikację w docelowych neuronach AgRP i prowadził do rozwinięcia fenotypu otyłości powiązanego z hiperfagią. Natomiast działanie tego wektora nie było ograniczone wyłącznie do neuronów AgRP. Ekspresja Cre pochodząca z wektora AAV-AgRPCre obecna była również w ośrodkach podwzgórza sąsiadujących z ARC (takich jak VMH czy DMH). Dopiero poprzez zastosowanie technologii CRISPR/Cas9 możliwe stało się wybiórcze usunięcie cząsteczek miRNA w neuronach AgRP, co zaowocowało masywną otyłością i znaczącym wzrostem apetytu u samic mutantów. Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują na istotne zaangażowanie neuronów AgRP/NPY w rozwój miRNA-zależnej otyłości, związanej z płcią.

5.1 Znaczenie genu NPY w fenotypie otyłości u myszy DicerCKO

Wśród neuropeptydów o działaniu stymulującym pobór pokarmu, AgRP oraz NPY odgrywają kluczową rolę. Wspomniany już, pierwotny model myszy DicerCKO, charakteryzował się nagłym przyrostem masy ciała w około czwartym tygodniu po indukcji

mutacji. Przyrost ten został skorelowany ze zwiększonym zapotrzebowaniem kalorycznym, a na poziomie molekularnym odsłonił pewną prawidłowość. Zwierzęta pozbawione miRNA w neuronach CaMKII α , tuż przed rozwinięciem fenotypu otyłości, mniej więcej trzy tygodnie po indukcji mutacji, wykazywały istotnie podwyższony poziom mRNA oraz białka dla NPY. Jeden z możliwych scenariuszy zakładał udział tego neuropeptydu w kształtowaniu się niepohamowanego apetytu i tym samym w rozwoju fenotypu. Sprawdzenie tego założenia u zwierząt DicerCKO, które jednocześnie pozbawione były obydwóch alleli genu *Npy* (NPY-KO/DicerCKO) pokazało, że gen *Npy* i jego białkowy produkt nie są kluczowe dla rozwinięcia fenotypu otyłości. Zwierzęta te znacząco zwiększyły swoją masę, choć kinetyka tego przyrostu była odmienna od tej charakteryzującej grupę DicerCKO.

W literaturze jednoznacznie opisane są modele zwierzęce zarówno z iniekcją NPY, jak i z nadekspresją jego genu. Zgodnie z oczekiwaniami, i analogicznie do modelu DicerCKO ze zwiększonym poziomem NPY, są to przykłady, w których zwierzęta rozwinęły otyłość i zaburzenia metaboliczne (Kaga i in. 2001; Bi, Kim, i Zheng 2012; Long i in. 2015; Sousa-Ferreira i in. 2011). Z kolei, utrata NPY objawiała się generalnym brakiem zaburzeń w obrębie masy ciała i zachowań żywieniowych u zwierząt karmionych standardową dietą (Jay C. Erickson, Hollopeter, i Palmiter 1996; Sousa-Ferreira i in. 2011). Jednym z możliwych uzasadnień obserwowanego u myszy NPY-KO/DicerCKO zjawiska jest efekt kompensacji, który wykształcił się w trakcie rozwoju zarodkowego, w odpowiedzi na brak istotnego, choć nie krytycznego dla rozwoju, czynnika. Tym samym dotyczy on linii transgenicznych, w których gen *Npy* usuwany czy nieobecny jest już w trakcie embriogenezy, a nie selektywnie u dorosłych osobników w pełni zróżnicowanych komórkach.

Kolejnym ważnym aspektem omawianego zjawiska jest udział leptyny, która uwalniana jest z tkanki tłuszczowej proporcjonalnie do rosnącego poziomu zasobów energetycznych. Leptyna, zwana hormonem sytości, sygnalizuje brak zapotrzebowania energetycznego, działając antagonizująco na system NPY. Receptory dla leptyny obecne są m.in. na neuronach syntetyzujących i wydzielających ten neuropeptyd, a wiązanie się leptyny prowadzi do obniżenia ekspresji *Npy*. Dzieje się to najprawdopodobniej poprzez aktywację kinazy Janus (JAK) i w konsekwencji aktywację czynnika STAT3, którego ufosforylowana forma reguluje ekspresję *Npy* (Mesaros i in. 2008; Ernst i in. 2009; Y. Huang, Lin, i Lin 2021). Ponadto leptyna hamuje wrażliwość neuronów na działanie NPY. Znany model otyłości *ob/ob* (z globalnym brakiem leptyny), charakteryzuje się nadaktywnością systemu NPY (Schwartz i in. 1996). Natomiast doświadczenie przeprowadzone na myszach *ob/ob*, z jednoczesną utratą *Npy*, zaowocowało zmniejszeniem otyłości u zwierząt, dzięki ograniczeniom apetytu i

zwiększonemu wydatkowi energetycznemu (Jay C. Erickson, Hollopeter, i Palmiter 1996). Kluczowe w tym przypadku okazało się obniżenie aktywności systemu NPY poprzez wyłączenie go. W modelu eksperymentalnym NPY-KO/DicerCKO, zwierzęta pozbawione NPY i miRNA m.in. w neuronach jądra łukowatego, których znaczną część stanowią neurony syntetyzujące AgRP oraz NPY, rozwinęły otyłość, mimo wyłączenia ścieżki NPY. Odmienne od zwierząt NPY^{-/-}, które zachowały leptynowrażliwość i reagowały gwałtownym spadkiem masy ciała po iniekcji leptyny (J. C. Erickson, Clegg, i Palmiter 1996b), mutanty NPY-KO/DicerCKO nie reagowały na rosnący poziom leptyny w organizmie (odzwierciedlanego rosnącym poziomem tkanki tłuszczowej). Można zatem przypuszczać, że brak funkcjonalnego systemu NPY u badanych osobników uniemożliwia leptynie działanie w ramach dedykowanej ścieżki. Ponadto utrata miRNA mogła zaburzać alternatywne dla NPY drogi komunikacji leptyny, które to mogłyby wykształcić się jako rozwojowy efekt kompensacyjny. W takim scenariuszu dysfunkcja systemu NPY oraz leptynooporność prowadziłyby właśnie do rosnącej masy ciała.

5.2 Wpływ profilu molekularnego neuronów jądra łukowatego na fenotyp otyłości z uwzględnieniem neuronów AgRP jako wiodących kandydatów

Pomimo, iż utrata miRNA zależnych od enzymu Dicer w neuronach z aktywnym promotorem CaMKII α (DicerCKO) powodowała otyłość, to nie można było na jej podstawie wnioskować na temat zaangażowania konkretnej grupy neuronów. Ekspresję CaMKII α przypisuje się prawie wyłącznie neuronom glutaminianergicznym ze względu na udział CaMKII α w modulowaniu transmisji pobudzającej i zaangażowanie w procesy plastyczne. Opisane zostały jednak wyjątki od tej reguły. W komórkach jądra spoidłowego prążkowiec oraz w mózdkowych neuronach Purkiniego odnotowano wyraźną wspólną ekspresję znaczników GABAergicznym oraz CaMKII α (Benson i in. 1992). Opisane są również przypadki interakcji CaMKII α z podjednostkami receptora GABA_A w neuronach hamujących (Marsden i in. 2010). Wang i in. wykorzystując mysią linię z ekspresją GFP regulowaną promotorem CaMKII α stwierdzili intensywny, rozproszony sygnał GFP w różnych częściach jądra łukowatego, bez korelacji z typem przekaźnictwa (X. Wang i in. 2013). Literatura dostarcza informacji na temat zaangażowania CaMKII α w procesy plastyczności, której modulatorem jest leptyna działająca na podwzgórzowe neurony AgRP jak i POMC (Morishita i in. 1998). Znany jest efekt zależnej od leptyny zmiany liczby synaps jak i aktywności neuronów AgRP oraz POMC (Pinto i in.

2004). Zatem można przyjąć, że wśród zmodyfikowanych w linii DicerCKO neuronów o charakterze glutaminianergicznym znalazły się również neurony GABAergiczne. Badany model wymagał jednak rozwinięcia i uszczegółowienia, polegającego na celowanej modyfikacji genu *Dicer1* w wąskiej grupie wybranych neuronów. Podparciem hipotezy o zaangażowaniu neuronów AgRP w obserwowany fenotyp otyłości, był wspomniany już wzrost apetytu i masy ciała u mutantów DicerCKO. Skoro zwierzęta pozbawione miRNA m.in. w neuronach jądra łukowatego jadły więcej (przy początkowo podwyższonym poziomie neuropeptydów oreksygenicznym) i zwiększały swoją masę, to istnieje duże prawdopodobieństwo, że był to efekt pobudzenia neuronów stymulujących pobór pokarmu. Jak wiadomo z literatury, opto- i chemogenetyczna stymulacja neuronów AgRP powodowała wzrost jedzenia, a wyciszenie ich aktywności przynosiło odwrotny efekt (Aponte, Atasoy, i Sternson 2011; Krashes i in., b.d.).

Należy przy tym pamiętać, że neurony podwzgórza, w tym jądra łukowatego, charakteryzuje niezwykle zróżnicowane komórkowe (Romanov i in. 2017; Campbell i in. 2017). Pośród dobrze scharakteryzowanych GABAergicznych neuronów AgRP oraz glutaminianergicznych neuronów POMC zidentyfikowano kolejne subpopulacje, które wymykają się temu binarnemu podziałowi związanemu z ich przeciwstawnie zdefiniowaną rolą. Przykładem mogą być glutaminianergiczne neurony ARC, z ekspresją receptora oksytocynowego, ale bez ekspresji POMC, których inaktywacja zwiększa pobór pokarmu (Fenselau i in. 2017). Innym przykładem są GABAergiczne neurony ARC z ekspresją Somatostatyny, ale bez ekspresji AgRP, które po stymulacji prowokowały zwiększenie apetytu (Campbell i in. 2017). Z kolei pula GABAergicznych neuronów ARC, bez ekspresji AgRP, ale z obecnością receptorów leptyny bierze czynny udział w regulacji apetytu. Selektywne usunięcie tych receptorów w GABAergicznych neuronach ARC powodowało wzrost apetytu i masy ciała (Vong i in. 2011). Opisano także hamujące neurony GABAergiczne, nie będące ani NPY+, ani POMC+ które biorą udział w regulacji jedzenia u osesków (Kim i in. 2015). W populacji GABAergicznych neuronów ARC znalazły się również takie z ekspresją POMC (Hentges 2004; Hentges i in. 2009; Dicken, Tooker, i Hentges 2012), które utrzymują apetyt na odpowiednim poziomie poprzez działanie na neurony w DMH (Trotta i in. 2020). Co ciekawe, doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach z upośledzoną ekspresją *Pomc*, po jej wybiórczym przywróceniu w neuronach glutaminianergicznych, pokazały, że zapobiega to otyłości (Jones i in. 2019). Te rozbieżności są dodatkowo podkreślone obserwacją, że pewne grupy komórek (np. POMC) charakteryzuje współekspresja znaczników zarówno glutaminianergiczej jak i GABAergicznej transmisji. To z kolei może świadczyć o niezwyklej

rozwojowej plastyczności tych neuronów i ich potencjałe do modulowania typu odpowiedzi w zależności od panujących warunków (Romanov i in. 2017, Campbell i in. 2017, Jones i in. 2019).

Dodatkowy poziom złożoności wynika ze wspólnego filogenetycznego pochodzenia neuronów AgRP oraz POMC. Otóż, około 25% neuronów z ekspresją oreksygenicznego NPY, tożsamego z neuronami AgRP, odróżnicowuje się z progenitorowych neuronów POMC (Padilla, Carmody, i Zeltser 2010). Zaproponowano nawet udział miR-103/107 w regulacji odróżnicowywania progenitorowych neuronów POMC w populację z ekspresją NPY. Zgodnie z tym postulatem brak mir-103/107 w progenitorach POMC miałyby prowadzić do wykształcenia większej liczby odróżnicowanych neuronów z ekspresją NPY (Croizier i in. 2018).

Mnogość i odmienność obserwowanych fenotypów, nawet w obrębie jednego typu komórek, może być bezpośrednio związana z tym, jaki model zwierząt transgenicznych został wykorzystany do badania. Wymownym przykładem jest praca, która opisuje zależność między aktywacją dojrzałych, odróżnicowanych neuronów POMC lub wszystkich wywodzących się z progenitorów POMC, a obserwowanym zachowaniem żywieniowym. Optogenetyczna stymulacja tych pierwszych prowadziła do zahamowania jedzenia, podczas gdy stymulacja neuronów POMC w linii ze stabilną ekspresją Cre w neuronach POMC i Cre-zależną ekspresją kanału światłoczułego (Chr2) prowadziła do wzrostu apetytu poprzez jednoczesną stymulację wykształconych neuronów POMC oraz frakcji komórek AgRP, wywodzącej się z POMC (Wei i in. 2018). To podkreśla zależności między tymi dwoma populacjami komórek o przeciwstawnym działaniu. Unaocznia również konieczność wnikliwej analizy stosowanego modelu i rozważenia niespecyficzných efektów, które mogą być wynikiem nakładających się cech zarówno dojrzałych, jak i będących „ślądem” po rozwoju embrionalnym, komórek.

Przytoczone przykłady zarysowują niezwykle złożony charakter regulacji apetytu i metabolizmu, który wynika bezpośrednio z istnienia i współpracy subtelnych, wąskich populacji neuronalnych jądra łukowatego. Kształtujący się obraz sugeruje, że wzrost apetytu i związany z tym wzrost masy ciała, może być efektem zarówno aktywacji oreksygeniczných grup komórek, jak i inaktywacji tych o przeciwstawnym działaniu. Zachowania żywieniowe są efektem ustalającej się równowagi pomiędzy tymi przeciwstawnymi strategiami. Zaburzenia tej równowagi prowadzą do zachowania, które bądź to promują, bądź przeciwnie - hamują konsumpcję. Różne strategie z kolei wynikają bezpośrednio z profilu molekularnego zaangażowanych w nie grup neuronów. Sumując jednak wyjściowe obserwacje emipryczne

oraz dane literaturowe, wybór neuronów AgRP jako kandydatów kierujących fenotypem miRNA-zależnej otyłości wydawał się właściwy.

5.3 Wpływ czynników metodycznych na skuteczność tworzenia neurospecyficznego modelu

Dążenie do uzyskania specyficznego dla wyselekcjonowanej grupy komórek modelu transgenicznego wymaga uważnej analizy wszystkich wykorzystywanych składowych. Oprócz podstawowych właściwości docelowych komórek (promotor, obecność charakterystycznych receptorów), specyficznie transdukujących je wektorów (tropizm serotypów), znajomości systemu Cre-loxP (indukowalny/nieindukowalny) należy uwzględnić gamę początkowo nieprzewidywanych czynników, które pojawiają się w trakcie trwania doświadczenia i mogą wpływać na ostateczny kształt obserwowanego fenotypu. Należą do nich np. transsynaptyczny ruch nośników wirusowych, mało wydajna rekombinacja linii transgenicznej spowodowana zbyt niskim poziomem rekombinazy bądź ektopowa ekspresja Cre na etapie embrionalnym, poszerzająca pulę komórek ulegających rekombinacji. Sformułowanie, że nie ma idealnego modelu wydaje się truizmem, niemniej każdy model wiąże się pewnymi ograniczeniami. Ich znajomość pozwala szukać możliwie najlepszego wariantu, pozwalającego odpowiedzieć na postawione pytanie badawcze.

5.3.1 Model AgRP-CreERT2

Globalne usunięcie genu *Dicer1* na etapie embriogenezy jest letalne, stąd jedynie rozwiązania wprowadzające indukowalne modyfikacje bądź mutacje ograniczone do wybranej grupy komórek, pozwalają na badanie jego udziału w procesach biologicznych. Modyfikacja genu *Dicer1* w modelu DicerCKO była indukowalna i miała miejsce dopiero po uruchomieniu CreERT2 w odpowiedzi na podanie Tamoksyfenu. To jest równoznaczne z tym, że zmianę wprowadzano u osobników w pełni rozwiniętych. Nie było zatem ryzyka, że rozwijający się fenotyp jest wypadkową efektów kompensacyjnych, mających miejsce w trakcie embriogenezy.

W niniejszej pracy postanowiono uzyskać analogiczny, indukowalny Tamoksyfenem model, w którym usunięcie *Dicer1* i zależnych od niego miRNA nastąpi w zróżnicowanych neuronach AgRP u osobników dorosłych. W literaturze udokumentowano przykład linii AgRPCreERT2, której podstawą była ekspresja CreERT2 kierowana sekwencją regulatorową AgRP, wprowadzoną na sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC, ang. *bacterial artificial*

chromosome) (Q. Wang i in. 2014). Linie stworzono w zespole Jeffrey'a Zigman'a (The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) i charakteryzował ją specyficzny dla neuronów AgRP, ale dość ograniczony, zakres rekombinacji. Dzięki uprzejmości twórców linii AgRPCreERT2, otrzymano tę linię, jednak pochodzącą od innego założyciela, z deklarowanym wyższym poziomem rekombinacji w neuronach AgRP.

Sprawdzenie hipotezy o udziale neuronów AgRP w miRNA-zależnej otyłości, z wykorzystaniem docelowej linii AgRPCreERT2Dicer, wykazało brak istotnych różnic w przyroście masy ciała u obu płci w grupie badanej. Ponadto, zwierzęta z grupy badanej nie jadły istotnie więcej pokarmu niż te z grupy kontrolnej. Co ciekawe, uwidoczniła się różnica w zakresie jedzenia pomiędzy mutantami, a kontrolami w grupie samic, ale obrazowała ona, przeciwnie do oczekiwanego efektu, istotnie mniejszą ilość spożytej karmy w grupie samic mutantów. Bez wyraźnej korelacji zmian apetytu ze zmianami w obrębie masy ciała u tych osobników, ciężko jest uargumentować obserwowany efekt.

Uzasadnieniem do powyższych obserwacji na temat braku rozwijającego się fenotypu otyłości u myszy AgRPCreERT2Dicer, było określenie zakresu rekombinacji w omawianej linii. Badanie osobników AgRPCreERT2Dicer z neuronami NPY dodatkowo wyznakowanymi białkiem zielonej fluorescencji (GFP) oraz Cre-zależną ekspresją białka tdTomato uwidocznilo niski poziom rekombinacji w tej linii. Spośród kilkuset neuronów NPY-GFP widocznych na skrawku, jednoczesną ekspresję białka tdTomato wykazało około dwudziestu komórek po każdej ze stron jądra łukowatego, co stanowi mniej niż 10% neuronów NPY-GFP. Tym samym, najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem braku oczekiwanego fenotypu jest niewystarczająca liczba komórek, które uległy modyfikacji genetycznej pod wpływem zaindukowanej CreERT2. Należy przy tym uwzględnić aspekt, który zarysowuje w swojej pracy Dause i Kirby (Dause i Kirby 2020), weryfikujący, na ile trafnie rekombinacja mierzona poziomem Cre-zależnego białka fluorescencyjnego odwzorowuje poziom zmian, których rekombinaza Cre dokonuje w tej samej komórce, ale w innym Cre-zależnym genie. Przytaczany przykład dotyczy hipokampalnych komórek progenitorowych, w których indukowana ekspresja CreERT2 regulowana była sekwencją promotora dla Nestyny, a porównywano ze sobą poziom ekspresji białek zielonej i czerwonej fluorescencji. Intensywność świecenia obydwóch białek na poziomie jednej komórki była na tyle niejednorodna, że zasugerowano, iż wnioskowanie na temat wydajności rekombinacji dla jednego genu nie przewiduje w jednoznaczny sposób zdarzeń rekombinacji dla innego genu (Dause i Kirby 2020). Sytuacja dodatkowo komplikuje się w przypadku, kiedy produkt tylko jednego z badanych genów posiada reprezentację w postaci świecącego białka. Niemniej, nawet jeśli w linii

AgRPCreERT2Dicer więcej niż 10% AgRP ulegałyby rekombinacji, to wciąż zakres rekombinacji pozostaje niewystarczający do wywołania efektu. Zasadne wydaje się też pytanie o to, czy brak obserwowanego efektu jest wynikiem zbyt małego poziomu aktywnej rekombinazy CreERT2, czy też jej niewydajnym cięciem docelowej nici DNA.

