

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk



PRACA DOKTORSKA

**Wybrane polimorfizmy genu *UCPI*, badanie ich znaczenia
funkcjonalnego i związku z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu
metabolicznego**

*Selected polymorphisms in UCPI gene, study of its functional significance
and association with the risk of obesity and metabolic syndrome*

Agata Witkowicz

Promotor: **dr hab. Lidia Karabon, prof. instytutu**

Zakład Terapii Doświadczalnej

Laboratorium Genetyki i Epigenetyki Chorób Człowieka

Wrocław 2022

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania:

*Mojej Pani Promotor, **dr hab. Lidii Karabon**, za wprowadzenie mnie do świata nauki, wieloletnią opiekę, cenne rady i wskazówki, ogromną życzliwość oraz cierpliwość, za okazane mi zaufanie, nieocenione wsparcie merytoryczne i psychiczne oraz za czas poświęcony podczas przygotowywania niniejszej rozprawy.*

***Dr hab. Łukaszowi Łaczmąnskiemu** za wskazówki oraz pomoc przy sekwencjonowaniu NGS.*

***Partnerom projektu U-GENE** za wspólną pracę nad projektem oraz możliwość poznania obyczajów i tradycji panujących w ich krajach.*

*Koleżankom z Laboratorium Genetyki i Epigenetyki Chorób Człowieka, a w szczególności **mgr Annie Tomkiewicz**, **mgr Annie Partyce** oraz **mgr Annie Andrzejczak**, za otrzymaną pomoc i wsparcie oraz za stworzenie miłej i życzliwej atmosfery w pracy.*

Rodzicom i najbliższym za cierpliwość.

Badania będące przedmiotem mojej pracy doktorskiej zostały przeprowadzone w ramach realizacji międzynarodowego projektu **IRSES** (International Research Staff Exchange Scheme) w ramach 7 Programu Ramowego UE, działania Marie-Curie, People, pt.: *„Multinational network of excellence for research on genetic predisposition to cardio-metabolic disorders due to UCP1 gene polymorphisms“*

oraz

projektu współfinansowanego Nr W15/7.PR/2016 *„Międzynarodowa sieć doskonałości dla badań nad predyspozycją do rozwoju chorób układu krążenia i zaburzeń metabolicznych uwarunkowaną polimorfizmami genu UCP1” – U-GENE*

Publikacje oraz doniesienia zjazdowe dotyczące pracy doktorskiej

Publikacje:

1. Stosio M, Witkowicz A, Kowalska A, Karabon L. Genetic background of aberrant thermogenin expression (UCP1) in obesity leading to metabolic syndrome. *Postępy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 2016; 70:1389-1403.
2. Margaryan S, Witkowicz A, Partyka A, Yepiskoposyan L, Manukyan G, Karabon L. The mRNA expression levels of uncoupling proteins 1 and 2 in mononuclear cells from patients with metabolic disorders: obesity and type 2 diabetes mellitus. *Postępy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 2017;71(0):895-900.
doi:10.5604/01.3001.0010.5386
3. Dinas PC., Nintou E, Vliora M., Sakellariou P., Pravednikova AE, Witkowicz A, Kachaev ZM, Kerchev VV, Larina SN, Cotton J, Kowalska A, Gkiata P, Bargiota A, Khachatryan ZA, Hovhannisyan AA, Antonosyan MA, Margaryan S, Partyka A, Bogdanski P, Szulinska M, Kregielska-Narozna M, Czepczyński R, Ruchała M, Tomkiewicz, A, Yepiskoposyan, Karabon L, Shidlovskii Y, Metsios GS, Flouris AD. Prevalence of uncoupling protein one genetic polymorphisms and their relationship with cardiovascular and metabolic health. *PLoS One*. 2022 Apr 28;17(4):e0266386. doi: 10.1371/journal.pone.0266386

Konferencje:

1. „*Determination of UCP1 polymorphisms – design, optimization and verification of genotyping methods for the following SNPs: A-3826G, A-1766G, Ala64Thr, Met229Leu*“, konferencja “New Trends in Life Sciences” Erewań, Armenia – prezentacja ustna
2. “Multinational network of excellence for research on genetic predisposition to cardio-metabolic disorders due to UCP1 gene polymorphisms” Międzynarodowe sympozjum „*Metabolic Syndrome: Experiment, Clinics and Treatment*” 30.09-02.10.2015r., Grodno, Białoruś – udział bierny
3. „*The mRNA expression levels of UCP1, UCP2 in peripheral blood of patients with metabolic disorders*” - udział w międzynarodowej konferencji *11th East-West Immunogenetics Conference (EWIC2017)*, 10-11.03.2017, Ołomuniec, Czechy – prezentacja plakatu

4. *“Investigation of functional role of UCPI A-112C (rs10011540) promoter polymorphism – a preliminary study”*- udział w międzynarodowej konferencji organizowanej przez Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 6-11.07.2019, Kraków (Polska) – prezentacja plakatu
5. *„Study on the functional role of A-112C (rs10011540) and A-3826G (rs1800592) polymorphisms in UCPI gene – a preliminary study”* - The 34th European Immunogenetics and Histocompatibility Congress, organizowaną przez Europejską Federację (EFI), 21.04 – 24.04.2021, konferencja online – prezentacja plakatu
6. *“Do selected SNPs modify the transcriptional activity of the UCPI gene?”* - XVII Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, 27-29.05.2021, konferencja online – prezentacja plakatu

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	10
SUMMARY	12
WYKAZ SKRÓTÓW	14
I. WSTĘP.....	18
1.1 Zespół metaboliczny	18
1.1.1 Definicja i kryteria diagnostyczne	18
1.1.2 Epidemiologia	19
1.1.3 Przyczyny powstawania	20
1.2 Tkanka tłuszczowa (WAT i BAT).....	22
1.2.1 Budowa.....	23
1.2.2 Funkcja	25
1.2.3 Regulacja aktywności BAT	26
1.2.4 BAT a otyłość	30
1.3 Termogenina 1 - UCP1	30
1.3.1 Budowa i funkcja białka	31
1.3.2 Regulacja ekspresji genu <i>UCP1</i>	32
1.3.3 Polimorfizmy genu <i>UCP1</i>	34
II. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	38
III. MATERIAŁY	39
3.1 Charakterystyka badanych grup	39
3.1.1 Grupa badana	39
3.1.2 Grupa kontrolna	39
3.1.3 Grupy do badania ekspresji <i>UCP1</i> i <i>UCP2</i>	40
3.2 Linie komórkowe	40
3.3 Odczynniki	41
3.3.1 Startery PCR i sondy TaqMan	41
3.3.2 Enzymy.....	41
3.3.3 Płyny hodowlane.....	42
3.3.4 Bufory.....	42
3.3.5 Wektory	43
3.3.6 Zestawy komercyjne	43
3.3.7 Inne.....	44

3.4	Aparatura	45
IV.	METODY.....	47
4.1	Oznaczanie wybranych polimorfizmów genu <i>UCPI</i>	47
4.1.1	Izolacja DNA z krwi pełnej mrożonej	47
4.1.2	Oznaczanie SNP metodą PCR-RFLP	48
4.1.3	Oznaczanie SNP metodą Real-Time PCR.....	52
4.1.4	Analiza statystyczna.....	53
4.2	Sekwencjonowanie NGS regionu kodującego oraz regionów 5' i 3' genu <i>UCPI</i>	53
4.2.1	Wybór prób.....	54
4.2.2	Przygotowanie bibliotek.....	55
4.2.3	Sekwencjonowanie	57
4.2.4	Bioinformatyczna analiza danych.....	57
4.3	Badanie poziomu ekspresji <i>UCPI</i> i <i>UCP2</i> w PBMC.....	58
4.3.1	Izolacja RNA z PBMC	59
4.3.2	Odwrotna transkrypcja	59
4.3.3	Real-Time PCR – mRNA.....	60
4.3.4	Obliczenia i analiza statystyczna	60
4.4	Badanie funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP zlokalizowanych w rejonie 5' genu <i>UCPI</i> w odniesieniu do aktywności promotorowej.....	61
4.4.1	Hodowle linii komórkowych.....	61
4.4.2	Różnicowanie PAZ6 w kierunku dojrzałych adipocytów BAT	62
4.4.3	Barwienia IF, DAPI oraz Oil Red O	62
4.4.4	Badanie poziomu ekspresji genów <i>UCPI</i> , <i>zic1</i> , <i>β3AR</i> , <i>leptin</i> w BAT w trakcie 28-dniowego różnicowania	64
4.4.5	Badanie aktywności promotorowej genu <i>UCPI</i> w wybranych liniach komórkowych – test lucyferazowy	65
V.	WYNIKI.....	69
5.1	Analiza zmienności genetycznej w genie <i>UCPI</i>	69
5.1.1	Charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej - analiza danych antropometrycznych i biochemicznych badanych grup.....	69
5.1.2	Dystrybucja genotypów SNPs genu <i>UCPI</i> w badanych grupach	71
5.1.3	Analiza związku badanych SNP z ryzykiem zachorowania na MetS.....	74
5.1.4	Porównanie częstości haplotypów badanych SNP	76
5.1.5	Analiza nierównowagi sprzężeń (LD)	77

5.2	Poszukiwanie nowych nieopisanych w literaturze wariantów genu <i>UCP1</i> związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego przy zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS).....	78
5.2.1	Ocena jakości matrycowego DNA użytego do wygenerowania bibliotek.....	79
5.2.2	Ocena jakości wygenerowanych bibliotek	80
5.2.3	Analiza nowo zidentyfikowanych polimorfizmów genu <i>UCP1</i>	81
5.3	Ocena poziomu mRNA <i>UCP1</i> i <i>UCP2</i> w grupie osób z T2DM, otyłych i zdrowych	88
5.3.1	Analiza jakościowa wyizolowanego RNA	88
5.3.2	Analiza poziomu ekspresji <i>UCP1</i> i <i>UCP2</i>	89
5.4	Ocena funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP genu <i>UCP1</i>	90
5.4.1	Ocena poziomu białka UCP1 w trakcie różnicowania linii komórkowej PAZ6	91
5.4.2	Analiza poziomu ekspresji genów markerowych BAT i WAT w trakcie różnicowania linii komórkowej PAZ6 oraz genu <i>UCP1</i> w linii HepG2.	94
5.4.3	Analiza aktywności promotorowej genu <i>UCP1</i> mierzonej testem lucyferazowym dla linii komórkowej HepG2	96
5.4.4	Analiza aktywności promotorowej genu <i>UCP1</i> mierzonej testem lucyferazowym dla linii komórkowej PAZ6	100
VI.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	105
VII.	WNIOSKI	120
VIII.	PIŚMIENNICTWO	121
IX.	SPIS RYCIN, TABEL I WYKRESÓW.....	134
9.1	Spis rycin.....	134
9.2	Spis tabel	137
9.3	Spis wykresów	139

STRESZCZENIE

Zespół metaboliczny (MetS), a wraz z nim wszystkie choroby wchodzące w skład tego schorzenia m.in. otyłość, zaburzona gospodarka cukrowa czy lipidowa, występowanie T2DM oraz podwyższone ciśnienie tętnicze, to poważny problem dotykający milionów osób na całym świecie. Pomimo postępu w diagnostyce, leczeniu oraz prewencji, zaburzenia metaboliczne są nadal główną przyczyną śmierci w krajach wysoko rozwiniętych. W dobie epidemii otyłości, badacze na całym świecie od lat starają się jak najlepiej poznać mechanizm powstawania, funkcjonowania i regulacji tkanki tłuszczowej u człowieka. U ssaków tkankę tłuszczową można podzielić na: białą (WAT) oraz brunatną (BAT). WAT odpowiedzialna jest głównie za magazynowanie tłuszczu, natomiast funkcją BAT jest akumulacja energii oraz jej dystrybucja w postaci ciepła w procesie termogenezy bezdrzeniowej. Białkiem odpowiedzialnym za rozpraszanie energii w mitochondriach jest białko termogenina 1 – UCP1.

Istnieje wiele czynników modulujących aktywność termogeniczną BAT, tym samym wpływających na powstawanie białka UCP1, np. ekspozycja na zimno czy styl życia. Stymulacja receptorów β 3-adrenergicznych (np. przez norepinefrynę) powoduje aktywację cykazy adenylanowej oraz wzrost stężenia cAMP, co zapoczątkowuje lipolizę i uwolnienie wysoce specyficznych regulatorów ekspresji i funkcji białka UCP1 w organizmie. Obecność wariantów genetycznych w obrębie genu UCP1 może wpływać na poziom transkrypcji, translacji lub na zmienione właściwości białka i w ich następstwie zmianę funkcji białka, a w konsekwencji może różnicować podatność poszczególnych osób na występowanie otyłości i MetS.

Celem niniejszej pracy było zbadanie związku wybranych polimorfizmów występujących w genie UCP1 z ryzykiem wystąpienia otyłości i MetS w populacji polskiej oraz zbadanie funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP. W tym celu przeprowadzono genotypowanie pięciu SNP *UCP1* wśród grupy kontrolnej oraz osób ze zdiagnozowanym MetS. Test lucyferazowy z wykorzystaniem podwójnych genów reporterowych pozwolił na ocenę funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP regionu 5' *UCP1*. Sprawdzone również poziom mRNA *UCP1* i *UCP2* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) w grupie osób zdrowych oraz z zaburzeniami metabolicznymi (otyłych lub z cukrzycą typu 2 (T2DM)). Dodatkowo przeprowadzono sekwencjonowanie NGS regionu kodującego oraz regionów 5' oraz 3' genu *UCP1*

wybranej liczby prób, w celu poszukiwania nowych, nieopisanych dotąd w literaturze wariantów genetycznych UCP1.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, iż obecność allelu G w miejscu polimorficznym A-3826G genu UCP1 jest związana z mniejszym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego, dla pozostałych SNP: -1766 A/G, -112 A/C, Ala64Thr, Met229Leu nie wykazano związku z ryzykiem wystąpienia MetS w populacji polskiej. Badania funkcjonalne z wykorzystaniem linii komórkowych ekspresjonujących *UCP1*: HepG2 oraz PAZ6 wykazały, iż norepinefryna (NE) ma kluczowe znaczenie w mechanizmie aktywacji UCP1 w komórkach BAT, a obecność allelu zmutowanego (G) w polimorfizmie -3826, znajdującego się w bliskiej odległości wiązania czynników transkrypcyjnych, obniża aktywność tego białka w warunkach stymulujących komórki PAZ6 NE. W niniejszej pracy wykazano, iż PBMC nie ekspresjonują *UCP1* na mierzalnym poziomie, natomiast poziom mRNA *UCP2* w komórkach PBMC u osób z zaburzeniami metabolicznymi jest istotnie niższy niż u osób zdrowych. Sekwencjonowanie NGS pozwoliło na potwierdzenie wcześniejszych wyników genotypowania oraz na identyfikację 39 nowych, potencjalnie najbardziej istotnych polimorfizmów w kontekście MetS lub T2DM.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy wskazują na istotne znaczenie polimorfizmów genu *UCP1* na ryzyko wystąpienia otyłości oraz zespołu metabolicznego.

SUMMARY

Metabolic syndrome (MetS) refers to the co-occurrence of several known metabolic risk factors, including obesity, impaired sugar or lipid metabolism, the presence of type 2 diabetes mellitus (T2DM), and high blood pressure. MetS is a serious problem which affects millions of people around the world. Despite advances that have been made in diagnosis, treatment and prevention, MetS is still the leading cause of death in developed countries. In the era of obesity epidemic, researchers have been trying for years to understand the mechanism of functioning and regulation of adipose tissue. In mammals, adipose tissue can be divided into white (WAT) and brown adipose tissue (BAT). The main role of WAT is fat storage, while BAT accumulates energy and dissipates it in a process called non-shivering thermogenesis. The best-characterized marker of BAT is uncoupling protein 1 (UCP1) which plays a key role in regulating thermogenesis, energy expenditure and oxidative stress protection.

There are many factors that modulate the thermogenic activity of BAT (e.g. cold exposure or lifestyle), subsequently affecting UCP1 expression. Stimulation of β 3-adrenergic receptors (e.g. by norepinephrine) activates adenylate cyclase, causing an increase in cAMP levels that initiates lipolysis and the release of regulators of *UCP1* expression. It is postulated that the *UCP1* gene polymorphisms might be associated with altered transcription, translation and function of the UCP1 protein, leading to disturbances in fat metabolism, followed by increased risk of obesity and MetS.

The aim of this study was to investigate whether there is correlation between selected *UCP1* polymorphisms with the risk of obesity and MetS in the Polish population. Moreover, the functional significance of selected SNPs in terms of promoter activity was verified. A luciferase assay facilitated assessment of the functional significance of selected SNPs in the 5' *UCP1* region. Levels of *UCP1* and *UCP2* mRNA were also analysed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a group of healthy donors, as well as those with metabolic disorders (obesity or T2DM). In addition, NGS sequencing of the coding region and the 5' and 3' regions of the *UCP1* gene was performed to search for new, previously unknown genetic variants of *UCP1*.

The results presented in this study indicate that presence of the G allele at position A-3826G of the *UCP1* gene is associated with a lower risk of MetS. The

remaining SNPs: A-1766G, A-112/C, Ala64Thr, and Met229Leu have not been associated with a risk of developing MetS nor obesity in the Polish population. Functional studies using *UCP1* expressing cell lines: HepG2 and PAZ6, have shown that norepinephrine (NE) plays a key role in the mechanism of UCP1 activation in BAT. Presence of a mutant allele (G) in the -3826 polymorphism, located in close proximity to transcription factor binding sites, reduces the activity of UCP1 (PAZ6 cell line stimulated with NE). In this study, it was shown that PBMC do not express *UCP1* at a measurable level, while the level of *UCP2* mRNA in PBMC in the group of people with metabolic disorders is significantly lower than in the healthy control group. NGS sequencing confirmed earlier genotyped SNPs and allowed for identification of 39 new, possibly significant polymorphisms in term of susceptibility to MetS or T2DM.

Summarizing, the results of this study indicate a significant importance of the *UCP1* gene polymorphisms in the risk of obesity and metabolic syndrome.

WYKAZ SKRÓTÓW

9-cis RA (ang. *9-cis retinoic acid*) - kwas 9-cis retinowy

A (ang. *adenine*) - adenina

Ala (ang. *alanine*) - alanina

ATF2 (ang. *activating transcription factor 2*) - aktywujący czynnik transkrypcyjny 2

ATP (ang. *adenosine triphosphate*) - adenozyntrifosforan

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

BMI (ang. *body mass index*) - wskaźnik masy ciała

C (ang. *cytosine*) - cytozyna

C/EBP (ang. *CCAAT/enhancer binding proteins*) - białka wiążące się z sekwencją CCAAT

cAMP (ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan

CI95 (ang. *confidence interval*) - przedział ufności 95%

CRE (ang. *cAMP response element*) - element odpowiedzi na cAMP

CREB (ang. *CRE-binding protein*) - białko łączące się do CRE

Ct (ang. *threshold cycle*) - cykl progowy

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

dbSNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism Database*) - baza danych polimorfizmu pojedynczego nukleotydu

DMEM/F12 (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) - medium hodowlane

DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*) - dimetylosulfotlenek

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) - kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP (ang. *deoxynucleotide*) - deoksyrybonukleotydy

EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - kwas wersenowy

FCS (ang. *fetal calf serum*) - płodowa surowica cielęca

FDG (ang. *fluorodeoxyglucose*) - fluorodeoksyglukoza

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

EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*) - minimalne, podstawowe medium hodowlane Eagle

G (ang. *guanine*) - guanina

GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) - gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego

- Glut1** (ang. *glucose transporter 1*) - transporter glukozy 1
- Glut4** (ang. *glucose transporter 4*) - transporter glukozy 4
- HepG2** (ang. *hepatocellular carcinoma*) - linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby
- HOMA** (ang. *homeostasis model assessment*) - wskaźnik insulinooporności, stosunek stężenia glukozy i insuliny we krwi na czczo
- HPRT** (ang. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) - gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynową
- hRluc** - gen lucyferazy pochodzący z *Renilla reniformis*
- HWE** (ang. *Hardy –Weinberg equilibrium*) - prawo Hardy’ego Weinberga
- IBMX** (ang. *3-isobutyl-1-methylxanthine*) - 3-izobutylo-1-metyloksantyna
- ICC** (ang. *immunocytochemistry*) - immunocytochemia
- IDF - AHA/NHLBI** (ang. *International Diabetes Federation - American Heart Association/ National Heart, Lung and Blood Institute*) – Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna - Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne/ Amerykański Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi
- IF** (ang. *immunofluorescence*) - immunofluorescencja
- IITD** - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
- IL-6** (ang. *interleukin 6*) - interleukina 6
- indel** (ang. *insertion, deletion*) - insercja delecja
- IRS** (ang. *insulin response sequence*) - element odpowiedzi insuliny
- LCFA** (ang. *long-chain fatty acids*) - długołańcuchowe wolne kwasy tłuszczowe
- LD** (ang. *linkage disequilibrium*) - nierównowaga sprzężeń
- Leu** (ang. *leucine*) - leucyna
- luc⁺** - gen lucyferazy pochodzącej z *Photinus pyralis*
- m.in.** - między innymi
- MCP -1** (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) - białko chemotaksji monocytów 1
- Met** (ang. *methionine*) - metionina
- MetS** (ang. *metabolic syndrome*) - syndrome metaboliczny
- mRNA** (ang. *messenger RNA*) - matrycowy RNA
- NaOH** (ang. *sodium hydroxide*) - wodorotlenek sodu
- NGS** (ang. *next generation sequencing*) - sekwencjonowanie nowej generacji
- np.** - na przykład

OR (ang. *odds ratio*) - iloraz szans

ori (ang. *origin of replikation*) - miejsce inicjacji replikacji

p38 MAPK (ang. *p38 mitogen-activated protein kinases*) - kinaza białkowa aktywowana mitogenami p38

PAN - Polska Akademia Nauk

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) - buforowany roztwór soli fizjologicznej

PCho - pracownia chemii ogólnej

PCR (ang. *polymerase chain reaction*) - łańcuchowa reakcja polimerazy

PET/CT (ang. *positron emission tomography/computed tomography*) - pozytonowa tomografia emisyjna z tomografią komputerową

PGC-1 α (ang. *coactivator 1 alpha*) - koaktywator 1 α PPAR

PBMC (ang. *peripheral mononuclear blood cell*) - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

PPRE (ang. *PPAR response element*) - element odpowiedzi PPAR

PRDM16 (ang. *PR domain containing protein 16*) - domena PR zawierająca białko 16

pz - para zasad

r. - rok

RA (ang. *retinoic acid*) - kwas retinowy

RAR (ang. *retinoic acid receptor*) - receptor kwasu retinowego

RARE (ang. *retinoic acid response element*) - elementu odpowiedzi kwasu retinowego

RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

RLU (ang. *relative luminescence unit*) - względna jednostka luminescencji

RNA (ang. *ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

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

rpm (ang. *revolutions per minute*) - obroty na minutę

RT (ang. *reverse transcription*) - odwrotna transkrypcja

RXR (ang. *retinoid X receptor*) - receptor retinoidowy X

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

SLR (ang. *red blood lysis solution*) - bufor lizujący czerwone krwinki

SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) - polimorfizm pojedynczego genu

SV40 (ang. *simian virus 40*) - małpi wirus 40

- T** (ang. *tymine*) – tymina
- T2DM** (ang. *type 2 diabetes mellitus*) - cukrzyca typu 2
- T3** (ang. *triiodothyronine*) - trójiodotyronina
- T4** (ang. *thyroxine*) - tyroksyna
- TBE** - (ang. *Tris/borate/EDTA*) - bufor boranowy do elektroforezy (Tris-boran-EDTA)
- TG** (ang. *triglyceride, triacylglycerol*) - trójglicerydy, triacyloglicerole
- Thr** (ang. *threonine*) - treonina
- TNF- α** (ang. *tumor necrosis factor alpha*) - czynnik martwicy nowotworu
- TR** (ang. *thyroid receptor*) - receptor jądrowy hormonu tarczycy
- Tris** (ang. *tris (hydroxymethyl) aminomethane*) - zasada Tris (hydroksymetylo) aminometan
- TRE** (ang. *thyroid response element*) - element odpowiedzi TR
- UCP1** (ang. *uncoupling protein 1*) - termogenina 1
- UCP2** (ang. *uncoupling protein 2*) - termogenina 2
- UCPs** (ang. *uncoupling proteins*) – białka rozprzegające
- UTR** (ang. *untranslated region*) - rejon mRNA niepodlegający translacji
- vs.** (łac. *versus*) - w stosunku do
- WBC** (ang. *white blood cells*) - białe krwinki krwi
- wg** - według
- WHO** (ang. *World Health Organisation*) - Światowa Organizacja Zdrowia
- WHR** (ang. *waist to hip ratio*) - stosunek obwodu talii do bioder
- wsp.** - współpracownicy
- ww.** - wyżej wymieniony
- zic1** (ang. *zic family member 1*) - białko z rodziny palca cynkowego 1
- Zfp516** (ang. *zinc finger protein 516*) - białko palca cynkowego 516
- ZM** - zespół metaboliczny
- β 2M** (ang. *β_2 microglobulin*) - β 2 mikroglobulina
- β 3AR** (ang. β_3 adrenergic receptor) - receptor β 3 adrenergiczny

I. WSTĘP

1.1 Zespół metaboliczny

Terminem zespołu metabolicznego (ZM, ang. *metabolic syndrome* – MetS) definiuje się współwystępowanie powiązanych ze sobą zaburzeń pochodzenia metabolicznego, sprzyjających rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym (udar mózgu, choroby wieńcowej i zawału serca) oraz cukrzycy typu 2^{1,2}. Do grupy tych zaburzeń zalicza się m.in.: podwyższone stężenie glukozy we krwi, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe, otyłość, insulinooporność. Pomimo postępu w diagnostyce, leczeniu oraz prewencji, choroby sercowo-naczyniowe nadal są główną przyczyną śmierci w krajach wysoko rozwiniętych, a częstość występowania tej jednostki chorobowej z roku na rok rośnie na całym świecie³.