5.3.2 Model z wykorzystaniem wektorów wirusowych AAV

Brak fenotypu otyłości u zwierząt AgRPCreERT2Dicer był bezpośrednią przyczyną poszukiwania alternatywnych rozwiązań, które gwarantowałyby usunięcie genu *Dicer1* w neuronach AgRP. Jedną z najbardziej powszechnych strategii osiągnięcia specyficzności jest stosowanie charakterystycznych dla określonego typu komórek sekwencji promotorowych, kierujących ekspresją transgenu. Zatem poszukiwanie odpowiedzi na pytanie o udział neuronów AgRP w fenotypie miRNA-zależnej otyłości wymagało opracowania wektora z mysią sekwencją promotorową AgRP, warunkującą ekspresję rekombinazy Cre oraz sekwencji reporterowych. Brak w literaturze jednoznacznych i szczegółowych informacji opisujących mysiego promotora AgRP. Kaelin i in. (Kaelin i in. 2004) zidentyfikowali natomiast w jego obrębie 3 regiony o wysokim poziomie konserwacji ewolucyjnej (ang. *conserved region*) między myszą i człowiekiem. Dwa spośród nich to odległe, oddalone o kilkadziesiąt tysięcy par zasad od miejsca startu transkrypcji regiony. Trzeci obszar o wysokim poziomie zakonserwowania złożony jest z kilkuset par zasad i zlokalizowany w okolicy egzonu 1 genu *AgRP*. Zawiera on potencjalne miejsca regulatorowe wiążące czynniki transkrypcyjne oraz sekwencje charakterystyczne dla promotorów, takie jak TATA-box. Mysiego gen *AgRP* składa się z 5 egzonów, z czego dwa pierwsze nie kodują sekwencji białka. Wspólnie z intronem znajdującym się między nimi, egzony te są elementem sekwencji minimalnego promotora zawiadującego transkrypcją genu. Zaprojektowany mysiego promotor AgRP (706 pz) objął swoim zakresem właśnie ten fragment. Selekcja tego fragmentu oparta została, w dużej mierze, na szczegółowo opisanym ludzkim odpowiedniku promotora AgRP (Brown i in. 2001).

Uzyskane w ten sposób wektory plazmidowe, a następnie wirusowe (AAV-AgRPYFP, AAV-AgRPMCherry, AAV-AgRPCre) oceniono początkowo pod kątem specyficzności i poziomu ekspresji. Wzorzec świecenia dla obu wektorów kodujących sekwencje białek fluorescencyjnych był charakterystyczny dla dystrybucji neuronów AgRP w mózgu. Natomiast dopiero mysiego model z neuronami NPY wyznakowanymi białkiem GFP pozwolił na ocenę kolokalizacji z białkiem mCherry kierowanym promotorem AgRP, potwierdzając, że zsyntetyzowany promotor AgRP kieruje ekspresję we właściwych komórkach.

Krytyczne do przeprowadzenia doświadczeń funkcjonalnych, polegających na indukcji fenotypu otyłości, było właściwe działanie wektora kodującego rekombinazę Cre (AAV-AgRPCre), mierzone poziomem i zakresem ekspresji transgenu.

Barwienie immunohistochemiczne wykrywające Cre trzy tygodnie po stereotaktycznej operacji ujawniło, że oprócz wzorca ekspresji charakterystycznego dla neuronów AgRP, Cre obecna była również w komórkach sąsiadującego jądra VMH. Przeprowadzony cykl doświadczeń optymalizujących dawkę podawanego wektora AAV-AgRPCre oraz sposób podania (jednostronny, dwustronny, do trzeciej komory), pokazał, że podania z mniejszą liczbą cząsteczek wektora ograniczało liczbę zainfekowanych neuronów jądra łukowatego, bez jednoczesnego zminimalizowania infekcji komórek w sąsiadujących jądrach podwzgórza. Zatem w tym przypadku nie prowadziło do podniesienia poziomu specyficzności poprzez modulowanie liczby cząsteczek wektora. Efekt ten mógłby się ujawnić przy stosowaniu większych zakresów miana AAV. Choć wektory AAV zaliczane są do bezpiecznych, najmniej immunogennych wektorów wirusowych, to wybrane doniesienia literaturowe pokazują, że zbyt duża liczba cząsteczek wektora może skutkować toksycznością zwłaszcza w odpowiedzi na iniekcje systemowe (Gernoux, Wilson, i Mueller 2017). Jednak przy podaniach domózgowych również odnotowano efekt neurotoksyczny zależny od dawki (Lavin i in. 2020; Khabou i in. 2018). Ponadto, zbyt wysokie miano wektora podawanego domózgowo może także skutkować nabyciem przez niego właściwości transportu antero-, retro- bądź transsynaptycznego, który w warunkach niskiego miana wirusa prawdopodobnie nie zachodzi (Haery i in. 2019).

Kierunek transportu cząsteczek AAV determinowany jest, podobnie jak ich tropizm, serotypem, czyli specyficznym składem białek kapsydu. Różny stosunek molowy białek kapsydu (ang. *viral proteins*) VP1, VP2 oraz VP3 oraz odmienne modyfikacje ich reszt aminokwasowych odpowiadają za to, czy wektor jest preferencyjnie pobierany przez dendryty, czy też wiąże się z receptorami w obrębie aksonów i transportowany jest do ciała komórki, gdzie po degradacji kapsydu, materiał genetyczny przenika do jądra komórkowego. Niektóre neurospecyficzne serotypy AAV są w stanie pokonać barierę synaptyczną infekując nie tylko komórki w miejscu iniekcji, ale również te odległe, będące w bezpośredniej komunikacji z zainfekowanymi neuronami I rzędu (Zingg i in. 2020). W ten właśnie sposób AAV1, który transportowany jest dwukierunkowo, przy wysokich stosowanych mianach oraz dłuższej czasowej ekspozycji, może infekować neurony poza miejscem iniekcji w mechanizmie anterogradowego transsynaptycznego transportu, charakteryzującego zarówno połączenia glutaminianergiczne jak i GABAergiczne (Zingg i in. 2017). Z kolei AAV2, wiążący się z receptorami na błonie dendrytów (Salegio i in. 2013), dopiero po upływie około 2 miesięcy od

iniekcji wykazywał właściwości retrogradowe (Haery i in. 2019). Wykorzystywane w powyższej pracy wektory AAV były równomolową mozaiką serotypu AAV1 oraz AAV2, zatem posiadały właściwości obydwóch tych serotypów.

Zwierzęta typu dzikiego, poddane stereotaktycznej iniekcji AAV-AgRPCre, po jedenastu tygodniach od zabiegu, charakteryzował znaczny wzrost intensywności sygnału jądrowego pochodzącego od Cre, jak i rozległość ekspresji, wykraczająca poza obszar jądra łukowego w porównaniu do zwierząt będących trzy tygodnie po iniekcji. Obserwację tę można uzasadnić m.in. właśnie transportem dwukierunkowym oraz transsynaptycznym, który jest funkcją czasu.

Próba określenia, czy jednostronna iniekcja wektora AAV-AgRPCre do jądra łukowego lub do 3V będzie wystarczająca do wywołania efektu biologicznego, wymagała użycia zwierząt *Dicer fl/fl* w celu monitorowania przyrostu masy ich ciała. W krótkim czasie od indukcji mutacji uwidocznił się efekt zwiększonej masy ciała, proporcjonalny do liczby zrekombinowanych komórek. Był on większy u zwierząt, których mutacja obejmowała obydwie strony jądra łukowego, niż u osobników po jednostronnej iniekcji. Iniekcja do 3V objawiała się infekcją tanycytów, które są osobliwymi komórkami wyściółki pochodzenia glejowego i dzięki swoim właściwościom zaangażowane się w kontrolę funkcji metabolicznych (Bolborea i Langlet 2021; Prevot i in. 2018). Ten typ iniekcji wykluczał selektywne w neuronach AgRP usunięcie genu *Dicer1* oraz nie skutkowało otyłością badanych zwierząt.

Sumując obserwacje z doświadczeń przygotowujących zestaw narzędzi do przeprowadzenia badań funkcjonalnych, można stwierdzić, że wszystkie przygotowane wektory AAV z promotorem AgRP wykazywały ekspresję transgenów w neuronach AgRP. Efekt ten był proporcjonalny do podawanej liczby cząsteczek wektora po każdej ze stron jądra łukowego w funkcji czasu. Pozostawał jeszcze aspekt obecności Cre w sąsiednich do ARC jądrach podwzgórza.

Badanie efektu biologicznego w neuronach AgRP u myszy *Dicer fl/fl* po iniekcji AAV-AgRPCre odsłoniło skalę zjawiska, wyrażającą się znaczącym przyrostem masy ciała. Pierwszą jego zapowiedzią była opisana wyżej próba oceny skuteczności iniekcji unilateralnych i bilateralnych u tych zwierząt. Zaledwie cztery tygodnie po obustronnej iniekcji AAV-AgRPCre do jądra łukowego, obserwowany był wzrost masy ciała. Rozwinięciem tej obserwacji było doświadczenie, w którym zwierzęta *Dicer fl/fl* po indukcji mutacji, obserwowane były przez kolejnych dziewięć tygodni. Analogicznie do pierwotnej obserwacji, wyraźne różnice w masie ciała między grupą mutantów i myszy kontrolnych ujawniły się już w czwartym tygodniu. Stale

rosnący trend zaowocował masywną otyłością w grupie mutantów utrzymującą się do ostatniego, dziewiątego tygodnia badania.

W literaturze obecne są doniesienia, które opisują efekty „zależne od dawki”, zarówno w kontekście wspomnianej wyżej liczby stosowanych cząsteczek wektora AAV i nabycia przez nie np. właściwości do transportu w alternatywnym niż dedykowany kierunku (Haery i in. 2019), albo ich toksycznego działania (Lavin i in. 2020; Khabou i in. 2018). Efekt zależny od dawki może być też związany z penetracją zmiany, wyrażającą się liczbą zmodyfikowanych alleli czy komórek, a także zmienną dynamiką w czasie, jak zostało to opisane na przykładzie zmutowanego białka TDP-43 w procesie degeneracji motoneuronów (Ebstein, Yagudayeva, i Shneider 2019). Aponte i in. (Aponte i in. 2011) pokazali również, że liczba stymulowanych optogenetycznie neuronów AgRP ma bezpośrednie przełożenie na ilość zjedzonego w trakcie stymulacji pokarmu.

Obserwacje w modelu myszy Dicer fl/fl po infekcji różnymi mianami wektora AAV-AgRPCre dobrze obrazują opisane zjawisko. Istotnie, dla trzech zakresów zastosowanych mian wektora AAV-AgRPCre zaobserwowano efekt zależny od dawki. Osobniki zainfekowane największą liczbą cząsteczek wektora rozwinęły najwyższy poziom otyłości, zależnej od ilości zjedzonego pokarmu w okresie rozwijającej się hiperfagii (między czwartym, a szóstym tygodniem). Natomiast zwierzęta traktowane wektorem w kolejnych rozcieńczeniach zjadły odpowiednio mniej pokarmu, a skala ich otyłości była proporcjonalnie mniejsza. Ta ilościowa korelacja może zatem nakreślać obraz, w którym większa liczba wprowadzanych cząsteczek AAV-AgRPCre infekuje więcej neuronów AgRP. To z kolei przekłada się na większą liczbę neuronów pozbawionych funkcjonalnego białka Dicer, co na poziomie fenotypowym prowadzi do wzrostu apetytu i większego przyrostu masy ciała. Próba zobrazowania tego zjawiska na poziomie mikroskopowym zakończyła się jednak niepowodzeniem, wskazując kolejne pytania. Żadna z badanych grup nie wykazywała bowiem ekspresji Cre w jądrze łukowatym po dziewięciu tygodniach trwania doświadczenia. O ile brak Cre w grupie myszy z najniższym mianem wektora jest uzasadniony, to w przypadku zwierząt z rozwiniętym fenotypem otyłości rodzi to rozważanie na temat losów zmodyfikowanych neuronów AgRP (opis w podrozdziale 5.5).

Do neuronów AgRP docierają projekcje z innych jąder podwzgórza, takich jak VMH, DMH, LH czy PVN, będących ośrodkami II rzędu w modulowaniu zachowań żywieniowych. Neurony AgRP komunikują się zwrotnie z ośrodkami II rzędu, z największym zagęszczeniem swoich projekcji w obrębie PVN, LH oraz VMH (Wang i in. 2015, Betley i in. 2013). Ekspresja Cre w większości przeprowadzonych doświadczeń z udziałem AAV-AgRPCre obecna była

właśnie w sąsiadującym z ARC jądrze VMH. Oprócz rozwijającego się w czasie trwania doświadczenia dwukierunkowego oraz transsynaptycznego transportu wektorów, który tłumaczyłby obecność transgenu w innych niż ARC jądrach podwzgórza, równoległy scenariusz zakładał udział neuronów zlokalizowanych w VMH w rozwoju fenotypu otyłości. Brak zmian fenotypowych przy próbie modyfikacji, za pomocą AAV-AgRPCre, neuronów VMH, będących w przeważającej części neuronami glutaminianergicznymi, wskazał na nieistotną rolę tego ośrodka w rozwoju miRNA-zależnej otyłości. Niemniej jednak, obserwowany brak selektywnej, ograniczonej wyłącznie do neuronów AgRP specyficzności, sprowokował poszukiwanie doskonalszego modelu.

5.3.3 Model CRIPR/Cas9

Kontynuacja badań nad udziałem neuronów AgRP w rozwoju miRNA-zależnej otyłości odbywała się w oparciu o kombinację narzędzi CRISPR/Cas9, systemu Cre-loxP oraz wektorów AAV. Osiągnięcie ostatecznego modelu transgenicznego wymagało przejścia przez etapy pośrednie, sprawdzające funkcjonalność poszczególnych elementów złożonego układu. Wstępna weryfikacja *in vitro*, na hodowli hipokampalnej z Cre-zależną ekspresją białka fuzyjnego Cas9-GFP, pozwoliła na wyselekcjonowanie jednego z dwóch wiodących RNA (guide2Dicer), jako skutecznie (prawie dwukrotnie) wyciszającego ekspresję genu *Dicer1*. Zarówno rekombinaza Cre, jak i oba warianty gRNA, rozpoznające gen *Dicer1* w różnych miejscach, dostarczone zostały na nośnikach AAV. Analogiczny układ eksperymentalny zastosowano *in vivo*, w zwierzętach Cas9-GFP. Obserwowany efekt potwierdzał skuteczność tylko jednego z wiodących RNA (guide2Dicer), która manifestowała się rozwinięciem fenotypu otyłości, z początkowym wzrostem masy ciała w czwartym tygodniu po indukcji mutacji, i osiągnięciem wartości maksymalnych w dziewiątym tygodniu badania. Powyższe obserwacje sankcjonowały wykorzystanie cząsteczki guide2Dicer, w połączeniu z ekspresją Cre oraz Cre-zależnej Cas9, do selektywnej modyfikacji wybranych populacji komórek.

Opisana (w podrozdziale 1.2) molekularna złożoność komórek jądra łukowatego pokazuje, że podział na oreksygeniczne neurony AgRP o charakterze GABAergicznym oraz anoreksygeniczne neurony POMC charakteryzujące się transmisją glutaminianergiczną jest niezbędnym, ale sporym uproszczeniem. Chcąc uwzględnić szerszą perspektywę w badaniu miRNA-zależnej otyłości, w której zawiera się bogata reprezentacja neuronów pobudzających i hamujących jądra łukowatego, wykorzystano modele myszy transgenicznych ze stabilną ekspresją Cre w neuronach GABAergicznych (GadCre) bądź glutaminianergicznych

(Vglut2Cre). Usunięcie genu *Dicer1* w obszarze ARC, w obu tych liniach miało na celu sprawdzenie, który typ transmisji jest decydujący dla rozwoju otyłości oraz czy kinetyka zmian masy ciała nawiązuje do dotychczas badanych modeli.

Pierwszą badaną grupą były zwierzęta ze stabilną ekspresją Cre oraz Cre-zależną Cas9 w neuronach z aktywnym promotorem dekarboksylazy kwasu glutaminowego (*Gad2*), będącego znacznikiem neuronów GABAergicznym. Po iniekcji AAV-guide2Dicer do jądra łukowego zwierząt *GadCreCas9*, delecja *Dicer1* miała mieć miejsce jedynie w tej grupie komórek. Obniżenie poziomu miRNA w ARC myszy *GadCreCas9* nie przyniosło znaczącego wzrostu masy ciała, a jedynie pewną delikatnie zarysowaną tendencję. Była ona natomiast podparta istotnie zwiększoną ilością zjedzonego pokarmu w grupie mutantów w okresie między czwartym, a szóstym tygodniem badania. Jednym z możliwych uzasadnień jest to, że pozbawione miRNA oreksygeniczne neurony hamujące ARC uległy aktywacji prowadząc do stymulacji jedzenia w początkowych tygodniach badania, dopóki ich działanie nie osłabło bądź nie zostało zrównoważone działaniem kompetencyjnych anoreksygenicznym neuronów GABAergicznym, dzięki czemu nie rozwinęła się masywna otyłość u tych zwierząt. Obraz mikroskopowy mózgow badanych myszy odsłonił charakterystykę, która obserwowana była we wcześniejszym modelach z utratą *Dicer1*. W grupie mutantów intensywność fluorescencji w zrekombinowanych komórkach, której miarą był m.in. poziom świecenia Cas9-GFP oraz Cre, była niższa niż w grupie kontrolnej (rozwińcie w podrozdziale 5.5). Należy przy tym dodać, że generalny poziom ekspresji Cas9-GFP był niższy w ARC osobników *GadCreCas9* niż w innych liniach transgenicznym, co może poddawać w wątpliwość czy rekombinacja zaszła wydajnie we wszystkich neuronach GABAergicznym ARC, obejmując kluczowe neurony AgRP. Około pięciokrotnie mniejsza liczba uwidocznionych komórek *Gad2+* z nakładającym się sygnałem Cas9, Cre, guideRNA (wyznakowanego tdTomato) oraz DAPI w grupie mutantów, implikuje, że może być to efekt zajścia wydajnej rekombinacji w komórkach, które w następstwie nieokreślonego procesu, obniżają poziom ekspresji białek, w tym fluorescencyjnym. Nie jest to jednak równoznaczne ze wspomnianą wydajną rekombinacją neuronów AgRP.

Z kolei usunięcie miRNA w linii *Vglut2CreCas9* ujawniło rozwijający się fenotyp otyłości, który jednak diametralnie różnił się swoim przebiegiem od dotychczas obserwowanych modeli. Fenotyp ten podobny dla obu badanych płci. Ze względu na odmienną kinetykę wzrostu masy ciała w stosunku do dotychczas badanych modeli, obserwacja myszy *Vglut2CreCas9* po indukcji mutacji trwała osiemnaście tygodni. Pierwsze istotne statystycznie różnice w przyroście masy ciała pojawiły się bowiem w siódmym (dla samców) i ósmym (dla

samic) tygodniu doświadczenia, czyli w okresie, w którym w innych modelach z utratą miRNA fenotyp otyłości był już w pełni rozwinięty. Krzywa przyrostu masy przypominała kinetykę rozwoju otyłości u myszy z delecją indywidualnego miRNA w neuronach POMC w systemie CRISPR, w linii POMCCreCas9 po domózgowych iniekcjach AAV-gRNA-miRNA (współpraca z I. Vinnikov, dane niepublikowane). Szczególnie istotną i odmienną cechą analizowanego fenotypu myszy Vglut2CreCas9 był fakt, że przyrost masy ciała nie był powiązany ze zwiększonym apetytem na żadnym etapie badania. Zatem u podstaw obserwowanego przyrostu masy ciała leżał mechanizm inny niż bezpośredni związek zwiększonego apetytu z przyrostem masy ciała. Wskazuje to również na udział innych grup neuronów niż te regulujące miRNA-zależną otyłość w poprzednich badanych modelach, w których zawsze wzrost masy ciała poprzedzony był wzrostem apetytu. Dotyczy to zarówno myszy DicerCKO po indukcji mutacji Tamoksyfenem, myszy Dicer fl/fl po iniekcji do jądra łukowatego AAV-AgRPCre, zwierząt Cas9-GFP po iniekcji domózgowej mieszanki AAV-AgRPCre/guide2Dicer, jak i linii GadCreCas9 po iniekcji AAV-guide2Dicer, która uwidoczniła jedynie tendencję wzrostową masy ciała, niemniej poprzedzoną zwiększoną konsumpcją w grupie mutantów. W obrazie mikroskopowym natomiast, choć komórki w grupie mutantów wydawały się mniejsze, to liczba tych ze współekspresją sygnału pochodzącego z Cas9, Cre, guideRNA oraz DAPI nie różniła się znacząco między grupą badaną, a kontrolną. Utrata miRNA w neuronach Vglut2+ nie prowadziła do wyciszenia ekspresji białek do poziomu, kiedy stają się niewykrywalne, tak jak zaobserwowano to w poprzednich doświadczeniach. Zatem modyfikacja *Dicer1* w tych neuronach prawdopodobnie reguluje zachowania żywieniowe i metabolizm na drodze innego mechanizmu, niż ta sama modyfikacja celowana w określone populacje neuronów GABAergicznym.

Zarówno w przypadku linii GadCreCas9, jak i Vglut2CreCas9 trzeba uwzględnić, że obserwowany fenotyp może być efektem niespecyficznego działania Cre i Cas9 w neuronach innych niż zlokalizowane w jądrze łukowatym. Zarówno komórki GABAergiczne, jak i glutaminianergiczne mają silną, wyraźną i uzupełniającą się reprezentację w całym mózgu, w tym w sąsiednich do ARC jądrach podwzgórza. Zatem nie można wykluczyć, że w obu przypadkach pewna frakcja sąsiadujących komórek jądra łukowatego uległa modyfikacji wpływając na ostateczny kształt obserwowanego fenotypu. Jest to tym bardziej prawdopodobne po uwzględnieniu możliwości dwukierunkowego i transsynaptycznego transportu wektorów AAV, jak miało to miejsce w przypadku myszy Dicer fl/fl i wektora AAV-AgRPCre.

Badanie roli poszczególnych populacji neuronalnych wymaga wysoce specyficznego działania. Technologia CRISPR/Cas9 może je zapewnić o ile modyfikowane z jej udziałem linie transgeniczne wykazują właściwy profil rekombinacji. Badanie wzorca rekombinacji można monitorować poprzez skojarzenie linii ze stabilną ekspresją Cre z taką, która wykazuje Cre-zależną ekspresję białka, najczęściej fluorescencyjnego. W wykorzystanych w niniejszej pracy liniach transgenicznych (GadCreCas9, Vglut2CreCas9, AgRPCreCas9) aktywność Cre oraz zależna od niej ekspresja Cas9 wyznakowane były białkiem zielonej fluorescencji, które syntetyzowane jest jako białko fuzyjne Cas9-GFP. W każdej z trzech linii stwierdzono rekombinację, która ma miejsce w neuronach ARC. Niemniej, jej wzór okazał się odmienny dla każdej z nich. Jest to kluczowa obserwacja, zwłaszcza dla porównania linii GadCreCas9 z linią AgRPCreCas9, świadcząca o tym, że obserwowane fenotypy wynikają z modyfikacji nakładających się, ale nieidentycznych grup komórek. Ponadto rekombinacja w ARC zwierząt AgRPCreCas9 charakteryzuje się najwyższym poziomem intensywności świecenia, wskazując na potencjalnie najwydajniejszy mechanizm modyfikacji. Niespodziewanym obrazem w linii AgRPCreCas9 była częściowa rekombinacja w hipokampie, choć ekspresja Cre kierowana jest promotorem AgRP i powinna być ograniczona do obszaru ARC. Przy wykorzystaniu nieindukowalnego systemu Cre-loxP w linii zarodkowej może wystąpić nieoczekiwana, przejściowa ekspresja rekombinazy Cre, determinowana aktywnością określonego promotora, który ją uruchamia (np. AgRP). Tym samym, uruchomiona zostanie ekspresja Cas9-GFP, pozostawiając ślad w postaci wzoru świecących komórek, który niejednokrotnie może odbiegać od wzorca aktywności danego promotora u dorosłych zwierząt (Song i Palmiter 2018). Obserwowany w linii AgRPCreCas9 efekt w hipokampie pozostaje jednak bez wpływu na specyficzność modyfikacji, ponieważ AAV-guide2Dicer wprowadzany był jedynie do jądra łukowatego.

Końcowe doświadczenie przeprowadzono na linii AgRPCreCas9, w której usunięcie miRNA osiągnięto poprzez stereotaktyczne iniekcje AAV-guide2Dicer do jądra łukowatego. W tym modelu ekspresja Cre i Cas9 warunkowana była aktywnością promotora AgRP pochodzącego od transgenicznego zwierzęcia. Zatem modyfikacja była ograniczona wybiórczo do neuronów AgRP w ARC, nawet jeśli wprowadzane wektory wirusowe miałyby przemieszczać się z upływem czasu do ośrodków II rzędu, w których nie zachodzi aktywna ekspresja Cas9 i Cre. W trakcie tego doświadczenia zaobserwowano masywny rozwój otyłości powiązany ze wzrostem apetytu jedynie w grupie samic z neurospecyficzną utratą genu *Dicer1*. Największy przyrost masy ciała w tej grupie miał miejsce bardzo wcześnie - między trzecim, a piątym tygodniem po indukcji mutacji. Kolejne tygodnie przyniosły ustabilizowanie się

otyłości na bardzo wysokim poziomie i osiągnięcie plateau utrzymującego się do końca badania. Okres gwałtownego wzrostu masy ciała korelował z intensywnym wzrostem apetytu. Z kolei brak różnic w ilości zjedzonego pokarmu w grupie samców odzwierciedlony został nieistotnym wzrostem masy ciała w grupie mutantów tej płci. Podsumowując obserwowany efekt, można wyciągnąć dwa wnioski. Po pierwsze, że to neurony AgRP w odpowiedzi na utratę miRNA, zaangażowane są w rozwinięcie otyłości związanej ze zwiększonym popytem na jedzenie. Po drugie, że ten efekt jest silnie związany z płcią, bowiem jedynie samice pozbawione miRNA w neuronach AgRP, rozwijają charakterystyczny fenotyp. Ta obserwacja jest potwierdzeniem i rozwinięciem różnic płciowych, które obserwowane były (na mniejszą skalę) u osobników DicerCKO (Vinnikov i in. 2014).

5.4 Wpływ płci zwierząt na obserwowany fenotyp otyłości

Kolejny istotny wątek niniejszych badań dotyczy obserwowanej różnicy między samicami i samcami w rozwoju otyłości spowodowanej hiperfagią. U podłoża tego zjawiska najprawdopodobniej leżą odmienne dla płci wzory ekspresji miriad różnych białek. Jednym z najbardziej oczywistych przykładów są białka zaangażowane w regulację hormonalną. Estrogeny regulują kluczowe aspekty metabolizmu, do których zalicza się masa ciała, wydatek energetyczny, wrażliwość na insulinę czy leptynę, wykazując zasadniczo efekt anorektyczny. Jednak wewnątrzkomórkowe receptory dla estrogenów ER α (ang. *estrogen receptor*) w podwzgórzu najliczniej występują w VMH, a te występujące w ARC zlokalizowano przede wszystkim na neuronach POMC (Kelly i Rønnekleiv 2015). Analiza różnic płciowych w poziomie ekspresji ER w ARC potwierdza istniejący dymorfizm (Cao i Patisaul 2011). Olofsson i in. pokazali, że poziom ekspresji *Npy* oraz *AgRP* (ale nie *Pomc*) i powiązany z tym apetyt ma zmienny profil w trakcie cyklu menstruacyjnego u samic oraz że estrogen moduluje ekspresję tych genów. Wykazali również, że zwierzęta z degeneracją neuronów AgRP nie odpowiadają na redukujące apetyt działanie estrogenu jedząc więcej niż myszy kontrolne (Olofsson, Pierce, i Xu 2009). Zatem, wpływ estrogenu na neurony AgRP jest najprawdopodobniej pośredni i ma miejsce w mechanizmie presynaptycznym pochodzącym od innych komórek z ekspresją ER, albo odbywa się poprzez alternatywne receptory zlokalizowane na neuronach AgRP (Stincic, Rønnekleiv, i Kelly 2018; Marraudino i in. 2021). Możliwe jest, że ubytek miRNA w neuronach AgRP prowadzi do zmiany odpowiedzi na sygnały anoreksygeniczne (takie jak estrogen czy leptyna), warunkowane płcią. Nie można wykluczyć, że dzieje się to w odpowiedzi na wyciszenie aktywności neuronów AgRP np. w obliczu

starzenia się komórkowego („senescence”) i towarzyszącej mu autofagii (rozwińcie w podrozdziale 5.5).

Model z delecją *Dicer1* zakłada masową utratę tych miRNA, które ulegają obróbce przez ten enzym. Dotyczy to prawie wszystkich cząsteczek miRNA. Brak doniesień jakoby miR-451, niezależny od białka Dicer, regulował procesy sytości i apetytu. Należy przy tym uwzględnić, że wyciszenie genu *Dicer1* może być niecałkowite, albo wykazywać międzykomórkowe różnice wśród zmodyfikowanych neuronów, co wynika ze stochastycznego charakteru mutacji za sprawą CRISPR/Cas9. Ponadto, proponowane są mechanizmy międzykomórkowej komunikacji szczelinowej, dzięki którym miRNA mogłyby się przemieszczać lokalnie do sąsiadujących komórek. Dodatkowo, miRNA zamknięte w pęcherzykach lipidowych pokonywałyby także duże odległości (Saliminejad i in. 2019; Mussbacher i in. 2021; O'Brien i in. 2020; Y. Park 2017). Zatem może istnieć pewna frakcja miRNA, które nie uległy wyciszeniu lub dostarczane są do komórek z delecją *Dicer1* z innych, nawet odległych komórek zachowujących ekspresję *Dicer1*.

Choć brak doniesień na temat potencjalnych różnic międzypłciowych w procesie dojrzewania miRNA, to profilowanie miRNA m.in. w mózgu odsłoniło różnice płciowe w ekspresji miRNA (Cui i in. 2018; Pak i in. 2013), również tych miRNA, które związane są z rozwojem otyłości (Mentzel i in. 2015). Ponadto, zidentyfikowano 162 miRNA z istotnie różną ekspresją w podwzgórzu u samic i samców, spośród których aż 92 były regulowane przez estrogen (Morgan i Bale 2017). Można sobie wyobrazić, że postulowana zaburzona u samic odpowiedź neuronów AgRP na estrogen wynika nie tylko z braku miRNA kontrolujących hormono-zależne ścieżki sygnałowe, ale też braku miRNA efektorowych, podlegających kontroli hormonalnej. Hormony regulują poziom wybranych miRNA, a te ostatnie kontrolują translację białek zaangażowanych w regulację hormonalną. Wyłaniający się obraz zależności nie podsumowuje prawdopodobnie wszystkich aspektów obserwowanego zjawiska, a jedynie nakreśla wąski wycinek możliwych powiązań.

5.5 Zjawisko zaniku ekspresji (transkrypcji/translacji) w neuronach pozbawionych genu *Dicer1*

Porównanie wzoru ekspresji Cre między osobnikami *Dicer* fl/fl, a myszami typu dzikiego C57Bl/6 po upływie trzech oraz jedenastu tygodni od indukcji mutacji pokazało, że efekt utraty ekspresji Cre jest charakterystyczny dla mutantów pozbawionych miRNA w neuronach jądra łukowatego. Jednak do oceny poziomu ilościowych zmian w obrębie

neuronów AgRP wykorzystano model myszy transgenicznych z ekspresją GFP zależną od aktywności promotora NPY. Współekspresja białka AgRP oraz NPY w obszarze jądra łukowatego pokrywa się w około 95%. Zatem wykorzystanie tej linii daje możliwość miarodajnego wskazania zmieniającej się w czasie liczby neuronów AgRP, pozbawionych miRNA. Linie NPY-GFP skojarzono z indukowalnym modelem Dicer CKO. Zastosowanie modelu z Tamoksyfenem pozwoliło uniknąć sytuacji, w której można byłoby dokonać błędnej korelacji w szacowaniu ilości neuronów GFP+, podyktowanej nieidentyczną ilością stosowanego wektora wirusowego. Efekt tego badania potwierdził, że wraz ze wzrostem masy ciała u mutantów sygnał zielonej fluorescencji zanika. Ma to przełożenie na wartości liczbowe. Liczba neuronów GFP+ dla każdego z trzech obszarów jądra łukowatego, charakteryzującego się odmienną wyjściową liczbą neuronów AgRP, była około dwukrotnie mniejsza niż na skrawkach mózgowi myszy kontrolnych. Co ciekawe, w obrazie DAPI, który uwidacznia zmiany w obszarze jądra komórkowego, które mogłyby świadczyć o zachodzącym procesie apoptotycznym, brak jest różnic między grupą mutantów, a zwierzętami kontrolnymi. Zatem obniżona czy zanikająca intensywność immunofluorescencji neuronów NPY-GFP nie jest równoznaczna z aktywnym procesem apoptozy. Ten wynik jest tożsamy z obserwacją Vinnikov'a i in. (2014), który wykonując test specyficznym znakującym ciała apoptotyczne (TUNEL) w linii DicerCKO po indukcji mutacji, nie obserwował śmierci komórek w obszarze jądra łukowatego. Choć zwierzęta z usuniętym genem *Dicer1* w wybranych neuronach jądra łukowatego traktowano jako narzędzie do uzyskania modelu degeneracji, której towarzyszył rozwój otyłości (Greenman i in. 2013), to ablacja neuronów AgRP/NPY u zwierząt dorosłych ujawniła jednokierunkowość zmian prowadzącą do wygłodzenia, wyniszczenia i śmierci zwierząt w obliczu braku tych kluczowych komórek (Gropp i in. 2005; Luquet i in. 2005). W opisywanym w niniejszej pracy modelu mutanty z usuniętym genem *Dicer1* w neuronach AgRP oraz obniżonym poziomem ekspresji Cre czy GFP wykazują efekt zwiększonej masy ciała. Uzasadnienie tego zjawiska może polegać z jednej strony na zachowaniu przez neurony AgRP, przynajmniej w pewnym zmodyfikowanym zakresie, funkcji oreksygenicznej i katabolicznej. Może też być tłumaczone przemodelowaniem sieci neuronalnej regulującej apetyt i metabolizm wobec intensywnych zmian plastycznych, w odpowiedzi na zmieniające się wraz ze zmianami statusu energetycznego i rozwijającym się fenotypem otyłości, poziomy neuromodulatorów takich jak grelina czy leptyna. Oba hormony wykazują udokumentowane działanie modulujące odpowiedź neuronów AgRP, aktywnie uczestnicząc w procesach plastycznych (Serrenho, Santos, i Carvalho 2019; Baver i in. 2014; Varela i Horvath 2012). Warte uwagi są niepublikowane dane elektrofizjologiczne (współpraca z A. Beroun), które

pokazały, że neurony AgRP w okresie czterech tygodni po indukcji mutacji *Dicer1*, zachowały cechy komórek pobudliwych.

Powtarzający się wzorzec obniżenia ekspresji białek w pozbawionych miRNA neuronach jądra łukowatego (z wyjątkiem linii *Vglut2CreCas9*) pozostaje niezbadany. Barwienie DAPI na skrawkach mózgów mutantów nie uwidacznia oczywistych, charakteryzujących śmierć komórkową, znamion w postaci ciałek apoptotycznych. Mówi o tym, że w momencie analizy immunohistochemicznej nie odnotowano aktywnych zmian apoptotycznych. Proponowanym, możliwym uzasadnieniem zjawiska „gasnącej” ekspresji białek fluorescencyjnych (GFP, tdTomato), jak i funkcjonalnych (Cre, NPY, AgRP) jest mechanizm alternatywny do apoptozy. Usunięcie miRNA w komórce oznacza masowe odblokowanie translacji, bowiem cząsteczki te odgrywają kluczową rolę w jej hamowaniu wiążąc się z docelowymi niemi mRNA. Równolegle, na poziomie fenotypowym, wraz ze wzrostem apetytu, zwierzę dostarcza większą ilość składników odżywczych, które są budulcem do syntezy makromolekuł takich jak białka czy lipidy. Zatem można założyć, że z jednej strony następuje odhamowanie translacji (za sprawą ubytku miRNA), z drugiej zaś jest znacznie zwiększona podaż składników do syntezy makromolekuł. Obie sytuacje mogą prowadzić do namiaru białek w komórce. Kluczowe do rozważenia scenariusze powinny uwzględniać to, jak komórka radzi sobie z nadmiarem białek. Jedną z możliwych strategii jest autofagia, czyli odpowiedź komórki na stres i forma ochrony przed degradacją z nim związaną. Rozregulowanie procesu autofagii - aktywację lub nefizjologiczne zahamowanie w zależności od typu komórek, przypisano również zaburzeniom masy ciała (Y. Zhang, Sowers, i Ren 2018; Namkoong i in., b.d.; Hotamisligil 2010; H.-Y. Liu i in. 2009; Ebato i in. 2008). Co ciekawe, Meng i in. (Q. Meng i Cai 2011) postulują, że otyłość wywołana dietą wysoko-tłuszczową przyczyniła się do obniżenia poziomu autofagii w (niezdefiniowanych) komórkach jądra łukowatego, przyczyniając się do rozwinięcia otyłości, powiązanego ze zwiększonym apetytem. Zdecydowana większość opracowań opisuje autofagię komórek w odpowiedzi na stres związany z deficytem składników odżywczych (L. He i in. 2018). Jednak masowa nadprodukcja białek również może być dla komórki sygnałem stresowym, który przekierowuje ją na aktywność związaną z recyklingiem nadmiarowych substancji w celu utrzymania proteostazy (Bustamante i in. 2014). Zjawiskiem powiązanim z autofagią jest pojęcie starzenia się komórki, zwanego „sensescence” (Carroll i Korolchuk 2018). Jest to stan w którym komórka zatrzymuje funkcje związane z podziałami czy wzrostem, zachowując jednocześnie pewną niezbędną funkcjonalność. Udokumentowano, że komórki będące w stanie takiego „wyciszenia” charakteryzuje obecność autofagosomów i lizosomów, ponadto charakteryzuje je

wzmożona aktywność białka mTOR (Narita i in. 2011; Young i in. 2009). Podsumowując, w jednym z możliwych scenariuszy, neurony pozbawione miRNA przeżywają, uzyskując status komórek starzejących się, czego znakiem może być obecność autofagii.

6. Podsumowanie i Wnioski

1. W przypadku zastosowania systemu CRISPR/Cas9 uzyskano najbardziej selektywny model utraty genu *Dicer1*.
2. Stwierdzono zjawisko wyciszenia ekspresji (transkrypcji/translacji) genów w neuronach po usunięciu genu *Dicer1*.
3. Usunięcie genu *Dicer1* w neuronach AgRP skutkujące utratą miRNA prowadzi do otyłości.
4. miRNA w neuronach AgRP pełnią kluczową rolę w kontroli zachowań żywieniowych myszy.
5. Otyłość związana z hiperfagią jest zależna od liczby zmodyfikowanych neuronów AgRP oraz od płci zwierząt.
6. Produkt genu *Npy* nie jest kluczowy dla rozwoju otyłości związanej z utratą miRNA.
7. Uwidoczniono odmienną rolę neuronów GABAergicznym i glutaminianergicznym w kontroli spożywania pokarmu w kontekście kinetyki rozwoju miRNA zależnej otyłości.

7. Bibliografia

- 1) Abdallah, Khaled, Francis Nadeau, Francis Bergeron, Sylvie Blouin, Véronique Blais, Kelly M. Bradbury, Christine L. Lavoie, Jean-Luc Parent, i Louis Gendron. 2018. „Adeno-Associated Virus 2/9 Delivery of Cre Recombinase in Mouse Primary Afferents”. *Scientific Reports* 8 (1): 7321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25626-y>.
- 2) Ahmad, Sheikh Firdous, Kanika Mahajan, Tania Gupta, Maliha Gulzar, i Vandana Yadav. 2018. „Transgenesis in Animals: Principles and Applications – A Review”. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (10): 3068–77. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.358>.
- 3) Ahmed, Bushra Y, Sridhara Chakravarthy, Ruben Eggers, Wim TJMC Hermens, Jing Ying Zhang, Simone P Niclou, Christiaan Levelt, i in. 2004. „Efficient Delivery of Cre-Recombinase to Neurons in Vivo and Stable Transduction of Neurons Using Adeno-Associated and Lentiviral Vectors”. *BMC Neuroscience*, 11.
- 4) Alhadeff, Amber L., Nitsan Goldstein, Onyoo Park, Michelle L. Klima, Alexandra Vargas, i J. Nicholas Betley. 2019. „Natural and Drug Rewards Engage Distinct Pathways That Converge on Coordinated Hypothalamic and Reward Circuits”. *Neuron* 103 (5): 891-908.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.050>.
- 5) Alhadeff, Amber L., Zhenwei Su, Elen Hernandez, Michelle L. Klima, Sophie Z. Phillips, Ruby A. Holland, Caiying Guo, Adam W. Hantman, Bart C. De Jonghe, i J. Nicholas Betley. 2018. „A Neural Circuit for the Suppression of Pain by a Competing Need State”. *Cell* 173 (1): 140-152.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.057>.
- 6) Almeida, Maria I., Rui M. Reis, i George A. Calin. 2011. „MicroRNA History: Discovery, Recent Applications, and next Frontiers”. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 717 (1–2): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>.
- 7) Anand, B. K., i J. R. Brobeck. 1951. „Localization of a «Feeding Center» in the Hypothalamus of the Rat”. *Experimental Biology and Medicine* 77 (2): 323–25. <https://doi.org/10.3181/00379727-77-18766>.
- 8) Andermann, Mark L., i Bradford B. Lowell. 2017. „Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control”. *Neuron* 95 (4): 757–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.014>.
- 9) Anorexia Nervosa Genetics Initiative, Eating Disorders Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Hunna J. Watson, Zeynep Yilmaz, Laura M. Thornton, Christopher Hübel, Jonathan R. I. Coleman, i in. 2019. „Genome-Wide Association Study Identifies Eight Risk Loci and Implicates Metabo-Psychiatric Origins for Anorexia Nervosa”. *Nature Genetics* 51 (8): 1207–14. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0439-2>.
- 10) Aponte, Yexica, Deniz Atasoy, i Scott M Sternson. 2011. „AGRP Neurons Are Sufficient to Orchestrate Feeding Behavior Rapidly and without Training”. *Nature Neuroscience* 14 (3): 351–55. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>.