1.1.1 Definicja i kryteria diagnostyczne

Na przestrzeni lat definicja zespołu metabolicznego ulegała wielu zmianom, począwszy od samej nazwy, kończąc na kryteriach diagnostycznych. Pierwszą próbę zdefiniowania zespołu metabolicznego, podjął w 1988 r. amerykański endokrynolog Gerald M. Reaven. W swojej pracy zwraca uwagę na związek występowania insulinooporności (ang. *insulin resistance*, IR) oraz hiperinsulinemii z podwyższonym ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z zaburzeniami tolerancji glukozy oraz cukrzycą typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM). W ten sposób sformułował hipotezę, iż IR jest powszechnym czynnikiem etiologicznym dla grupy chorób, nazwanej przez autora pracy zespołem X, która składa się z: hiperinsulinemii, wysokiego poziomu lipoprotein o bardzo małej gęstości (ang. *very low density lipoprotein*, VLDL), trójglicerydów (ang. *triglycerides*, TG), niskiego poziomu lipoprotein o dużej gęstości (ang. *high density lipoprotein*, HDL) oraz nadciśnienia tętniczego. W roku 1989 Norman Kaplan dodał do grupy zaburzeń opisanych przez Reaven'a bardzo ważny czynnik – otyłość brzuszna. Grupę tych zaburzeń nazwał „śmiertelnym kwartetem”, do których zaliczył dodatkowo nadciśnienie tętnicze, podwyższone stężenie TG we krwi oraz zaburzoną tolerancję glukozy⁴. Kolejne lata badań dostarczyły nowych prac dotyczących związku IR z rozwojem zaburzeń zespołu. Od tej pory nazwa „zespół X” została zastąpiona terminem „zespołu oporności na insulinę”^{5,6}. Dopiero w 1998 r. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) przyjęła obowiązującą do tej pory

nazwę – zespół metaboliczny oraz zaproponowała kryteria diagnostyczne dla tej choroby⁷. Wieloprzyczynowy i skomplikowany do ustalenia mechanizm powstawania MetS spowodował pewną trudność w sformułowaniu ujednoczonej definicji oraz kryteriów rozpoznawania zespołu metabolicznego. W pierwszej dekadzie XXI powstało aż 6 różniących się między sobą kryteriów diagnostycznych⁸. Aktualnie obowiązuje i funkcjonuje ujednoczona definicja zespołu metabolicznego zatwierdzona przez Międzynarodową Federację Diabetologiczną (ang. *International Diabetes Federation*, IDF) z 2005 r.⁹ z uwzględnieniem poprawek Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ang. *American Heart Association*, AHA) i Amerykańskiego Narodowego Instytutu Serca, Płuc i Krwi (ang. *National Heart, Lung and Blood Institute*, NHLBI) z 2009 r.¹⁰. Stwierdzenie trzech z pięciu poniżej zaprezentowanych zaburzeń stanowi podstawę diagnozy w kierunku MetS:

- otyłość brzuszna (dla Europejczyków: obwód talii u mężczyzn ≥ 94 cm, natomiast u kobiet ≥ 80 cm);
- podwyższony poziom trójglicerydów ≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/L) lub leczenie z powodu zaburzenia metabolizmu trójglicerydów;
- obniżony poziom HDL cholesterol HDL < 40 mg/dl (1,0 mmol/L) u mężczyzn lub < 50 mg/dl (1,3 mmol/L) u kobiet lub leczenie z powodu zaburzenia metabolizmu HDL;
- ciśnienie tętnicze skurczowe ≥ 130 lub rozkurczowe ≥ 85 mm Hg lub leczenie nadciśnienia tętniczego;
- glikemia na czczo ≥ 100 mg/dl lub leczenie cukrzycy typu 2.

1.1.2 Epidemiologia

Badania wskazują, że częstość występowania zespołu metabolicznego jest wysoka i stale rośnie, niezależnie od kryteriów diagnostycznych przyjętych w różnych definicjach tej jednostki chorobowej. Szacuje się, że na świecie problem ten może dotyczyć średnio około 34% mieszkańców Stanów Zjednoczonych, 22% populacji Chin oraz od 15% do 34% populacji europejskiej¹¹⁻¹³. Uwzględniając kryteria IDF, w Polsce zespół metaboliczny rozpoznano u 20% osób, co oznacza, że występuje on u blisko 5,8 milionów dorosłych Polaków¹¹. Wyniki jednego z największych badań epidemiologicznych NATPOL 2011 (*Nadciśnienie Tętnicze oraz inne czynniki ryzyka chorób serca i naczyń w Polsce*) przeprowadzonego w Polsce, pozwoliły na wykonanie

analiz oceniających trendy zmian w rozpowszechnianiu i kontroli czynników ryzyka związanych z MetS oraz pozwoliły na stworzenie prognozy dotyczącej otyłości, nadciśnienia tętniczego i dyslipidemii¹⁴. Badacze alarmują, że do 2035 r. występowanie cukrzycy wzrośnie z 6% do 12%, nadciśnienia tętniczego z 32% do ponad 50%, a otyłości z 22% do 33%¹¹. Warto nadmienić, że czynnikiem zwiększającym częstość występowania MetS jest wiek oraz płeć. Badanie MORGAN (ang. *MONICA Risk, Genetics, Archiving and Monograph*) obejmujące prawie 70 000 osób w wieku 19-78 lat z 10 krajów Unii Europejskiej wykazało, że MetS występuje częściej w grupie osób starszych. Uwzględniając kryteria diagnostyczne IDF zaobserwowano pięciokrotny wzrost częstości występowania MetS u kobiet w przedziale wiekowym 60 - 78 lat w porównaniu do kobiet pomiędzy 19 a 39 rokiem życia. U mężczyzn, w analogicznych przedziałach wiekowych, wzrost występowania MetS był dwukrotny (5,3% vs 10,5%)¹⁵.

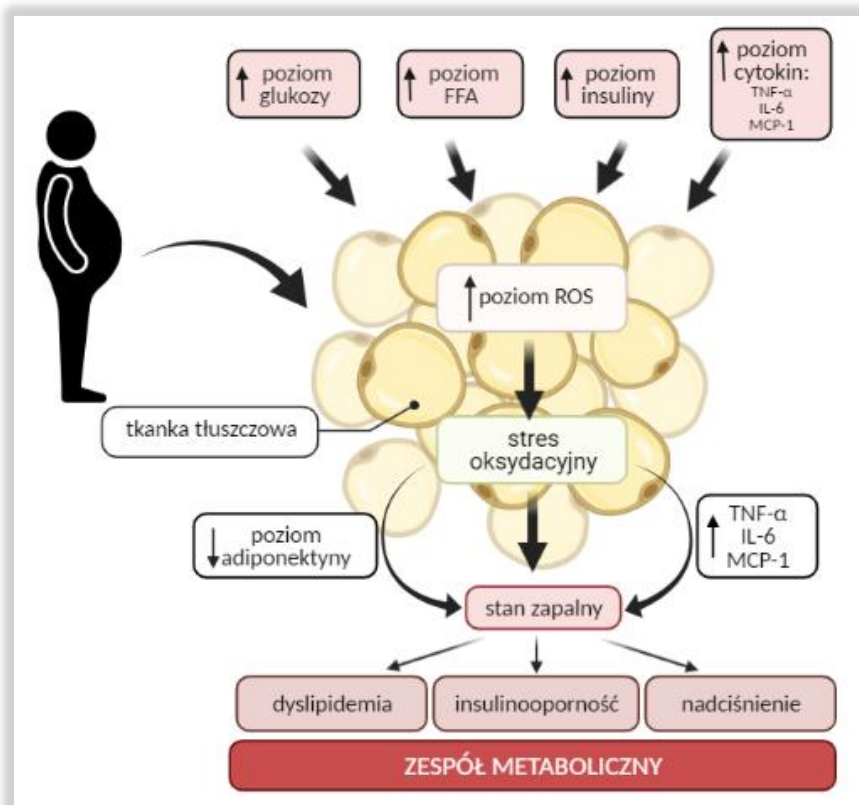
1.1.3 Przyczyny powstawania

Patogeneza zespołu metabolicznego jest złożona - obejmuje zaburzenia gospodarki zarówno lipidowej jak i węglowodanowej, jednak do tej pory mechanizm powstawania tych zaburzeń nie został w pełni poznany. Spośród wielu proponowanych czynników etiologicznych leżących u podstaw MetS, otyłość brzuszna oraz insulinooporność uznawane są za kluczowe¹⁶. Otyłość brzuszna, zwana trzewną bądź wisceralną, to nadmierne odkładanie się tkanki tłuszczowej w obrębie jamy brzusznej¹⁷. Według WHO liczba osób otyłych od 1975 roku potroiła się. Szacuje się, że w 2016 roku ponad 650 milionów ludzi (13%) było otyłych¹⁸. Te niepokojące dane utwierdzają naukowców oraz lekarzy z całego świata w przekonaniu, iż otyłość stała się epidemią XXI wieku¹⁹. Otyłość wpływa na zaburzony metabolizm tłuszczów, zmienia homeostazę energetyczną organizmu^{16,17}, przyczynia się do rozwoju kolejnych dysfunkcji MetS, takich jak: hiperglikemia, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze²⁰. Zwiększenie masy tkanki tłuszczowej trzewnej powoduje również nasiloną lipolizę, a także oporność komórek tkanki tłuszczowej na działanie insuliny²⁰.

Insulinooporność (IR) w przebiegu otyłości postrzegana jest jako najwcześniejszy etap zespołu metabolicznego i w konsekwencji T2DM. U osób zdrowych prawidłowy poziom glukozy we krwi zachowany jest dzięki prawidłowemu wydzielaniu insuliny przez komórki β wysp trzustkowych oraz dzięki odpowiedniej wrażliwości tkanek obwodowych na jej działanie²⁰. Insulinooporność jest to obniżona

wrażliwość narządów i tkanek, takich jak wątroba, serce, mięśnie szkieletowe oraz tkanka tłuszczowa na fizjologiczne stężenie insuliny we krwi. W wyniku IR dochodzi do zaburzenia metabolizmu węglowodanów (zmniejszenie wychwytu i zużycia glukozy w procesie oksydacji oraz zaburzenia w magazynowania glukozy w postaci glikogenu), białek i tłuszczów (nasiloną aktywność lipolityczną, hamowaną lipogenezą) ²¹.

Zasadniczym czynnikiem w procesie powstawania, rozwoju oraz przebiegu MetS, łączącym otyłość z IR, jest łagodny, przewlekły stan zapalny spowodowany m.in. stresem oksydacyjnym ¹⁷. Stres oksydacyjny definiowany jest jako stan zaburzonej równowagi między działaniem reaktywnych form tlenu a przeciwutleniaczami (antyoksydantami) w komórkach i tkankach. Dochodzi wówczas do nadprodukcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) ²². ROS generowane są głównie w mitochondriach jako produkty pośrednie łańcucha oddechowego i w warunkach homeostazy pełnią istotną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak: wzrost komórki, proliferacja, apoptoza, różnicowanie, fosforylacja białek, regulacja ekspresji genów ²³. W przypadku zaburzonej gospodarki węglowodanowo - lipidowej (niezależnie czy wskutek występowania otyłości, IR, czy obu dysfunkcji) dochodzi do gromadzenia nadmiaru substratów energetycznych napływających do komórek tkanki tłuszczowej w postaci wolnych kwasów tłuszczowych (ang. *free fatty acids*, FFA) i glukozy. Powoduje to powstawanie zwiększonej ilości fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego - NADPH, w konsekwencji czego wzrasta biosynteza ROS w mitochondriach ²⁴. Wysoki poziom ROS jest kompensowany przez enzymy przeciwutleniające (katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa) ²⁵. Dane literaturowe sugerują, że wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za produkcję ROS oraz obniżona aktywność enzymów antyoksydacyjnych prowadzą do stresu oksydacyjnego w komórkach tkanki tłuszczowej u osób otyłych ²⁶, co prowadzi do uszkodzenia białek, lipidów, fosfolipidów błon komórkowych i DNA, przyczyniając się do dysfunkcji i destrukcji tych komórek. Ponadto, podwyższony poziom ROS w tkance tłuszczowej hamuje sekrecję i ekspresję mRNA adiponektyny, zwiększając ekspresję mRNA cytokin prozapalnych produkowanych przez tkankę tłuszczową (adipocytokin) takich jak: interleukina 6 (ang. *interleukin 6*, IL-6), białko chemotaksji monocytów 1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor alpha*, TNF α). Podsumowując, stres oksydacyjny zaburza regulację ekspresji adipocytokin powodując stan zapalny tkanki (Ryc. 1) ²⁵.



Ryc. 1 Czynniki wpływające na zwiększony poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach tkanki tłuszczowej oraz skutki stresu oksydacyjnego. Rycina powstała przy użyciu *BioRender.com*.

Inną przyczyną powstania stanu zapalnego w otyłości jest infiltracja makrofagów do tkanki tłuszczowej. Naukowcy zaobserwowali, że obecność makrofagów u osób z nadwagą lub u osób otyłych jest większa niż u osób o prawidłowej masie ciała^{2,16}. Makrofagi wpływają na ekspresję cytokin prozapalnych w komórkach tkanki tłuszczowej. W konsekwencji zwiększa się poziom cytokin w środowisku tkanki tłuszczowej, zaostrzając tym samym proces zapalny¹⁶.

Pozostałymi czynnikami predestynującymi do występowania zespołu metabolicznego są predyspozycje genetyczne (obecność polimorfizmów lub mutacji określonych genów związanych z rozwojem otyłości, IR i zaburzeń gospodarki energetycznej) oraz uwarunkowania środowiskowe (wysokokaloryczna, dieta aterogenna, czyli bogata w tłuszcze nasycone oraz cholesterol, niski poziom aktywności fizycznej, stres, palenie tytoniu)^{19,20,24}.

1.2 Tkanka tłuszczowa (WAT i BAT)

W dobie epidemii otyłości, badacze na całym świecie od lat starają się jak najlepiej poznać mechanizm powstawania, funkcjonowania i regulacji tkanki

tłuszczowej (ang. *adipose tissue*, AT) u człowieka. Ta niesamowicie plastyczna ²⁷, rozproszona w postaci depozytów tłuszczowych tkanka, która głównie kojarzona jest jako miejsce magazynowania i przekształcania energii dostarczanej z pożywienia, obecnie uznawana jest jako organ tłuszczowy ^{28 29}, pełniący funkcję endokrynną, detoksykacyjną ³⁰ oraz immunomodulującą ³¹.

1.2.1 Budowa

Jeszcze do niedawna rozróżniano u człowieka dwa rodzaje tkanki tłuszczowej: białą (ang. *white adipose tissue*, WAT) oraz brązową, zwaną inaczej brunatną (ang. *brown adipose tissue*, BAT) ³². Oba typy tkanki tłuszczowej różnią się zasadniczo funkcją, morfologią i umiejscowieniem w organizmie. W ostatnich latach wyodrębniono różową tkankę tłuszczową pojawiającą się u kobiet w czasie ciąży i okresie laktacji ²⁷. Pomimo różnej funkcji fizjologicznej każdej z trzech rodzajów AT, wszystkie cechują się zdolnością endokrynną, różniąc się proporcjami i rodzajem wydzielanych hormonów. Ciekawym zjawiskiem jest odwracalny proces różnicowania się pod wpływem odpowiednich bodźców WAT w kierunku BAT, zwany transdyferencjacją. Komórki białej tkanki tłuszczowej z funkcją brązowych komórek tłuszczowych określa się mianem beżowych (ang. *beige*) ³³. Należy pamiętać, iż duża specjalizacja fizjologiczna tkanki tłuszczowej oraz jej plastyczność zależy głównie od lokalizacji anatomicznej ³⁴.

Tkanka tłuszczowa jest tkanką łączną składającą się z wyspecjalizowanych komórek parenchymalnych (mięszkowych) zwanych adipocytami, rozproszonych w obrębie cienkiej sieci włókien kolagenowych tworzących macierz pozakomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Poza adipocytami, w tkance tłuszczowej występują również: multipotencjalne komórki macierzyste, preadipocyty, fibroblasty, makrofagi oraz komórki śródbłonna naczyń włosowatych ^{35,36}. Komórki te tworzą frakcję zrębowo – nacyniową, a ich główną funkcją jest wspieranie i ochrona tkanki tłuszczowej ³⁶.

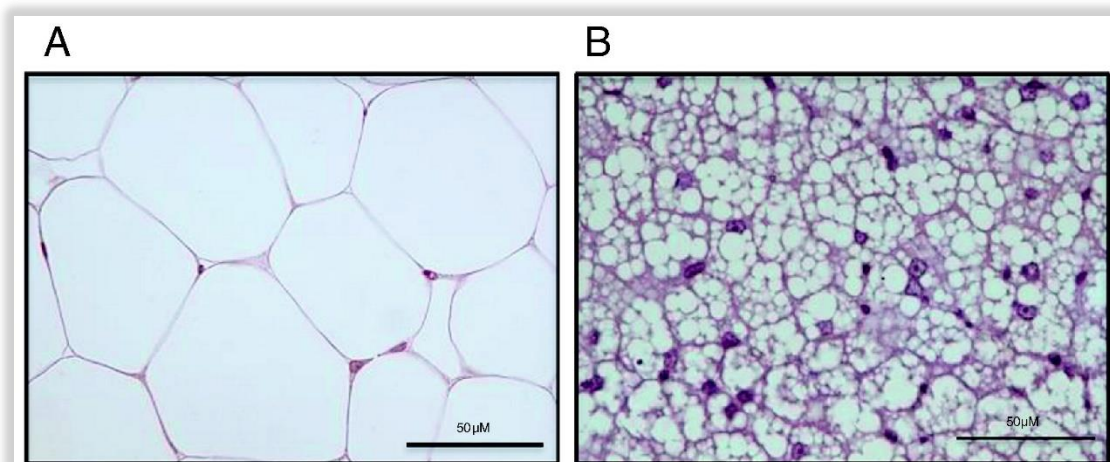
Cechy ewolucyjne i rozwojowe BAT i WAT sugerują, iż są to odrębne tkanki, pochodzące z różnych linii komórek progenitorowych. Większość brązowych adipocytów ma wspólne pochodzenie z komórkami tkanki mięśniowej i powstają z prekursorowych, mezenchymalnych komórek macierzystych podczas rozwoju embrionalnego. O pochodzeniu miogennym BAT świadczy ekspresja czynnika transkrypcyjnego Myf5 (ang. *myogenic factor 5*, Myf5) ³⁷. Mechanizm adipogenezy obejmuje całą kaskadę aktywacji i represji różnych czynników transkrypcyjnych

(koaktywatorów, korepresorów, cząsteczek regulatorowych), wpływających na powstawanie tkanki tłuszczowej³⁸. Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi regulującymi funkcje oraz powstawanie BAT z preadipocytów są: receptory γ aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ), białka wiążące się z sekwencją CCAAT - C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ (ang. *CCAAT/enhancer binding proteins*, C/EBP), koaktywator 1 α PPAR γ (ang. *coactivator 1 alpha*, PGC-1 α) oraz domenę homologiczną PR zawierającą białko 16 (ang. *PR domain containing protein 16*, PRDM16)³⁹.

Morfologia BAT i WAT różni się między sobą głównie ze względu na pełnione funkcje fizjologiczne, a zawartość zależna jest od czynników genetycznych, metabolicznych i środowiskowych³⁹. W **Tabela 1** przedstawiono główne różnice występujące między adipocytami białej i brązowej tkanki tłuszczowej. Białe adipocyty są to duże, sferyczne komórki o średnicy 20 - 200 μm ⁴⁰, zawierające przeważnie pojedynczą kroplę tłuszczu, która zajmuje nawet 90% objętości całej komórki. Jądro komórkowe ułożone jest peryferycznie, a cytoplazma tworzy cienką warstwę, zawierającą słabo rozwinięte, zepchnięte na obrzeża komórki, organelle komórkowe, w tym niewielką liczbę mitochondriów⁴¹. Brązowe adipocyty zawdzięczają swoją nazwę barwie, jaką można zaobserwować pod mikroskopem, wynikającej z dużej liczby mitochondriów oraz z bogatego unaczynienia i unerwienia tkanki³⁹. Dodatkowo, w przeciwieństwie do WAT, mitochondria są dobrze wykształcone - posiadają duże, liczne grzebienie i wypełniają większość cytoplazmy. Posiadają cytochromy łańcucha oddechowego, zawierające atom żelaza w kofaktorze hemowym⁴². Komórki te są dużo mniejsze od komórek WAT, ich wielkość waha się między 15 a 60 μm ⁴⁰. Posiadają liczne wakuole, zawierające tłuszcze w postaci triacylogliceroli, a jądro komórkowe umiejscowione jest centralnie w komórce³⁹.

Tabela 1 Charakterystyka komórek tłuszczowych białej i brązowej tkanki tłuszczowej ³⁹.

	WAT	BAT
funkcja	gromadzenie energii	produkcja ciepła (funkcja termogeniczna)
morfologia komórki	pojedyncze krople lipidowe mała ilość mitochondriów tkanka ubogo naczyniona	wiele małych wakuoli duża ilość mitochondriów tkanka bogato unaczyniona
białko markerowe	leptyna	termogenina 1 (UCP1)
komórki progenitorowe	komórki bez ekspresji Myf5 (Myf5 ⁻)	komórki z ekspresją Myf5 (Myf5 ⁺)
wpływ na występowanie MetS	duża liczba związana ze zwiększonym ryzykiem otyłości	duża liczba związana ze zmniejszonym ryzykiem otyłości
wpływ wieku człowieka na rozwój tkanki	ilość rośnie wraz z wiekiem	ilość maleje wraz z wiekiem

**Ryc. 2** Skrawki histologiczne pokazujące różną morfologię adipocytów WAT (A) i BAT (B) ⁴³.

1.2.2 Funkcja

Triacyloglicerole, zwane również trójglicerydami (ang. *triacyloglycerol*, *triglyceride*, TG), są to proste organiczne związki lipidowe, składające się z trzech długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *long chain fatty acids*, LCFA) połączonych wiązaniem estrowym z cząsteczką glicerolu ⁴⁴. Większość energii w postaci TG dostarczana jest ze spożywanego pokarmu. W adipocytach tkanki tłuszczowej dochodzi do dwóch głównych procesów metabolicznych: lipogenezy -

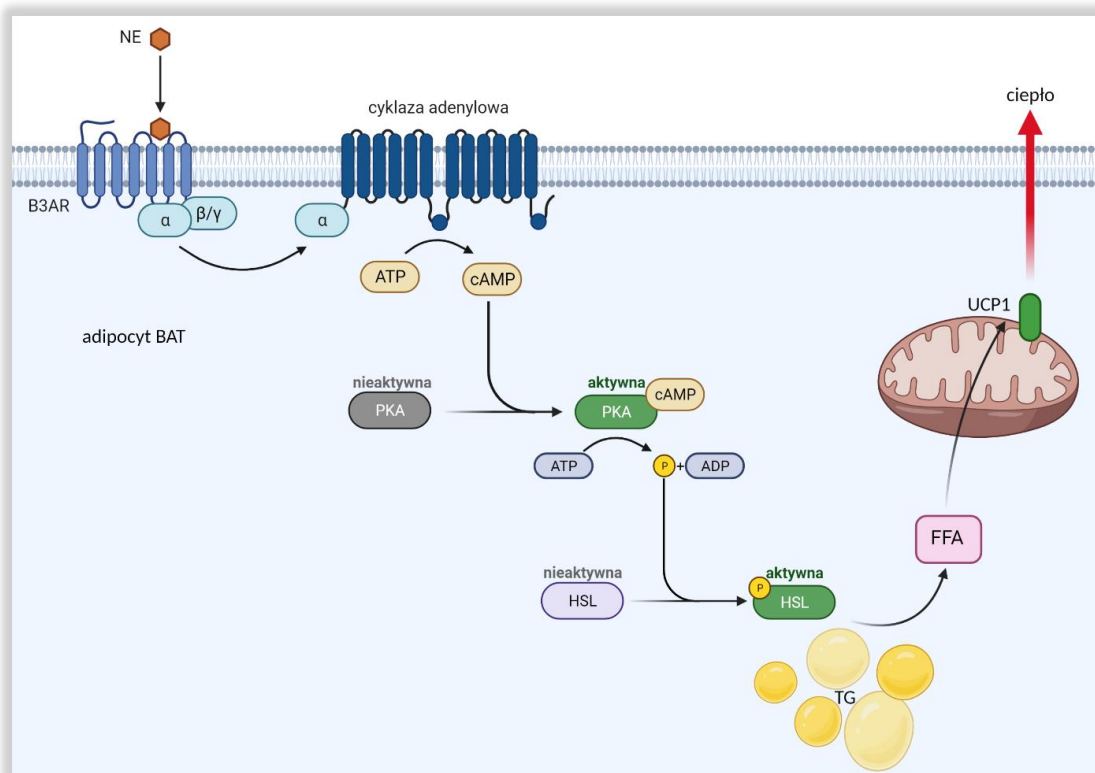
akumulacji TG oraz lipolizy - hydrolizy TG do kwasów tłuszczowych i glicerolu ⁴⁵. W przypadku nadmiernej podaży energii do organizmu i/lub zmniejszenia wydatku energetycznego, nadwyżka TG magazynowana jest w WAT. Z drugiej strony, gdy spożycie energii jest niewystarczające i/lub zwiększony jest wydatek energetyczny, dochodzi do lipolizy magazynowanych TG w WAT i do uwolnienia kwasów tłuszczowych i glicerolu do krwioobiegu. W ten sposób wolne kwasy tłuszczowe stają się dostępnym źródłem energii dla innych tkanek ⁴⁶. Kolejną bardzo ważną funkcją białej tkanki tłuszczowej jest utrzymanie w stałej lokalizacji i ochrona organów wewnętrznych. Depozyty WAT wypełniające przestrzenie między narządami i organami wewnętrznymi nazywane są tłuszczem wisceralnym. Dodatkowo komórki WAT zlokalizowane podskórnice mają właściwości izolacyjne i ułatwiają termoregulację ⁴⁷.

Funkcją brązowej tkanki tłuszczowej jest metabolizowanie TG do produkcji ciepła w procesie zwanym termogenezą bezdrzeniową (ang. *non-shivering thermogenesis*, NST). NST jest jednym ze sposobów regulacji temperatury ciała u zwierząt stałocieplnych ⁴⁸. Oprócz termogenezy bezdrzeniowej istnieją inne mechanizmy termoregulacji (termogeneza adaptacyjna), jednak wynikają one z aktywności mięśni (termogeneza drzeniowa) ⁴⁹ lub ze zwiększonego zużycia energii potrzebnej do strawienia pokarmów (termogeneza poposiłkowa) ⁴⁹. Charakterystyczną cechą adipocytów BAT jest występowanie białka termogeniny 1 (ang. *uncoupling protein 1*, UCP1) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. UCP1 jest kluczowym białkiem biorącym udział w NST, którego zadaniem jest rozpraszanie energii w formie ciepła ⁵⁰.