- 11) Arakil, Kimi, Masatake Araki, i Ken-ichi Yamamura. b.d. „Targeted Integration of DNA Using Mutant Fox Sites in Embryonic Stem Cells”, 5.
- 12) Aravin, Alexei A., Mariana Lagos-Quintana, Abdullah Yalcin, Mihaela Zavolan, Debora Marks, Ben Snyder, Terry Gaasterland, Jutta Meyer, i Thomas Tuschl. 2003. „The Small RNA Profile during Drosophila Melanogaster Development”. *Developmental Cell* 5 (2): 337–50. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00228-4).
- 13) Armbruster, B. N., X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze, i B. L. Roth. 2007. „Evolving the Lock to Fit the Key to Create a Family of G Protein-Coupled Receptors Potently Activated by an Inert Ligand”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (12): 5163–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700293104>.
- 14) Atasoy, D., Y. Aponte, H. H. Su, i S. M. Sternson. 2008. „A FLEX Switch Targets Channelrhodopsin-2 to Multiple Cell Types for Imaging and Long-Range Circuit Mapping”. *Journal of Neuroscience* 28 (28): 7025–30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1954-08.2008>.
- 15) Atasoy, Deniz, J. Nicholas Betley, Helen H. Su, i Scott M. Sternson. 2012. „Deconstruction of a Neural Circuit for Hunger”. *Nature* 488 (7410): 172–77. <https://doi.org/10.1038/nature11270>.
- 16) Bäck, Susanne, Julie Necarsulmer, Leslie R. Whitaker, Lamarque M. Coke, Pyry Koivula, Emily J. Heathward, Lowella V. Fortunato, i in. 2019. „Neuron-Specific Genome Modification in the Adult Rat Brain Using CRISPR-Cas9 Transgenic Rats”. *Neuron* 102 (1): 105-119.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.035>.
- 17) Bai, Ling, Sheyda Mesgarzadeh, Karthik S. Ramesh, Erica L. Huey, Yin Liu, Lindsay A. Gray, Tara J. Aitken, i in. 2019. „Genetic Identification of Vagal Sensory Neurons That Control Feeding”. *Cell* 179 (5): 1129-1143.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.031>.
- 18) Balthasar, Nina, Roberto Coppari, Julie McMinn, Shun M Liu, Charlotte E Lee, Vinsee Tang, Christopher D Kenny, i in. 2004. „Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis”. *Neuron* 42 (6): 983–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.004>.
- 19) Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, i Philippe Horvath. 2007. „CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes”. *Science* 315 (5819): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- 20) Baver, S. B., K. Hope, S. Guyot, C. Bjorbaek, C. Kaczorowski, i K. M. S. O’Connell. 2014. „Leptin Modulates the Intrinsic Excitability of AgRP/NPY Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus”. *Journal of Neuroscience* 34 (16): 5486–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4861-12.2014>.
- 21) Beier, K. T., A. Saunders, I. A. Oldenburg, K. Miyamichi, N. Akhtar, L. Luo, S. P. J. Whelan, B. Sabatini, i C. L. Cepko. 2011. „Anterograde or Retrograde Transsynaptic Labeling of CNS Neurons with Vesicular Stomatitis Virus Vectors”. *Proceedings of the*

- 22) Beier, Kevin T. 2019. „Hitchhiking on the Neuronal Highway: Mechanisms of Transsynaptic Specificity”. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 99 (wrzesień): 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.05.001>.
- 23) Bernardis, Lee L., i Larry L. Bellinger. 1996. „The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Ingestive Behavior”. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 20 (2): 189–287. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00015-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00015-1).
- 24) Bernardis', Lee L, i Larry L Bellinger. b.d. „The Dorsomedial Hypothalamic Nucleus Revisited: 1986 Update”, 61.
- 25) Bernstein, Emily, Amy A. Caudy, Scott M. Hammond, i Gregory J. Hannon. 2001. „Role for a Bidentate Ribonuclease in the Initiation Step of RNA Interference”. *Nature* 409 (6818): 363–66. <https://doi.org/10.1038/35053110>.
- 26) Bernstein, Emily, Sang Yong Kim, Michelle A Carmell, Elizabeth P Murchison, Heather Alcorn, Mamie Z Li, Alea A Mills, Stephen J Elledge, Kathryn V Anderson, i Gregory J Hannon. 2003. „Dicer Is Essential for Mouse Development”. *Nature Genetics* 35 (3): 215–17. <https://doi.org/10.1038/ng1253>.
- 27) Berrios, Janet, Chia Li, Joseph C. Madara, Alastair S. Garfield, Jennifer S. Steger, Michael J. Krashes, i Bradford B. Lowell. 2021. „Food Cue Regulation of AGRP Hunger Neurons Guides Learning”. *Nature* 595 (7869): 695–700. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03729-3>.
- 28) Bertolini, A. b.d. „ACTH-(1-24) and c -MSH Antagonize Feeding Behavior Stimulated by Kappa Opiate Agonists”, 6.
- 29) Betley, J. Nicholas, Shengjin Xu, Zhen Fang Huang Cao, Rong Gong, Christopher J. Magnus, Yang Yu, i Scott M. Sternson. 2015. „Neurons for Hunger and Thirst Transmit a Negative-Valence Teaching Signal”. *Nature* 521 (7551): 180–85. <https://doi.org/10.1038/nature14416>.
- 30) Betley, J. Nicholas, Zhen Fang Huang Cao, Kimberly D. Ritola, i Scott M. Sternson. 2013. „Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior”. *Cell* 155 (6): 1337–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>.
- 31) Beutler, Lisa R., Yiming Chen, Jamie S. Ahn, Yen-Chu Lin, Rachel A. Essner, i Zachary A. Knight. 2017. „Dynamics of Gut-Brain Communication Underlying Hunger”. *Neuron* 96 (2): 461-475.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.043>.
- 32) Bewick, Gavin A., James V. Gardiner, Waljit S. Dhillon, Aysha S. Kent, Nicholas E. White, Zoe Webster, Mohammad A. Ghatei, i Stephen R. Bloom. 2005. „Postembryonic Ablation of AgRP Neurons in Mice Leads to a Lean, Hypophagic Phenotype”. *The FASEB Journal* 19 (12): 1680–82. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3434fje>.

- 33) Bi, Sheng, Yonwook J. Kim, i Fenping Zheng. 2012. „Dorsomedial Hypothalamic NPY and Energy Balance Control”. *Neuropeptides* 46 (6): 309–14. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002>.
- 34) Biglari, Nasim, Isabella Gaziano, Jonas Schumacher, Jan Radermacher, Lars Paeger, Paul Klemm, Weiyi Chen, i in. 2021. „Functionally Distinct POMC-Expressing Neuron Subpopulations in Hypothalamus Revealed by Intersectional Targeting”. *Nature Neuroscience* 24 (7): 913–29. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00854-0>.
- 35) Billington, C. J., J. E. Briggs, M. Grace, i A. S. Levine. 1991. „Effects of Intracerebroventricular Injection of Neuropeptide Y on Energy Metabolism”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 260 (2): R321–27. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.2.R321>.
- 36) Blasiak, Anna, Andrew L. Gundlach, Grzegorz Hess, i Marian H. Lewandowski. 2017. „Interactions of Circadian Rhythmicity, Stress and Orexigenic Neuropeptide Systems: Implications for Food Intake Control”. *Frontiers in Neuroscience* 11 (marzec). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00127>.
- 37) Boddu, Prajwal C., Abhishek K. Gupta, Jung-Sik Kim, Karla M. Neugebauer, Todd Waldman, i Manoj M. Pillai. 2021. „Generation of Scalable Cancer Models by Combining AAV-Intron-Trap, CRISPR/Cas9, and Inducible Cre-Recombinase”. *Communications Biology* 4 (1): 1184. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02690-1>.
- 38) Bolborea, Matei, i Fanny Langlet. 2021. „What Is the Physiological Role of Hypothalamic Tanycytes in Metabolism?” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 320 (6): R994–1003. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00296.2020>.
- 39) Bolotin, Alexander, Benoit Quinquis, Alexei Sorokin, i S. Dusko Ehrlich. 2005. „Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin”. *Microbiology* 151 (8): 2551–61. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- 40) Bouabe, Hicham, i Klaus Okkenhaug. 2013. „Gene Targeting in Mice: A Review”. W *Virus-Host Interactions*, zredagowane przez Susanne M. Bailer i Diana Lieber, 1064:315–36. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6_23.
- 41) Boyden, Edward S. 2011. „A History of Optogenetics: The Development of Tools for Controlling Brain Circuits with Light”. *F1000 Biology Reports* 3 (maj). <https://doi.org/10.3410/B3-11>.
- 42) Boyden, Edward S, Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, i Karl Deisseroth. 2005. „Millisecond-Timescale, Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity”. *Nature Neuroscience* 8 (9): 1263–68. <https://doi.org/10.1038/nn1525>.
- 43) Brobeck, John R. 1946. „MECHANISM OF THE DEVELOPMENT OF OBESITY IN ANIMALS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS”. *Physiological Reviews* 26 (4): 541–59. <https://doi.org/10.1152/physrev.1946.26.4.541>.

- 44) Brocard, J., X. Warot, O. Wendling, N. Messaddeq, J.-L. Vonesch, P. Chambon, i D. Metzger. 1997. „Spatio-Temporally Controlled Site-Specific Somatic Mutagenesis in the Mouse”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (26): 14559–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14559>.
- 45) Brown, Angela M. 2001. „The gene structure and minimal promoter of the human agouti-related protein.” *Gene* 277 (październik): 231–38. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00705-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00705-3).
- 46) Burnett, C. Joseph, Chia Li, Emily Webber, Eva Tsaousidou, Stephen Y. Xue, Jens C. Brüning, i Michael J. Krashes. 2016. „Hunger-Driven Motivational State Competition”. *Neuron* 92 (1): 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.032>.
- 47) Bustamante, Carlos J., Christian M. Kaiser, Rodrigo A. Maillard, Daniel H. Goldman, i Christian A.M. Wilson. 2014. „Mechanisms of Cellular Proteostasis: Insights from Single-Molecule Approaches”. *Annual Review of Biophysics* 43 (1): 119–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022811>.
- 48) Butler, A.A, i R.D Cone. 2002. „The Melanocortin Receptors: Lessons from Knockout Models”. *Neuropeptides* 36 (2–3): 77–84. <https://doi.org/10.1054/npep.2002.0890>.
- 49) Cai, X. 2004. „Human MicroRNAs Are Processed from Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function as MRNAs”. *RNA* 10 (12): 1957–66. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>.
- 50) Campbell, John N, Evan Z Macosko, Henning Fenselau, Tune H Pers, Anna Lyubetskaya, Danielle Tenen, Melissa Goldman, i in. 2017. „A Molecular Census of Arcuate Hypothalamus and Median Eminence Cell Types”. *Nature Neuroscience* 20 (3): 484–96. <https://doi.org/10.1038/nn.4495>.
- 51) Cao, Jinyan, i Heather B. Patisaul. 2011. „Sexually Dimorphic Expression of Hypothalamic Estrogen Receptors α and β and Kiss1 in Neonatal Male and Female Rats”. *The Journal of Comparative Neurology* 519 (15): 2954–77. <https://doi.org/10.1002/cne.22648>.
- 52) Caron, Alexandre, Heather M Dungan Lemko, Carlos M Castorena, Teppei Fujikawa, Syann Lee, Caleb C Lord, Newaz Ahmed, i in. 2018. „POMC Neurons Expressing Leptin Receptors Coordinate Metabolic Responses to Fasting via Suppression of Leptin Levels”. *ELife* 7 (marzec): e33710. <https://doi.org/10.7554/eLife.33710>.
- 53) Carroll, Bernadette, i Viktor I. Korolchuk. 2018. „Nutrient Sensing, Growth and Senescence”. *The FEBS Journal* 285 (11): 1948–58. <https://doi.org/10.1111/febs.14400>.
- 54) Carullo, Nancy V. N., Jenna E. Hinds, Jasmin S. Revanna, Jennifer J. Tuscher, Allison J. Bauman, i Jeremy J. Day. 2021. „A Cre-Dependent CRISPR/DCas9 System for Gene Expression Regulation in Neurons”. *ENEURO* 8 (4): ENEURO.0188-21.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0188-21.2021>.

- 55) Cassidy, Suzanne B., Stuart Schwartz, Jennifer L. Miller, i Daniel J. Driscoll. 2012. „Prader-Willi Syndrome”. *Genetics in Medicine* 14 (1): 10–26. <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822bead0>.
- 56) Castle, Michael J., Zachary T. Gershenson, April R. Giles, Erika L.F. Holzbaaur, i John H. Wolfe. 2014. „Adeno-Associated Virus Serotypes 1, 8, and 9 Share Conserved Mechanisms for Anterograde and Retrograde Axonal Transport”. *Human Gene Therapy* 25 (8): 705–20. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.189>.
- 57) Castle, Michael J, Eran Perlson, Erika LF Holzbaaur, i John H Wolfe. 2014. „Long-Distance Axonal Transport of AAV9 Is Driven by Dynein and Kinesin-2 and Is Trafficked in a Highly Motile Rab7-Positive Compartment”. *Molecular Therapy* 22 (3): 554–66. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.237>.
- 58) Cedernaes, Jonathan, Wenyu Huang, Kathryn Moynihan Ramsey, Nathan Waldeck, Lei Cheng, Biliana Marcheva, Chiaki Omura, i in. 2020. „Transcriptional Basis for Rhythmic Control of Hunger and Metabolism within the AgRP Neuron”, 34.
- 59) Chen, Renchao, Xiaoji Wu, Lan Jiang, i Yi Zhang. 2017. „Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity”. *Cell Reports* 18 (13): 3227–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.004>.
- 60) Chen, Shao-Rui, Hong Chen, Jing-Jing Zhou, Geetali Pradhan, Yuxiang Sun, Hui-Lin Pan, i De-Pei Li. 2017. „Ghrelin Receptors Mediate Ghrelin-Induced Excitation of Agouti-Related Protein/Neuropeptide Y but Not pro-Opiomelanocortin Neurons”. *Journal of Neurochemistry* 142 (4): 512–20. <https://doi.org/10.1111/jnc.14080>.
- 61) Chen, Yiming, Rachel A Essner, Seher Kosar, Oliver H Miller, Yen-Chu Lin, Sheyda Mesgarzadeh, i Zachary A Knight. 2019. „Sustained NPY Signaling Enables AgRP Neurons to Drive Feeding”. *ELife* 8 (kwiecień): e46348. <https://doi.org/10.7554/eLife.46348>.
- 62) Chen, Yiming, Yen-Chu Lin, Tzu-Wei Kuo, i Zachary A. Knight. 2015. „Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits”. *Cell* 160 (5): 829–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033>.
- 63) Chen, Zheng. 2019. „Temporal Control of Appetite by AgRP Clocks”. *Cell Metabolism* 29 (5): 1022–23. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.04.009>.
- 64) Chendrimada, Thimmaiah P., Richard I. Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, i Ramin Shiekhattar. 2005. „TRBP Recruits the Dicer Complex to Ago2 for MicroRNA Processing and Gene Silencing”. *Nature* 436 (7051): 740–44. <https://doi.org/10.1038/nature03868>.
- 65) Chylinski, Krzysztof, Anaïs Le Rhun, i Emmanuelle Charpentier. 2013. „The TracrRNA and Cas9 Families of Type II CRISPR-Cas Immunity Systems”. *RNA Biology* 10 (5): 726–37. <https://doi.org/10.4161/rna.24321>.

- 66) Chylinski, Krzysztof, Kira S. Makarova, Emmanuelle Charpentier, i Eugene V. Koonin. 2014. „Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems”. *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>.
- 67) Cobb, Bradley S., Tatyana B. Nesterova, Elizabeth Thompson, Arnulf Hertweck, Eric O’Connor, Jonathan Godwin, Christopher B. Wilson, i in. 2005. „T Cell Lineage Choice and Differentiation in the Absence of the RNase III Enzyme Dicer”. *Journal of Experimental Medicine* 201 (9): 1367–73. <https://doi.org/10.1084/jem.20050572>.
- 68) Cone, Roger D. 2005. „Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System”. *Nature Neuroscience* 8 (5): 571–78. <https://doi.org/10.1038/nn1455>.
- 69) Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, i in. 2013. „Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems”. *Science* 339 (6121): 819–23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- 70) Corander, Marcus P., Debra Rimmington, Benjamin G. Challis, Stephen O’Rahilly, i Anthony P. Coll. 2011. „Loss of Agouti-Related Peptide Does Not Significantly Impact the Phenotype of Murine POMC Deficiency”. *Endocrinology* 152 (5): 1819–28. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1450>.
- 71) Cowley, Michael A., James L. Smart, Marcelo Rubinstein, Marcelo G. Cerdán, Sabrina Diano, Tamas L. Horvath, Roger D. Cone, i Malcolm J. Low. 2001. „Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus”. *Nature* 411 (6836): 480–84. <https://doi.org/10.1038/35078085>.
- 72) Cowley, Michael A, Roy G Smith, Sabrina Diano, Matthias Tschöp, Nina Pronchuk, Kevin L Grove, Christian J Strasburger, i in. 2003. „The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis”. *Neuron* 37 (4): 649–61. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1).
- 73) Creugny, Antoine, Aurélie Fender, i Sébastien Pfeffer. 2018. „Regulation of Primary MicroRNA Processing”. *FEBS Letters* 592 (12): 1980–96. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13067>.
- 74) Croizier, Sophie, Soyoung Park, Julien Maillard, i Sebastien G Bouret. 2018. „Central Dicer-MiR-103/107 Controls Developmental Switch of POMC Progenitors into NPY Neurons and Impacts Glucose Homeostasis”. *ELife* 7 (październik): e40429. <https://doi.org/10.7554/eLife.40429>.
- 75) Cui, Chunmei, Weili Yang, Jiangcheng Shi, Yong Zhou, Jichun Yang, Qinghua Cui, i Yuan Zhou. 2018. „Identification and Analysis of Human Sex-Biased MicroRNAs”. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 16 (3): 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.03.004>.
- 76) Date, Yukari, Noboru Murakami, Koji Toshinai, Shigeru Matsukura, Akira Niiijima, Hisayuki Matsuo, Kenji Kangawa, i Masamitsu Nakazato. 2002. „The Role of the Gastric Afferent Vagal Nerve in Ghrelin-Induced Feeding and Growth Hormone

- Secretion in Rats". *Gastroenterology* 123 (4): 1120–28. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35954>.
- 77) Dause, Tyler Joseph, i Elizabeth Diana Kirby. 2020. „Poor Concordance of Floxed Sequence Recombination in Single Neural Stem Cells: Implications for Cell Autonomous Studies". *Eneuro* 7 (2): ENEURO.0470-19.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0470-19.2020>.
- 78) Deisseroth, Karl. 2015. „Optogenetics: 10 Years of Microbial Opsins in Neuroscience". *Nature Neuroscience* 18 (9): 1213–25. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
- 79) Denli, Ahmet M., Bastiaan B. J. Tops, Ronald H. A. Plasterk, René F. Ketting, i Gregory J. Hannon. 2004. „Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex". *Nature* 432 (7014): 231–35. <https://doi.org/10.1038/nature03049>.
- 80) Dexheimer, Philipp J., i Luisa Cochella. 2020. „MicroRNAs: From Mechanism to Organism". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (czerwiec): 409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>.
- 81) Deyle, David R, i David W Russell. 2010. „Adeno-Associated Virus Vector Integration", 11.
- 82) Dicken, M. S., R. E. Tooker, i S. T. Hentges. 2012. „Regulation of GABA and Glutamate Release from Proopiomelanocortin Neuron Terminals in Intact Hypothalamic Networks". *Journal of Neuroscience* 32 (12): 4042–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6032-11.2012>.
- 83) Dietrich, Marcelo O., Marcelo R. Zimmer, Jeremy Bober, i Tamas L. Horvath. 2015. „Hypothalamic Agrp Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding". *Cell* 160 (6): 1222–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.024>.
- 84) Dong, Jian-Yun, Pei-Dong Fan, i Raymond A. Frizzell. 1996. „Quantitative Analysis of the Packaging Capacity of Recombinant Adeno-Associated Virus". *Human Gene Therapy* 7 (17): 2101–12. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.17-2101>.
- 85) Duan, Dongsheng, Prerna Sharma, Jusan Yang, Yongping Yue, Lorita Dudus, Yulong Zhang, Krishna J Fisher, i John F Engelhardt. 1998. „Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue". *J. VIROL.* 72: 10.
- 86) Dubé, D, J C Lissitzky, R Leclerc, i G Pelletier. 1978. „Localization of α -Melanocyte-Stimulating Hormone in Rat Brain and Pituitary" 102 (4): 9.
- 87) Ebato, Chie, Toyoyoshi Uchida, Masayuki Arakawa, Masaaki Komatsu, Takashi Ueno, Koji Komiya, Kosuke Azuma, i in. 2008. „Autophagy Is Important in Islet Homeostasis and Compensatory Increase of Beta Cell Mass in Response to High-Fat Diet". *Cell Metabolism* 8 (4): 325–32. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.009>.
- 88) Ebstein, Sarah Y., Ilona Yagudayeva, i Neil A. Shneider. 2019. „Mutant TDP-43 Causes Early-Stage Dose-Dependent Motor Neuron Degeneration in a TARDBP Knockin

- Mouse Model of ALS". *Cell Reports* 26 (2): 364-373.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.045>.
- 89) Erdmann, Gitta, Günther Schütz, i Stefan Berger. 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>.
- 90) Erickson, J. C., K. E. Clegg, i R. D. Palmiter. 1996a. „Sensitivity to Leptin and Susceptibility to Seizures of Mice Lacking Neuropeptide Y". *Nature* 381 (6581): 415–21. <https://doi.org/10.1038/381415a0>.
- 91) Erickson. 1996b. „Sensitivity to Leptin and Susceptibility to Seizures of Mice Lacking Neuropeptide Y". *Nature* 381 (6581): 415–21. <https://doi.org/10.1038/381415a0>.
- 91) Erickson, Jay C., Gunther Hollopeter, i Richard D. Palmiter. 1996. „Attenuation of the Obesity Syndrome of *Ob/Ob* Mice by the Loss of Neuropeptide Y". *Science* 274 (5293): 1704–7. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1704>.
- 92) Ernst, M. B., C. M. Wunderlich, S. Hess, M. Paehler, A. Mesaros, S. B. Koralov, A. Kleinridders, i in. 2009. „Enhanced Stat3 Activation in POMC Neurons Provokes Negative Feedback Inhibition of Leptin and Insulin Signaling in Obesity". *Journal of Neuroscience* 29 (37): 11582–93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5712-08.2009>.
- 93) Essner, Rachel A., Alison G. Smith, Adam A. Jamnik, Anna R. Ryba, Zoe D. Trutner, i Matthew E. Carter. 2017. „AgRP Neurons Can Increase Food Intake during Conditions of Appetite Suppression and Inhibit Anorexigenic Parabrachial Neurons". *The Journal of Neuroscience* 37 (36): 8678–87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0798-17.2017>.
- 94) Fabian, Marc R., Thomas R. Sundermeier, i Nahum Sonenberg. 2010. „Understanding How MiRNAs Post-Transcriptionally Regulate Gene Expression". W *MiRNA Regulation of the Translational Machinery*, zredagowane przez Robert E. Rhoads, 50:1–20. Progress in Molecular and Subcellular Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03103-8_1.
- 95) Fang, Huaqiang, Alexei M Bygrave, Richard H Roth, Richard C Johnson, i Richard L Haganir. 2021. „An Optimized CRISPR/Cas9 Approach for Precise Genome Editing in Neurons". *eLife* 10 (marzec): e65202. <https://doi.org/10.7554/eLife.65202>.
- 96) Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, i P. Chambon. 1996. „Ligand-Activated Site-Specific Recombination in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (20): 10887–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10887>.
- 97) Fenselau, Henning, John N Campbell, Anne M J Verstegen, Joseph C Madara, Jie Xu, Bhavik P Shah, Jon M Resch, i in. 2017. „A Rapidly Acting Glutamatergic ARC→PVH Satiety Circuit Postsynaptically Regulated by α -MSH". *Nature Neuroscience* 20 (1): 42–51. <https://doi.org/10.1038/nn.4442>.
- 98) Fiorenza, Anna, Jose P. Lopez-Atalaya, Victor Rovira, Marilyn Scandaglia, Emilio Geijo-Barrientos, i Angel Barco. 2016. „Blocking MiRNA Biogenesis in Adult Forebrain Neurons Enhances Seizure Susceptibility, Fear Memory, and Food Intake by Increasing

- Neuronal Responsiveness". *Cerebral Cortex* 26 (4): 1619–33. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu332>.
- 99) Flak, Jonathan N., i Martin G. Myers. 2016. „Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action". *Molecular Endocrinology* 30 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1232>.
- 100) Fong, Tung Ming, Cheri Mao, Tanya MacNeil, Rubana Kalyani, Tim Smith, David Weinberg, i Michael R Tota. b.d. „ART (Protein Product of Agouti-Related Transcript) as an Antagonist of MC-3 and MC-4 Receptors". *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 237 (3): 3.
- 101) Förstemann, Klaus, Yukihide Tomari, Tingting Du, Vasily V Vagin, Ahmet M Denli, Diana P Bratu, Carla Klattenhoff, William E Theurkauf, i Phillip D Zamore. 2005. „Normal MicroRNA Maturation and Germ-Line Stem Cell Maintenance Requires Loquacious, a Double-Stranded RNA-Binding Domain Protein". Zredagowane przez James C. Carrington. *PLoS Biology* 3 (7): e236. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030236>.
- 102) Frank, Filipp, Nahum Sonenberg, i Bhushan Nagar. 2010. „Structural Basis for 5'-Nucleotide Base-Specific Recognition of Guide RNA by Human AGO2". *Nature* 465 (7299): 818–22. <https://doi.org/10.1038/nature09039>.
- 103) Friedländer, Marc R, Esther Lizano, Anna JS Houben, Daniela Bezdán, Mónica Bález-Coronel, Grzegorz Kudła, Elisabet Mateu-Huertas, i in. 2014. „Evidence for the Biogenesis of More than 1,000 Novel Human MicroRNAs". *Genome Biology* 15 (4): R57. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>.
- 104) Fukao, Akira, Yuichiro Mishima, Naoki Takizawa, Shigenori Oka, Hiroaki Imataka, Jerry Pelletier, Nahum Sonenberg, Christian Thoma, i Toshinobu Fujiwara. 2014. „MicroRNAs Trigger Dissociation of EIF4AI and EIF4AII from Target MRNAs in Humans". *Molecular Cell* 56 (1): 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.005>.
- 105) Fukaya, Takashi, Hiro-oki Iwakawa, i Yukihide Tomari. 2014. „MicroRNAs Block Assembly of EIF4F Translation Initiation Complex in Drosophila". *Molecular Cell* 56 (1): 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.004>.
- 106) Gama Sosa, Miguel A., Rita De Gasperi, i Gregory A. Elder. 2010. „Animal Transgenesis: An Overview". *Brain Structure and Function* 214 (2–3): 91–109. <https://doi.org/10.1007/s00429-009-0230-8>.
- 107) Garfield, Alastair S, Chia Li, Joseph C Madara, Bhavik P Shah, Emily Webber, Jennifer S Steger, John N Campbell, i in. 2015. „A Neural Basis for Melanocortin-4 Receptor–Regulated Appetite". *Nature Neuroscience* 18 (6): 863–71. <https://doi.org/10.1038/nn.4011>.
- 108) Gendron, William A. C., Jeffrey D. Rubin, Michael J. Hansen, Rebecca A. Nace, Brandon W. Simone, Stephen C. Ekker, i Michael A. Barry. 2021. „Unlocking LoxP to Track Genome Editing In Vivo". *Genes* 12 (8): 1204. <https://doi.org/10.3390/genes12081204>.

- 109) Gernoux, Gwladys, James M. Wilson, i Christian Mueller. 2017. „Regulatory and Exhausted T Cell Responses to AAV Capsid”. *Human Gene Therapy* 28 (4): 338–49. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.022>.
- 110) Glenn Stanley, B., Stavroula E. Kyrkouli, Sharon Lampert, i Sarah F. Leibowitz. 1986. „Neuropeptide Y Chronically Injected into the Hypothalamus: A Powerful Neurochemical Inducer of Hyperphagia and Obesity”. *Peptides* 7 (6): 1189–92. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90149-X).
- 111) Goldstein, Nitsan, Brian J. Levine, Kelsey A. Loy, William L. Duke, Olivia S. Meyerson, Adam A. Jamnik, i Matthew E. Carter. 2018. „Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding Can Influence Sleep/Wake States Based on Homeostatic Need”. *Current Biology* 28 (23): 3736–3747.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.055>.
- 112) Gradinaru, Viviana, Feng Zhang, Charu Ramakrishnan, Joanna Mattis, Rohit Prakash, Ilka Diester, Inbal Goshen, Kimberly R. Thompson, i Karl Deisseroth. 2010. „Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics”. *Cell* 141 (1): 154–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.037>.
- 113) Graham, M., J. R. Shutter, U. Sarmiento, I. Sarosi, i K. L. Stark. 1997. „Overexpression of Agprt Leads to Obesity in Transgenic Mice”. *Nature Genetics* 17 (3): 273–74. <https://doi.org/10.1038/ng1197-273>.
- 114) Greenman, Yona, Yael Kuperman, Yonat Drori, Sylvia L. Asa, Inbal Navon, Oren Forkosh, Shosh Gil, Naftali Stern, i Alon Chen. 2013. „Postnatal Ablation of POMC Neurons Induces an Obese Phenotype Characterized by Decreased Food Intake and Enhanced Anxiety-Like Behavior”. *Molecular Endocrinology* 27 (7): 1091–1102. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1344>.
- 115) Gribkoff, Valentin K., Rick L. Pieschl, Todd A. Wisialowski, Anthony N. van den Pol, i Frank D. Yocca. 1998. „Phase Shifting of Circadian Rhythms and Depression of Neuronal Activity in the Rat Suprachiasmatic Nucleus by Neuropeptide Y: Mediation by Different Receptor Subtypes”. *The Journal of Neuroscience* 18 (8): 3014–22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-03014.1998>.
- 116) Grimson, Andrew, Kyle Kai-How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P. Lim, i David P. Bartel. 2007. „MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing”. *Molecular Cell* 27 (1): 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>.
- 117) Grishok, Alla, Amy E. Pasquinelli, Darryl Conte, Na Li, Susan Parrish, Ilho Ha, David L. Baillie, Andrew Fire, Gary Ruvkun, i Craig C. Mello. 2001. „Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs That Control *C. Elegans* Developmental Timing”. *Cell* 106 (1): 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7).
- 118) Gropp, Eva, Marya Shanabrough, Erzsebet Borok, Allison W Xu, Ruth Janoschek, Thorsten Buch, Leona Plum, i in. 2005. „Agouti-Related Peptide-Expressing Neurons Are Mandatory for Feeding”. *Nature Neuroscience* 8 (10): 1289–91. <https://doi.org/10.1038/nn1548>.

- 119) Haase, Astrid D, Lukasz Jaskiewicz, Haidi Zhang, Sébastien Lainé, Ragna Sack, Anne Gatignol, i Witold Filipowicz. 2005. „TRBP, a Regulator of Cellular PKR and HIV-1 Virus Expression, Interacts with Dicer and Functions in RNA Silencing”. *EMBO Reports* 6 (10): 961–67. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400509>.
- 120) Haery, Leila, Benjamin E. Deverman, Katherine S. Matho, Ali Cetin, Kenton Woodard, Connie Cepko, Karen I. Guerin, i in. 2019. „Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation”. *Frontiers in Neuroanatomy* 13 (listopad): 93. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093>.
- 121) Haggerty, David L., Gregory G. Grecco, Kaitlin C. Reeves, i Brady Atwood. 2020. „Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research”. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17 (czerwiec): 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.11.012>.
- 122) Hahn, Tina M., John F. Breininger, Denis G. Baskin, i Michael W. Schwartz. 1998. „Coexpression of Agrp and NPY in Fasting-Activated Hypothalamic Neurons”. *Nature Neuroscience* 1 (4): 271–72. <https://doi.org/10.1038/1082>.
- 123) Hamilton, Cl, Pj Ciaccia, i Do Lewis. 1976. „Feeding Behavior in Monkeys with and without Lesions of the Hypothalamus”. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 230 (3): 818–30. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.3.818>.
- 124) Han, J. 2004. „The Drosha-DGCR8 Complex in Primary MicroRNA Processing”. *Genes & Development* 18 (24): 3016–27. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>.
- 125) He, Long, Jie Zhang, Jinshan Zhao, Ning Ma, Sung Woo Kim, Shiyan Qiao, i Xi Ma. 2018. „Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress”. *Advances in Nutrition* 9 (4): 493–504. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy011>.
- 126) He, Miao, Jason Tucciarone, SooHyun Lee, Maximiliano José Nigro, Yongsoo Kim, Jesse Maurica Levine, Sean Michael Kelly, i in. 2016. „Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex”. *Neuron* 91 (6): 1228–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.021>.
- 127) Heidenreich, Matthias, i Feng Zhang. 2016. „Applications of CRISPR–Cas Systems in Neuroscience”. *Nature Reviews Neuroscience* 17 (1): 36–44. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.2>.
- 128) Hentges, S. T. 2004. „GABA Release from Proopiomelanocortin Neurons”. *Journal of Neuroscience* 24 (7): 1578–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3952-03.2004>.
- 129) Hentges, S. T., V. Otero-Corchon, R. L. Pennock, C. M. King, i M. J. Low. 2009. „Proopiomelanocortin Expression in Both GABA and Glutamate Neurons”. *Journal of Neuroscience* 29 (43): 13684–90. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3770-09.2009>.
- 130) Herrera-Carrillo, Elena, i Ben Berkhout. 2017. „Dicer-Independent Processing of Small RNA Duplexes: Mechanistic Insights and Applications”. *Nucleic Acids Research* 45 (18): 10369–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx779>.

- 131) Hetherington, A. W., i S. W. Ranson. 1940. „Hypothalamic Lesions and Adiposity in the Rat”. *The Anatomical Record* 78 (2): 149–72. <https://doi.org/10.1002/ar.1090780203>.
- 132) Hill, Jennifer W., Carol F. Elias, Makoto Fukuda, Kevin W. Williams, Eric D. Berglund, William L. Holland, You-Ree Cho, i in. 2010. „Direct Insulin and Leptin Action on Pro-Opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility”. *Cell Metabolism* 11 (4): 286–97. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>.
- 133) Hordeaux, Juliette, Elizabeth L. Buza, Brianne Jeffrey, Chunjuan Song, Tahsin Jahan, Yuan Yuan, Yanqing Zhu, i in. 2020. „MicroRNA-Mediated Inhibition of Transgene Expression Reduces Dorsal Root Ganglion Toxicity by AAV Vectors in Primates”. *Science Translational Medicine* 12 (569): eaba9188. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba9188>.
- 134) Horvath, Tamas L, Ingo Bechmann, Frederick Naftolin, Satya P Kalra, i Csaba Leranth. 1997. „Heterogeneity in the Neuropeptide Y-Containing Neurons of the Rat Arcuate Nucleus: GABAergic and Non-GABAergic Subpopulations”. *Brain Research* 756 (1–2): 283–86. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00184-4).
- 135) Hotamisligil, Gökhan S. 2010. „Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease”. *Cell* 140 (6): 900–917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>.
- 136) Huang, Hsi-Yuan, Yang-Chi-Dung Lin, Jing Li, Kai-Yao Huang, Sirjana Shrestha, Hsiao-Chin Hong, Yun Tang, i in. 2019. „MiRTarBase 2020: Updates to the Experimentally Validated MicroRNA–Target Interaction Database”. *Nucleic Acids Research*, październik, gkz896. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz896>.
- 137) Huang, Lin-Ya, Sujata Halder, i Mavis Agbandje-McKenna. 2014. „Parvovirus Glycan Interactions”. *Current Opinion in Virology* 7 (sierpień): 108–18. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.05.007>.
- 138) Huang, Yinqiong, Xiahong Lin, i Shu Lin. 2021. „Neuropeptide Y and Metabolism Syndrome: An Update on Perspectives of Clinical Therapeutic Intervention Strategies”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (lipiec): 695623. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.695623>.
- 139) Huijbers, Ivo J. b.d. „Generating Genetically Modified Mice: A Decision Guide”, 19.
- 140) Huszar, Dennis, Catherine A Lynch, Victoria Fairchild-Huntress, Judy H Dunmore, Qing Fang, Lucy R Berkemeier, Wei Gu, i in. 1997. „Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice”. *Cell* 88 (1): 131–41. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81865-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6).
- 141) Hutson, T H, C Kathe, i L D F Moon. 2016. „Trans-Neuronal Transduction of Spinal Neurons Following Cortical Injection and Anterograde Axonal Transport of a Bicistronic AAV1 Vector”. *Gene Therapy* 23 (2): 231–36. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.103>.

- 142) Hutvágner, György, Juanita McLachlan, Amy E. Pasquinelli, Éva Bálint, Thomas Tuschl, i Phillip D. Zamore. 2001. „A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the *Let-7* Small Temporal RNA”. *Science* 293 (5531): 834–38. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>.
- 143) Hutvágner, György, i Phillip D. Zamore. 2002. „A MicroRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex”. *Science* 297 (5589): 2056–60. <https://doi.org/10.1126/science.1073827>.
- 144) Ilnytska, Olha, Adrian M. Stütz, MieJung Park-York, David A. York, David M. Ribnicky, Aamir Zuberi, William T. Cefalu, i George Argyropoulos. 2011. „Molecular Mechanisms for Activation of the Agouti-Related Protein and Stimulation of Appetite”. *Diabetes* 60 (1): 97–106. <https://doi.org/10.2337/db10-0172>.
- 145) Ishino, Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, i A Nakata. 1987. „Nucleotide Sequence of the *Iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product”. *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.
- 146) Iwasaki, Shintaro, Tomoko Kawamata, i Yukihide Tomari. 2009. „*Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression”. *Molecular Cell* 34 (1): 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.010>.
- 147) Jansen, Ruud., Jan. D. A. van Embden, Wim. Gaastra, i Leo. M. Schouls. 2002. „Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes”. *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.
- 148) Jiang, F. 2005. „Dicer-1 and R3D1-L Catalyze MicroRNA Maturation in *Drosophila*”. *Genes & Development* 19 (14): 1674–79. <https://doi.org/10.1101/gad.1334005>.
- 149) Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, i Emmanuelle Charpentier. 2012. „A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”. *Science* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- 150) Jones, Graham L., Gábor Wittmann, Eva B. Yokosawa, Hui Yu, Aaron J. Mercer, Ronald M. Lechan, i Malcolm J. Low. 2019. „Selective Restoration of *Pomc* Expression in Glutamatergic POMC Neurons: Evidence for a Dynamic Hypothalamic Neurotransmitter Network”. *Eneuro* 6 (2): ENEURO.0400-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0400-18.2019>.
- 151) Kaelin, Christopher B., Allison Wanting Xu, Xin-Yun Lu, i Gregory S. Barsh. 2004. „Transcriptional Regulation of Agouti-Related Protein (*Agrp*) in Transgenic Mice”. *Endocrinology* 145 (12): 5798–5806. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0956>.
- 152) Kaga, T., A. Inui, M. Okita, A. Asakawa, N. Ueno, M. Kasuga, M. Fujimiya, i in. 2001. „Modest Overexpression of Neuropeptide Y in the Brain Leads to Obesity After High-Sucrose Feeding”. *Diabetes* 50 (5): 1206–10. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.5.1206>.