1.2.3 Regulacja aktywności BAT

Dla lepszego zrozumienia funkcji brązowej tkanki tłuszczowej, należy poznać mechanizmy regulujące aktywność BAT oraz czynniki wpływające na aktywność brązowych adipocytów. Na powierzchni dojrzałych brunatnych komórek tłuszczowych można wyróżnić wszystkie rodzaje receptorów adrenergicznych α i β oraz ich podtypy (izoformy), jednak to stymulacja receptorów β -adrenergicznych jest najbardziej znaczącym i najlepiej zbadanym szlakiem stymulacji termogenezy. Receptor β_3 adrenergiczny (ang. *β_3 adrenergic receptor*, β_3 AR) jest dominującą izoformą na powierzchni mysich adipocytów BAT i odpowiada za aktywację całej kaskady sygnałowej skutkującej zwiększoną ekspresją UCP1. Ostatnie badania wskazują, że

u ludzi za aktywację procesu NST oraz regulację ekspresji UCP1 oprócz β 3AR⁵¹ może odpowiadać również izoforma β_1 receptora adrenergicznego (β 1AR)⁵²⁻⁵⁴. Do naturalnych agonistów receptorów β -adrenergicznych (ang. *β adrenergic receptor*, β AR) należy norepinefryna, inaczej zwana noradrenaliną (ang. *norepinephrine*, *noradrenaline*, NE) – najlepiej zbadana i najważniejsza cząsteczka efektorowa w kontekście aktywacji adipocytów BAT⁵⁵⁻⁵⁷. Stymulacja współczulnego układu nerwowego, głównie przez ekspozycję na zimno, powoduje uwalnianie się tego neuroprzekaźnika oraz jego przyłączenie się do β 3AR⁵⁸. Ekspresja UCP1 znajduje się pod kontrolą adrenergiczną. Aktywacja β 3AR przez NE aktywuje kaskadę sygnałową w adipocytach BAT, która obejmuje szereg enzymów i czynników transkrypcyjnych, bezpośrednio lub pośrednio wpływających na powstawanie termogeniny 1⁵⁹. Kompleks NE- β 3AR aktywuje białko G, które następnie pobudza enzym błonowy - cyklazę adenylową, katalizującą reakcję powstawania cyklicznego adenozylo 3', 5' - monofosforanu (ang. *cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate*, cAMP) z ATP. Wzrost stężenia cAMP w cytoplazmie komórek BAT jest niezbędny do aktywacji kinazy białkowej A (ang. *protein kinase A*, PKA). PKA fosforyluje lipazę hormonowrażliwą (ang. *hormone sensitive lipase*, HSL). Aktywna lipaza hydrolizuje wiązanie estrowe w TG, rozszczepiając je na wolne kwasy tłuszczowe (FFA lub LCFA) i glicerol. Następnie LCFA transportowane są przez L-karnitynę do mitochondriów, gdzie bezpośrednio aktywują ekspresję UCP1 lub są utleniane w procesie β -oksydacji (Ryc. 3)^{52,55}.



Ryc. 3 Mechanizm aktywacji adipocytów brązowej tkanki tłuszczowej. Opracowanie własne na podstawie ⁵². Rycina powstała przy użyciu *BioRender.com*.

Do innych czynników wpływających na pobudzenie NST w BAT należą hormony tarczycy (trójiodotyronina – T3 oraz tyroksyna – T4) ^{59, 60}. Wzrost poziomu NE prowadzi do wzmożonej aktywności enzymu dejodynazy typu II, zlokalizowanego w komórkach efektorowych BAT, który odpowiada za konwersję prohormonu T4 do aktywnej formy – T3. Skutkiem powyższego zjawiska jest lokalny wzrost stężenia T3, w bliskim sąsiedztwie receptorów jądrowych, zlokalizowanych w komórkach adipocytów BAT. W ten sposób stężenie T3 wpływa na ekspresję szeregu czynników transkrypcyjnych regulujących aktywność UCP1 ^{52,62}.

Już w latach 60-tych XX wieku zwrócono uwagę na właściwości termoregulacyjne brązowej tkanki tłuszczowej. Początkowo badania ograniczały się tylko do modeli zwierzęcych (w szczególności zwierząt zapadających w sen zimowy, następnie małych ssaków) ^{63–66}. Wyróżniono wtedy warunki, w których ta tkanka jest aktywna - podczas wybudzenia z hibernacji oraz w odpowiedzi na ekspozycję na zimno niektórych dorosłych ssaków ⁶⁷. W tym czasie przyjęto również tezę, że u ludzi, aktywna BAT występuje tylko u noworodków chroniąc je przed hipotermią i zanika w kolejnych latach życia ⁶⁴. Doniesienia dokumentujące istnienie BAT u dorosłych ⁶⁸⁻⁷¹ zostały przez środowisko naukowe wówczas zignorowane. Istnienie

funkcjonalnej BAT u osób dorosłych udowodniono na początku XXI wieku, wraz z rozwojem nowych technik obrazowania – wychwyty 18-fluorodeoksyglukozy (FDG) ocenianego metodą pozytonowej tomografii emisyjnej sprzężonej z tomografią komputerową (PET/CT) ⁷². Metoda ta pozwoliła na lokalizację aktywnych depozytów BAT głównie w okolicy karku i okolicy nadobojczykowej oraz w dole pachowym, śródpiersiu (zwłaszcza w okolicy przyaortalnej) oraz między łopatkami (**Ryc. 4**) ^{73,74}.



Ryc. 4 Obrazowanie BAT przy użyciu FDG PET/CT. Kolorem żółtym i czerwonym zobrazowano aktywne depozyty brązowego tłuszczu - obszar szyjny i nadobojczykowy (biała strzałka), obszar pachowy i przykręgowy (czarna strzałka) ⁷⁴.

Kolejne badania wykazały, iż wielkość i aktywność termogeniczna tkanki zależna jest od wieku ⁷⁵, płci ^{75,76}, pory roku ^{77,78}, zawartości WAT (BMI) ⁷⁹ oraz poziomu aktywności fizycznej ^{80,81}. Zaobserwowano również, że BAT ulega aktywacji pod wpływem różnych bodźców np. ekspozycji na zimno (podobnie jak u gryzoni) ⁸², podawania insuliny ⁸³ lub mirabregonu – agonisty receptora β 3AR ⁵¹.

Równoległe z odkryciem BAT u osób dorosłych zauważono (za pomocą FDG - PET/CT), że odpowiednia stymulacja umożliwia nabranie cech morfologicznych i funkcjonalnych brązowych adipocytów przez komórki WAT ⁸⁴. Jest to proces zwany transdiferencjacją lub „brązowieniem” tkanki i był on obserwowany w badaniach na modelu zwierzęcym już w połowie lat 80-tych ubiegłego wieku ⁸⁵⁻⁸⁷. Zróżnicowane komórki WAT o funkcjach BAT nazwano dopiero w 2010 roku komórkami beżowymi (ang. *beige/brite*) ⁸⁸. Brązowe oraz beżowe komórki tłuszczowe posiadają wiele cech wspólnych, w tym: liczne mitochondria, obecność wielu kropeł lipidowych, ekspresję UCP1, jednak pochodzą z odrębnych linii prekursorowych – komórki progenitorowe

beżowych adipocytów nie ekspresjonują czynnika transkrypcyjnego Myf5⁴³. Obecnie poznano ponad 50 czynników regulujących transkrypcję oraz kontrolujących różnicowanie WAT w kierunku BAT. Transdyferencjacja jest procesem odwracalnym i jest indukowana przez: bodźce termiczne (takie jak zimno), wysokokaloryczną dietę, środki farmakologiczne (agonistów receptorów β AR, agonistów receptora PPAR γ)^{57,87,89}.

1.2.4 BAT a otyłość

W początkowych badaniach na myszach zaobserwowano, iż aktywność BAT zwiększa się nie tylko pod wpływem bodźców termicznych, ale indukowana jest również przez przyjmowanie wysokotłuszczowych posiłków. Silny związek między termogenezą indukowaną przez zimno a termogenezą poposiłkową doprowadził do wniosku, że brązowa tkanka tłuszczowa gra kluczową rolę w obu tych procesach⁹⁰. W kolejnych badaniach zaobserwowano zmniejszoną aktywność BAT u zwierząt otyłych, co stanowiło podstawę do stwierdzenia, że zaburzona aktywność BAT wpływa na ryzyko wystąpienia otyłości⁹¹. Przyjęta teza zrodziła wiele trwających do dziś dyskusji, dotyczących stopnia, w jakim wyniki badań nad gryzoniami korelują z gospodarką energetyczną oraz otyłością u ludzi. Udział aktywnej BAT w całkowitym wydatku energetycznym organizmu ludzkiego nie został do tej pory dokładnie poznany^{67,92}. Z pewnością termogeneza (zarówno NST jak i poposiłkowa) nie jest główną składową całkowitego wydatku energetycznego. Istnieją badania, z których wynika, że wkład brązowej tkanki tłuszczowej w całkowity wydatek energetyczny wynosi tylko 1 - 5% spoczynkowego tempa metabolizmu (ang. *resting metabolic rate*, RMR), a przy odpowiedniej stymulacji wartość ta wzrasta do 16% RMR⁶⁷. Od niedawna wiadomo, że brązowa tkanka tłuszczowa jest mniej aktywna u osób starszych⁶⁸ i co ważne, aktywność BAT jest niższa u osób otyłych, niż u osób szczupłych (odwrotnie proporcjonalna do BMI)^{82,93,94}. Dlatego też zainteresowanie tą tkanką znacznie wzrosło w ostatniej dekadzie ze względu na możliwość wykorzystania jej potencjału w leczeniu otyłości oraz chorób z nią związanych.

1.3 Termogenina 1 - UCP1

Odkrycie BAT, a w szczególności jej właściwości termogenicznych⁶³⁻⁶⁵, doprowadziło do obserwacji, że mitochondria tej tkanki posiadają niespotykany mechanizm oddzielania (rozprzęgania, ang. *uncoupling*) fosforylacji oksydacyjnej od

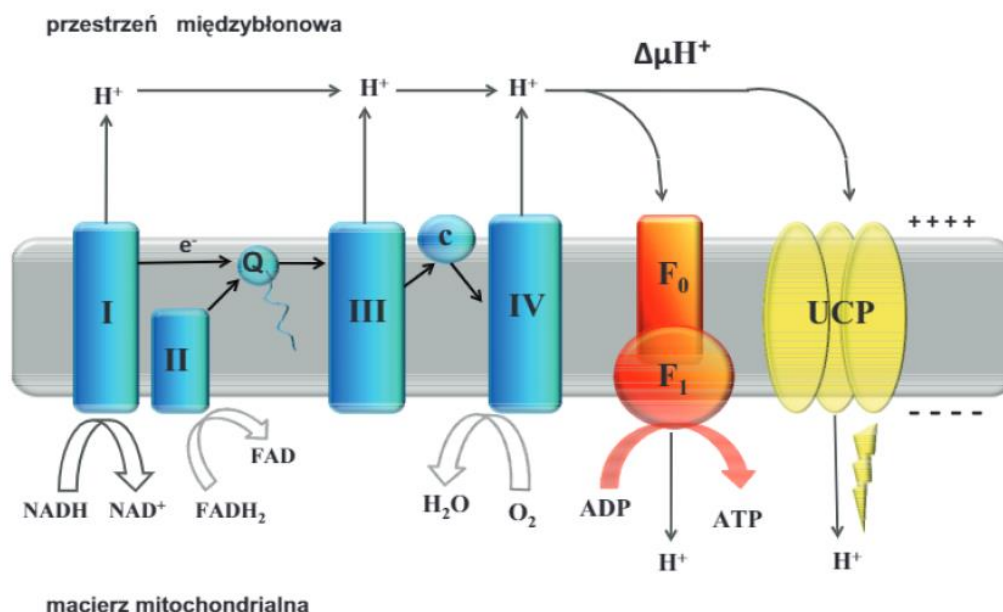
syntezy ATP⁹⁵. W połowie lat 70-tych zidentyfikowano białko - termogeninę 1 (UCP1), odpowiedzialne za to zjawisko^{96,97}. Identyfikacja UCP1 wpłynęła znacznie na zrozumienie, w jaki sposób komórki BAT biorą udział w NST.

1.3.1 Budowa i funkcja białka

UCP1 jest 33kDa (forma monomeryczna), transmembranowym białkiem znajdującym się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej brązowych adipocytów⁹⁸. Poznanie genu oraz sekwencji aminokwasowej pozwoliło zakwalifikować termogeninę 1 oraz jej izoformy (ang. *uncoupling proteins*, UCPs) do rodziny mitochondrialnych białek przENOŚNIKOWYCH (ang. *mitochondrial carrier family*, MCF)⁹⁹. Łańcuch polipeptydowy UCPs składa się z trzech homologicznych domen, zawierających każda po około 100 aminokwasów. Pojedyncza domena zawiera dwa α helikalne, hydrofobowe regiony transbłonowe, kotwiczące białko w błonie mitochondrialnej. Od strony macierzy mitochondrialnej regiony te połączone są hydrofilową pętlą, która posiada konserwatywną ewolucyjnie sekwencję, charakterystyczną dla wszystkich białek MCF⁷⁴.

Aby lepiej zrozumieć funkcję UCP1 w termogenezie adaptacyjnej, niezbędne jest poznanie zależności między szlakiem fosforylacji oksydacyjnej, a procesem wytwarzania energii w postaci ciepła. Dominującym szlakiem metabolicznym eukariontów, w wyniku którego dochodzi do powstania ATP, jest fosforylacja oksydacyjna⁹⁸. Proces syntezy ATP zachodzi w wyniku przeniesienia elektronów ze zredukowanych dinukleotydów (nikotynoamidoadeninowego – NADH, flawinoademinowego - FADH₂) na akceptor w postaci tlenu cząsteczkowego – O₂ przez szereg przENOŚNIKÓW ELEKTRONOWYCH. Przepływ elektronów z NADH i/lub FADH₂ na O₂ poprzez łańcuch oddechowy (pompy protonowe, kompleksy I, III, IV) umiejscowiony w wewnętrznej błonie mitochondriów powoduje wypompowanie protonów z macierzy mitochondrialnej. Wytworzona siła protonomotoryczna składa się z gradientu pH i transbłonowego potencjału elektrycznego. Zgromadzona w tej formie energia ($\Delta\mu\text{H}^+$) wykorzystywana jest następnie przez kompleks enzymatyczny syntazy ATP, umożliwiający protonom (H⁺) przejście przez błonę z powrotem do macierzy mitochondrialnej zgodnie z gradientem stężeń. Syntaza ATP, będąca kompleksem dwóch domen F₀ i F₁, zamienia $\Delta\mu\text{H}^+$ na energię wiązań chemicznych ATP, wytwarzaną przez przyłączenie adenosyno 5' - fosforanu (ang. *adenosine diphosphate*, ADP) do reszty kwasu ortofosforowego (Pi) - reakcja fosforylacji^{98,100,101}. Wytworzona energia

$\Delta\mu\text{H}^+$ sprzęga transport elektronów w łańcuchu oddechowym z syntezą ATP, jednak obecność białka UCP1 w mitochondriach adipocytów BAT umożliwia przekształcenie tej energii w ciepło. Białko to wykorzystuje przejście protonów w poprzek błony do rozproszenia (dyssypacji) energii w formie ciepła z pominięciem etapu syntezy cząsteczki ATP – jest to tzw. proces rozprzęgnięcia (**Ryc. 5**)¹⁰¹.



Ryc. 5 Uproszczony schemat fosforylacji oksydacyjnej eukariontów. Elektrony transportowane są w dół łańcucha oddechowego. Wytworzona w ten sposób siła protonomotoryczna ($\Delta\mu\text{H}^+$) napędza kompleks syntazy ATP (F_0F_1), która katalizuje reakcję fosforylacji ADP z wytworzeniem ATP. UCP1 wykorzystuje $\Delta\mu\text{H}^+$ do produkcji ciepła. Q - koenzym Q, c - cytochrom c¹⁰¹.

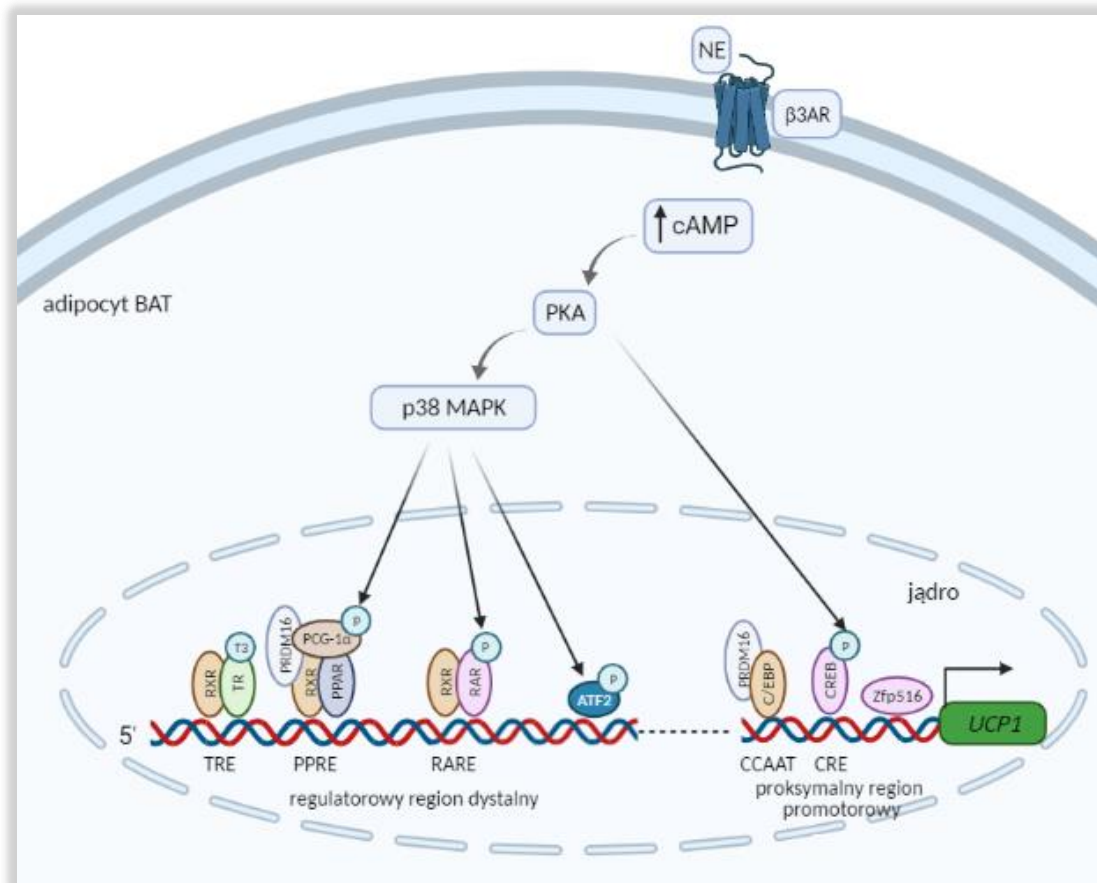
Mechanizm transportu protonów H^+ przez UCP1 do macierzy mitochondrialnej do tej pory nie został jednoznacznie potwierdzony. Na przestrzeni lat zaproponowano kilka różnych modeli opisujących przebieg tego procesu, zgodnych co do tego, iż jest to reakcja aktywowana przez LCFA, a hamowana przez nukleotydy purynowe (adeninowe i guaninowe)¹⁰².

1.3.2 Regulacja ekspresji genu *UCP1*

Mechanizm regulacji transkrypcji termogeniny 1 na poziomie molekularnym jest mechanizmem dokładnie zbadanym, nie tylko na modelu mysim i szczurzym, ale również u ludzi. Niekodujący region 5' flankujący gen *UCP1* składa się z: proksymalnego regionu regulatorowego, znajdującego się blisko miejsca inicjacji transkrypcji oraz z silnie konserwatywnego dystalnego regionu wzmacniającego (enhancerowego), leżącego około 3900 pz (u ludzi) powyżej miejsca inicjacji

transkrypcji^{59,103}. Proksymalny region promotorowy (promotor podstawowy) - leżący w obrębie 250 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, zawiera element regulatorowy typu CCAAT box, wiążący czynnik transkrypcyjny C/EBP (dokładniej formę C/EBP α i C/EBP β). Kolejną ważną sekwencją znajdującą się w tym regionie jest element odpowiedzi na cAMP (*cAMP response element*, CRE) oddziałujący z białkiem CREB (ang. *CRE-binding protein*). Czynnik transkrypcyjny CREB jest regulowany przez cAMP¹⁰³. W 2015 roku znaleziono nowy czynnik transkrypcyjny, indukowany zimnem - białko palca cynkowego 516 (ang. *zinc finger protein 516*, Zfp516) wiążący się z sekwencją znajdującą się w bliskim odcinku promotorowym¹⁰⁴. Region dystalny 5' genu *UCPI* posiada dwa miejsca CRE oraz miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych należących do nadrodziny receptorów jądrowych, które aktywowane są przez agonistów PPAR, retinoidy i hormony tarczycy. Jednym z takich miejsc jest element odpowiedzi na proliferatory peroksysomów (ang. *PPAR response element*, PPRE) rozpoznający izoformę PPAR α , PPAR γ lub oba, jako heterodimery z receptorem retinoidowym X (ang. *retinoid X receptor*, RXR). Przyłączenie endogennych ligandów, do których należą kwasy tłuszczowe oraz ich pochodne, aktywuje obie izoformy proliferatorów peroksysomów (α , γ) indukując ekspresję *UCPI* w BAT. PPAR γ pełni ważną funkcję w regulacji różnicowania preadipocytów w dojrzałe komórki tkanki tłuszczowej, a PPAR α kontroluje ekspresję *UCPI* w dojrzałych już adipocytach BAT. Kolejnym kluczowym receptorem jądrowym łączącym się z sekwencją elementu odpowiedzi kwasu retinowego (ang. *retinoic acid response element*, RARE) jest RXR i receptor kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptor*, RAR) tworzące heterodimer RXR/RAR. Aktywowany jest przez wiązanie kwasu retinowego all-trans lub 9-cis (ang. *retinoic acid*, RA) z cząsteczką RAR lub z PPAR w kompleksie z RXR. Tak jak wspomniano w rozdziale 1.2.3, stymulacja BAT przez NE powoduje wzrost stężenia hormonu T3, który jest ligandem dla receptora jądrowego hormonu tarczycy (ang. *thyroid receptor*, TR). Heterodimer TR/RXR rozpoznaje i łączy się z odpowiednią sekwencją DNA, zwaną elementem odpowiedzi TR (ang. *thyroid response element*, TRE), znajdującą się w dystalnym odcinku regulatorowym *UCPI*. Oprócz ww. receptorów jądrowych oddziałujących z regionem dystalnym *UCPI*, należy wspomnieć o aktywującym czynniku transkrypcyjnym 2 (ang. *activating transcription factor 2*, ATF2), który jest zależny od cAMP (**Ryc. 6**). Koaktywatorem transkrypcji *UCPI* jest PRDM16. Cząsteczka ta rozpoznaje i łączy się z czynnikami transkrypcyjnymi C/EBP β , PPAR α , PPAR γ , Zfp516 oraz koregulatorem PGC-1 α , którego zaś ekspresja jest

aktywowana PPAR α , PPAR γ , cAMP oraz retinoidy ¹⁰⁵. Uznaje się, że PRDM16 odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności tkanki tłuszczowej oraz regulacji transdiferencjacji WAT w BAT ¹⁰⁶.



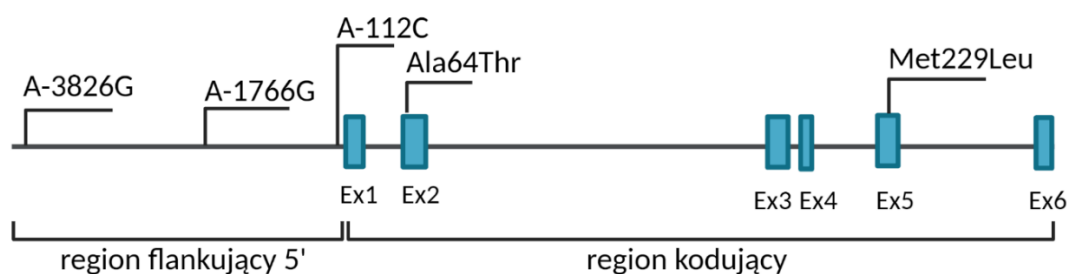
Ryc. 6 Mechanizm aktywacji transkrypcji *UCP1* jest procesem wieloczynnikowym. Wzrost stężenia cAMP poprzez stymulację współczulnego układu nerwowego prowadzi do aktywacji PKA, która oprócz uruchomienia szlaku lipolizy, fosforyluje czynnik transkrypcyjny CREB oraz aktywuje kinazę białkową aktywowaną mitogenami p38 (ang. *p38 mitogen-activated protein kinases*, p38 - MAPK). Kinaza ta z kolei uruchamia dwa niezależne szlaki: fosforyluje ATF-2, aktywując ekspresję PGC-1 α (nie pokazano na rycinie) oraz fosforyluje PGC-1 α i receptory jądrowe RAR. Po przyłączeniu się odpowiednich ligandów do dimerów receptorów jądrowych: PPAR α / PPAR γ , PPAR/RXR, RAR/RXR, TR/RXR, utworzone kompleksy rozpoznają i łączą się do im właściwym sekwencji DNA (elementów odpowiedzi) w distalnym regionie regulatorowym. Aktywacja w proksymalnym regionie promotorowym zachodzi poprzez przyłączenie białek C/EBP oraz ufosforylowanego CREB do elementów odpowiedzi indukując transkrypcję *UCP1*. Opracowanie własne na podstawie ^{59,103} Rycina powstała przy użyciu *BioRender.com*.