- 153) Kaludov, Nikola, Kevin E. Brown, Robert W. Walters, Joseph Zabner, i John A. Chiorini. 2001. „Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity”. *Journal of Virology* 75 (15): 6884–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6884-6893.2001>.
- 154) Kaspar, Brian K., Dawn Erickson, David Schaffer, Linda Hinh, Fred H. Gage, i Daniel A. Peterson. 2002. „Targeted Retrograde Gene Delivery for Neuronal Protection”. *Molecular Therapy* 5 (1): 50–56. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0520>.
- 155) Kelly, Martin J., i Oline K. Rønnekleiv. 2015. „Minireview: Neural Signaling of Estradiol in the Hypothalamus”. *Molecular Endocrinology* 29 (5): 645–57. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1397>.
- 156) Ketting, R. F. 2001. „Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. Elegans*”. *Genes & Development* 15 (20): 2654–59. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>.
- 157) Khabou, Hanen, Chloé Cordeau, Laure Pacot, Sylvain Fisson, i Deniz Dalkara. 2018. „Dosage Thresholds and Influence of Transgene Cassette in Adeno-Associated Virus–Related Toxicity”. *Human Gene Therapy* 29 (11): 1235–41. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.144>.
- 158) Kim, E. R., Z. Wu, H. Sun, Y. Xu, L. R. Mangieri, Y. Xu, i Q. Tong. 2015. „Hypothalamic Non-AgRP, Non-POMC GABAergic Neurons Are Required for Postweaning Feeding and NPY Hyperphagia”. *Journal of Neuroscience* 35 (29): 10440–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1110-15.2015>.
- 159) Knight, Scott W., i Brenda L. Bass. 2001. „A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis Elegans*”. *Science* 293 (5538): 2269–71. <https://doi.org/10.1126/science.1062039>.
- 160) Kohno, Daisuke, Hong-Zhi Gao, Shinji Muroya, Sakae Kikuyama, i Toshihiko Yada. 2003. „Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y–Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus” 52: 9.
- 161) Könner, A. Christine, Ruth Janoschek, Leona Plum, Sabine D. Jordan, Eva Rother, Xiaosong Ma, Chun Xu, i in. 2007. „Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production”. *Cell Metabolism* 5 (6): 438–49. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>.
- 162) Konopka, W., A. Kiryk, M. Novak, M. Herwerth, J. R. Parkitna, M. Wawrzyniak, A. Kowarsch, i in. 2010. „MicroRNA Loss Enhances Learning and Memory in Mice”. *Journal of Neuroscience* 30 (44): 14835–42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3030-10.2010>.
- 163) Konopka, Witold, Günther Schütz, i Leszek Kaczmarek. 2011. „The MicroRNA Contribution to Learning and Memory”. *The Neuroscientist* 17 (5): 468–74. <https://doi.org/10.1177/1073858411411721>.

- 164) Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, i Sam Griffiths-Jones. 2019. „MiRBase: From MicroRNA Sequences to Function”. *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- 165) Krashes, Michael J, Shuichi Koda, ChianPing Ye, Sarah C Rogan, Andrew C Adams, Daniel S Cusher, Eleftheria Maratos-Flier, Bryan L Roth, i Bradford B Lowell. b.d. „Rapid, Reversible Activation of AgRP Neurons Drives Feeding Behavior in Mice”, 6.
- 166) Krashes, Michael J., Bhavik P. Shah, Joseph C. Madara, David P. Olson, David E. Strohlic, Alastair S. Garfield, Linh Vong, i in. 2014. „An Excitatory Paraventricular Nucleus to AgRP Neuron Circuit That Drives Hunger”. *Nature* 507 (7491): 238–42. <https://doi.org/10.1038/nature12956>.
- 167) Krashes, Michael J., Bhavik P. Shah, Shuichi Koda, i Bradford B. Lowell. 2013. „Rapid versus Delayed Stimulation of Feeding by the Endogenously Released AgRP Neuron Mediators GABA, NPY, and AgRP”. *Cell Metabolism* 18 (4): 588–95. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.009>.
- 168) Kumar, Namrata, William Stanford, Christopher de Solis, Aradhana, Nigel D. Abraham, Trieu-Mi J. Dao, Sadiqa Thaseen, Anusha Sairavi, Cuauhtemoc Ulises Gonzalez, i Jonathan E. Ploski. 2018. „The Development of an AAV-Based CRISPR SaCas9 Genome Editing System That Can Be Delivered to Neurons in Vivo and Regulated via Doxycycline and Cre-Recombinase”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (listopad): 413. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00413>.
- 169) Kuzuoğlu-Öztürk, Duygu, Dipankar Bhandari, Eric Huntzinger, Maria Fauser, Sigrun Helms, i Elisa Izaurralde. 2016. „Mi RISC and the CCR 4– NOT Complex Silence mRNA Targets Independently of 43S Ribosomal Scanning”. *The EMBO Journal* 35 (11): 1186–1203. <https://doi.org/10.15252/embj.201592901>.
- 170) Lagos-Quintana, Mariana, Reinhard Rauhut, Winfried Lendeckel, i Thomas Tuschl. 2001. „Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs”. *Science* 294 (5543): 853–58. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>.
- 171) Lai, Eric C, Pavel Tomancak, Robert W Williams, i Gerald M Rubin. 2003. „Computational Identification of Drosophila MicroRNA Genes”. *Genome Biology*, 20.
- 172) Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, E. J. Lee, R. W. Manning, S. H. Yu, K. L. Mulder, i H. Westphal. 1992. „Targeted Oncogene Activation by Site-Specific Recombination in Transgenic Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (14): 6232–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6232>.
- 173) Lander, Eric S. 2016. „The Heroes of CRISPR”. *Cell* 164 (1–2): 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>.
- 174) Lau, Nelson C., Lee P. Lim, Earl G. Weinstein, i David P. Bartel. 2001. „An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis Elegans*”. *Science* 294 (5543): 858–62. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>.

- 175) Lavin, Thomas K., Lei Jin, Nicholas E. Lea, i Ian R. Wickersham. 2020. „Monosynaptic Tracing Success Depends Critically on Helper Virus Concentrations”. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 12 (lut): 6. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00006>.
- 176) Lee, Nicola J., Ireni M. Clarke, Ayse Zengin, Ronaldo F. Enriquez, Vanj Nagy, Josef M. Penninger, Paul A. Baldock, i Herbert Herzog. 2019. „RANK Deletion in NEUROPEPTIDE Y Neurons Attenuates Oestrogen Deficiency-related Bone Loss”. *Journal of Neuroendocrinology* 31 (2): e12687. <https://doi.org/10.1111/jne.12687>.
- 177) Lee, R. C., R. L. Feinbaum, i V. Ambros. 1993. „The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14”. *Cell* 75 (5): 843–54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
- 178) Lee, Rosalind C., i Victor Ambros. 2001. „An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis Elegans*”. *Science* 294 (5543): 862–64. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>.
- 179) Lee, Y. 2002. „MicroRNA Maturation: Stepwise Processing and Subcellular Localization”. *The EMBO Journal* 21 (17): 4663–70. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>.
- 180) Lee, Yoontae, Minju Kim, Jinju Han, Kyu-Hyun Yeom, Sanghyuk Lee, Sung Hee Baek, i V Narry Kim. 2004. „MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II”. *The EMBO Journal* 23 (20): 4051–60. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>.
- 181) Li, Hongyi, Yang Yang, Weiqi Hong, Mengyuan Huang, Min Wu, i Xia Zhao. 2020. „Applications of Genome Editing Technology in the Targeted Therapy of Human Diseases: Mechanisms, Advances and Prospects”. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
- 182) Li, Monica M., Joseph C. Madara, Jennifer S. Steger, Michael J. Krashes, Nina Balthasar, John N. Campbell, Jon M. Resch, Nicholas J. Conley, Alastair S. Garfield, i Bradford B. Lowell. 2019. „The Paraventricular Hypothalamus Regulates Satiety and Prevents Obesity via Two Genetically Distinct Circuits”. *Neuron* 102 (3): 653-667.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.028>.
- 183) Li, Qingsong, Shan Bian, Janet Hong, Yoko Kawase-Koga, Edwin Zhu, Yongri Zheng, Lizhuang Yang, i Tao Sun. 2011. „Timing Specific Requirement of MicroRNA Function Is Essential for Embryonic and Postnatal Hippocampal Development”. Zredagowane przez Brahim Nait-Oumesmar. *PLoS ONE* 6 (10): e26000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026000>.
- 184) Li, Sung-Chou, Wen-Ching Chan, Ling-Yueh Hu, Chun-Hung Lai, Chun-Nan Hsu, i Wen-chang Lin. 2010. „Identification of Homologous MicroRNAs in 56 Animal Genomes”. *Genomics* 96 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.009>.
- 185) Li, Xing-Yu, Ying Han, Wen Zhang, Shao-Ran Wang, Yi-Chao Wei, Shuai-Shuai Li, Jun-Kai Lin, i in. 2019. „AGRP Neurons Project to the Medial Preoptic Area and Modulate Maternal Nest-Building”. *The Journal of Neuroscience* 39 (3): 456–71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0958-18.2018>.

- 186) Liu, Hui-Yu, Jianmin Han, Sophia Y. Cao, Tao Hong, Degen Zhuo, Jianbo Shi, Zhenqi Liu, i Wenhong Cao. 2009. „Hepatic Autophagy Is Suppressed in the Presence of Insulin Resistance and Hyperinsulinemia”. *Journal of Biological Chemistry* 284 (45): 31484–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033936>.
- 187) Liu, Tiemin, Dong Kong, Bhavik P. Shah, Chianping Ye, Shuichi Koda, Arpiar Saunders, Jun B. Ding, Zongfang Yang, Bernardo L. Sabatini, i Bradford B. Lowell. 2012. „Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone”. *Neuron* 73 (3): 511–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.027>.
- 188) Long, Min, Jiyin Zhou, Dandan Li, Lu Zheng, Zihui Xu, i Shiwen Zhou. 2015. „Long-Term Over-Expression of Neuropeptide Y in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Contributes to Adipose Tissue Insulin Resistance Partly via the Y5 Receptor”. Zredagowane przez Zane Andrews. *PLOS ONE* 10 (5): e0126714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126714>.
- 189) Lu, Qi, Elena Ivanova, Tushar H Ganjawala, i Zhuo-Hua Pan. 2013. „Cre-Mediated Recombination Efficiency and Transgene Expression Patterns of Three Retinal Bipolar Cell-Expressing Cre Transgenic”. *Molecular Vision*, 12.
- 190) Luo, Liqun, Edward M. Callaway, i Karel Svoboda. 2018. „Genetic Dissection of Neural Circuits: A Decade of Progress”. *Neuron* 98 (2): 256–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.040>.
- 191) Luquet, Serge, Francisco A. Perez, Thomas S. Hnasko, i Richard D. Palmiter. 2005. „NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates”. *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748): 683–85. <https://doi.org/10.1126/science.1115524>.
- 192) Madisen, Linda, Theresa A Zwingman, Susan M Sunkin, Seung Wook Oh, Hatim A Zariwala, Hong Gu, Lydia L Ng, i in. 2010. „A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain”. *Nature Neuroscience* 13 (1): 133–40. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>.
- 193) Maillard, Julien, Soyoung Park, Sophie Croizier, Charlotte Vanacker, Joshua H. Cook, Vincent Prevot, Maithe Tauber, i Sebastien G. Bouret. 2016. „Loss of Magel2 Impairs the Development of Hypothalamic Anorexigenic Circuits”. *Human Molecular Genetics* 25 (15): 3208–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw169>.
- 194) Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, i in. 2011. „Evolution and Classification of the CRISPR–Cas Systems”. *Nature Reviews Microbiology* 9 (6): 467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- 195) Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, i G. M. Church. 2013. „RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9”. *Science* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.

- 196) Mandelblat-Cerf, Yael, Rohan N Ramesh, Christian R Burgess, Paola Patella, Zongfang Yang, Bradford B Lowell, i Mark L Andermann. 2015. „Arcuate Hypothalamic AgRP and Putative POMC Neurons Show Opposite Changes in Spiking across Multiple Timescales”. *ELife* 4 (lipiec): e07122. <https://doi.org/10.7554/eLife.07122>.
- 197) Mang, Géraldine M., Sylvain Pradervand, Ngoc-Hien Du, Alaaddin Bulak Arpat, Frédéric Preitner, Leonore Wigger, David Gatfield, i Paul Franken. 2015. „A Neuron-Specific Deletion of the MicroRNA-Processing Enzyme DICER Induces Severe but Transient Obesity in Mice”. Zredagowane przez Motoyuki Otsuka. *PLOS ONE* 10 (1): e0116760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116760>.
- 198) Marchant, Elliott G., Neil V. Watson, i Ralph E. Mistlberger. 1997. „Both Neuropeptide Y and Serotonin Are Necessary for Entrainment of Circadian Rhythms in Mice by Daily Treadmill Running Schedules”. *The Journal of Neuroscience* 17 (20): 7974–87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-20-07974.1997>.
- 199) Marraudino, Marilena, Beatriz Carrillo, Brigitta Bonaldo, Ricardo Llorente, Elia Campioli, Iciar Garate, Helena Pinos, Luis Miguel Garcia-Segura, Paloma Collado, i Daniela Grassi. 2021. „G Protein-Coupled Estrogen Receptor Immunoreactivity in the Rat Hypothalamus Is Widely Distributed in Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes, Fluctuates during the Estrous Cycle, and Is Sexually Dimorphic”. *Neuroendocrinology* 111 (7): 660–77. <https://doi.org/10.1159/000509583>.
- 200) Marsden, K. C., A. Shemesh, K. U. Bayer, i R. C. Carroll. 2010. „Selective Translocation of Ca²⁺/Calmodulin Protein Kinase II (CaMKII) to Inhibitory Synapses”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (47): 20559–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010346107>.
- 201) Maselli, Vincenza, Diego Di Bernardo, i Sandro Banfi. 2008. „CoGemiR: A Comparative Genomics MicroRNA Database”. *BMC Genomics* 9 (1): 457. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-457>.
- 202) McCarty, Douglas M., Samuel M. Young, i R. Jude Samulski. 2004. „Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors”. *Annual Review of Genetics* 38 (1): 819–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143717>.
- 203) McFarlane, Matthew R., Michael S. Brown, Joseph L. Goldstein, i Tong-Jin Zhao. 2014. „Induced Ablation of Ghrelin Cells in Adult Mice Does Not Decrease Food Intake, Body Weight, or Response to High-Fat Diet”. *Cell Metabolism* 20 (1): 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.007>.
- 204) Meijer, H. A., Y. W. Kong, W. T. Lu, A. Wilczynska, R. V. Spriggs, S. W. Robinson, J. D. Godfrey, A. E. Willis, i M. Bushell. 2013. „Translational Repression and EIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation”. *Science* 340 (6128): 82–85. <https://doi.org/10.1126/science.1231197>.
- 205) Meister, Björn, Burçak Gömüç, Elisabet Suarez, Yuko Ishii, Katrin Dürr, i Linda Gillberg. 2006. „Hypothalamic Proopiomelanocortin (POMC) Neurons Have a Cholinergic Phenotype”. *European Journal of Neuroscience* 24 (10): 2731–40. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05157.x>.

- 206) Meng, Fantao, Yong Han, Dollada Srisai, Valery Belakhov, Monica Farias, Yong Xu, Richard D. Palmiter, Timor Baasov, i Qi Wu. 2016. „New Inducible Genetic Method Reveals Critical Roles of GABA in the Control of Feeding and Metabolism”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (13): 3645–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602049113>.
- 207) Meng, Qingyuan, i Dongsheng Cai. 2011. „Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I κ B Kinase β (IKK β)/NF- κ B Pathway”. *Journal of Biological Chemistry* 286 (37): 32324–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254417>.
- 208) Mentzel, Caroline M. Junker, Christian Anthon, Mette J. Jacobsen, Peter Karlskov-Mortensen, Camilla S. Bruun, Claus B. Jørgensen, Jan Gorodkin, Susanna Cirera, i Merete Fredholm. 2015. „Gender and Obesity Specific MicroRNA Expression in Adipose Tissue from Lean and Obese Pigs”. Zredagowane przez M. Lucrecia Alvarez. *PLOS ONE* 10 (7): e0131650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131650>.
- 209) Mesaros, Andrea, Sergei B. Koralov, Eva Rother, F. Thomas Wunderlich, Marianne B. Ernst, Gregory S. Barsh, Klaus Rajewsky, i Jens C. Brüning. 2008. „Activation of Stat3 Signaling in AgRP Neurons Promotes Locomotor Activity”. *Cell Metabolism* 7 (3): 236–48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.01.007>.
- 210) Milam, K. M., J. S. Stern, L. H. Storlien, i R. E. Keesey. 1980. „Effect of Lateral Hypothalamic Lesions on Regulation of Body Weight and Adiposity in Rats”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 239 (3): R337–43. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1980.239.3.R337>.
- 211) Millington, George WM. 2007. „The Role of Proopiomelanocortin (POMC) Neurones in Feeding Behaviour”. *Nutrition & Metabolism* 4 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-18>.
- 212) Mojica, F. J. M., G. Juez, i F. Rodriguez-Valera. 1993. „Transcription at Different Salinities of *Haloferax Mediterranei* Sequences Adjacent to Partially Modified PstI Sites”. *Molecular Microbiology* 9 (3): 613–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>.
- 213) Mojica, Francisco J. M., Cesar Diez-Villasenor, Elena Soria, i Guadalupe Juez. 2000. „Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria”. *Molecular Microbiology* 36 (1): 244–46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
- 214) Mojica, Francisco J.M., Cesar Diez-Villasenor, Jesus Garcia-Martinez, i Elena Soria. 2005. „Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements”. *Journal of Molecular Evolution* 60 (2): 174–82. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- 215) Morgan, Christopher P., i Tracy L. Bale. 2017. „Sex Differences in MicroRNA-MRNA Networks: Examination of Novel Epigenetic Programming Mechanisms in the Sexually Dimorphic Neonatal Hypothalamus”. *Biology of Sex Differences* 8 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0149-3>.

- 216) Morishita, Takehiko, Tomomi Hidaka, Kunio Sugahara, i Tadashi Noguchi. 1998. „Leptin Changes Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Response and Upregulates the Gene Expression of Calcineurin in Rat Hypothalamus”. *Life Sciences* 63 (20): 311–15. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00460-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00460-3).
- 217) Morita, Sumiyo, Takuro Horii, Mika Kimura, Yuji Goto, Takahiro Ochiya, i Izuho Hatada. 2007. „One Argonaute Family Member, Eif2c2 (Ago2), Is Essential for Development and Appears Not to Be Involved in DNA Methylation”. *Genomics* 89 (6): 687–96. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.01.004>.
- 218) Morton, GJ, i MW Schwartz. b.d. „PAPER The NPY=AgRP Neuron and Energy Homeostasis”. *International Journal of Obesity*, 7.
- 219) Mussbacher, Marion, Anita Pirabe, Laura Brunthaler, Waltraud C. Schrottmaier, i Alice Assinger. 2021. „Horizontal MicroRNA Transfer by Platelets – Evidence and Implications”. *Frontiers in Physiology* 12 (czerwiec): 678362. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.678362>.
- 220) Nagaraj, Siranjeevi, Katarzyna Marta Zoltowska, Katarzyna Laskowska-Kaszub, i Urszula Wojda. 2019. „MicroRNA Diagnostic Panel for Alzheimer’s Disease and Epigenetic Trade-off between Neurodegeneration and Cancer”. *Ageing Research Reviews* 49 (styczeń): 125–43. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.008>.
- 221) Nakano, Masataka, i Miki Nakajima. 2018. „Current Knowledge of MicroRNA-Mediated Regulation of Drug Metabolism in Humans”. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 14 (5): 493–504. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1472237>.
- 222) Nakazato, Masamitsu, Noboru Murakami, Yukari Date, Masayasu Kojima, Hisayuki Matsuo, Kenji Kangawa, i Shigeru Matsukura. 2001. „A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding”. *Nature* 409 (6817): 194–98. <https://doi.org/10.1038/35051587>.
- 223) Namkoong, Sim, Chun-Seok Cho, Ian Semple, i Jun Hee Lee. b.d. „Autophagy Dysregulation and Obesity-Associated Pathologies”, 8.
- 224) Narita, Masako, Andrew R. J. Young, Satoko Arakawa, Shamith A. Samarajiwa, Takayuki Nakashima, Sei Yoshida, Sungki Hong, i in. 2011. „Spatial Coupling of MTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes”. *Science* 332 (6032): 966–70. <https://doi.org/10.1126/science.1205407>.
- 225) Nassi, Jonathan J., Constance L. Cepko, Richard T. Born, i Kevin T. Beier. 2015. „Neuroanatomy Goes Viral!” *Frontiers in Neuroanatomy* 9 (lipiec). <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00080>.
- 226) O’Brien, Killian, Koen Breyne, Stefano Ughetto, Louise C. Laurent, i Xandra O. Breakefield. 2020. „RNA Delivery by Extracellular Vesicles in Mammalian Cells and Its Applications”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (10): 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>.
- 227) Ohtsuka, Masato, Masahiro Sato, Hiromi Miura, Shuji Takabayashi, Makoto Matsuyama, Takayuki Koyano, Naomi Arifin, Shingo Nakamura, Kenta Wada, i Channabasavaiah

- B. Gurumurthy. 2018. „I-GONAD: A Robust Method for in Situ Germline Genome Engineering Using CRISPR Nucleases”. *Genome Biology* 19 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1400-x>.
- 228) Okada, Chimari, Eiki Yamashita, Soo Jae Lee, Satoshi Shibata, Jun Katahira, Atsushi Nakagawa, Yoshihiro Yoneda, i Tomitake Tsukihara. 2009. „A High-Resolution Structure of the Pre-MicroRNA Nuclear Export Machinery”. *Science* 326 (5957): 1275–79. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>.
- 229) Okada, Hironori, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Yukihiko Baba, Sumiko Watanabe, Shin'ichi Takeda, i Takashi Okada. 2013. „Robust Long-Term Transduction of Common Marmoset Neuromuscular Tissue With RAAV1 and RAAV9”. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2: e95. <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.21>.
- 230) Ollmann, Michael M., Brent D. Wilson, Ying-Kui Yang, Julie A. Kerns, Yanru Chen, Ira Gantz, i Gregory S. Barsh. 1997. „Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein”. *Science* 278 (5335): 135–38. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135>.
- 231) Olofsson, Louise E., Andrew A. Pierce, i Allison W. Xu. 2009. „Functional Requirement of AgRP and NPY Neurons in Ovarian Cycle-Dependent Regulation of Food Intake”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (37): 15932–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904747106>.
- 232) Oncul, Merve, Pelin Dilsiz, Edanur Ates Oz, Tayfun Ates, Iltan Aklan, Esref Celik, Nilufer Sayar Atasoy, i Deniz Atasoy. 2018. „Impaired Melanocortin Pathway Function in Prader–Willi Syndrome Gene-Magel2 Deficient Mice”. *Human Molecular Genetics* 27 (18): 3129–36. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy216>.
- 233) Orban, P. C., D. Chui, i J. D. Marth. 1992. „Tissue- and Site-Specific DNA Recombination in Transgenic Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (15): 6861–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6861>.
- 234) Padilla, Stephanie L, Jill S Carmody, i Lori M Zeltser. 2010. „Pomc-Expressing Progenitors Give Rise to Antagonistic Neuronal Populations in Hypothalamic Feeding Circuits”. *Nature Medicine* 16 (4): 403–5. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>.
- 235) Pak, Toni R., Yathindar S. Rao, Sarah A. Prins, i Natasha N. Mott. 2013. „An Emerging Role for MicroRNAs in Sexually Dimorphic Neurobiological Systems”. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465 (5): 655–67. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1227-y>.
- 236) Park, Seongjoon, Toshimitsu Komatsu, Sang Eun Kim, Katsuya Tanaka, Hiroko Hayashi, Ryoichi Mori, i Isao Shimokawa. 2017. „Neuropeptide Y Resists Excess Loss of Fat by Lipolysis in Calorie-Restricted Mice: A Trait Potential for the Life-Extending Effect of Calorie Restriction”. *Aging Cell* 16 (2): 339–48. <https://doi.org/10.1111/acel.12558>.