1.3.3 Polimorfizmy genu *UCP1*

Jak wspomniano w rozdziale 1.1.3, otyłość oraz MetS uwarunkowane są wieloczynnikowo, w głównej mierze przez czynniki środowiskowe. Istnieją jednak liczne badania wykazujące związek ww. dysfunkcji z predyspozycjami genetycznymi.

Uwaga badaczy została zwrócona na obecność wariantów genetycznych w obrębie genu *UCPI* oraz na ich wpływ na poziom transkrypcji i translacji. Istnieje wiele doniesień naukowych opisujących, że obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) może mieć wpływ na budowę oraz na zmianę aktywności tego białka, a w konsekwencji może różnicować podatność poszczególnych osób na występowanie otyłości i zespołu metabolicznego^{98,107}.

Gen kodujący białko UCPI znajduje się na długim ramieniu chromosomu 4 (region 4q28-q31). Składa się z 6 eksonów i 5 intronów i obejmuje około 13 000 pz, z czego 9 000 pz to część kodująca genu¹⁰¹. Liczne badania opisują związek wariantów genetycznych znajdujących się w niekodującym regionie 5' genu *UCPI* z ryzykiem wystąpienia otyłości, T2DM i innymi chorobami związanymi z niewłaściwą gospodarką lipidową, a należą do nich: A-3826G (rs1800592), A-1766G (rs3811791), A-112C (rs10011540). Innymi polimorfizmami genu *UCPI* omawianymi w literaturze są: Ala64Thr (rs45539933) i Met229Leu (rs2270565) znajdujące się odpowiednio w eksonie drugim i piątym¹⁰⁷.



Ryc. 7 Uproszczony schemat genu *UCPI* z zaznaczonymi omawianymi polimorfizmami (skrótom Ex oznaczono kolejne eksony w genie). Opracowanie własne na podstawie bazy *Ensembl*.

A-3826G (rs1800592)

Pierwszym i najlepiej opisanym polimorfizmem jest A-3826G, rs1800592. Wariant ten znajduje się w dystalnym niekodującym regionie regulatorowym 5', 3826 pz od pozycji startu transkrypcji genu *UCPI*. Dochodzi tutaj do substytucji adeniny (ang. *adenine*, A) na guaninę (ang. *guanine*, G). Udowodniono, iż nosiciele allelu G w grupie osób otyłych wykazują zmniejszoną ekspresję mRNA białka UCPI, sugerując znaczenie funkcjonalne dla tego SNP¹⁰⁸. Wykazano, iż polimorfizm ten znajduje się w rejonie enhancerowym, w bliskiej odległości miejsc wiązania jądrowych czynników transkrypcyjnych: RAR α , RAR β , RXR, PPAR γ ¹⁰⁹. Teza ta znalazła potwierdzenie w kolejnych badaniach, gdzie zaobserwowano, iż zmutowany wariant G omawianego

polimorfizmu znacznie obniżał aktywność promotorową genu *UCPI* mierzoną testem lucyferazowym ¹¹⁰. Polimorfizm ten został po raz pierwszy opisany w 1994 roku przez Oppert i współpracowników, którzy zaobserwowali w grupie osób populacji kanadyjskiej, że częstość występowania allelu G była wyższa u osób z dużym przyrostem wagi na przestrzeni 12 lat, niż u osób, które niewiele przybrały na wadze w tym czasie ¹¹¹.

A-1766G (rs3811791)

Kolejnym polimorfizmem genu *UCPI* jest wariant znajdujący się powyżej 1766 pz od miejsca startu transkrypcji oraz oddalony o około 2000 pz od A-3826G. Dochodzi tutaj do punktowej substytucji adeniny na guaninę. Po raz pierwszy został on opisany w 2005 roku przez zespół koreańskich badaczy, którzy wykazali, iż allel G jest istotnie związany z wyższym wskaźnikiem WHR i BMI, zwiększoną masą tkanki tłuszczowej i procentową zawartością tkanki tłuszczowej ¹¹². W badaniu tym analizowano również wzajemne oddziaływanie polimorfizmów A-3826G oraz A-1766G. Wykazano, iż osoby z haplotypem [GG] posiadają najwyższy procent tkanki tłuszczowej, podczas gdy haplotyp [GA] związany był z niższą zawartością tkanki tłuszczowej wśród koreańskich kobiet.

A-112C (rs10011540)

Polimorfizm A-112C (mutacja punktowa adeniny na cytozynę) znajduje się w proksymalnym regionie regulatorowym 5' genu *UCPI*, 112 pz od miejsca startu transkrypcji. Uznaje się, że A-112C wpływa na motyw elementu odpowiedzi insuliny (ang. *insulin response sequence*, IRS). W badaniach *in vitro*, wariant C polimorfizmu A-112C zmniejszył aktywność promotorową genu *UCPI* badaną w teście lucyferazowym w porównaniu do wariantu dzikiego (A), potwierdzając tym samym udział IRS w regulacji transkrypcji *UCPI* ¹⁰⁸. Mori i wsp. wykazali również, że częstość występowania allelu C jest większa u Japończyków ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2, niż u osób zdrowych. Dodatkowo polimorfizm ten występował w silnej nierównowadze sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD) z innym SNP genu *UCPI*: Met229Leu ¹¹³.

Ala64Thr (rs45539933)

Zamiana G na A w pozycji 1068 pz poniżej miejsca rozpoczęcia startu transkrypcji (ekson 2) powoduje zmianę aminokwasu alaniny (ang. *alanine*, Ala)

w pozycji 64 na treoninę (ang. *threonine*, Thr). Polimorfizm ten zwrócił uwagę badaczy w 1998 r., kiedy to zaobserwowano, że zmutowany allel występuje dwa razy częściej w grupie osób otyłych niż w grupie kontrolnej ¹¹⁴.

Met229Leu (rs2270565)

Jednym z najmniej poznanych polimorfizmów genu *UCPI* jest polimorfizm pojedynczej mutacji (A → T) w piątym eksonie, zmieniający aminokwas metioninę (ang. *methionine*, Met) w pozycji 229 na leucynę (ang. *leucine*, Leu). Wcześniej wspomniana praca Hamann'a i wsp. dotyczyła również polimorfizmu Met229Leu, jednak nie wykazano związku tego SNP z występowaniem otyłości ¹¹⁴. Przytoczone badanie Mori'ego pokazało, iż chorzy na T2DM częściej posiadają genotyp Met/Leu oraz Leu/Leu w porównaniu do osób zdrowych, co sugeruje związek tego SNP z ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2 ¹¹³.

II. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Aktywność termogeniczna brązowej tkanki tłuszczowej może przyczyniać się do spalania tłuszczu na drodze termogenezy i w ten sposób przyczyniać się do nadmiernego gromadzenia tłuszczu prowadzącego do otyłości. Wiele czynników moduluje tę aktywność, tym samym wpływających na powstawanie białka UCP1. Należą do nich m.in.: ekspozycja na zimno, styl życia, w tym uprawianie sportów, palenie papierosów, stosowanie diety, zanieczyszczenie środowiska, a także czynniki genetyczne. Dane literaturowe wskazują, że obecność wariantów genetycznych w obrębie genu *UCP1* może wpływać na poziom transkrypcji, translacji lub na zmienione właściwości białka - w ich następstwie może dochodzić do zmiany funkcji białka, a w konsekwencji może różnicować podatność poszczególnych osób na występowanie otyłości i zespołu metabolicznego.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie związku polimorfizmów występujących w genie *UCP1* z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego w populacji polskiej oraz zbadanie funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP. Realizowane badania zostały podzielone na główne zadania:

- Analiza związku wybranych na podstawie danych literaturowych polimorfizmów genu *UCP1* z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego.
- Poszukiwanie nowych, nieopisanych w literaturze wariantów genu *UCP1* związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego przy zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS).
- Badanie ekspresji *UCP1* w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej.
- Badanie funkcjonalnego znaczenia wybranych polimorfizmów regionu 5' genu *UCP1* z wykorzystaniem linii komórkowej HepG2 oraz PAZ6.

III. MATERIAŁY

3.1 Charakterystyka badanych grup

Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie, a komisja bioetyczna wyraziła zgodę na prowadzenie badań (UMED w Poznaniu KB 215/13 aneksowana uchwałą nr 85/16 na projekt „*Międzynarodowa sieć doskonałości dla badań nad predyspozycją do rozwoju chorób układu krążenia i zaburzeń metabolicznych uwarunkowaną polimorfizmami genu UCPI*”, akronim: U-GENE, w ramach 7. PR UE PEOPLE Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) na podstawie kontraktu zawartego z Research Executive Agency o nr 319010”, nr decyzji MNiSZW, nr 3564/7.PR/2016/2). Kryteria wyłączenia z projektu to: wiek poniżej 18 lat, palenie tytoniu, ciąża, karmienie piersią, stany zapalne lub aktualne infekcje.

3.1.1 Grupa badana

W ramach współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w latach 2014-2017 zrekrutowano grupę pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym, którą stanowiły 252 osoby bez stwierdzonej cukrzycy typu 2 oraz 29 osób z T2DM (kryteria rozpoznania IDF - AHA/NHLBI). Od pacjentów pobrano 3 ml krwi obwodowej, a z otrzymanego materiału wyizolowano DNA. Zebrano pełny opis kliniczny pacjentów obejmujący: dane antropometryczne (płeć, wiek w dniu pobrania materiału, wzrost, waga, obwód talii, obwód bioder, ciśnienie skurczowe/rozkurczowe krwi), pomiary biochemiczne krwi w tym morfologię krwi (erytrocyty, leukocyty, hematokryt), profil lipidowy (cholesterol ogólny, LDL, HLD, trójglicerydy), poziom glukozy na czczo.

3.1.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 365 osób zdrowych, od których materiał do badań pobrano w ramach współpracy z Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu. 5 ml krwi obwodowej pobrano wg. ścisłych kryteriów włączenia do projektu. Od uczestników badania zebrano dokładny wywiad medyczny, wykonano pomiary antropometryczne (płeć, wiek w dniu pobrania materiału, wzrost, waga, obwód talii, obwód bioder, ciśnienie skurczowe/rozkurczowe krwi). Dodatkowo, przy użyciu analizatora tkanki tłuszczowej OMRON BF-306, zmierzono procentową zawartość tkanki tłuszczowej.

3.1.3 Grupy do badania ekspresji *UCP1* i *UCP2*

Wykonano badania ekspresji genów *UCP1* i *UCP2* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi (cukrzycą typu 2 oraz osób otyłych) oraz grupy osób zdrowych (grupa kontrolna). Próbkę krwi obwodowej pobrano od 20 osób z T2DM (średni wiek $54,5 \pm 4,8$), 19 osób z otyłością ($49,8 \pm 5,2$) i 22 zdrowych ochotników ($44 \pm 6,3$). Pacjenci zostali zdiagnozowani w „*Surb Astvatsamayr*” Medical Center w Erywaniu, Armenii. Kryteria rozpoznania T2DM: poziom glukozy w osoczu krwi na czczo ≥ 7 mmol/l, ogólny poziom glukozy w osoczu krwi $\geq 11,1$ mmol/l, poziom hemoglobiny glikowanej $HbA_{1c} > 48$ mmol/mol (6,5%). Wszyscy pacjenci stosowali doustne środki hipoglikemizujące, jednak żaden nie był leczony insuliną. Grupę pacjentów otyłych stanowiły osoby o BMI ≥ 30 kg/m², bez zdiagnozowanej T2DM. Osoby zdrowe nie zgłosiły zdiagnozowanej T2DM, otyłości lub innych chorób metabolicznych. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Etyki Instytutu Biologii Molekularnej NAS RA (IRB IORG0003427), a materiał do badań został dostarczony w ramach współpracy z Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej, Instytutu Biologii Molekularnej, Narodowej Akademii Nauk w Erywaniu, Armenii.

3.2 Linie komórkowe

Badania funkcjonalnego znaczenia wybranych wariantów genetycznych zlokalizowanych w rejonie 5' genu *UCP1* w odniesieniu do aktywności promotorowej wykonano na dwóch liniach komórkowych: HepG2 oraz PAZ6. HepG2 (ang. *hepatocellular carcinoma*) to linia komórkowa nowotworu wątrobowo-komórkowego, pozyskana z banku komórek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej imienia Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

Linie komórkową PAZ6 otrzymano dzięki uprzejmości profesora Tarika Issad z Instytutu Cochin w Paryżu. Linie tę wyprowadzono z BAT z frakcji naczyniowej podścieliska ludzkiego noworodka i unieśmiertelniono przez transfekcję genami kodującymi duży i mały antygen SV40 pod kontrolą promotora wimentyny¹¹⁵. Jest to linia, która w odpowiednim medium różnicującym ma zdolność do różnicowania się w kierunku dojrzałych brązowych adipocytów.

3.3 Odczynniki

3.3.1 Startery PCR i sondy TaqMan

Tabela 2 Sekwencje stosowanych starterów i sond TaqMan do oznaczeń wybranych miejsc polimorficznych.

SNP		Sekwencja startera 5' → 3'	Sonda TaqMan (Applied Biosystems)
A-3826G (rs1800592)	forward	CTGTGGTAGTGACAAAGTAT	C___8866368_20
	reverse	CCAAAGGGTCAGATTTCTAC	
A-1766G (rs3811791)	forward	ATGTTGACCTGACGGGTAGC	C___2052379_10
	reverse	AGCTTGCAACCCATGTTCTT	
A-112C (rs10011540)	forward	AAGTCCCAGCGGAAGACCGG	C___25761748_10
	reverse	GGCAGCAAACCCGATTCCTG	
Ala64Thr (rs45539933)	forward	GCCCACCCATATTCTCCAGA	C___25619416_30
	reverse	GAGGGAGGTGGATGGAAGAG	
Met229Leu (rs2270565)	forward	GCTGGATTTTGCGCCAAAAGCT	C___15957896_20
	reverse	GTCCCAAAGCACACAGACAG	

Tabela 3 Sondy TaqMan wykorzystane do badania ekspresji mRNA wybranych genów.

badany gen	Sonda Taqman (Applied Biosystems)
<i>UCP1</i>	Hs00222453_m1
<i>UCP2</i>	Hs01075227_m1
<i>zic1</i>	Hs00602749_m1
<i>leptin</i>	Hs00174877_m1
<i>B3AR</i>	Hs00609046_m1
<i>B2M</i>	Hs00699198_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1
<i>HPRT</i>	Hs99999909_m1

3.3.2 Enzymy

- **BclI** (New England BioLabs)
- **BsiHKAI** (New England BioLabs)
- **BstNI** (*MvaI*) (Thermo Fisher Scientific)
- **MspA1I** (New England BioLabs)
- **HindIII** (EURx)
- **polimeraza KAPA Taq** (Kapa Biosystems)

3.3.3 Płyiny hodowlane

Tabela 4 Skład mediów hodowlanych dla wybranych linii komórkowych wykorzystywanych w badaniach.

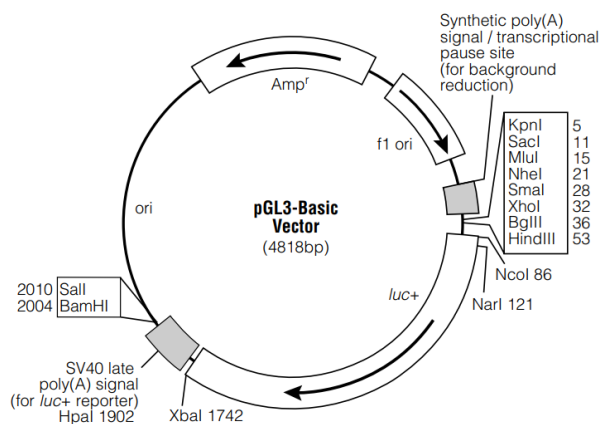
linia	skład medium hodowlanego
HEPG2	EMEM (PChO IITD PAN) 10% FCS (<i>Gibco</i>)
niezróżnicowana linia PAZ6	DMEM/F12 + Glutamax-I (<i>Gibco</i>) 8% FCS (<i>Gibco</i>) 15mM HEPES (<i>Gibco</i>) 1% penicylina/streptomycyna (<i>Gibco</i> , 10,000U/ml)
zróżnicowana linia PAZ6	DMEM/F12 + Glutamax (<i>Gibco</i>) 5% FCS (<i>Gibco</i>) 15mM HEPES (<i>Gibco</i>) 1% penicylina/streptomycyna (<i>Gibco</i> , 10,000U/ml) 33 µM biotyna (<i>Sigma Aldrich</i>) 17 µM kwas pantotenowy (<i>Sigma Aldrich</i>) 1 nM trójiodotyronina (<i>Sigma Aldrich</i>) 100 nM deksametazon (<i>Sigma Aldrich</i>) 1 µM pioglitazon (<i>Sigma Aldrich</i>) 500 nM insulina (<i>Sigma Aldrich</i>) 0,25 mM IBMX (<i>Sigma Aldrich</i>)

Do przygotowania mieszaniny transfekcyjnej używano medium Opti – MEM (*Gibco*).

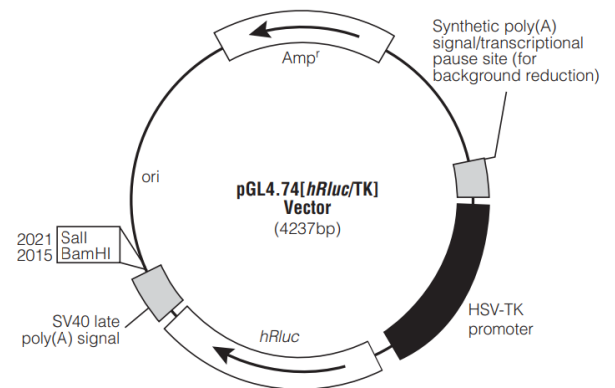
3.3.4 Bufory

- **PBS** z jonami Ca²⁺, Mg²⁺ - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej z jonami wapnia i magnezu (*PChO IITD PAN*)
- **PBS** bez jonów - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów wapnia i magnezu (*PChO IITD PAN*)
- **TBE** - bufor boranowy (Tris-boran-EDTA) do elektroforezy agarozowej (*PChO IITD PAN*)
- **SLR** - bufor lizujący czerwone krwinki (*PChO IITD PAN*)

3.3.5 Wektory



Ryc. 8 Mapa wektora pGL3-Basic (Promega).



Ryc. 9 Mapa wektora pGL4.74 (Promega).

Objaśnienie:

- **polilinker** – miejsce wielokrotnego klonowania dla wektora pGL3-Basic
- **SV40 late poly(A) signal** – sygnał późnej poliadenylacji pochodzący z wirusa SV40
- **Amp^r** – gen oporności na ampicynę (gen β-laktamazy)
- **synthetic poly(A) signal/transcriptional pause site** – sygnał terminacji transkrypcji
- **ori** – miejsce inicjacji replikacji
- **f1 ori** – miejsce inicjacji replikacji (sekwencja pochodząca z faga filamentowego)
- **luc⁺** – gen kodujący lucyferazę pochodzącą ze świetlika
- **hRLuc** – gen lucyferazy pochodzący z *Renilla reniformis*
- **HSV-TK** – promotor wektora pGL4.74

Do doświadczenia optymalizacji transfekcji PAZ6 użyto wektora zawierającego sekwencję kodującą białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) – pmaxGFP vector (*Lonza*).

3.3.6 Zestawy komercyjne

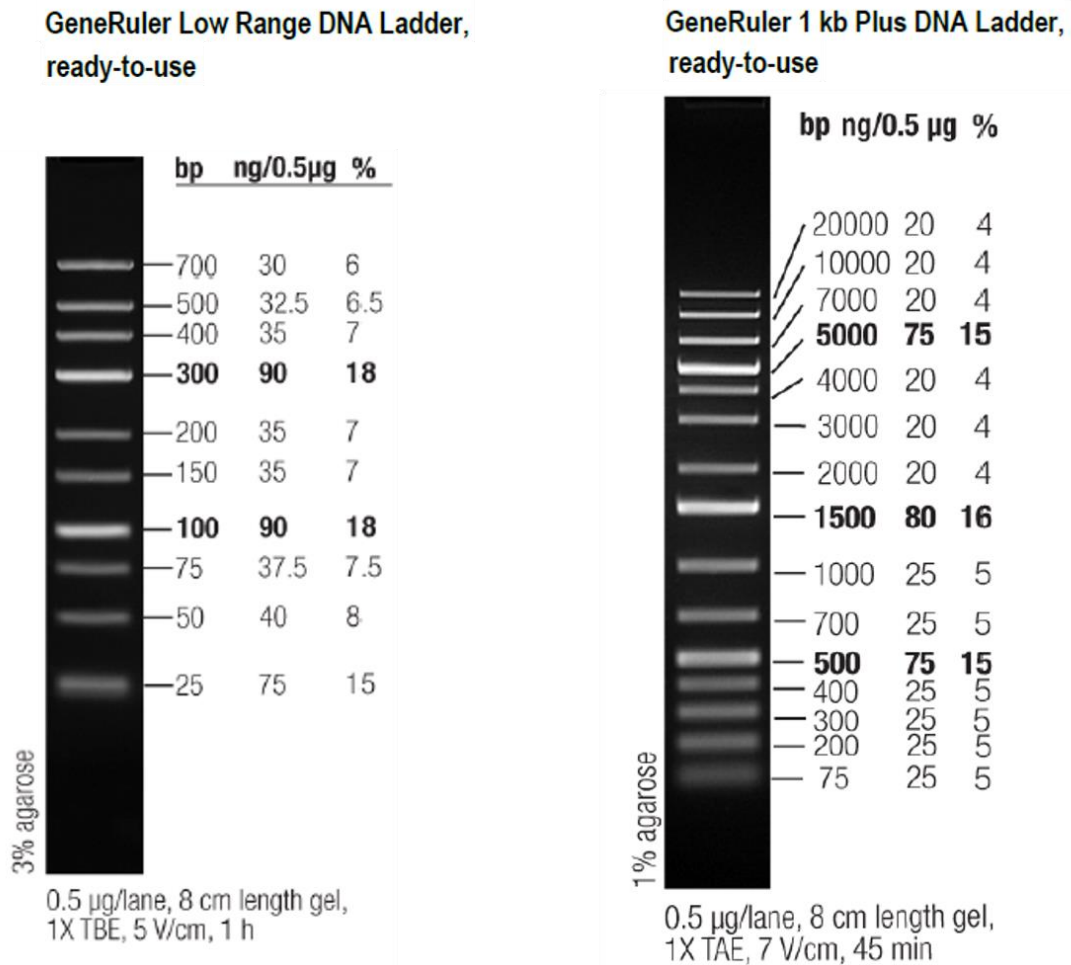
- AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel (*Illumina, Inc.*)
- Ampliseq CD Indexes (*Illumina, Inc.*)
- Dual-Glo Luciferase Assay System (*Promega*) - substrat dla lucyferazy ze świetlika, składający się z lucyferyny ze świetlika, jonów Mg²⁺, ATP i tlenu cząsteczkowego
- Genomic DNA ScreenTape Assay (*Agilent Technologies*)
- High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (*Agilent Technologies*)

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*)
- Invisorb Spin Blood Midi Kit (*Stratec*)
- iScript cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*)
- Kapa Pure Beads (*KapaBiosystems*)
- MiSeq Reagent Kit v2 (*Illumina, Inc.*)
- Qiagen RNeasy Mini Kit (*Qiagen*)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (*Invitrogen*)
- TaqMan Gene Expression Assay (*Applied Biosystems*)
- TaqMan Genotyping Assay (*Applied Biosystems*)
- Truseq Custom Amplicon Low Input Kit (*Illumina, Inc.*)
- TruSeq Dual Index Sequencing Primers (*Illumina, Inc.*)

3.3.7 Inne

- 1N NaOH
- aceton (*Chempur*)
- agarozą w proszku (*PronaAgarose*)
- β - merkaptoetanol (*Sigma Aldrich*)
- błękit trypanu 0,4% (*Sigma Aldrich*)
- DAPI Staining Solution (*Abcam*)
- etanol 99,8% cz.d.a. (*Chempur*)
- FuGENE® HD Transfection Reagent (*Promega*)
- kwas 9 - *cis* retinowy (*Sigma Aldrich*)
- norepinefryna (*Levonor*)
- GeneRuler 1 kb Plus Dna Ladder (*Thermo Fisher Scientific*) – marker molekularny do elektroforezy agarozowej - **Ryc. 10**
- GeneRuler Low Range DNA lader, ready-to-use (*Thermo Fisher Scientific*) - marker molekularny do elektroforezy agarozowej - **Ryc. 10**
- Oil Red O - roztwór 0,5% w izopropanolu (*Sigma Aldrich*)
- Orange DNA Loading Dye 6X (*Thermo Fisher Scientific*) - obciążnik DNA
- RNAlater Stabilization Solution (*Invitrogen*)
- paraformaldehyd 16% w ampułkach (*Thermo Fisher Scientific*)
- odczynnik do rozcieńczania przeciwciał – Dako Antibody Diluent (*Agilent Dako*)
- SimplySafe (*EURx*) – barwnik do barwienia DNA w żelu agarozowym

- poliklonalne królicze przeciwciało anti-UCP1 (*Abcam*)
- poliklonalne kozie przeciwciało anti – królik IgG skoniugowane z AlexaFluor 647 (*Abcam*)
- TaqMan Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*)
- TaqMan Genotyping Master Mix (*Applied Biosystems*)
- trypsyna z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} (*PChO IITD*)



Ryc. 10 Układ prążków i odpowiadające im masy markera. Po lewej - GeneRuler Low Range DNA ladder (*ThermoFisher Scientific*), po prawej – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific*).

3.4 Aparatura

- aparat do automatycznej elektroforezy żelowej (*Agilent Technologies*, TapeStation 4200)
- aparat do elektroforezy poziomej (*Wealtec*, Elite 300)
- chłodziarko - zamrażarka (*Polar*)
- fluorometr (*ThermoFisher Scientific*, Qubit 3)

- inkubator do hodowli komórkowych, 37 °C, 5% CO₂ (*Forma Scientific*, CO₂ Water Jacketed Incubator)
- komora Bürkera (*Fein-Optik*, Bürker chamber depth 0,1 mm)
- komora laminarna (*Faster*, SafeFast Premium)
- komora z transluminatorem do wizualizacji i dokumentacji żeli (*Uvitec Cambridge*, FireReader MAX)
- kuchenka mikrofalowa (*Alaska*, typ MW 1000)
- luminometr (*Promega*, GloMax®-Multi Microplate Multimode Reader)
- mikroskop fluorescencyjny (*Olympus*, BX51)
- mikroskop świetlny (*Nikon*, Eclipse E200)
- mikroskop świetlny odwróconego pola (*Nikon*, TMS)
- mikrowirówka (*BIOSAN*, FVL 2400N Combi-Spin)
- pipety automatyczne (0,5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 µl, 1-5 ml, wielokanałowa 20-200) (*Eppendorf*)
- sekwanator NGS (*Illumina*, MiSeq)
- spektrofotometr (*DeNovix*, DS-11 Spectrophotometer)
- termoblok (*Biometra*, TB1 Thermoblock)
- termocykler (*BioRad*, T100 ThermoCycler)
- termocykler do Real Time PCR (*Applied Biosystems*, Viia 7)
- vortex (*IKA*, MS1 Minishaker)
- waga (*Mettler*, AT261 DeltaRange)
- wirówka (*Sigma*, 1-15)
- wirówka (*Sigma*, 3K15)
- wirówka do cytopspinu (*Thermo Fisher Scientific*, Shandon Cytospin)
- zamrażarka -20°C (*Liebherr*)
- zamrażarka o ultraniskiej temperaturze zamrażania -80°C (*Telstar*, Igloo 445L)

IV. METODY

4.1 Oznaczanie wybranych polimorfizmów genu *UCPI*

4.1.1 Izolacja DNA z krwi pełnej mrożonej

Uzyskanie peletu WBC

Przed przystąpieniem do izolacji właściwej na kolumnach ze złożem krzemionkowym, przeprowadzono lizę erytrocytów w celu uzyskania osadu składającego się z leukocytów (białych krwinek) (ang. *white blood cells*, WBC). Krok ten oraz zastosowanie zestawu MIDI pozwala na otrzymanie wysokojakościowego DNA o wysokim stężeniu, z dużych objętości krwi pełnej. Rozmrożono próbkę krwi i przeniesiono zawartość do nowej 13 ml okrągłodennej probówki. Dodano 3 objętości buforu lizującego erytrocyty SLR, a następnie całość dokładnie wymieszano przez kilkukrotne odwracanie, następnie krótko zworteksowano. Zwirowano próbkę 1000 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Supernatant delikatnie usunięto, zostawiając pelet komórkowy na dnie probówki. Płukanie buforem SLR (3 ml) powtórzono dwukrotnie, pamiętając o dokładnym rozbiciu peletu leukocyтарnego. Po ostatnim płukaniu, ostrożnie zebrano pipetą resztkę supernatantu. Otrzymany pelet WBC użyto w kolejnych krokach izolacji DNA.

Izolacja DNA na kolumnach ze złożem krzemionkowym

Do izolacji DNA wykorzystano zestaw Invisorb Spin Blood Midi Kit. W tej metodzie izolacji wykorzystuje się wiązanie DNA do złoża krzemionkowego w wysokim stężeniu soli chaotropowych. Ujemnie naładowane cząsteczki DNA łączą się do dodatnio naładowanej krzemionki. Zanieczyszczenia są odpłukiwane, a następnie DNA wmywany jest roztworem o niskim stężeniu soli.

Do osadu z krwi dodano 600 µl buforu lizującego (Lysis Solution) i dokładnie wymieszano przez pipetowanie. Całość roztworu przeniesiono do czystej 1,5 ml probówki Eppendorf zawierającej 40 µl proteiny K i krótko zworteksowano. Następnie probówkę umieszczono w termobloku, w temperaturze 70°C na 20 minut. W trakcie inkubacji w wysokiej temperaturze kilkukrotnie mieszano próbkę. Po inkubacji jeszcze raz dokładnie zworteksowano i krótko zwirowano probówkę. Do lizatu dodano 300 µl buforu wiążącego (Binding Buffer), a następnie całość roztworu przeniesiono na kolumnę z membraną krzemionkową umieszczoną w probówce

zbiorczej. Zwirowano kolumnę (3 minuty, 11 000 x g, temperatura pokojowa). Usunięto filtrat z próbki zbiorczej. Dodano 500 µl buforu płuczącego (Washing Buffer I) na kolumnę, zwirowano (11 000 x g, 1 minuta). Usunięto filtrat z próbki zbiorczej. Następnie dwukrotnie przepłukano kolumnę 500 µl buforu płuczącego II - Washing Buffer II (za każdym razem wirowano 1 min w 11 000 x g, filtrat usuwano). Zwirowano próbkę na maksymalnych obrotach przez 3 min w celu usunięcia pozostałości buforu płuczącego - Washing Buffer II zawierającego etanol. Przeniesiono kolumnę do czystej 1,5 ml próbki Eppendorf. Dodano 150 µl dejonizowanej wody MiliQ i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie zwirowano kolumnę (11 000 x g, 1 minuta), a eluat zachowano. Przygotowano nową próbkę i przeniesiono do niej kolumnę, z której ponownie eluowano DNA dodając 100 µl wody dejonizowanej MiliQ (inkubacja 10 minut w temperaturze pokojowej) i wirując (11 000 x g przez 1 min.). Otrzymane eluaty zostały sprawdzone spektrofotometrycznie pod względem ilościowym i jakościowym przy długości fali A₂₆₀ i A₂₈₀.

4.1.2 Oznaczanie SNP metodą PCR-RFLP

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) polega na przeprowadzeniu reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) wybranej sekwencji DNA, a następnie trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym zamplifikowanego fragmentu DNA. W zależności od liczby miejsc restrykcyjnych i odległości między nimi uzyskuje się fragmenty o różnej długości. Metoda ta pozwala na identyfikację polimorfizmu, jeśli w efekcie mutacji powstaje nowe miejsce restrykcyjne lub dochodzi do utraty poprzednio istniejącego miejsca. Allele danego polimorfizmu rozróżnia się na podstawie wielkości fragmentów DNA widocznych po rozdziale elektroforetycznym.

Projektowanie starterów

Na podstawie sekwencji nukleotydowych fragmentów genu *UCP1* okalających badane polimorfizmy zaprojektowano pary starterów: forward i reverse (**Tabela 2**, **Tabela 7**). Startery projektowano przy użyciu programu *Primer 3*.

PCR

Przygotowano mieszaninę do PCR w próbkach o pojemności 200 µl, mieszając w odpowiednich ilościach następujące reagenty (końcowa objętość

mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μ l). Skład mieszaniny PCR został przedstawiony w **Tabela 5**.

Tabela 5 Skład mieszaniny PCR.

reagent	objętość
starter forward (2 μ m)	0,5 μ l
starter reverse (2 μ m)	0,5 μ l
dNTP (10 mm)	0,1 μ l
matryca (DNA, stężenie \approx 100 ng/ μ l)	1 μ l
bufor (10 x stężony z MgCl ₂): 10x Kapa bufor a: A-1766G, Ala64Thr 10x Kapa bufor b: A-3826G, a-112c, Met229Leu	1 μ l
woda dejonizowana MiliQ	6,8 μ l
polimeraza Kapa Taq [5u/ μ l]	0,1 μ l

Tabela 6 Etapy oraz czas trwania reakcji PCR

etap	czas	temperatura	ilość cykli
denaturacja wstępna	5 minut	95 °C	x 1
denaturacja właściwa	35 sekund	95 °C	
hybrydyzacja starterów	55 sekund	*	x 30
reakcja polimeryzacji	1 minuta	72 °C	
wydłużenie końcowe	10 minut	72 °C	x 1
przechowywanie	∞	4 °C	-

* temperatury hybrydyzacji starterów z komplementarnymi sekwencjami zostały zoptymalizowane dla każdej pary starterów odpowiadającej badanemu miejscu polimorficznemu (**Tabela 7**).

Sekwencje starterów forward i reverse do reakcji PCR przedstawiono w podrozdziale 3.3.1. Temperatury hybrydyzacji (T_m) dla każdej pary starterów zostały wyznaczone w procesie optymalizacji reakcji PCR i wynosiły: 52,2°C dla A-3826G; 61,1°C dla A-1766G; 56,9 °C dla A-112C; 61,1°C dla Ala64Thr; 54,2°C dla Met229Leu.

Elektroforeza w żelu agarozowym po reakcji PCR

Część namnożonego produktu PCR (4 μ l) sprawdzono na 2% żelu agarozowym z 3% dodatkiem barwnika SimplySafe w 1 x stężonym buforze TBE – kontrola reakcji amplifikacji. Przed nałożeniem próbki na żel mieszano ją z 2 μ l barwnika obciążającego.

Do pierwszej studzienki w żelu dodawano 2 µl markera (O'GeneRuler Low Range DNA ladder), a do pozostałych - badane próby. Elektroforezę prowadzono 20 minut przy stałym napięciu elektrycznym 120 V.

Cięcie restrykcyjne

Pozostałe 6 µl mieszaniny po reakcji PCR poddano trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (podrozdział 3.3.2). Do mieszaniny dodano 1 µl odpowiedniego buforu 10x stężonego; dla mieszaniny z restryktazą BclII (A-3826G), BsiHKAI (A-1766G), MvaI, MspA1 (Ala64Thr), HindIII (Met229Leu) były to odpowiednio NeBuffer 3.1, CutSmart, 1xbuffer R, CutSmart i 10xONE Buffer bez BSA. Mieszanina z enzymem HindIII wymagała dodania 0,1 µl BSA. Całość uzupełniono wodą dejonizowaną miliQ do objętości końcowej 10 µl. Na końcu dodawano 0,2 µl odpowiedniej restryktazy: BclII, BsiHKAI, MvaI, MspA1, HindIII. W **Tabela 7** przedstawiono warunki cięcia restrykcyjnego dla używanych enzymów.

Elektroforeza w żelu agarozowym po trawieniu restrykcyjnym

Produkty cięcia enzymami restrykcyjnymi (10 µl) były rozdzielane na 2% żelu agarozowym z 3% dodatkiem barwnika SimplySafe w 1x stężonym buforze TBE. Przed nałożeniem próbki na żel mieszano ją z 2 µl barwnika obciążającego. Do pierwszej studzienki w żelu dodawano 2 µl markera (O'GeneRuler Low Range DNA ladder), a do pozostałych - badane próby. Elektroforezę prowadzono 30 minut przy stałym napięciu elektrycznym 120 V. Dla produktów cięcia enzymem HindIII oraz MvaI analizę przeprowadzono w 3% żelu, obniżono napięcie do 100V oraz wydłużono czas elektroforezy do 60 minut. W **Tabela 7** przedstawiono zbiorczo warunki przeprowadzenia PCR-RFLP dla badanych SNP.

Tabela 7 Zoptymalizowane warunki PCR-RFLP dla badanych polimorfizmów.

SNP	dbSNP	T _M [°C]	amplicon [pz]	sekwencja starterów	enzym restrykcyjny (bufor)	warunki trawienia	Długości produktów na żelu po cięciu restrykcyjnym [pz]
A-3826G	rs1800592	52,2	470	5'CTGTGGTAGTGACAAAGTAT3' 5'CCAAAGGGTCAGATTCTAC3'	BclI (NeBuffer 3.1)	50°C - 20 minut	AA: 179, 291 AG: 179, 291, 470 GG: 470
A-1766G	rs3811791	61,1	443	5'ATGTTGACCTGACGGGTAGC3' 5'AGCTTGCAACCCATGTTCTT3'	BsiHKAI (CutSmart)	65°C - 90 minut	AA: 103, 340 AG: 103, 340, 443 GG: 443
A-112C	rs10011540	56,9	165	5' AAGTCCCAGCGGAAGACCGG 3' 5' GGCAGCAAACCCGATTCTG 3'	MvaI (BstNI) (10xBuffer R)	37°C- 1h 15minut	AA:165 AC:18, 147, 165, CC: 18, 147 GG: 12, 228, 345
Ala64Thr	rs45539933	61,1	585	5'GCCCACCCATATTCTCCAGA3' 5'GAGGGAGGTGGATGGAAGAG3'	MspAII (CutSmart)	37°C - 1h, 65°C – 20 minut	GA: 12, 47, 190, 228, 345 AA: 12, 47, 190, 345
Met229Leu	rs2270565	54,2	203	5'GCTGGATTTTGCGCAAAAGCT3' 5'GTCCCAAAGCACACAGACAG3'	HindIII (10xONE Buffer)	37°C- 1h 15minut, 65°C- 20min	AA: 17, 186 TA: 17, 186,203 TT : 203

4.1.3 Oznaczanie SNP metodą Real-Time PCR

Aby zweryfikować wiarygodność wyników PCR-RFLP zdecydowano się na powtórne genotypowanie wybranych losowo próbek, z wykorzystaniem metody Real Time PCR.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) jest to metoda umożliwiająca monitorowanie przyrostu produktu w każdym kolejnym cyklu trwania reakcji. Jest to możliwe dzięki znakowaniu starterów, sond oligonukleotydowych lub produktów amplifikacji odpowiednimi fluoroforami. Do reakcji Real Time PCR wykorzystano sondy TaqMan, nazywane inaczej „sondami degradacyjnymi”. Są to krótkie (20-30 par zasad) oligonukleotydy komplementarne do powielanej sekwencji DNA. Barwnik fluorescencyjny (fluorochrom - reporter) znajduje się na końcu 5' sondy, natomiast na końcu 3' przyłączony jest wygaszacz (quencher). Genotypowanie metodą Real-Time PCR wykorzystuje dwie sondy, różniące się sekwencją tylko w miejscu SNP oraz posiadające inny fluorochrom dla każdego allelu. Jeśli sondy są niezhybrydyzowane z fragmentem DNA, to bliskość barwnika i wygaszacza blokuje fluorescencję. Termostabilne polimerazy Taq mające aktywność egzonukleazową 5'-3', rozszczepiają podwójnie znakowane sondy podczas hybrydyzacji do komplementarnej sekwencji. Degradacja sond w zależności od występującego allelu powoduje przestrzenne rozdzielenie fluorochromu i wygaszacza, co powoduje uwolnienie sygnału fluorescencji. Pomiar akumulującego się produktu następuje po zakończeniu etapu wydłużania (elongacji). W każdym cyklu PCR wraz ze wzrostem stężenia produktu hybrydyzuje z nim więcej sondy. Podczas jej degradacji dochodzi do uwalniania fluorochromu, a w związku z tym w każdym kolejnym cyklu zwiększa się intensywność fluorescencji ¹¹⁶.

Wybrane polimorfizmy genu *UCPI* oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu sond i starterów TaqMan SNP Genotyping Assay. Do określenia genotypu badanej próbki wykorzystano 20 ng DNA na jedną reakcję (1 µl). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl, oprócz matrycy zawierała również: 5 µl TaqMan Genotyping Master Mix, 0,2 µl odpowiedniej dla badanego SNP sondy oraz wodę dejonizowaną MiliQ - 3,8 µl. Sondy te znakowane były barwnikami fluorescencyjnymi: VIC – allel 1, FAM – allel 2, umożliwiając tym samym rozróżnienie alleli w badanej próbce. Wykorzystane sondy przedstawiono w **Tabela 2**.

Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 1) 95°C przez 10 minut; 2) 40 cykli składających się z: denaturacji 95°C przez 15 sekund oraz annealingu (przyłączanie starterów) w 60°C przez 1 minutę w aparacie do reakcji Real Time PCR Viiia 7 z wykorzystaniem oprogramowania QuantStudio™ Software V1.2.4.

4.1.4 Analiza statystyczna

Dokonano analizy asocjacji wybranych SNP z ryzykiem zachorowania na zespół metaboliczny przy pomocy platformy SHEsis¹¹⁷. Sprawdzone, czy częstość genotypów badanych SNP jest zgodna z częstościami przewidzianymi przez rozkład Hardy'ego Weinberga (ang. *Hardy Weinberg equilibrium*, HWE). Następnie sprawdzono za pomocą testu statystycznego chi-kwadrat (χ^2), czy nie ma istotnych różnic między obserwowanymi licznosciami poszczególnych genotypów oraz częstości alleli pomiędzy porównywanymi grupami (chorzy – zdrowi, ect). Sprawdzone również czy badane SNP są w nierównowadze sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD) między poszczególnymi *loci*. Przeprowadzono analizę haplotypów i porównywano ich przewidywane częstości pomiędzy badanymi grupami. Wyniki przedstawiono w postaci ilorazu szans (ang. *odds ratio*, OR) z 95% przedziałem ufności (ang. *confidence interval*, CI95) przyjmując wartość $p < 0,05$ za statystycznie istotną.

4.2 Sekwencjonowanie NGS regionu kodującego oraz regionów 5' i 3' genu *UCPI*

Sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) zwane sekwencjonowaniem masowo równoległym jest wysokoprzepustową techniką, znaną od 2005 roku i szeroko stosowaną m.in. do sekwencjonowania całych genomów, transkryptomów, badania interakcji białko-DNA/RNA, sprawdzanie stopnia metylacji, a także do badań metagenomowych. W niniejszej pracy wykorzystano platformę *Illumina*, która oparta jest o technologię sekwencjonowania przez syntezę (ang. *sequencing by synthesis*, SBS) do sekwencjonowania regionu kodującego *UCPI* oraz regionów regulatorowych 5' oraz 3' UTR w trzech grupach: 36 osób zdrowych, 30 osób ze zdiagnozowanym MetS oraz u 29 osób z cukrzycą typu 2. W tym celu zaprojektowano i wykorzystano dwa panele:

- Truseq Custom Amplicon Low Input Kit - sekwencjonowanie regionu kodującego *UCPI*,

- AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel - sekwencjonowanie regionów: 5' (5000 pz powyżej miejsca startu transkrypcji *UCPI*) oraz 3' UTR (2000 pz poniżej ostatniego egzonu).

Panele zostały zaprojektowane oraz przygotowane przez firmę *Illumina* na podstawie koordynatów referencji genomu Hg19 dla regionu kodującego genu oraz regionów 5' i 3' genu *UCPI*.

4.2.1 Wybór prób

Materiał do przygotowania bibliotek a następnie sekwencjonowania stanowiło wysokiej jakości, niezdegradowane genomowe DNA wyizolowane do genotypowania (procedura izolacji DNA opisana w rozdziale 4.1.1). Ocenę jakości genomowego DNA przeprowadzono dwiema metodami. Pierwsza z nich stanowiła tradycyjny rozdział DNA w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe w 1 x stężonym buforze TBE i wizualizację w świetle UV. Drugą metodę stanowiła automatyczna elektroforeza żelowa z wykorzystaniem systemu TapeStation 4200 i odczynników Genomic DNA ScreenTape Assay, umożliwiająca samodzielne pobieranie, nakładanie, rozdział, obrazowanie i analizowanie badanej próbki. Spośród trzech badanych grup (3.1.1, 3.1.2) wybrano 36 osób z grupy kontrolnej, 30 osób z grupy osób ze zdiagnozowanym MetS oraz 29 osób z T2DM. Warto nadmienić, iż osoby z grupy kontrolnej i z MetS posiadały taki sam genotyp dla wcześniej zbadanych polimorfizmów genu *UCPI*. Kolejnym etapem przygotowania wybranych prób do sekwencjonowania było dokładne określenie stężenia DNA w tych próbkach. Oprócz typowego spektrofotometrycznego (DeNovix) sprawdzenia ilości i jakości DNA, wykorzystano wysokoczułą, fluorymetryczną analizę ilościową. Fluorymetr Qubit 3 pozwala na bardziej precyzyjny pomiar stężenia, eliminując potencjalne zanieczyszczenia, takie jak sole, rozpuszczalniki, detergenty lub białka w wyizolowanym materiale. Do oznaczeń zastosowano zestaw Qubit dsDNA HS Assay Kit: 2 µl badanych prób zawieszono w 198 µl buforu zawierającego odczynnik fluoroforowy, który wiąże się specyficznie do dwuniciowego kwasu nukleinowego. Po dokładnym wymieszaniu i 2 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dokonano pomiarów każdej próbki na fluorymetrze. Pomiar przeprowadzono w odniesieniu do dwóch prób wzorcowych załączonych do zestawu, przygotowanych i zmierzonych w analogiczny sposób jak próby badane. Przed rozpoczęciem procedury przygotowania

bibliotek do sekwencjonowania NGS, próby badane zostały bardzo dokładnie rozcieńczone do określonego stężenia; dla zestawu TruSeq wynosiło ono 2,5 ng/μl, natomiast dla zestawu AmpliSeq – 4 ng/μl dla każdej z prób.

4.2.2 Przygotowanie bibliotek

Biblioteki DNA, będące zbiorem krótkich fragmentów DNA otrzymanych poprzez fragmentację materiału pochodzącego od pojedynczej osoby, przygotowywano na matrycy genomowego DNA z użyciem zestawów: Truseq Custom Amplicon Low Input Kit oraz AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel zgodnie z protokołem i zaleceniami producenta (*Illumina*). W obu panelach wykorzystano podwójne indeksowanie: TruSeq Dual Index Sequencing Primers oraz Ampliseq CD Indexes. Na potrzeby niniejszej pracy, procedurę przygotowania bibliotek dla obu paneli przedstawiono w sposób uproszczony.

Otrzymywanie krótkich amplikonów pokrywających sekwencję badaną

Pierwszym etapem tworzenia bibliotek przy użyciu panelu TruSeq była hybrydyzacja zestawu odpowiednio zaprojektowanych, długich oligonukleotydów (ang. *custom amplicon tube*, CAT) do sekwencji rejonu kodującego *UCPI*. Ponadto, CAT zawierały w swojej budowie sekwencje adaptorowe, umożliwiające sekwencjonowanie wielu fragmentów i bibliotek DNA podczas jednej reakcji sekwencjonowania. Następnie usunięto sondy CAT z mieszaniny, aby w kolejnym etapie przeprowadzić reakcję wydłużania i ligacji nici konsensusowej powstałej dzięki hybrydyzacji CAT do nici matrycowej. Do tak powstałych krótkich fragmentów (150-200 pz) pokrywających sekwencję rejonu kodującego *UCPI*, dołączono z obu stron unikatową dla każdej badanej próbki parę indeksów (i5 oraz i7) z wbudowanymi starterami niezbędnymi do amplifikacji biblioteki. Ostatnim etapem było namnożenie przygotowanych bibliotek oraz ich oczyszczenie na kulkach magnetycznych dołączonych do zestawu.

W procedurze tworzenia bibliotek używając zestawu AmpliSeq nie dochodziło do hybrydyzacji specjalnie zaprojektowanych sond do matrycowego DNA, a od razu do amplifikacji krótkich fragmentów DNA dzięki starterom, specyficznym do sekwencji niekodującej *UCPI* 5' oraz 3'. Proces ten nazywa się multipleksowym PCR. Następnie przeprowadzono reakcję trawienia dimerów primerów, aby następnie zligować unikalną dla danej próbki parę indeksów (i5 oraz i7) z sekwencją adaptorową. Po oczyszczeniu bibliotek na kulkach magnetycznych (*Kapa Pure Beads*, *KapaBiosystems*)

przeprowadzono drugą reakcję PCR, aby otrzymać wystarczającą ilość krótkich fragmentów niezbędnych do sekwencjonowania NGS. Podobnie jak w zestawie TruSeq, wzbogacone i oznakowane biblioteki oczyszczano z mieszaniny reakcyjnej z użyciem kulek magnetycznych Kapa Pure Beads (*KapaBiosystems*). W trakcie przygotowywania bibliotek (zarówno zestawem TruSeq jak i AmpliSeq) za każdym razem uwzględniano próbę ślepą – używano wody MiliQ zamiast matrycy w postaci genomowego DNA.

Sprawdzenie jakości przygotowanych bibliotek

Analizę jakości otrzymanych bibliotek przeprowadzono poprzez rozkład wielkości fragmentów otrzymanych w wyniku przeprowadzenia procedur obu zaprojektowanych na potrzeby tego badania paneli. Rozkład ten sprawdzano poprzez automatyczny rozdział elektroforetyczny przy użyciu systemu TapeStation 4200 oraz High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (biblioteki przygotowane zestawem TruSeq) oraz tradycyjną elektroforezę w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe w buforze TBE i wizualizację w świetle UV (biblioteki przygotowane zestawem AmpliSeq). Biblioteki DNA przygotowywane przy użyciu obu zestawów wykazywały główny prążek na wysokości około 300 - 400 pz odpowiadającej długości amplifikowanych fragmentów z przyłączonymi sekwencjami adapterowymi i indeksami. Ponadto, sprawdzono fluorymetrycznie (Qubit 3) stężenie dla każdej przygotowanej biblioteki według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.1. Biblioteki o słabej jakości odrzucono przed normalizacją.

Normalizacja, łączenie oraz denaturacja bibliotek

Dokładne określenie stężenia pozwoliło na wykonanie obliczeń niezbędnych do przeprowadzenia normalizacji (rozcieńczeń w buforze RSB, ang. *resuspension buffer*), czyli doprowadzenia każdej z bibliotek do określonego stężenia - 4 nM. Dzięki normalizacji zapewniona została równomierna reprezentacja każdej z bibliotek po połączeniu wszystkich sekwencjonowanych prób. Łączono po 5µl znormalizowanych bibliotek do jednej probówki zbiorczej, a następnie rozcieńczano odpowiednią objętością buforu do hybrydyzacji do zalecanego stężenia oraz denaturowano 0.2N NaOH tuż przed samym sekwencjonowaniem.

4.2.3 Sekwencjonowanie

Połączone, rozcieńczone i zdenaturowane biblioteki naniesiono do odpowiedniego otworu znajdującego się w kasecie (tzw. kartridżu) dołączonej do zestawu MiSeq Reagent Kit v2 wykorzystując technologię SBS, jaką zapewnia sekwanator MiSeq, przeprowadzono reakcję sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Długość odczytów i jednocześnie liczba cykli wynosiła 250 pz, fragmenty były sekwencjonowane w dwóch kierunkach, z obu końców (odczyty sparowane, and. *pair-end read*, PE). Informacje o ilości sekwencjonowanych próbek, indeksach i5/i7 odpowiadającym danej próbce, zestawie użytym do przygotowania bibliotek, konfiguracji urządzenia wprowadzono do arkusza próbek (ang. *sample sheet*) we wbudowanym w maszynę MiSeq programie *Illumina Experiment Manager*. Oprogramowanie dostępne w sekwanatorze MiSeq umożliwia przycinanie sekwencji adaptorowych (tzw. *trimming*) oraz przypisanie odczytów uzyskanych w wyniku reakcji sekwencjonowania do odpowiednich próbek, na podstawie informacji o sekwencjach indeksujących zawartych w arkuszu próbek.