- 237) Park, Yongsoo. 2017. „MicroRNA Exocytosis by Vesicle Fusion in Neuroendocrine Cells”. *Frontiers in Endocrinology* 8 (grudzień): 355. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00355>.
- 238) Pasquinelli, Amy E., Brenda J. Reinhart, Frank Slack, Mark Q. Martindale, Mitzi I. Kuroda, Betsy Maller, David C. Hayward, i in. 2000. „Conservation of the Sequence and Temporal Expression of Let-7 Heterochronic Regulatory RNA”. *Nature* 408 (6808): 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>.
- 239) Pedragosa-Badia, Xavier, Jan Stichel, i Annette G. Beck-Sickinger. 2013. „Neuropeptide Y Receptors: How to Get Subtype Selectivity”. *Frontiers in Endocrinology* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00005>.
- 240) Pennock, Reagan L, Matthew S Dicken, i Shane T Hentges. b.d. „Multiple Inhibitory G-Protein-Coupled Receptors Resist Acute Desensitization in the Presynaptic But Not Postsynaptic Compartments of Neurons”, 9.
- 241) Perry, Rachel J., Jon M. Resch, Amelia M. Douglass, Joseph C. Madara, Aviva Rabin-Court, Hakan Kucukdereli, Chen Wu, Joongyu D. Song, Bradford B. Lowell, i Gerald I. Shulman. 2019. „Leptin’s Hunger-Suppressing Effects Are Mediated by the Hypothalamic–Pituitary–Adrenocortical Axis in Rodents”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (27): 13670–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901795116>.
- 242) Picciotto, Marina R., i Kevin Wickman. 1998. „Using Knockout and Transgenic Mice to Study Neurophysiology and Behavior”. *Physiological Reviews* 78 (4): 1131–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1131>.
- 243) Pillay, S., N. L. Meyer, A. S. Puschnik, O. Davulcu, J. Diep, Y. Ishikawa, L. T. Jae, i in. 2016. „An Essential Receptor for Adeno-Associated Virus Infection”. *Nature* 530 (7588): 108–12. <https://doi.org/10.1038/nature16465>.
- 244) Pinto, Shirly, Aaron G. Roseberry, Hongyan Liu, Sabrina Diano, Marya Shanabrough, Xiaoli Cai, Jeffrey M. Friedman, i Tamas L. Horvath. 2004. „Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin”. *Science* 304 (5667): 110–15. <https://doi.org/10.1126/science.1089459>.
- 245) Pourcel, C., G. Salvignol, i G. Vergnaud. 2005. „CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies”. *Microbiology* 151 (3): 653–63. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
- 246) Prevot, Vincent, Bénédicte Dehouck, Ariane Sharif, Philippe Ciofi, Paolo Giacobini, i Jerome Clasadonte. 2018. „The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism”. *Endocrine Reviews* 39 (3): 333–68. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00235>.
- 247) Qian, Su, Howard Chen, Drew Weingarh, Myrna E. Trumbauer, Dawn E. Novi, Xiaoming Guan, Hong Yu, i in. 2002. „Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice”. *Molecular and*

- Cellular Biology* 22 (14): 5027–35. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.14.5027-5035.2002>.
- 248) Quadros, Rolen M., Hiromi Miura, Donald W. Harms, Hisako Akatsuka, Takehito Sato, Tomomi Aida, Ronald Redder, i in. 2017. „Easi-CRISPR: A Robust Method for One-Step Generation of Mice Carrying Conditional and Insertion Alleles Using Long SsDNA Donors and CRISPR Ribonucleoproteins”. *Genome Biology* 18 (1): 92. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1220-4>.
- 249) Ran, F Ann, Patrick D Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A Scott, i Feng Zhang. 2013. „Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System”. *Nature Protocols* 8 (11): 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- 250) Rau, Andrew R., i Shane T. Hentges. 2017. „The Relevance of AgRP Neuron-Derived GABA Inputs to POMC Neurons Differs for Spontaneous and Evoked Release”. *The Journal of Neuroscience* 37 (31): 7362–72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0647-17.2017>.
- 251) Reinhart, Brenda J., Frank J. Slack, Michael Basson, Amy E. Pasquinelli, Jill C. Bettinger, Ann E. Rougvie, H. Robert Horvitz, i Gary Ruvkun. 2000. „The 21-Nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*”. *Nature* 403 (6772): 901–6. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
- 252) Rezai Amin, Sara, Carole Gruszczynski, Bruno P. Guiard, Jacques Callebert, Jean-Marie Launay, Franck Louis, Catalina Betancur, Vincent Vialou, i Sophie Gautron. 2019. „Viral Vector-mediated Cre Recombinase Expression in Substantia Nigra Induces Lesions of the Nigrostriatal Pathway Associated with Perturbations of Dopamine-related Behaviors and Hallmarks of Programmed Cell Death”. *Journal of Neurochemistry* 150 (3): 330–40. <https://doi.org/10.1111/jnc.14684>.
- 253) Roden, Christine, Jonathan Gaillard, Shaveta Kanoria, William Rennie, Syndi Barish, Jijun Cheng, Wen Pan, i in. 2017. „Novel Determinants of Mammalian Primary MicroRNA Processing Revealed by Systematic Evaluation of Hairpin-Containing Transcripts and Human Genetic Variation”. *Genome Research* 27 (3): 374–84. <https://doi.org/10.1101/gr.208900.116>.
- 254) Rodríguez, Esteban M., Juan L. Blázquez, i Montserrat Guerra. 2010. „The Design of Barriers in the Hypothalamus Allows the Median Eminence and the Arcuate Nucleus to Enjoy Private Milieus: The Former Opens to the Portal Blood and the Latter to the Cerebrospinal Fluid”. *Peptides* 31 (4): 757–76. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.01.003>.
- 255) Romanov, Roman A, Amit Zeisel, Joanne Bakker, Fatima Girach, Arash Hellysaz, Raju Tomer, Alán Alpár, i in. 2017. „Molecular Interrogation of Hypothalamic Organization Reveals Distinct Dopamine Neuronal Subtypes”. *Nature Neuroscience* 20 (2): 176–88. <https://doi.org/10.1038/nn.4462>.
- 256) Romanova, Irina V., Kira V. Derkach, Anastasiya L. Mikhrina, Ivan B. Sukhov, Elena V. Mikhailova, i Alexander O. Shpakov. 2018. „The Leptin, Dopamine and Serotonin

- Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents”. *Neurochemical Research* 43 (4): 821–37. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>.
- 257) Roth, Bryan L. 2016. „DREADDs for Neuroscientists”. *Neuron* 89 (4): 683–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>.
- 258) Saito, Kuniaki, Akira Ishizuka, Haruhiko Siomi, i Mikiko C Siomi. 2005. „Processing of Pre-MicroRNAs by the Dicer-1–Loquacious Complex in Drosophila Cells”. Zredagowane przez James C. Carrington. *PLoS Biology* 3 (7): e235. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030235>.
- 259) Salegio, E A, L Samaranch, A P Kells, G Mittermeyer, W San Sebastian, S Zhou, J Beyer, J Forsayeth, i K S Bankiewicz. 2013. „Axonal Transport of Adeno-Associated Viral Vectors Is Serotype-Dependent”. *Gene Therapy* 20 (3): 348–52. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.27>.
- 260) Saliminejad, Kioomars, Hamid Reza Khorram Khorshid, Shahrzad Soleymani Fard, i Seyed Hamidollah Ghaffari. 2019. „An Overview of MicroRNAs: Biology, Functions, Therapeutics, and Analysis Methods”. *Journal of Cellular Physiology* 234 (5): 5451–65. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>.
- 261) Sandoval, Alfredo, Hajira Elahi, i Jonathan E. Ploski. 2020. „Genetically Engineering the Nervous System with CRISPR-Cas”. *Eneuro* 7 (2): ENEURO.0419-19.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0419-19.2020>.
- 262) Sauer, B., i N. Henderson. 1988. „Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (14): 5166–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5166>.
- 263) Schneeberger, Marc, Jordi Altirriba, Ainhoa García, Yaiza Esteban, Carlos Castaño, Montserrat García-Lavandeira, Clara V. Alvarez, Ramon Gomis, i Marc Claret. 2013. „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) Schwartz, Michael W, Denis G Baskin, Thomas R Bukowski, Joseph L Kuijper, Donald Foster, Gerry Lasser, Donna E Prunkard, i in. 1996. „Specificity of Leptin Action on Elevated Blood Glucose Levels and Hypothalamic Neuropeptide Y Gene Expression in Ob/Ob Mice” 45: 5.
- 265) Schwartz, Michael W., Stephen C. Woods, Daniel Porte, Randy J. Seeley, i Denis G. Baskin. 2000. „Central Nervous System Control of Food Intake”. *Nature* 404 (6778): 661–71. <https://doi.org/10.1038/35007534>.
- 266) Schwarz, Dianne S., György Hutvágner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, i Phillip D. Zamore. 2003. „Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex”. *Cell* 115 (2): 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1).

- 267) Seiler, Michael P, Dr A Dusty Miller, Joseph Zabner, i Christine L Halbert. b.d. „Adeno-Associated Virus Types 5 and 6 Use Distinct Receptors for Cell Entry”. *Human Gene Therapy*, 10.
- 268) Sengupta, Ayesha, Marco Bocchio, David M. Bannerman, Trevor Sharp, i Marco Capogna. 2017. „Control of Amygdala Circuits by 5-HT Neurons via 5-HT and Glutamate Cotransmission”. *The Journal of Neuroscience* 37 (7): 1785–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2238-16.2016>.
- 269) Serrenho, Débora, Sandra D. Santos, i Ana Luísa Carvalho. 2019. „The Role of Ghrelin in Regulating Synaptic Function and Plasticity of Feeding-Associated Circuits”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (maj): 205. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00205>.
- 270) Shankar, Kripa, Deepali Gupta, Bharath K. Mani, Brianna G. Findley, Caleb C. Lord, Sherri Osborne-Lawrence, Nathan P. Metzger, i in. 2020. „Acyl-Ghrelin Is Permissive for the Normal Counterregulatory Response to Insulin-Induced Hypoglycemia”. *Diabetes* 69 (2): 228–37. <https://doi.org/10.2337/db19-0438>.
- 271) Shen, Shen, Kelli D. Bryant, Sarah M. Brown, Scott H. Randell, i Aravind Asokan. 2011. „Terminal N-Linked Galactose Is the Primary Receptor for Adeno-Associated Virus 9”. *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 13532–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210922>.
- 272) Shin, Andrew C., Nika Filatova, Claudia Lindtner, Tiffany Chi, Seta Degann, Douglas Oberlin, i Christoph Buettner. 2017. „Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action”. *Diabetes* 66 (6): 1560–71. <https://doi.org/10.2337/db16-1238>.
- 273) Shomron, Noam, David Golan, i Eran Hornstein. 2009. „An Evolutionary Perspective of Animal MicroRNAs and Their Targets”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2009/594738>.
- 274) Shrock, Ellen, i Marc Güell. 2017. „CRISPR in Animals and Animal Models”. W *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 152:95–114. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.010>.
- 275) Shutter, J R, M Graham, A C Kinsey, S Scully, R Luthy, i K L Stark. 1997. „Hypothalamic Expression of ART, a Novel Gene Related to Agouti, Is up-Regulated in Obese and Diabetic Mutant Mice.” *Genes & Development* 11 (5): 593–602. <https://doi.org/10.1101/gad.11.5.593>.
- 276) Singh, Chanpreet, Jason Rihel, i David A. Prober. 2017. „Neuropeptide Y Regulates Sleep by Modulating Noradrenergic Signaling”. *Current Biology* 27 (24): 3796-3811.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.018>.
- 277) Small, C J, Y L Liu, S A Stanley, I P Connoley, A Kennedy, M J Stock, i S R Bloom. 2003. „Chronic CNS Administration of Agouti-Related Protein (Agrp) Reduces Energy Expenditure”. *International Journal of Obesity* 27 (4): 530–33. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802253>.

- 278) Sohn, Jong-Woo, i Kevin W. Williams. 2012. „Functional Heterogeneity of Arcuate Nucleus Pro-Opiomelanocortin Neurons: Implications for Diverging Melanocortin Pathways”. *Molecular Neurobiology* 45 (2): 225–33. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8240-6>.
- 279) Sondhi, Dolan, Neil R Hackett, Daniel A Peterson, Jamie Stratton, Michael Baad, Kelly M Travis, James M Wilson, i Ronald G Crystal. 2007. „Enhanced Survival of the LINCL Mouse Following CLN2 Gene Transfer Using the Rh.10 Rhesus Macaque-Derived Adeno-Associated Virus Vector”. *Molecular Therapy* 15 (3): 481–91. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300049>.
- 280) Song, Allisa J., i Richard D. Palmiter. 2018. „Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre–Lox System”. *Trends in Genetics* 34 (5): 333–40. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.008>.
- 281) Soolingen, D van, P E de Haas, P W Hermans, P M Groenen, i J D van Embden. 1993. „Comparison of Various Repetitive DNA Elements as Genetic Markers for Strain Differentiation and Epidemiology of Mycobacterium Tuberculosis”. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (8): 1987–95. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.8.1987-1995.1993>.
- 282) Sousa-Ferreira, Lígia, Manuel Garrido, Isabel Nascimento-Ferreira, Clévio Nobrega, Ana Santos-Carvalho, Ana Rita Álvaro, Joana Rosmaninho-Salgado, i in. 2011. „Moderate Long-Term Modulation of Neuropeptide Y in Hypothalamic Arcuate Nucleus Induces Energy Balance Alterations in Adult Rats”. Zredagowane przez Daniel Tomé. *PLoS ONE* 6 (7): e22333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022333>.
- 283) Spanswick, D., M. A. Smith, V. E. Groppi, S. D. Logan, i M. L. J. Ashford. 1997. „Leptin Inhibits Hypothalamic Neurons by Activation of ATP-Sensitive Potassium Channels”. *Nature* 390 (6659): 521–25. <https://doi.org/10.1038/37379>.
- 284) Steculorum, Sophie M., Johan Ruud, Ismene Karakasilioti, Heiko Backes, Linda Engström Ruud, Katharina Timper, Martin E. Hess, i in. 2016. „AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue”. *Cell* 165 (1): 125–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.044>.
- 285) Sternberg, N., i D. Hamilton. 1981. „Bacteriophage P1 Site-Specific Recombination. I. Recombination between LoxP Sites”. *Journal of Molecular Biology* 150 (4): 467–86. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2).
- 286) Sternberg, Samuel H., Benjamin LaFrance, Matias Kaplan, i Jennifer A. Doudna. 2015. „Conformational Control of DNA Target Cleavage by CRISPR–Cas9”. *Nature* 527 (7576): 110–13. <https://doi.org/10.1038/nature15544>.
- 287) Sternson, Scott M., i Deniz Atasoy. 2014. „Agouti-Related Protein Neuron Circuits That Regulate Appetite”. *Neuroendocrinology* 100 (2–3): 95–102. <https://doi.org/10.1159/000369072>.
- 288) Sternson, Scott M., i Anne-Kathrin Eiselt. 2017. „Three Pillars for the Neural Control of Appetite”. *Annual Review of Physiology* 79 (1): 401–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-104948>.