4.2.4 Bioinformatyczna analiza danych

Po zakończonej reakcji sekwencjonowania NGS, aparat MiSeq wygenerował sekwencje w formie plików *fastq* dla każdej próby. Sekwencje te były wstępnie „przycięte”, tzn. pozbawione sekwencji adaptorowych. Następnie wykonano analizę bioinformatyczną, składającą się z czterech, głównych etapów. Pierwszym z nich było przetworzenie odczytu, polegające na przycięciu fragmentów o niskiej jakości zasad (zazwyczaj w okolicy końca 3') oraz sekwencji egzogenicznych takich jak adaptory do sekwencjonowania. Kolejnym etapem była ocena jakości „przyciętych” odczytów. Odczyty, które przeszły kontrolę jakości, następnie mapowane zostały zasada po zasadzie do miejsc im odpowiadającym w genomie referencyjnym. Ostatnim krokiem była detekcja wariantów genetycznych. W tym celu wykorzystano skrypt bioinformatyczny zawierający takie narzędzia jak:

- *Trimmomatic* – przycinanie pozostałych sekwencji adaptorowych w każdym z odczytów,
- *FastQC* – narzędzie do analizy jakości odczytów,
- *Bowtie2* – przyrównanie otrzymanych, przyciętych odczytów do sekwencji referencyjnej (Hg38)

- *Variant calling* – identyfikacja polimorfizmów SNP oraz małych insercji lub delecji na podstawie otrzymanych danych.

Skrypt ten umożliwił wygenerowanie pliku *Excel* zawierającego listę zidentyfikowanych variantów genetycznych w danym koordynacie, dla danej próbki. Na podstawie otrzymanej listy koordynatów możliwe było zidentyfikowanie polimorfizmów poprzez porównanie danej pozycji (koordynatu) z koordynatami w sekwencji referencyjnej (Hg38), korzystając ze strony *UCSC Genome Browser* (<https://genome-euro.ucsc.edu>) oraz z bazy *Varsome* (<https://varsome.com/gene/ucp1>).

Następnie obliczono częstość występowania genotypów dla każdej z trzech badanych grup i przeprowadzono analizę statystyczną analogicznie jak to opisano w punkcie 4.1.4. Informacje na temat zidentyfikowanych polimorfizmów zaczerpnięto z baz danych:

- Ensembl (www.ensembl.org/index.html),
- dbSNP NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

4.3 Badanie poziomu ekspresji *UCP1* i *UCP2* w PBMC

Technika Real Time PCR jest również skuteczną metodą analizy ilości powstawania transkryptów mRNA. Przed właściwym oznaczeniem poziomu ekspresji genów należy wyizolować RNA, przeprowadzić reakcję odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT) oraz amplifikację otrzymanego cDNA. Do oznaczenia ilości produktu powstającego podczas qPCR użyto detektorów specyficznych (sond), które połączone z barwnikami uwalniają sygnał fluorescencyjny, którego ilość wzrasta proporcjonalnie do ilości produktu. Cykl reakcji, przy którym fluorescencja próby przekracza linię graniczną (threshold) definiowany jest, jako Ct (*cycle threshold*). Ct mierzone jest w fazie logarytmicznego wzrostu ilości DNA i im jego wartość jest mniejsza tym większe było stężenie matrycy na początku reakcji ¹¹⁸. Analiza ilościowa poziomu ekspresji genu oparta jest na wykorzystaniu kontroli endogennych. Kontrola endogenna zwana inaczej genem referencyjnym w założeniu ulega transkrypcji w danej tkance na stałym i niezmiennym poziomie. Dzieląc poziom ekspresji transkryptu, uzyskany dla badanego genu, przez poziom RNA kontroli endogennej otrzymujemy znormalizowaną wartość (ΔCt), niezależną od wyjściowej ilości dodanej do analizy matrycy ¹¹⁹.

4.3.1 Izolacja RNA z PBMC

Przed przystąpieniem do izolacji policzono w komorze Bürkera komórki PBMC zawieszony w RNAlater Stabilization Solution (roztwór zapewniający stabilność mRNA), barwiąc komórki roztworem Türka. Następnie komórki zwirowano 5 min w 300 x g i delikatnie usunięto pipetą supernatant z nad osadu komórek. W zależności od policzonej ilości komórek dodano odpowiednią objętość buforu RLT (350 µl $5 \cdot 10^6$ kom. > 600) z dodatkiem 1% β-merkaptoetanolu i dokładnie wymieszano przez pipetowanie. Lizat komórkowy dodatkowo wymieszano używając strzykawki tuberkulinowej z igłą iniekcyjną o średnicy 0,4 mm. Do mieszaniny dodano jedną objętość 70% etanolu i wymieszano przez pipetowanie. Przeniesiono 700 µl próbki na kolumnę RNease, umieszczoną w próbówce zbiorczej 2 ml. Wirowano przez 15 sekund w 8000 x g; jeśli cała objętość mieszaniny nie zmieściła się na kolumnę czynność powtórzono, usuwając uprzednio filtrat z próbki zbiorczej. Dodano 350 µl buforu RW1 na kolumnę, zwirowano przez 15 sekund, 8000 x g, filtrat usunięto. Na membranę kolumny dodano 80 µl roztworu DNazy I (10 µl DNase + 70 µl buforu RDD). Kolumnę z roztworem DNazy inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Ponownie dodano 350 µl buforu RW1 na kolumnę, zwirowano przez 15 sekund w 8000 x g, filtrat usunięto. Następnie dwukrotnie przepłukano kolumnę 500 µl buforem RPE (za każdym razem wirowano 15 sekund w 8000 x g, filtrat usuwano). Zwirowano próbkę na maksymalnych obrotach przez 1 minutę w celu usunięcia pozostałości buforu RPE zawierającego etanol. Przeniesiono kolumnę do czystej próbki Eppendorf. Dodano 20-30 µl dejonizowanej wody MiliQ i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zwirowano kolumnę (8 000 x g, 1 minuta), a eluat zachowano. Dokonano pomiaru stężenia przy użyciu spektrofotometru. Ocenę jakościową wykonano przez wizualizację 18S:23S rybosomalnego RNA w 2% żelu agarozowym z 3% dodatkiem barwnika SimplySafe w 1x stężonym buforze TBE. Wyizolowane próbki umieszczano na lodzie i przystępowano bezpośrednio do kolejnego etapu tj. odwrotnej transkrypcji.

4.3.2 Odwrotna transkrypcja

Odwrotna transkrypcja przy użyciu zestawu iScript cDNA Synthesis Kit

Do 15 µl wyizolowanego RNA dodano 4 µl 5x stężonego buforu dla odwrotnej transkryptazy (5x iScript reaction mix) oraz 1 µl enzymu odwrotnej transkryptazy z zestawu iScript cDNA Synthesis Kit. Reakcję RT prowadzono w termocyklerze

w następujących warunkach: 25°C - 5 min, 42°C - 30 min, 85°C - 5 min. Próbki cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Odwrotna transkrypcja przy użyciu zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Przygotowano 2x stężony master mix (na jedną reakcję) składający się z: 2 µl 10x RT Buffer, 25x 0,8 µl dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 4,2 µl wody wolnej od nukleaz. Do 10 µl wyizolowanego RNA dodano 10 µl master mixu. Reakcję RT prowadzono w termocyklerze w następujących warunkach: 25°C - 10 min, 37°C - 120 min, 85°C - 5 min. Próbki cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

4.3.3 Real-Time PCR – mRNA

Do zbadania ekspresji genów *UCP1* oraz *UCP2* wykorzystano 1 µl cDNA, 9 µl TaqMan Gene Expression Master Mix, 9 µl wody dejonizowanej MiliQ oraz 1 µl odpowiedniej sondy TaqMan na jedną reakcję (**Tabela 3**). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 95°C przez 10 min, 40 cykli składających się z: denaturacji 95°C przez 15 sekund oraz annealingu (przyłączanie starterów) w 60°C przez 1 minutę w aparacie do reakcji Real Time PCR Viia 7 z wykorzystaniem oprogramowania QuantStudio™ Software V1.2.4.

4.3.4 Obliczenia i analiza statystyczna

Ekspresja badanych genów była oszacowana przy użyciu metody porównawczej ΔC_t , czyli różnicy wartości C_t ¹²⁰. Próby były analizowane w duplikacie. Amplifikacja produktów reakcji PCR była normalizowana przy użyciu kontroli endogennej β -2-mikroglobuliny ($\beta 2M$). Obliczenia oraz analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Microsoft Excel (Microsoft Office) oraz *GraphPad Prism* 8.4.3 (GraphPad Software). Grupy były porównywane przy użyciu nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a. Podsumowanie statystyki zostało przedstawione, jako mediana \pm SD. Wartość $p \leq 0,05$ przyjęto za istotną statystycznie.

4.4 Badanie funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP zlokalizowanych w rejonie 5' genu *UCP1* w odniesieniu do aktywności promotorowej

4.4.1 Hodowle linii komórkowych

Komórki linii HepG2, przechowywane w ciekłym azocie w banku komórek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, rozmrożono w temperaturze pokojowej, delikatnie przepłukano PBS (w celu usunięcia toksycznego DMSO – składnika płynu do zamrażania hodowli), zwirowano (300 x g, 5 min) a następnie pelet komórkowy zawieszono w odpowiednim medium hodowlanym (**Tabela 4**) i przeniesiono do butelki hodowlanej (25cm², Sarstedt) W ten sam sposób rozmrożono i przeniesiono do butelki hodowlanej komórki PAZ6. Komórki hodowano w inkubatorze CO₂ z płaszczem powietrznym, ciągłą filtracją HEPA oraz systemem dekontaminacji gorącym powietrzem w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze z obecnością 5% CO₂. Po upływie 24 godzin i przyklejeniu się komórek do dna naczynia, usuwano medium znad hodowli i dodawano świeży płyn hodowlany. Naczynia z hodowlą ponownie umieszczano w inkubatorze i hodowano do czasu wytworzenia pojedynczej, jednolitej warstwy komórek na całej powierzchni butelki (ang. *monolayer*).

W celu otrzymania odpowiedniej liczby komórek do przeprowadzenia testów, wykonywano pasażowanie hodowli do większych butelek hodowlanych (75cm², Sarstedt). Płyn znad hodowli zlewano, komórki płukano najpierw PBS z jonami Ca²⁺ i Mg²⁺, a następnie dodawano roztwór trypsyny w EDTA, aby zakrył całą powierzchnię butelki. Po około 5 minutach usuwano roztwór trypsyny, dolewano medium hodowlanego i odklejano komórki od dna naczynia hodowlanego. Następnie zawieszano je w odpowiednim dla danej linii medium wzrostowym. Komórki liczone w komorze Bürkera barwiąc je 0,4% roztworem błękitu trypanu, aby ocenić ich żywotność. Następnie hodowlę doprowadzano do odpowiedniej gęstości i rozlewano, w zależności od eksperymentu, do dołków w odpowiednich płytkach plastikowych lub do butelek. W trakcie hodowli część komórek HepG2 oraz PAZ6 zebrano, zawieszono w 100µl *RNAlater* (Invitrogen) i zamrożono w -20°C do czasu wykonania dalszych analiz.

4.4.2 Różnicowanie PAZ6 w kierunku dojrzałych adipocytów BAT

Komórki linii PAZ (preadipocyty) hodowano, aż do uzyskania około 80% konfluencji w naczyniu hodowlanym. Następnie medium usunięto i komórki płukano PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} . Do butelki hodowlanej dodano medium różnicującego (skład medium w **Tabela 4**). Medium różnicujące zmieniano co 2 dni, przepłukując komórki PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} po zlanie starego medium. W pierwszych 4 dniach medium różnicujące zawierało dodatkowo 0,25 mM IBMX, która jest jednocześnie kompetycyjnym inhibitorem fosfodiesterazy, podnoszącym wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, oraz antagonistą receptora adenozyiny. Różnicowanie linii komórkowej PAZ6 prowadzono 28 dni. W trakcie 28 dni różnicowania dokonano dokumentacji fotograficznej komórek. Dodatkowo wykonano barwienie Oil Red O w pierwszych siedmiu dniach różnicowania (procedurę barwienia opisano w podrozdziale 4.4.3). Komórki pasażowano w momencie, kiedy komórki pokrywały powierzchnię butelki. W dniach 0, 4, 7, 14, 28 różnicowania zbierano komórki do dalszych analiz, najpierw odrywając je od podłoża przez trypsynizację, następnie dwukrotnie płuczac PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} , zawieszając w 100 μl *RNAlater*. Zabezpieczone komórki w *RNAlater* przechowywano w temperaturze -20°C .

Przygotowanie cytospinów

W celu wykonania barwienia immunofluorescencyjnego (ang. *immunofluorescent*, IF) linii komórkowej PAZ6 w kolejnych dniach różnicowania, komórki zebrano, policzono i wykonano odpowiednie rozcieńczenia zawiesiny komórek tak, aby otrzymać 20 000 lub 40 000 komórek w 100 μl PBS. Zawiesinę komórek umieszczono w rynienkach do cytospinu i naniesiono na szkiełka podstawowe wirując przez 7 minut, 700 x g w temperaturze pokojowej w wirówce do cytospinu. Po odwirowaniu, szkiełka pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny do całkowitego wyschnięcia. Cytospiny przechowywano w -20°C aż do wykonania barwień.

4.4.3 Barwienia IF, DAPI oraz Oil Red O

Barwienie immunofluorescencyjne (IF) oraz DAPI

Po wyjęciu przygotowanych cytospinów z -20°C (zebranych w 0, 4, 7, 14, 28 dniu różnicowania PAZ6) i doprowadzeniu preparatów do temperatury pokojowej,

utrwalono komórki wkładając cytospiny do acetonu na 10 minut. Po upływie tego czasu, wyjęto preparaty z rozpuszczalnika i pozostawiono na powietrzu aż do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Przy pomocy pisaka firmy Dako obrysowano dookoła obszar na slajdzie, na którym znajdowały się komórki, tworząc hydrofobową barierę wokół komórek. Przygotowano odpowiednie rozcieńczenie (wg. zaleceń producenta 1:500) pierwszorzędowego przeciwciała anty - UCP1 w odczynniku Dako Antibody Diluent. Następnie nakropiono 100 µl roztworu anty - UCP1 na zaznaczony na szkiełku obszar z komórkami i pozostawiono na 30 minut w ciemności, w komorze utrzymującej stałą poziom wilgotności. Po tym czasie, przepłukano trzykrotnie szkiełko 1x stężonym PBS bez jonów. Po ostatnim płukaniu dokładnie usunięto bufor z nad obszaru, gdzie znajdowały się komórki. Przygotowano rozcieńczenie 1:20 drugorzędowego przeciwciała (kozie anty-królik IgG skoniugowane z AlexaFluor 647) w PBS bez jonów i nakropiono 100 µl tak przygotowanego roztworu na komórki. Cytospiny inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem 30 minut w ciemności, w komorze utrzymującej stałą poziom wilgotności. Następnie, przepłukano trzykrotnie szkiełko PBS bez jonów. Dokładnie i delikatnie usunięto bufor z nad obszaru, gdzie znajdowały się komórki.

Przystąpiono do barwienia jąder komórkowych odczynnikiem 4',6-diamidyno-2-fenylindolem (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI), który ma zdolność do penetracji błony i połączenia się bezpośrednio z DNA w komórce. Nakropiono jedną kroplę roztworu DAPI na zaznaczony obszar komórek na cytospinie i inkubowano w ciemności 15 minut. Szkiełko przepłukano PBS bez jonów. Na cytospiny nałożono szkiełka nakrywkowe. Zabarwione komórki obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Do analizy barwienia użyto zdjęć z kanału niebieskiego (DAPI) i czerwonego (UCP1). Obrazy z obu kanałów nałożono na siebie uzyskując jednocześnie obraz jądra komórkowego i białka UCP1.

Barwienie Oil Red O

Oil Red O jest diazowym barwnikiem stosowanym do barwienia obojętnych TG lub lipidów znajdujących się w komórce. Podczas hodowli linii komórkowej PAZ6, przeprowadzono barwienie barwnikiem Oil Red O. Komórki hodowano na 96-dołkowej przezroczystej płytce przeznaczonej do hodowli linii adherentnych (20 000 komórek/dołek). Przed przystąpieniem do barwienia, zebrano medium hodowlane z nad komórek i utrwalono komórki 4% paraformaldehydem przez 20 minut w temperaturze

pokojoyej. Po usunięciu środka utrwalającego, dwukrotnie przepłukano komórki buforem PBS. Następnie usunięto PBS i pozostawiono puste dołki z komórkami do wyschnięcia. W tym czasie przygotowano roztwór Oil Red O poprzez jego rozcieńczenie w wodzie destylowanej w stosunku 1:1 i pozostawiono na 10 minut. Tak przygotowany roztwór barwnika dodano do komórek (100 μ l/dołek) i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto roztwór z nad komórek i przepłukano dołki dwukrotnie wodą destylowaną. Po ostatnim płukaniu w dołkach pozostawiono 100 μ l wody destylowanej. Płytkę z zabarwionymi komórkami obserwowano pod mikroskopem świetlnym odwróconego pola.

4.4.4 Badanie poziomu ekspresji genów *UCP1*, *zic1*, *β 3AR*, *leptin* w BAT w trakcie 28-dniowego różnicowania

Zebrane w kolejnych dniach różnicowania komórki PAZ6 oraz komórki HepG2 zawieszane w *RNAlater* (Invitrogen) rozmrożono i zwirowano 5 min, 400 x g. Supernatant delikatnie usunięto i niezwłocznie przystąpiono do izolacji RNA przy użyciu zestawu *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Proces izolacji RNA przeprowadzono w sposób analogiczny jak w rozdziale 4.3.1. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji wg. procedury opisanej w rozdziale 4.3.2 przy użyciu zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems).

Do zbadania ekspresji genów *UCP1*, *zic1*, *β 3AR*, *leptin* wykorzystano metodę Real time PCR z użyciem sond TaqMan (odczynniki). Mieszanina reakcyjna zawierała: 0,7 μ l cDNA; 7,1 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix; 6,5 μ l wody dejonizowanej MiliQ oraz 0,7 μ l odpowiedniej sondy TaqMan na jedną reakcję. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 15 μ l. Reakcję przeprowadzono w taki sam sposób, jak opisano w podrozdziale 4.3.3. Próby były analizowane w triplikacie. Amplifikacja produktów reakcji PCR była normalizowana przy użyciu kontroli endogennej *GAPDH* oraz *HPRT*. Ekspresja badanych genów była oszacowana przy użyciu metody porównawczej $\Delta\Delta C_t$, czyli różnicy różnic wartości C_t ¹²⁰. Obliczenia oraz analiza statystyczna została przeprowadzona w analogiczny sposób jak to opisano w punkcie 4.3.4. Obliczenia i analiza statystyczna

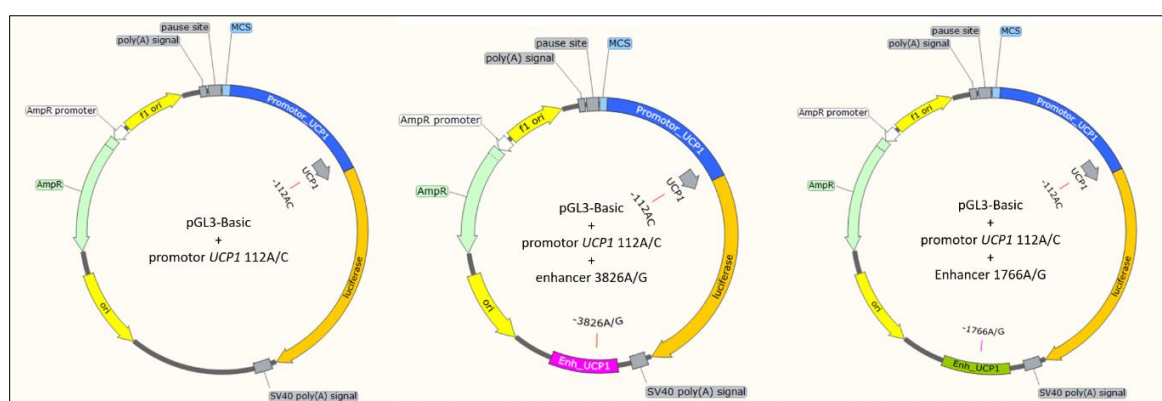
4.4.5 Badanie aktywności promotorowej genu *UCPI* w wybranych liniach komórkowych – test lucyferazowy

Geny reporterowe, pozwalające na analizę ekspresji genów oraz śledzenie zmian komórkowych związanych z ekspresją genów, są szeroko stosowane w badaniach farmaceutycznych i biomedycznych, a także biologii molekularnej i biochemii. Zazwyczaj gen reporterowy z interesującą sekwencją DNA jest klonowany do wektora ekspresyjnego, który następnie jest transfekowany do komórek. W dalszej kolejności komórki analizuje się pod kątem obecności reportera poprzez bezpośredni pomiar samego białka reporterowego lub aktywności enzymatycznej białka reporterowego. W niniejszej pracy wykorzystano wektory ekspresyjne posiadające zmodyfikowany region kodujący genu reporterowego - lucyferazy *luc*⁺, pochodzący ze świetlika (łac. *Photinus pyralis*), wykazujące naturalną zdolność do bioluminescencji ¹²¹. Transfekcja wektora z pojedynczym reporterem może być niewystarczająca do osiągnięcia wiarygodnych wyników, dlatego też wykorzystano system podwójnych genów reporterowych. Obok wektora zawierającego *luc*⁺, kotransfekowano wektor kontrolny zawierający gen lucyferazy *hRluc* pochodzący z parzydełkowców z gatunku *Renilla reniformis*. Zastosowanie kontroli wewnętrznej pozwoliło na normalizację wyników, minimalizując tym samym różnice wynikające z wydajności transfekcji, niespecyficznymi odpowiedziami komórkowymi oraz różnicami w ilości komórek. Zastosowany test pozwala dodatkowo na odrzucenie wyników fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych ¹²².

4.4.5.1 Przygotowanie wektorów do transfekcji

W ramach współpracy z Laboratorium Rozwoju Regulacji Ekspresji Genów w Instytucie Biologii Genu RAS w Moskwie otrzymano konstrukty zawierające fragment regulatorowy (enhancerowy) oraz/lub fragment promotorowy genu *UCPI*. Zaprojektowano oraz przygotowano w sumie 10 konstruktów, opartych na wektorze dedykowanym do testów lucyferazowych - pGL3-Basic. pGL3-Basic jest wektorem, który nie posiada promotora eukariotycznego oraz sekwencji wzmacniających (enhancerowych). Ekspresja lucyferazy w komórkach transfekowanych tym wektorem zależy od insercji oraz właściwej orientacji regionu promotorowego wklonowanego powyżej genu *luc*⁺. Dodatkowo, aktywność lucyferazy można badać w zależności od wklonowanych regionów enhancerowych poniżej genu *luc*⁺. Przygotowane plazmidy

zawierały inserty z sekwencją regionu promotorowego o długości 1077 pz, zawierającą wariant A lub C w pozycji -112 powyżej genu lucyferazy. Konstrukty te nazwano kolejno: 112A oraz 112C. Do otrzymanych konstruktów wklonowano fragment regulatorowy 5' (enhancerowy) genu *UCP1* z sekwencją okalającą miejsce polimorficzne A-3826G (523 pz) lub A-1766G (496 pz), 270 pz poniżej genu lucyferazy. W ten sposób otrzymano konstrukty z dwoma wariantami regionu promotorowego (A lub C) oraz czterema wariantami regionu enhancerowego A-3826G lub A-1766G (**Ryc. 11**), nazwanych: 112A/3826A, 112A/3826G, 112C/3826A, 112C/3826G, 112A/1766A, 112A/1766G, 112C/1766A, 112C/1766G.



Ryc. 11 Mapy konstruktów przygotowanych do transfekcji. Po lewej – pGL3-Basic z wklonowanym rejonem promotorowym zawierającym wariant A lub C polimorfizmu -112A/C. W środku konstrukt zawierający fragment promotorowy z allelem A lub C oraz fragment regulatorowy 5' z miejscem polimorficznym -3826A lub -3826G. Po prawej konstrukt z fragmentem promotorowym -112A lub C oraz z fragmentem -1766A lub -1766G.

Oprócz konstruktów zawierających funkcjonalne fragmenty genu *UCP1* przygotowano konstrukt kontrolny posiadający przypadkową sekwencję w miejscu insercji sekwencji regulatorowej 5' (poniżej genu *luc+*).

4.4.5.2 Transfekcja

Transfekcja

Dzień przed planowaną transfekcją komórki HepG2 odklejono od butelki hodowlanej, wirowano 5 min w 400 x g, zlano medium znad osadu komórek, zawieszono w 1ml medium hodowlanego i policzono komórki przy użyciu komory Bürkera. Komórki HepG2 zawieszono w odpowiedniej objętości medium hodowlanego i przeniesiono na białą, 96-dołkową, płytkę do hodowli komórkowych. W każdym dołku znajdowało się 20 000 komórek zawieszonych w 100µl medium hodowlanego. Była to wystarczająca ilość komórek, aby po 24h hodowla osiągnęła ok. 80% konfluencji.

Dodatkowo, komórki przeniesiono w takiej samej ilości i objętości medium na kilka dołków bezbarwnej 96-dołkowej płytki w celu obserwacji konfluencji i żywotności komórek w obecności transfektanta (obserwacja mikroskopowa). Komórki hodowano w warunkach opisanych w rozdziale 4.4. Po 24h sprawdzono konfluencję komórek i przystąpiono do transfekcji przy użyciu odczynnika FuGENE® HD Transfection Reagent.

W przypadku linii komórkowej PAZ6, przed planowaną transfekcją wykonano 4-dniowe różnicowanie w medium różnicującym (skład medium w **Tabela 4**) z dodatkiem 0,25 mM IBMX. Dzień przed planowaną transfekcją (4 dzień różnicowania) przesiano PAZ6 w ten sam sposób jak wyżej opisane komórki HepG2 na białą, 96-dołkową, płytkę do hodowli komórkowych w ilości 15 000 komórek na dołek w 100 µl medium różnicującego.

Przygotowano roztwory odpowiednich wektorów razem z wektorem kontrolnym pGL4.74 w medium ze zredukowaną ilością serum Opti-MEM w taki sposób, aby na jeden dołek 96-dołkowej płytki przypadało 100 ng badanego wektora oraz 10 ng wektora kontrolnego pGL4.74. Do mieszaniny wektorów w Opti-MEM dodano odczynnik transfekcyjny w stosunku 4,5:1 do ilości wektora dla komórek HepG2 oraz 4:1 dla komórek PAZ6. Całość delikatnie wymieszano przez pipetowanie. Objętość całkowita kompleksu DNA-transfektant przypadająca na jeden dołek płytki wynosiła 5 µl. Mieszaninę tę inkubowano 15 minut, a następnie dodano do komórek, delikatnie mieszano płytkę. Komórki hodowano w warunkach opisanych w rozdziale 4.4.

4.4.5.3 Stymulacja komórek transfekowanych

Po 10 h od transfekcji dodawano do odpowiednich dołków na płytce 5 µl kwasu 9-cis retinowego (ang. *9-cis retinoic acid*, 9-cis RA) lub norepinefryny i kontynuowano hodowlę. Stężenie końcowe stymulantów w hodowli wynosiło 1 µM.

4.4.5.4 Test lucyferazowy

Po 48h od transfekcji przeprowadzono test lucyferazowy przy użyciu zestawu *Dual-Glo Luciferase Assay*, Z każdego dołka odciągnięto delikatnie pipetą 35 µl medium tak, aby uzyskać 75 µl medium w jednym dołku. Następnie do każdego dołka dodano 75 µl Dual-Glo Luciferase Reagent. Mieszaninę inkubowano 15 min. Następnie

delikatnie wymieszano, kilkakrotnie pipetując i uważając, aby nie spenić mieszaniny, gdyż mogło to zaburzyć odczyt. Następnie zmierzono luminescencję na czytniku GloMax®-Multi Microplate Multimode Reader (Promega). Po dokonaniu pierwszego odczytu luminescencji dla lucyferazy ze świetlika dodano substrat dla lucyferazy z *Renilla reniformis* (Dual-Glo Stop&Glo, Promega) składający się z koelenterazyny i tlenu cząsteczkowego, w objętości 75 µl/dołek. Mieszaninę inkubowano 15 minut i podobnie jak przed pierwszym odczytem delikatnie wymieszano przez pipetowanie. Wykonano drugi odczyt luminescencji dla lucyferazy z *Renilla reniformis*. Testy lucyferazowe z wykorzystaniem linii komórkowej HepG2 oraz PAZ6 transfekowanej w 4 dniu różnicowania wykonano trzykrotnie, w trzech powtórzeniach technicznych (tryplikacie). Odczyt luminescencji otrzymano we względnej jednostce luminescencji (ang. *Relative Luminescence Unit*, RLU). Otrzymane wyniki RLU dla lucyferazy ze świetlika (RLU_{luc}) dla każdego z transfekowanych plazmidów uśredniano a następnie dzielono przez uśredniony odpowiadający im wynik RLU dla lucyferazy z *Renilla reniformis* (RLU_{Renilla}). Następnie, normalizowano stosunek RLU_{luc}/RLU_{Renilla} do RLU_{luc}/RLU_{Renilla} wektora pGL3-Basic w przypadku komórek HepG2, w przypadku PAZ6 normalizację przeprowadzono w stosunku do wektora kontrolnego. Każde niezależne doświadczenie uwzględniało próby kontrolne: komórki transfekowane wektorem pGL3-Basic, komórki nietransfekowane (C-), komórki traktowane tylko transfektantem (blank) oraz w przypadku transfekcji komórek PAZ6, komórki transfekowane wektorem kontrolnym (kontrola) zawierającym niefunkcjonalną sekwencję w miejscu insercji sekwencji zawierających wariant 3826A/G lub 1766A/G.

4.4.5.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software) oraz Microsoft Excel (Microsoft Office). Normalność rozkładu sprawdzano testem Shapiro-Wilk'a. Dane wykazujące rozkład normalny analizowano przy użyciu testu jednoczynnikowego ANOVA. Dane nieparametryczne analizowano testem U Manna-Whitneya (porównanie dwóch grup) lub testem Kruskala-Wallisa (porównanie >2 grup). Istotność statystyczną uwzględniano przy założeniu $p < 0,05$. Wykresy przygotowano przy użyciu programu Excel 2013 (Microsoft Office) lub GraphPad Prism 8.4.3.

V. WYNIKI

5.1 Analiza zmienności genetycznej w genie *UCP1*

5.1.1 Charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej - analiza danych antropometrycznych i biochemicznych badanych grup

Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym. Grupa badana liczyła 281 osób, z czego u 252 osób nie stwierdzono cukrzycy typu 2, natomiast 29 osób było poddanych leczeniu T2DM (kryteria rozpoznania IDF - AHA/NHLBI). Przeprowadzono analizę danych biochemicznych oraz antropometrycznych grupy, w tym: profilu lipidowego (cholesterol całkowity, stężenie LDL, HDL, TG), glikemii na czczo, BMI, WHR. Wyniki analizy przedstawiono, jako średnią wyników dla wszystkich pacjentów \pm SD (**Tabela 8**).

Tabela 8 Parametry biochemiczne oraz antropometryczne grupy badanej z podziałem na osoby bez oraz z T2DM.

Parametry	Grupa badana z MetS		
	bez T2DM (n = 252)	z T2DM (n = 29)	wszyscy (n = 281)
profil lipidowy:			
cholesterol całkowity [mg/dl]	202,19 \pm 39,82	186,94 \pm 55,45	200,60 \pm 42,06
LDL [mg/dl]	111,30 \pm 44,81	101,16 \pm 40,18	110,18 \pm 44,52
HDL [mg/dl]:	58,49 \pm 14,13	48,38 \pm 19,16	57,44 \pm 15,08
HDL u kobiet [mg/dl]	62,61 \pm 13,72	51,72 \pm 21,58	61,51 \pm 14,91
HDL u mężczyzn [mg/dl]	50,95 \pm 11,68	43,65 \pm 15,75	50,08 \pm 12,37
TG [mg/dl]	192,53 \pm 01,83	194,12 \pm 101,69	176,86 \pm 99,68
glukoza na czczo [mg/dl]	102,55 \pm 30,99	151,80 \pm 56,14	107,50 \pm 37,48
BMI (kg/m²)	32,05 \pm 3,92	33,96 \pm 9,61	32,34 \pm 4,85
obwód talii [cm]	105,68 \pm 13,34	109,02 \pm 19,44	105,13 \pm 13,308
kobiety [cm]	102,28 \pm 12,74	111,82 \pm 23,49	103,18 \pm 12,68
mężczyźni [cm]	109,08 \pm 9,22	105,04 \pm 12,81	108,60 \pm 9,76
WHR	0,97 \pm 0,15	1,00 \pm 0,11	0,97 \pm 0,14
kobiety	0,94 \pm 0,14	0,97 \pm 0,13	0,94 \pm 0,14
mężczyźni	1,01 \pm 0,12	1,06 \pm 0,05	1,01 \pm 0,94
ciśnienie tętnicze skurczowe (mm Hg)	142,26 \pm 19,21	134,86 \pm 18,57	141,50 \pm 19,31
ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mm Hg)	84,61 \pm 12,12	77,34 \pm 11,52	83,85 \pm 12,29

Wszystkie osoby z grupy badanej były osobami otyłymi, o czym świadczy wysoki wskaźnik BMI (≥ 30) oraz otyłość brzuszna (normy wg. IDF dla Europejczyków obwód talii: < 94 cm, u kobiet < 80 cm). Ponadto, pacjenci ze zdiagnozowanym zespołem MetS mieli zaburzone wartości lipidogramu, a w szczególności parametry świadczące o zespole metabolicznym, czyli poziom HDL oraz TG (norma wg. IDF: HDL dla kobiet > 50 , dla mężczyzn > 40 , poziom TG ≤ 150). Osoby z MetS oraz ze zdiagnozowaną T2DM posiadali również wysoki poziom glukozy mierzonej na czczo (norma poniżej 100 mg/dl). Innym parametrem świadczącym o MetS był stosunek ciśnienia tętniczego skurczowego do ciśnienia rozkurczowego, którego norma wg. IDF wynosi 130/85. Zdecydowana większość osób zakwalifikowanych do grupy badanej miała ciśnienie tętnicze wyższe niż zakłada to norma (141,50/83,85).

Przeprowadzono analizę grupy kontrolnej pod kątem wartości pomiarów antropometrycznych. Spośród 365 osób, odrzucono osoby, których BMI wynosiło powyżej 30, oraz osoby, u których zawartość tkanki tłuszczowej stanowiła powyżej 35% u kobiet oraz powyżej 30% u mężczyzn. Do analizy ostatecznie zakwalifikowano 316 osób z grupy kontrolnej. Poniżej przedstawiono porównanie parametrów antropometrycznych obu grup (**Tabela 9**).

Tabela 9 Porównanie danych (średnia \pm SD) grupy kontrolnej i grupy pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym.

parametry antropometryczne	grupa kontrolna (n =316)	pacjenci z MetS (n=281)
wiek (lata)	34,84 \pm 12,56	60,05 \pm 11,71
kobieta/ mężczyzna, n (%)	108 (34) / 208 (66)	180 (64) / 101 (36)
BMI (kg/m^2)	23,76 \pm 2,50	32,34 \pm 4,85
obwód talii [cm]	84,25 \pm 9,69	108,69 \pm 61,36
WHR	0,84 \pm 0,07	0,99 \pm 0,58
% zawartość tkanki tłuszczowej	22,73 \pm 6,25	brak danych
ciśnienie tętnicze skurczowe (mmhg)	123,13 \pm 10,07	141,50 \pm 19,31
ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mmhg)	77,42 \pm 6,68	83,85 \pm 12,29

Należy podkreślić, iż grupa pacjentów stanowiła grupę osób ze zdiagnozowanym syndromem metabolicznym oraz otyłością. W dalszej części pracy grupa z MetS jednocześnie oznacza grupę osób otyłych.

5.1.2 Dystrybucja genotypów SNPs genu *UCPI* w badanych grupach

Metodą PCR-RFLP oznaczono miejsca polimorficzne w grupie osób ze zdiagnozowanym MetS (281 osób) oraz w grupie osób zdrowych (316 osób). Elektroforeza w żelu agarozowym pozwoliła na wizualizację otrzymanych genotypów. Poniżej przedstawiono obraz prążków w żelu agarozowym dla każdego genotypu, otrzymanego dla wybranych polimorfizmów genu *UCPI* (**Ryc. 12, Ryc. 13, Ryc. 14, Ryc. 15, Ryc. 16**).

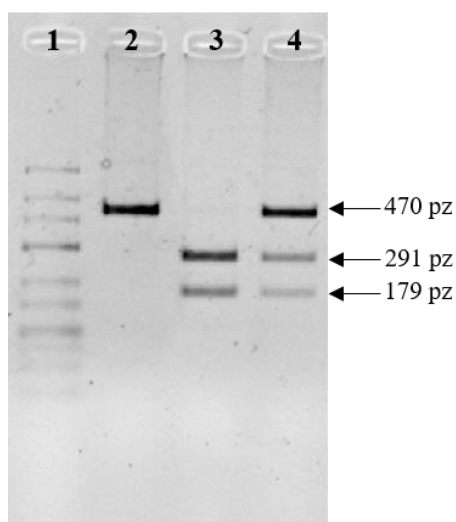
Uzyskane produkty na drodze analizy restrykcyjnej BclI dla polimorfizmu A-3826G to prążki o długości: 470, 291, 179 pz (**Ryc. 12**). Prążek o długości 470 pz odpowiada fragmentowi okalającemu A-3826G, zawierającemu allel niezmutowany (allel A) w badanym miejscu polimorficznym. W przypadku obecności allelu G w badanym miejscu polimorficznym, enzym BclI nie amplikon, dając dwa produkty o długości: 291 oraz 179 pz. Obraz trzech prążków uzyskano dla heterozygoty AG, kiedy to allel A pochodzi z jednego chromosomu, natomiast allel zmutowany G pochodzi z drugiego chromosomu homologicznego.

W przypadku SNP A-1766G (**Ryc. 13**), homozygota drugiego rodzaju (GG) daje obraz nieciętego przez enzym restrykcyjny BsiHKAI prążka o długości 443 pz. Co ciekawe, żadna z badanych prób (zarówno w grupie kontrolnej jak i grupie badanej) nie posiadała genotypu GG. Enzym BsiHKAI ciął amplikon w przypadku obecności allelu A dając dwa produkty (340 i 103 pz) dla homozygoty pierwszego rodzaju (AA) oraz trzy produkty (443, 340 i 103 pz) w przypadku heterozygoty (AG). Heterozygotami były tylko dwie próbki spośród 543 genotypowanych osób.

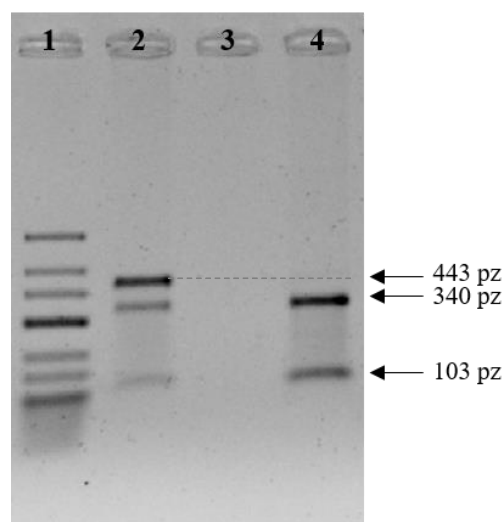
Kolejnym polimorfizmem leżącym w rejonie 5' promotorowym jest A-112C (**Ryc. 14**). W trakcie reakcji PCR uzyskano amplikon o długości 165 pz, który następnie poddawano cięciu restrykcyjnym enzymem MvaI. W przypadku obecności niezmutowanego allelu (A) w badanym miejscu polimorficznym produkt PCR nie ulegał trawieniu, natomiast występowanie allelu C powodowało w trakcie trawienia MvaI powstanie dwóch produktów o długości 18 i 147 pz. Na żelu agarozowym widoczny jest tylko jeden prążek o długości 147 pz dla genotypu CC, gdyż produkt

o długości 18 pz nie jest widoczny na żelu. Heterozygota AC daje trzy produkty, z czego na żelu widoczne są tylko dwa: 147 oraz 165 pz.

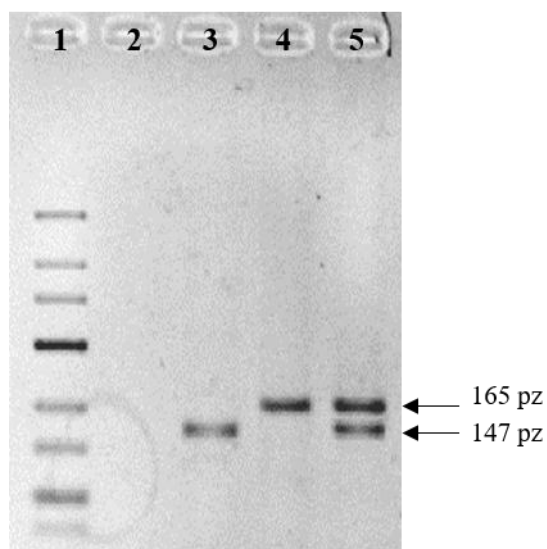
Do oznaczenia polimorfizmu Ala64Thr, leżącego w eksonie 2 genu *UCPI*, namnożono w pierwszym etapie amplikon o długości 585 pz. W amplikonie zawierającym niezmutowany allel G w badany miejscu polimorficznym enzym rozpoznaje trzy miejsca restrykcyjne. W wyniku cięcia *MspA1* powstają produkty: 12 pz (prążek niewidoczny na żelu), 237 pz oraz 345 pz. Na zamieszczonym zdjęciu żelu (**Ryc. 15**) w przypadku homozygoty GG widnieje dodatkowy prążek o długości 594 pz i jest to produkt pochodzący od niedotrąwionego amplikonu. W przypadku homozygoty AA (zamiana aminokwasu Ala na Thr), w amplikonie powstaje dodatkowe miejsce cięcia restrykcyjnego i w ten sposób powstają produkty: 12, 47, 190, 345 pz. Dla heterozygoty powstają następujące produkty: 12, 47, 190, 237, 345 pz.



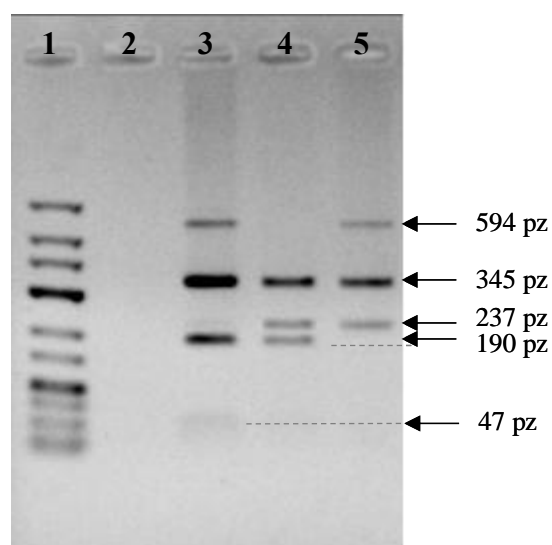
Ryc. 12 Analiza genotypów dla SNP **A-3826G** po cięciu restrykcyjnym enzymem *BclI*. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-homozygota AA, 3-heterozygota AG, 4-homozygota GG.



Ryc. 13 Analiza genotypów dla SNP **A-1766G** po cięciu restrykcyjnym enzymem *BsiHKAI*. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-heterozygota AG, 3-blank, 4-homozygota AA. Wśród badanych próbek nie znaleziono homozygoty drugiego rodzaju (GG).

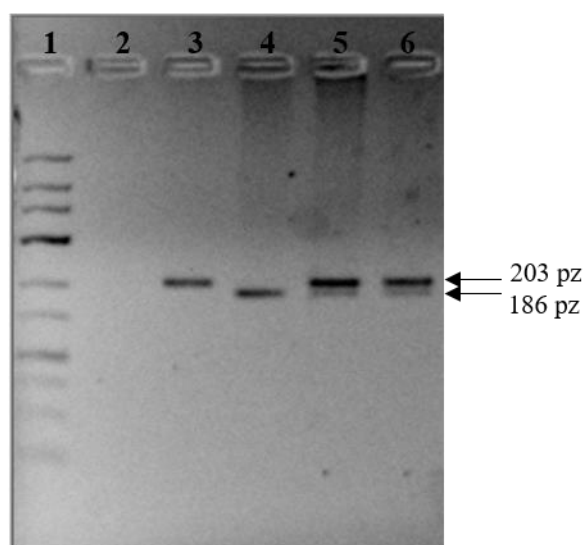


Ryc. 14 Analiza genotypów dla SNP **A-112C** po cięciu restrykcyjnym enzymem *MvaI* (*BstNI*). 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-blank, 3-homozygota CC, 4-homozygota AA, 5-heterozygota AC.



Ryc. 15 Analiza genotypów dla SNP **Ala64Thr** po cięciu restrykcyjnym enzymem *MspAII*. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2 - blank, 3- homozygota AA (Thr/Thr), 4-heterozygota GA (Ala/Thr), 5- homozygota GG (Ala/Ala), 594 pz – niestrawiony produkt po PCR.

W przypadku **Met229Leu** (**Ryc. 16**) miejsce cięcia znajduje się w wariacie niezmutowanej homozygoty, czyli AA – powstają dwa produkty o długości: 17 pz (niewidoczny na żelu) oraz 186 pz. Sekwencja posiadająca zmutowany allel T nie jest rozpoznawana przez *HindIII* i nie dochodzi do cięcia restrykcyjnego (produkt o długości 203 pz). Trzy produkty otrzymano dla heterozygoty AT: 17, 186 i 203 pz.



Ryc. 16 Analiza genotypów dla SNP **Met229Leu** po cięciu restrykcyjnym enzymem *HindIII*. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-blank, 3- homozygota TT (Met/Met), 4-homozygota AA (Met/Met), 5,6-heterozygota AT (Met/Leu).

5.1.3 Analiza związku badanych SNP z ryzykiem zachorowania na MetS

Pierwszym etapem analizy była ocena zgodności dystrybucji genotypów z prawem Hardy'ego – Weinberga (HWE) w obu badanych grupach. W przypadku polimorfizmu A-1766G rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów nie spełniał założeń HWE, a ponadto ze względu na bardzo niską częstość allelu rzadkiego (0,3%), ten SNP został odrzucony w dalszej analizie.

W kolejnym etapie sprawdzono, czy częstość występowania poszczególnych alleli oraz genotypów dla czterech wybranych polimorfizmów u pacjentów ze stwierdzonym MetS oraz otyłością różni się od częstości w grupie kontrolnej. W tym celu przeprowadzono test χ^2 . Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów i alleli dla A-112C, Ala64Thr oraz Met229Leu porównując genotypy pacjentów z MetS i osoby zdrowe (dla genotypów p odpowiednio 0,99; 0,84; 0,46, dla alleli p odpowiednio 0,99; 0,83; 0,21), co świadczy o braku związku tych SNP z ryzykiem zachorowania na MetS. Wyniki analiz dla badanych SNP przedstawiono odpowiednio w **Tabela 11**, **Tabela 12** oraz w **Tabela 13**.

Istotnie statystyczną różnicę zaobserwowano dla allelu G w polimorfizmie A-3826G ($p = 0,034$). Zmutowany allel występował istotnie statystycznie częściej w grupie kontrolnej (29,3%) niż w grupie pacjentów z MetS (23,8%) ($p = 0,034$). Ponadto, wykazano że osoby posiadające allel G (tj. genotypy AG + GG) znacząco częściej występują u osób zdrowych ($p=0,035$). Obecność allelu G zmniejsza ryzyko zachorowania o około 30% (OR = 0,71; CI95% 0,51-0,98).

Tabela 10 Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu A-3826G genu *UCPI* w grupie badanej i kontrolnej.

A-3826G rs1800592							
	pacjenci MetS		kontrola		OR	CI95%	p
	n	%	n	%			
allel							
A	428	76,2	447	70,7	1,32	1,02-1,71	<u>0,034</u>
G	134	23,8	185	29,3	0,76	0,58-0,98	
genotyp							
AA	163	58	156	49,4	1 ^a		$\chi^2_{df=2}=4,45$
AG+GG	118	42	160	50,6	0,71	0,51-0,98	<u>p=0,035</u>
Σ	281	100,0	316	100,0			
HWE	$\chi^2=0,0001$; p=0,99		$\chi^2=0,32$; p=0,57				

^a grupa referencyjna, HWE – prawo Hardy'ego Weinberga, df – stopnie swobody

Tabela 11 Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu A-112C genu *UCPI* w grupie badanej i kontrolnej.

A-112C rs10011540							
allel	pacjenci MetS		kontrola		OR	CI95%	p
	n	%	n	%			
A	514	91,5	576	91,4	1,004	0,67-1,51	0,99
C	48	8,5	54	8,6	1,12	0,22-5,59	
genotyp							
AA	236	84,0	264	83,8	1 ^a		$\chi^2_{df=2}=0,03$ p= 0,99
AC	42	14,9	48	15,2	0,98	0,63-1,53	
CC	3	1,1	3	1,0	1,12	0,25-4,97	
Σ	281	100,0	315	100,0			
HWE	$\chi^2=0,53$; p=0,47		$\chi^2=0,24$; p=0,62				

^a grupa referencyjna, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, df – stopnie swobody

Tabela 12 Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Ala64Thr genu *UCPI* w grupie badanej i kontrolnej.

Ala64Thr rs45539933							
allel	pacjenci MetS		kontrola		OR	CI95%	p
	n	%	n	%			
G	513	91,3	579	91,6	0,96	0,64-1,44	0,83
A	49	8,7	53	8,4	1,69	0,28-10,21	
genotyp							
GG	235	83,6	265	83,9	1		$\chi^2_{df=2}=0,34$ p= 0,84
GA	43	15,3	49	15,5	0,99	0,64-1,54	
AA	3	1,1	2	0,6	1,58	0,31-8,08	
Σ	281	100,0	316	100,0			
HWE	$\chi^2=0,42$; p=0,52		$\chi^2=0,03$; p=0,87				

^a grupa referencyjna, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, df – stopnie swobody

Tabela 13 Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Met229Leu genu *UCPI* w grupie badanej i kontrolnej.

Met229Leu rs2270565							
allel	pacjenci MetS		kontrola		OR	CI95%	p
	n	%	n	%			
A	455	90,3	457	92,5	1,33	0,85-2,08	0,21
T	49	9,7	37	7,5	0,65	0,11-3,92	
genotyp							
AA	206	81,7	212	85,8	1		$\chi^2_{df=2}=1,55$ p=0,46
AT	43	17,1	33	13,4	1,34	0,82-2,18	
TT	3	1,2	2	0,8	1,44	0,28-7,38	
Σ	252	100,0	247	100,0			
HWE	$\chi^2=0,20$; p=0,66		$\chi^2=0,32$; p=0,57				

5.1.4 Porównanie częstości haplotypów badanych SNP

Na podstawie otrzymanych wyników częstości występowania genotypów polimorfizmów genu *UCPI* obliczono częstość występowania poszczególnych haplotypów przy użyciu narzędzia SHEsis. W analizie nie uwzględniono polimorfizmu A-1766G, gdyż wyniki genotypowania grupy z MetS nie spełniały założeń HWE.