- 289) Stincic, Todd L., Oline K. Rønnekleiv, i Martin J. Kelly. 2018. „Diverse Actions of Estradiol on Anorexigenic and Orexigenic Hypothalamic Arcuate Neurons”. *Hormones and Behavior* 104 (sierpień): 146–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.001>.
- 290) Su, Zhenwei, Amber L. Alhadeff, i J. Nicholas Betley. 2017. „Nutritive, Post-Ingestive Signals Are the Primary Regulators of AgRP Neuron Activity”. *Cell Reports* 21 (10): 2724–36. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.036>.
- 291) Su, Zhenyi, Zuozhang Yang, Yongqing Xu, Yongbin Chen, i Qiang Yu. 2015. „MicroRNAs in Apoptosis, Autophagy and Necroptosis”. *Oncotarget* 6 (11): 8474–90. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3523>.
- 292) Summerford, Candace, i Richard Jude Samulski. 1998. „Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions”. *Journal of Virology* 72 (2): 1438–45. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1438-1445.1998>.
- 293) Sumner-Jones, S G, L A Davies, A Varathalingam, D R Gill, i S C Hyde. 2006. „Long-Term Persistence of Gene Expression from Adeno-Associated Virus Serotype 5 in the Mouse Airways”. *Gene Therapy* 13 (24): 1703–13. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302815>.
- 294) Sun, Haojie, Su Fu, Shuang Cui, Xiangsha Yin, Xiaoyan Sun, Xuetao Qi, Kun Cui, i in. 2020. „Development of a CRISPR-SaCas9 System for Projection- and Function-Specific Gene Editing in the Rat Brain”. *Science Advances* 6 (12): eaay6687. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6687>.
- 295) Sun, Yuxiang, Nancy F. Butte, Jose M. Garcia, i Roy G. Smith. 2008. „Characterization of Adult Ghrelin and Ghrelin Receptor Knockout Mice under Positive and Negative Energy Balance”. *Endocrinology* 149 (2): 843–50. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0271>.
- 296) Szczelkun, Mark D., Maria S. Tikhomirova, Tomas Sinkunas, Giedrius Gasiunas, Tautvydas Karvelis, Patrizia Pschera, Virginijus Siksnys, i Ralf Seidel. 2014. „Direct Observation of R-Loop Formation by Single RNA-Guided Cas9 and Cascade Effector Complexes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (27): 9798–9803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402597111>.
- 297) Takahashi, Kanji A., i Roger D. Cone. 2005. „Fasting Induces a Large, Leptin-Dependent Increase in the Intrinsic Action Potential Frequency of Orexigenic Arcuate Nucleus Neuropeptide Y/Agouti-Related Protein Neurons”. *Endocrinology* 146 (3): 1043–47. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1397>.
- 298) Tan, Keith, Zachary A. Knight, i Jeffrey M. Friedman. 2014. „Ablation of AgRP Neurons Impairs Adaption to Restricted Feeding”. *Molecular Metabolism* 3 (7): 694–704. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.002>.
- 299) Tang-Christensen, Mads, Niels Vrang, Sylvia Ortmann, Martin Bidlingmaier, Tamas L. Horvath, i Matthias Tschöp. 2004. „Central Administration of Ghrelin and Agouti-Related Protein (83–132) Increases Food Intake and Decreases Spontaneous Locomotor

- Activity in Rats". *Endocrinology* 145 (10): 4645–52. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0529>.
- 300) Tanzer, Andrea, i Peter F Stadler. 2004. „Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster". *Journal of Molecular Biology* 339 (2): 327–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065>.
- 301) Tervo, D. Gowanlock R., Bum-Yeol Hwang, Sarada Viswanathan, Thomas Gaj, Maria Lavzin, Kimberly D. Ritola, Sarah Lindo, i in. 2016. „A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons". *Neuron* 92 (2): 372–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.021>.
- 302) Thaker, Vidhu V. 2018. „GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY", 26.
- 303) Tong, Qingchun, Chian-Ping Ye, Juli E Jones, Joel K Elmquist, i Bradford B Lowell. 2008. „Synaptic Release of GABA by AgRP Neurons Is Required for Normal Regulation of Energy Balance". *Nature Neuroscience* 11 (9): 998–1000. <https://doi.org/10.1038/nn.2167>.
- 304) Top, Marco van den, Kevin Lee, Andrew D Whyment, Andrew M Blanks, i David Spanswick. 2004. „Orexigen-Sensitive NPY/AgRP Pacemaker Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus". *Nature Neuroscience* 7 (5): 493–94. <https://doi.org/10.1038/nn1226>.
- 305) Trotta, Milagros, Estefanía Pilar Bello, Ramiro Alsina, María Belén Tavella, José Luis Ferrán, Marcelo Rubinstein, i Viviana Florencia Bumashny. 2020. „Hypothalamic Pomc Expression Restricted to GABAergic Neurons Suppresses Npy Overexpression and Restores Food Intake in Obese Mice". *Molecular Metabolism* 37 (lipiec): 100985. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.100985>.
- 306) Tschöp, Matthias, David L. Smiley, i Mark L. Heiman. 2000. „Ghrelin Induces Adiposity in Rodents". *Nature* 407 (6806): 908–13. <https://doi.org/10.1038/35038090>.
- 307) Tsien, Joe Z, Dong Feng Chen, David Gerber, Cindy Tom, Eric H Mercer, David J Anderson, Mark Mayford, Eric R Kandel, i Susumu Tonegawa. 1996. „Subregion- and Cell Type–Restricted Gene Knockout in Mouse Brain". *Cell* 87 (7): 1317–26. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81826-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81826-7).
- 308) Tüfekci, Kemal Uğur, Ralph Leo Johan Meuwissen, i Şermin Genç. 2014. „The Role of MicroRNAs in Biological Processes". W *MiRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, zredagowane przez Malik Yousef i Jens Allmer, 1107:15–31. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_2.
- 309) Tye, Kay M., i Karl Deisseroth. 2012. „Optogenetic Investigation of Neural Circuits Underlying Brain Disease in Animal Models". *Nature Reviews Neuroscience* 13 (4): 251–66. <https://doi.org/10.1038/nrn3171>.

- 310) Varela, Luis, i Tamas L Horvath. 2012. „Leptin and Insulin Pathways in POMC and AgRP Neurons That Modulate Energy Balance and Glucose Homeostasis”. *EMBO Reports* 13 (12): 1079–86. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>.
- 311) Vinnikov, I. A., K. Hajdukiewicz, J. Reymann, J. Beneke, R. Czajkowski, L. C. Roth, M. Novak, i in. 2014. „Hypothalamic MiR-103 Protects from Hyperphagic Obesity in Mice”. *Journal of Neuroscience* 34 (32): 10659–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4251-13.2014>.
- 312) Vong, Linh, Chianping Ye, Zongfang Yang, Brian Choi, Streamson Chua, i Bradford B. Lowell. 2011. „Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons”. *Neuron* 71 (1): 142–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>.
- 313) Wakiyama, M., K. Takimoto, O. Ohara, i S. Yokoyama. 2007. „Let-7 MicroRNA-Mediated mRNA Deadenylation and Translational Repression in a Mammalian Cell-Free System”. *Genes & Development* 21 (15): 1857–62. <https://doi.org/10.1101/gad.1566707>.
- 314) Wall, Esther van de, Rebecca Leshan, Allison W. Xu, Nina Balthasar, Roberto Coppari, Shun Mei Liu, Young Hwan Jo, i in. 2008. „Collective and Individual Functions of Leptin Receptor Modulated Neurons Controlling Metabolism and Ingestion”. *Endocrinology* 149 (4): 1773–85. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1132>.
- 315) Wang, Daqing, Xiaobing He, Zhe Zhao, Qiru Feng, Rui Lin, Yue Sun, Ting Ding, Fuqiang Xu, Minmin Luo, i Cheng Zhan. 2015. „Whole-Brain Mapping of the Direct Inputs and Axonal Projections of POMC and AgRP Neurons”. *Frontiers in Neuroanatomy* 9 (marzec). <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00040>.
- 316) Wang, Kun, Wei Mao, Xiaoyu Zhang, Yufei Zhao, Kuikui Fan, Deng Pan, Haodong Liu, Penghui Li, Rihan Hai, i Chenguang Du. 2020. „Neuroanatomy of Melanocortin-4 Receptor Pathway in the Mouse Brain”. *Open Life Sciences* 15 (1): 580–87. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0063>.
- 317) Wang, Qian, Chen Liu, Aki Uchida, Jen-Chieh Chuang, Angela Walker, Tiemin Liu, Sherri Osborne-Lawrence, i in. 2014. „Arcuate AgRP Neurons Mediate Orexigenic and Glucoregulatory Actions of Ghrelin”. *Molecular Metabolism* 3 (1): 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.001>.
- 318) Wang, Xinjun, Chunzhao Zhang, Gábor Szábo, i Qian-Quan Sun. 2013. „Distribution of CaMKII α Expression in the Brain in Vivo, Studied by CaMKII α -GFP Mice”. *Brain Research* 1518 (czerwiec): 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>.
- 319) Wang, Yangming, Rostislav Medvid, Collin Melton, Rudolf Jaenisch, i Robert Blelloch. 2007. „DGCR8 Is Essential for MicroRNA Biogenesis and Silencing of Embryonic Stem Cell Self-Renewal”. *Nature Genetics* 39 (3): 380–85. <https://doi.org/10.1038/ng1969>.
- 320) Watson, Charles, George Paxinos, i L. Puelles, red. 2012. *The Mouse Nervous System*. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.

- 321) Wei, Chao, Xiao Han, Danwei Weng, Qiru Feng, Xiangbing Qi, Jin Li, i Minmin Luo. 2018. „Response Dynamics of Midbrain Dopamine Neurons and Serotonin Neurons to Heroin, Nicotine, Cocaine, and MDMA”. *Cell Discovery* 4 (1): 60. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0060-z>.
- 322) Wickersham, Ian R., David C. Lyon, Richard J.O. Barnard, Takuma Mori, Stefan Finke, Karl-Klaus Conzelmann, John A.T. Young, i Edward M. Callaway. 2007. „Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons”. *Neuron* 53 (5): 639–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.033>.
- 323) Wiepkema, P.R. 1971. „Positive Feedbacks At Work During Feeding”. *Behaviour* 39 (2–4): 266–73. <https://doi.org/10.1163/156853971X00258>.
- 324) Wierup, N., W.G. Richards, A.W. Bannon, M.J. Kuhar, B. Ahrén, i F. Sundler. 2005. „CART Knock out Mice Have Impaired Insulin Secretion and Glucose Intolerance, Altered Beta Cell Morphology and Increased Body Weight”. *Regulatory Peptides* 129 (1–3): 203–11. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.02.016>.
- 325) Wightman, B., I. Ha, i G. Ruvkun. 1993. „Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*”. *Cell* 75 (5): 855–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4).
- 326) Winnubst, Johan, Erhan Bas, Tiago A. Ferreira, Zhuhao Wu, Michael N. Economo, Patrick Edson, Ben J. Arthur, i in. 2019. „Reconstruction of 1,000 Projection Neurons Reveals New Cell Types and Organization of Long-Range Connectivity in the Mouse Brain”. *Cell* 179 (1): 268–281.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.042>.
- 327) Wojda, Urszula. 2016. „Alzheimer’s Disease Lymphocytes: Potential for Biomarkers?” *Biomarkers in Medicine* 10 (1): 1–4. <https://doi.org/10.2217/bmm.15.79>.
- 328) Wörner, Tobias P., Antonette Bennett, Sana Habka, Joost Snijder, Olga Friese, Thomas Powers, Mavis Agbandje-McKenna, i Albert J. R. Heck. 2021. „Adeno-Associated Virus Capsid Assembly Is Divergent and Stochastic”. *Nature Communications* 12 (1): 1642. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21935-5>.
- 329) Wortley, Katherine E., Keith D. Anderson, Jason Yasenchak, Andrew Murphy, David Valenzuela, Sabrina Diano, George D. Yancopoulos, Stanley J. Wiegand, i Mark W. Sleeman. 2005. „Agouti-Related Protein-Deficient Mice Display an Age-Related Lean Phenotype”. *Cell Metabolism* 2 (6): 421–27. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.11.004>.
- 330) Wu, Qi, Maureen P. Boyle, i Richard D. Palmiter. 2009. „Loss of GABAergic Signaling by AgRP Neurons to the Parabrachial Nucleus Leads to Starvation”. *Cell* 137 (7): 1225–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.022>.
- 331) Wu, Zhijian, Edward Miller, Mavis Agbandje-McKenna, i Richard Jude Samulski. 2006. „A2,3 and A2,6 N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6”. *Journal of Virology* 80 (18): 9093–9103. <https://doi.org/10.1128/JVI.00895-06>.

- 332) Xie, Mingyi, Mingfeng Li, Anna Vilborg, Nara Lee, Mei-Di Shu, Valeria Yartseva, Nenad Šestan, i Joan A. Steitz. 2013. „Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors That Generate a Single MicroRNA”. *Cell* 155 (7): 1568–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>.
- 333) Xu, Jie, Christopher L. Bartolome, Cho Shing Low, Xinchu Yi, Cheng-Hao Chien, Peng Wang, i Dong Kong. 2018. „Genetic Identification of Leptin Neural Circuits in Energy and Glucose Homeostases”. *Nature* 556 (7702): 505–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0049-7>.
- 334) Xu, Wenlong, Anthony San Lucas, Zixing Wang, i Yin Liu. 2014. „Identifying MicroRNA Targets in Different Gene Regions”. *BMC Bioinformatics* 15 (S7): S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S4>.
- 335) Yang, Yunlei, Deniz Atasoy, Helen H. Su, i Scott M. Sternson. 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>.
- 336) Yarmolinsky, Michael, i Ronald Hoess. 2015. „The Legacy of Nat Sternberg: The Genesis of Cre- *Lox* Technology”. *Annual Review of Virology* 2 (1): 25–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-054930>.
- 337) Yaswen, Linda, Nicole Diehl, Miles B. Brennan, i Ute Hochgeschwender. 1999. „Obesity in the Mouse Model of Pro-Opiomelanocortin Deficiency Responds to Peripheral Melanocortin”. *Nature Medicine* 5 (9): 1066–70. <https://doi.org/10.1038/12506>.
- 338) Yi, Min, Hekai Li, Zhiye Wu, Jianyun Yan, Qicai Liu, Caiwen Ou, i Minsheng Chen. 2018. „A Promising Therapeutic Target for Metabolic Diseases: Neuropeptide Y Receptors in Humans”. *Cellular Physiology and Biochemistry* 45 (1): 88–107. <https://doi.org/10.1159/000486225>.
- 339) Yizhar, Ofer, Lief E. Fenno, Thomas J. Davidson, Murtaza Mogri, i Karl Deisseroth. 2011. „Optogenetics in Neural Systems”. *Neuron* 71 (1): 9–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.004>.
- 340) Young, Andrew R.J., Masako Narita, Manuela Ferreira, Kristina Kirschner, Mahito Sadaie, Jeremy F.J. Darot, Simon Tavaré, i in. 2009. „Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition”. *Genes & Development* 23 (7): 798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709>.
- 341) Zarjevski, N, I Cusin, R Vettor, F Rohner-Jeanrenaud, i B Jeanrenaud. 1993. „Chronic Intracerebroventricular Neuropeptide-Y Administration to Normal Rats Mimics Hormonal and Metabolic Changes of Obesity.”, 6.
- 342) Zdanowicz, Agnieszka, Rolf Thermann, Joanna Kowalska, Jacek Jemielity, Kent Duncan, Thomas Preiss, Edward Darzynkiewicz, i Matthias W. Hentze. 2009. „Drosophila MiR2 Primarily Targets the M7GpppN Cap Structure for Translational Repression”. *Molecular Cell* 35 (6): 881–88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.009>.

- 343) Zhan, C., J. Zhou, Q. Feng, J.-e. Zhang, S. Lin, J. Bao, P. Wu, i M. Luo. 2013. „Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively”. *Journal of Neuroscience* 33 (8): 3624–32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>.
- 344) Zhang, Meijuan, Lijuan Han, i Yun Xu. 2012. „Roles of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript in the Central Nervous System: Roles of CART in the CNS”. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39 (6): 586–92. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05642.x>.
- 345) Zhang, Yingmei, James R. Sowers, i Jun Ren. 2018. „Targeting Autophagy in Obesity: From Pathophysiology to Management”. *Nature Reviews Endocrinology* 14 (6): 356–76. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0009-1>.
- 346) Zheng, Binhai, Marijke Sage, Elizabeth A. Sheppard, Vesna Jurecic, i Allan Bradley. 2000. „Engineering Mouse Chromosomes with Cre- *LoxP*: Range, Efficiency, and Somatic Applications”. *Molecular and Cellular Biology* 20 (2): 648–55. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.648-655.2000>.
- 347) Zhou, Xuefeng, Jianhua Ruan, Guandong Wang, i Weixiong Zhang. 2007. „Characterization and Identification of MicroRNA Core Promoters in Four Model Species”. Zredagowane przez Fran Lewitter. *PLoS Computational Biology* 3 (3): e37. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030037>.
- 348) Zhu, Canjun, Zhiying Jiang, Yuanzhong Xu, Zhao-Lin Cai, Qingyan Jiang, Yong Xu, Mingshan Xue, i in. 2020. „Profound and Redundant Functions of Arcuate Neurons in Obesity Development”. *Nature Metabolism* 2 (8): 763–74. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0229-2>.
- 349) Zigman, Jeffrey M., i Joel K. Elmquist. 2003. „Minireview: From Anorexia to Obesity—The Yin and Yang of Body Weight Control”. *Endocrinology* 144 (9): 3749–56. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0241>.
- 350) Zigman, Jeffrey M., Juli E. Jones, Charlotte E. Lee, Clifford B. Saper, i Joel K. Elmquist. 2006. „Expression of Ghrelin Receptor mRNA in the Rat and the Mouse Brain”. *The Journal of Comparative Neurology* 494 (3): 528–48. <https://doi.org/10.1002/cne.20823>.
- 351) Zimmer, Marcelo R., Antonio H.O. Fonseca, Onur Iyilikci, Rafael Dai Pra, i Marcelo O. Dietrich. 2019. „Functional Ontogeny of Hypothalamic *Agrp* Neurons in Neonatal Mouse Behaviors”. *Cell* 178 (1): 44–59.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.026>.
- 352) Zingg, Brian, Xiao-lin Chou, Zheng-gang Zhang, Lukas Mesik, Feixue Liang, Huizhong Whit Tao, i Li I. Zhang. 2017. „AAV-Mediated Anterograde Transsynaptic Tagging: Mapping Corticocollicular Input-Defined Neural Pathways for Defense Behaviors”. *Neuron* 93 (1): 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.045>.
- 353) Zingg, Brian, Bo Peng, Junxiang Huang, Huizhong W. Tao, i Li I. Zhang. 2020. „Synaptic Specificity and Application of Anterograde Transsynaptic AAV for Probing Neural Circuitry”. *The Journal of Neuroscience* 40 (16): 3250–67. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2158-19.2020>.

8. Supplement

8.1 Źródła finansowania pracy

National Science Centre – OPUS, UMO-2019/35/B/NZ4/02831
Regulation of AgRP hunger stimulating neurons by microRNAs
PI Witold Konopka
2020-2024

Foundation for Polish Science – Team Tech Core Facility Plus – ANIMOD -
Integrated platform for generation and analysis of animal models for biomedical applications
PI Witold Konopka
2018-2019

National Science Centre „SONATA”, UMO-201101/D/NZ4/03744
Identification of brain specific non-coding microRNAs in mice: 1 - regulating a synaptic
plasticity in learning&memory and 2 - controlling an Insulin-mTOR signalling pathway in
neurons responsible for development of obesity syndrome
PI Witold Konopka
2012-2017

8.2 Dorobek naukowy doktorantki

Publikacje zawarte w niniejszej rozprawie:

Ilya A. Vinnikov, Karolina **Hajdukiewicz**, Jurgen Reymann, Jurgen Beneke, Rafał Czajkowski, Lena C. Roth, Martin Novak, i in. 2014. „Hypothalamic MiR-103 Protects from Hyperphagic Obesity in Mice”. *Journal of Neuroscience* 34 (32): 10659–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4251-13.2014>.

Pozostałe publikacje:

Xu Yang, Karolina **Hajdukiewicz**, Anshul Tiwari, Joanna Przybyś, Jan Rodriguez Parkitna, Martin Novak, Ilya A. Vinnikov, Günther Schütz, i Witold Konopka. 2020. „MicroRNAs Are Indispensable for the Proliferation and Differentiation of Adult Neural Progenitor Cells in Mice”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 530 (1): 209–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.143>.

Akhan Iltan, Nilufer Sayar Atasoy, Yavuz Yavuz, Tayfun Ates, Ilknur Coban, Fulya Koksalar, Gizem Filiz, Karolina **Hajdukiewicz**, Witold Konopka, i in. 2020. „NTS Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger via Medial Hypothalamic Feeding Pathways”. *Cell Metabolism* 31 (2): 313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.016>.

Karolina Podolska, Agnieszka Lipiec, Karolina **Hajdukiewicz**, Helena Łubkowska, Maciej Małcki. 2013. “Sonic hedgehog stimulates the recruitment of endothelial progenitor cells.” *Developmental Period Medicine* 17 (2): 151-156.

Karolina **Hajdukiewicz**, Anna Stachurska, Robert Proczka, Maciej Malecki. 2013. "Study of angiogenic gene ointments designed for skin neovascularization." *Developmental Period Medicine* 17 (1): 31-36.

Karolina Podolska, Anna Stachurska, Karolina **Hajdukiewicz**, Maciej Malecki. 2012. "Gene therapy prospects: intranasal delivery of gene preparations." *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 21 (4): 525-534. <https://advances.umw.edu.pl/pdf/2012/21/4/525.pdf>

Danjuta Zapolska-Downar, Dorota Bryk, Maciej Małecki, Karolina **Hajdukiewicz**, i Dariusz Sitkiewicz. 2012. „Aronia Melanocarpa Fruit Extract Exhibits Anti-Inflammatory Activity in Human Aortic Endothelial Cells”. *European Journal of Nutrition* 51 (5): 563–72. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0240-1>.

Dorota Bryk, Danuta Zapolska-Downar, Maciej Malecki, Karolina **Hajdukiewicz**, Dariusz Sitkiewicz. 2011. „ Trans fatty acids induce a proinflammatory response in endothelial cells through ROS-dependent nuclear factor-κB activation.” *Journal of physiology and pharmacology* 62 (2): 229-238

Małgorzata Rydzanicz, Karolina **Cywińska**, Maciej Wróbel, Agnieszka Pollak, Wojciech Gawęcki, Irena Wojsyk-Banaszak, Urszula Lechowicz i in. 2011. „The Contribution of the Mitochondrial COI/TRNASer(UCN) Gene Mutations to Non-Syndromic and Aminoglycoside-Induced Hearing Loss in Polish Patients”. *Molecular Genetics and Metabolism* 104 (1–2): 153–59. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.05.004>.

Małgorzata Rydzanicz, Maciej Wróbel, Karolina **Cywińska**, Dominika Froehlich, Wojciech Gawęcki, Witold Szyfter i Krzysztof Szyfter. 2009. „Screening of the General Polish Population for Deafness-Associated Mutations in Mitochondrial *12S rRNA* and *tRNA^{Ser(UCN)}* Genes”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 13 (2): 167–72. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2008.0098>.