Tabela 14 Wyniki analizy haplotypów. Do analizy uwzględniono kolejno *loci*: A-3826G, Ala64Thr, A112C oraz Met229Leu. Haplotypy o częstości występowania <0,3 zostały pominięte w analizie. Miejsce A-1766G zostało odrzucone, ponieważ nie spełnia prawa HWE. Analizę wykonano dzięki narzędziu SHEsis.

haplotyp	Grupa MetS częstość występowania	Zdrowi częstość występowania	χ^2	p	OR [CI95%]
A G A T	376,5 (0,75)	349,9 (0,71)	2,69	0,10	1,3 [0,95-1,70]
G G A T	75,5 (0,15)	100,0 (0,20)	4,53	0,03	0,7 [0,50-0,97]
G A C A	37,7 (0,08)	33,9 (0,07)	0,16	0,69	1,1 [0,68-1,79]

W analizie zaobserwowano obecność 10 haplotypów (AGAA, AGAT, AAAT, GGAA, GGAT, GGCT, GACA, GACT, AGCT, AACA) występujących w obu badanych grupach. Dla haplotypów o częstości występowania niższej niż 3% nie wykonano analizy statystycznej. Częstość powyżej 3% miały tylko trzy haplotypy, wymienione w **Tabela 14**. W pierwszej kolumnie „haplotyp” litery oznaczają odpowiednio: pierwsza litera polimorfizm A-3826G, druga Ala64Thr, trzecia A-112C

i czwarta Met229Leu. Najczęściej występującym haplotypem jest AGAT (obecność wszystkich alleli dzikich) w obu porównywanych grupach.

Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w częstości występowania haplotypu GGAT między grupą osób zdrowych a grupą z MetS oraz otyłością. Haplotyp ten zawiera zmutowany allel G polimorfizmu A-3826G oraz zmutowany allel T w Met229Leu. Świadczy to o związku tego haplotypu z około 30% zmniejszeniem ryzyka zachorowania na MetS (OR=0,700; CI95% 0,503 - 0,973).

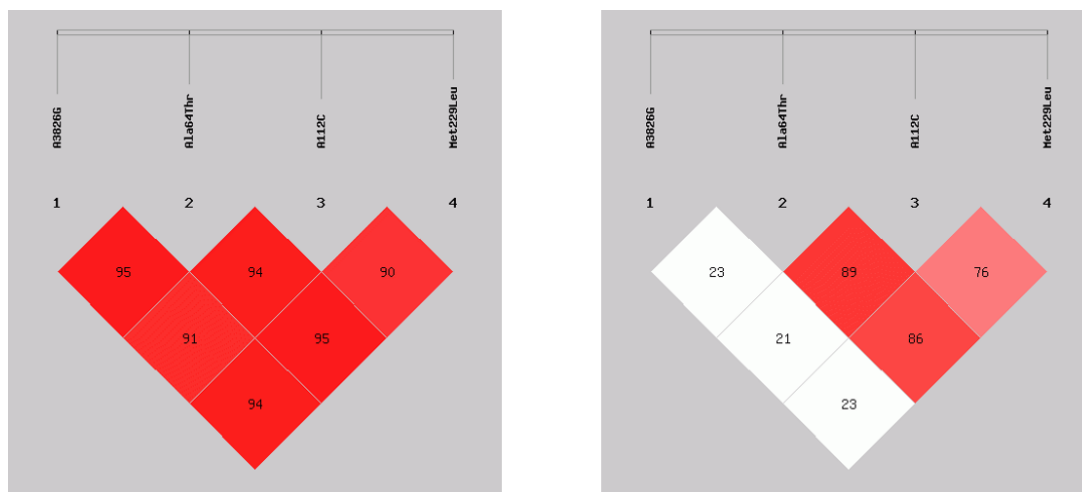
5.1.5 Analiza nierównowagi sprzężeń (LD)

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę nierównowagi sprzężeń badanych SNPs. Podobnie jak we wcześniejszych etapach, w obliczeniach nie uwzględniono polimorfizmu A-1766G. LD określa różnicę między rzeczywistą (obserwowaną) a oczekiwaną częstością występowania alleli w różnych *loci* w danej populacji. Analiza LD pozwala na ustalenie, czy położone w pobliskich *loci* polimorfizmy są ze sobą sprzężone, czyli czy tworzą wspólnie dziedziczony haplotyp. LD opisywane jest przez dwa parametry: D' , który przyjmuje wartość 1 dla całkowicie sprzężonych alleli, oraz parametr r^2 , który jest miarą statystycznej korelacji i wyraża się wartościami od 0 do 1, gdzie $r^2 = 1$ wskazuje, że dwa analizowane SNP niosą taką samą informację (allel pierwszego SNP jest obserwowany z allelem drugiego SNP).

Tabela 15 Wyniki parametrów (D' oraz r^2) LD dla badanych SNP genu *UCPI*.

D'	Ala64Thr	A-112C	Met229Leu	r^2	Ala64Thr	A-112C	Met229Leu
A-3826G	0,95	0,91	0,94	A3826G	0,23	0,21	0,23
Ala64Thr	-	0,95	0,95	Ala64Thr	-	0,89	0,86
A-112C	-	-	0,90	A112C	-	-	0,76

W silnej nierównowadze sprzężeń są polimorfizmy A-112C i Ala64Th4 ($D = 0,95$, $r^2 = 0,89$) oraz Ala64Thr oraz Met229Leu ($D'=0,96$, $r^2=0,86$) - wyniki przedstawiono w **Tabela 15** oraz na **Ryc. 17**. Oznacza to, iż allele dla tych polimorfizmów dziedziczone są bardzo podobnie.



Ryc. 17 Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *UCPI* w badanej grupie pacjentów z MetS oraz grupie kontrolnej. Po lewej LD wyrażone wartością parametru D' w procentach, po prawej wartością współczynnika korelacji r^2 w procentach. (kolor biały = 0, kolor czerwony 100%).

Podsumowując, wykonano genotypowanie 5 wybranych miejsc polimorficznych, z czego w przypadku SNP (A-1766G) stwierdzono, iż nie spełnia on założeń HWE i został wyłączony z dalszych analiz. Tylko dla jednego SNP zaobserwowano istotnie statystycznie różnicę w częstości występowania alleli. Jest to A-3826G, gdzie allel G występował częściej w grupie kontrolnej niż w grupie osób ze zdiagnozowanym MetS. Analiza haplotypów wykazała, iż spośród 10 zidentyfikowanych haplotypów, trzy występowały z częstością powyżej 3 %, a haplotyp (GGAT) występuje istotnie statystycznie częściej w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów. Haplotyp ten zawiera zmutowany allel G polimorfizmu A-3826G oraz allel T polimorfizmu Met229Leu i jego obecność wiąże się z obniżonym ryzykiem wystąpienia MetS. Ostatnim etapem analizy była analiza nierównowagi sprzężeń, która wykazała, iż w silnym niezrównoważeniu sprzężeń są dwie pary polimorfizmów: A-112C i Ala64Thr oraz Ala64Thr i Met229Leu.

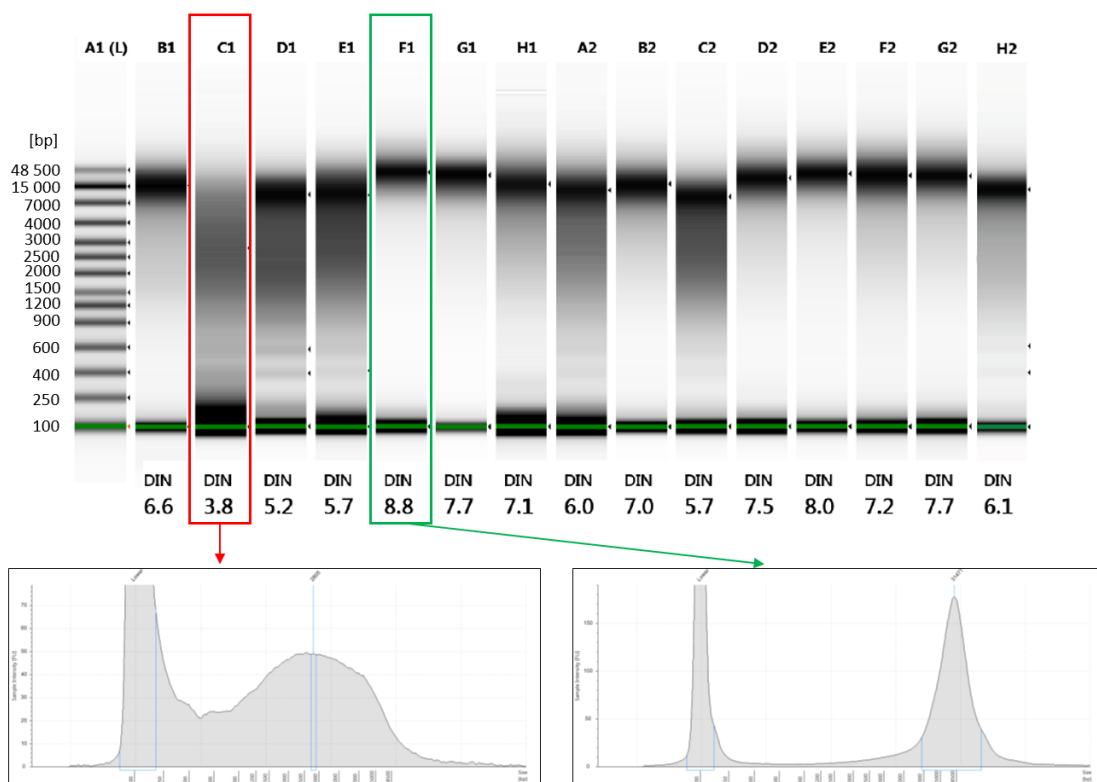
5.2 Poszukiwanie nowych nieopisanych w literaturze wariantów genu *UCPI* związanych z ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego przy zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS)

Znając funkcję oraz mechanizm działania termogeniny 1 można założyć, iż poznanie zmienności genu *UCPI* w obrębie jego części kodującej i regionów regulatorowych (5' oraz 3'UTR) może stanowić ciekawą podstawę do dalszych badań nad związkiem zmienności genetycznej z ryzykiem wystąpienia chorób o podłożu metabolicznym. W celu poszukiwania nowych polimorfizmów genu *UCPI*

przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji regionu kodującego oraz regionów 5' (5000 pz powyżej miejsca startu transkrypcji) i 3' (2000 pz poniżej końca eksonu 6) w grupie 36 osób zdrowych, 30 osób chorych na MetS (bez stwierdzonej cukrzycy typu 2 oraz w grupie 29 osób z MetS oraz T2DM.

5.2.1 Ocena jakości matrycowego DNA użytego do wygenerowania bibliotek

Spośród wyizolowanych próbek genomowego DNA używanych do wcześniejszego genotypowania, wybrano próby o najlepszej jakości, tzn. o niezdegradowanym DNA. Poniżej (**Ryc. 18**) przedstawiono przykładowe wyniki otrzymane podczas automatycznej elektroforezy żelowej. Cechą charakterystyczną próbki o wysokiej jakości (np. próbka F1, DIN = 8.8) jest ostry prążek na wysokości około 45 500 pz. Widać to również na wykresie przedstawiającym zależność długości DNA od intensywności, który posiada jeden główny peak na wysokości 31 477 pz. Cechą charakterystyczną zdegradowanego DNA jest obecność ciągnącego się, rozmytego prążka (smiru), który odpowiada wielu fragmentom DNA o różnej długości (np. próbka C1 na **Ryc. 18**). Próbki o takim obrazie nie były brane do dalszej analizy.

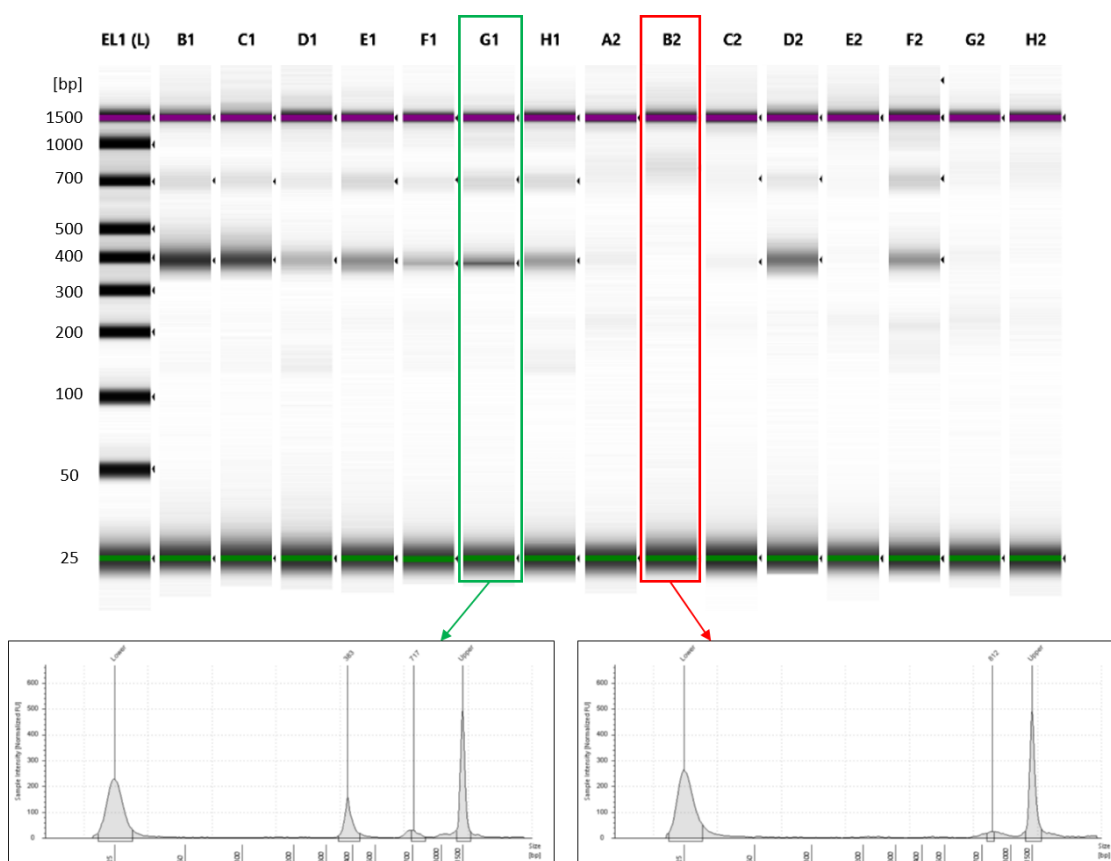


Ryc. 18 Na górze - przykładowy obraz automatycznej elektroforezy żelowej dla 15 próbek genomowego DNA (B1-H2). A1(L) - marker wielkości. DIN (DNA Integrity Number) – ocena

integralności DNA. Na dole - przykładowy rozkład wielkości dla dwóch próbek: o niskim DIN (3.8) - po lewej oraz wysokim DIN (8.8) – po prawej.

5.2.2 Ocena jakości wygenerowanych bibliotek

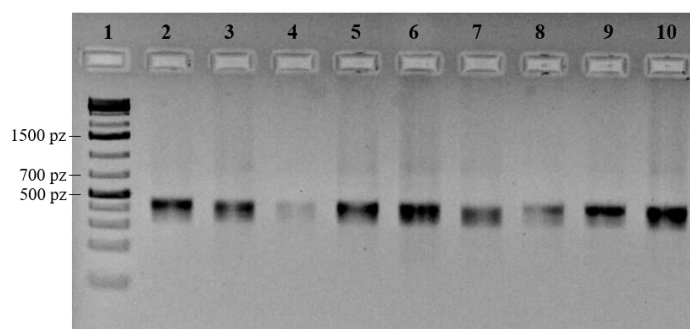
Przeprowadzono analizę jakości otrzymanych bibliotek poprzez automatyczny rozdział elektroforetyczny przy użyciu systemu TapeStation 4200 oraz High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (biblioteki przygotowane zestawem TruSeq) oraz tradycyjną elektroforezę w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe w buforze TBE i wizualizację w świetle UV (biblioteki przygotowane zestawem AmpliSeq). Przykładowe wyniki elektroforezy automatycznej przedstawiono na **Ryc. 19**. Prążek na wysokości około 400 pz pochodzi od poprawnie przygotowanej biblioteki zamplifikowanego fragmentu DNA z przyłączonymi adapterami (np. próbka G1 na **Ryc. 19**).



Ryc. 19 Na górze – przykładowy obraz automatycznej elektroforezy żelowej dla 15 próbek bibliotek przygotowanych zestawem *Truseq Custom Amplicon Low Input Kit* (A2-H2). EL1(L) - marker wielkości. Na dole - przykładowy rozkład wielkości dla dwóch wybranych bibliotek. Zielonym prostokątem zaznaczono obraz elektroforezy dla poprawnie przygotowanej biblioteki – widoczny produkt na wysokości 383 pz. Czerwonym prostokątem zaznaczono obraz elektroforezy dla biblioteki, gdzie nie powstał oczekiwany produkt. Taka biblioteka, była odrzucana do dalszych kroków sekwencjonowania NGS.

W przypadku tradycyjnej elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym również zaobserwowano prążek na wysokości 400 pz odpowiadający bibliotece (**Ryc. 20**). Analiza jakości bibliotek pozwoliła na odrzucenie bibliotek o złej jakości. Do kolejnych etapów sekwencjonowania NGS zakwalifikowano:

- biblioteki przygotowane zestawem TruSeq (dla części kodującej genu *UCPI*) - 35 próbek z grupy kontrolnej, 29 próbek z grupy osób ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym oraz 14 próbek osób z T2DM,
- biblioteki przygotowane zestawem AmpliSeq (dla regionów 5' i 3' genu *UCPI*) - 31 próbek z grupy kontrolnej, 30 osób z grupy osób ze zdiagnozowanym MetS oraz 29 próbek osób z T2DM.



Ryc. 20 Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym. 1 – marker wielkości GeneRuler 1 kb Plus Dna Ladder (*ThermoFisher Scientific*), 2-10 analizowane biblioteki przygotowane zestawem AmpliSeq (przykładowe próbki).

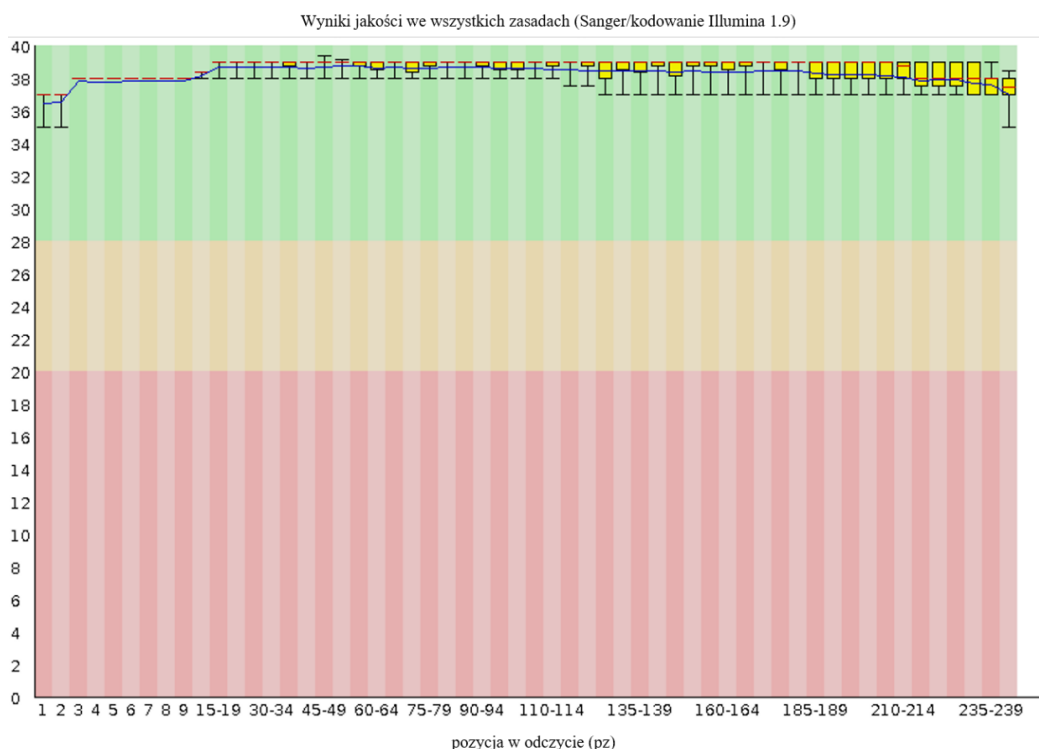
5.2.3 Analiza nowo zidentyfikowanych polimorfizmów genu *UCPI*

5.2.3.1 Ocena jakości otrzymanych odczytów

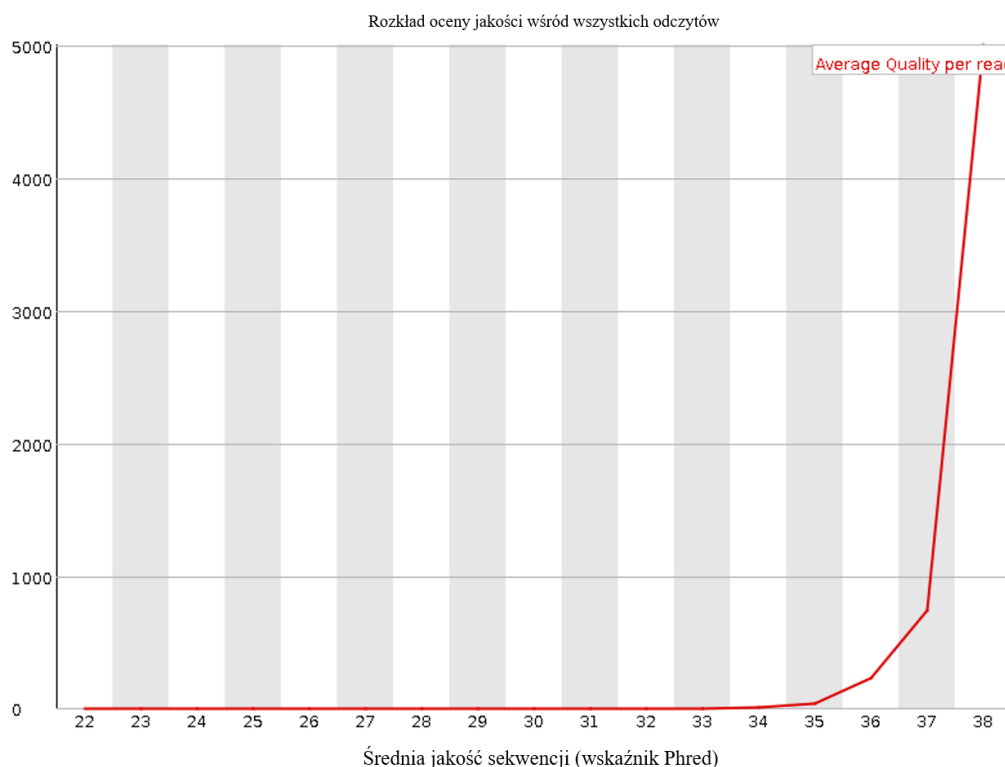
Po zastosowaniu narzędzia *Trimmomatic* i usunięciu sekwencji adaptorowych, przeanalizowano otrzymane odczyty pod kątem ich jakości, przy wykorzystaniu narzędzia *FastQC* dla każdej z sekwencjonowanych próbek. Raport *FastQC* pozwala na graficzną ocenę jakości pozbawionych sekwencji adaptorowych odczytów. Jednym z parametrów jest ocena jakości każdej sekwencjonowanej zasady we wszystkich odczytach dla danej próbki (**Ryc. 21**). Wykres typu „ramka-wąsy” stanowi prostą graficzną prezentację rozkładu badanej cechy statystycznej, w tym przypadku jakości odczytu. Na osi x znajduje się pozycja w odczycie wyrażona w pz, natomiast na osi y

wynik jakości Phred, który reprezentuje prawdopodobieństwo błędnego odczytu nukleotydu, wyrażone jako $-10\log_{10}(p)$, gdzie p to procent szans. Oś x nie jest jednolita, w miarę postępu odczytu wyniki jakości są przedstawiane dla kilku pozycji na raz (pozycji bazowej). Niebieską linią oznaczono uśrednione wyniki jakości dla danej pozycji bazowej w odczycie, natomiast czerwona linia w żółtym polu stanowi medianę wyniku jakości odczytu dla danej pozycji bazowej. Długość żółtego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartyłowy, czyli różnicę między trzecim a pierwszym kwartyłem, pomiędzy którymi znajduje się 50% obserwacji (wyników Phred). Wąsy górne i dolne reprezentują 10 i 90 percentyl Phred. Przedstawiony na **Ryc. 21** wynik jakości sekwencjonowania stanowi przykład bardzo dobrego rozkładu Phred na zasadę bazową w odczycie.

Innym ważnym wskaźnikiem jest rozkład/dystrybucja jakości wśród wszystkich odczytów (sekwencjach) dla analizowanej próbki (**Ryc. 22**). Na osi x znajduje się wartość Phred, natomiast oś y odzwierciedla całkowitą liczbę odczytów dla danej próbki.



Ryc. 21 Jakość sekwencji na zasadę w próbce od pacjenta nr 1 ze zdiagnozowaną T2DM po użyciu narzędzia *Trimmomatic* – bibliotekę przygotowano zestawem *AmpliSeq*.



Ryc. 22 Ocena jakości wszystkich odczytów próbki od pacjenta 1 w grupie T2DM. Bibliotekę przygotowano zestawem AmpliSeq. Wskaźnik Phred określa prawdopodobieństwo błędnego odczytu zasady i wyrażony jest, jako $-10\log_{10}(p)$, gdzie p to procent szans. Tutaj średni wskaźnik Phred wynosi 38, co oznacza, że prawdopodobieństwo błędnego odczytu zasady wynosi 1 na 6309 zasad, co stanowi bardzo dobry wynik i świadczy o dobrej jakości odczytów.

Wszystkie sekwencjonowane próbki spełniły wymagania kontroli jakości i zostały uwzględnione w dalszej analizie.

5.2.1.1 Detekcja wariantów

Ostatnim etapem analizy było wytypowanie potencjalnie najbardziej istotnych polimorfizmów w kontekście rozwoju zespołu metabolicznego lub cukrzycy typu 2. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na zidentyfikowanie 85 pozycji w obrębie sekwencjonowanych regionów genu *UCPI*, a dokładnie: 49 pozycji w regionie kodującym, 3 pozycji w regionie 3'UTR oraz 35 pozycji w regionie 5'UTR. Trzy pozycje zostały zidentyfikowane dwa razy, ponieważ zestaw AmpliSeq nachodził kilkaset pz na region kodujący genu *UCPI*. Z puli rozpoznanych wariantów, występujących w genie *UCPI* wśród grupy kontrolnej, osób ze zdiagnozowanym MetS oraz T2DM, zidentyfikowano te, które mogą mieć potencjalny związek z chorobą. Kryteria włączenia otrzymanych wyników to:

- równy rozkład SNP na obu odczytach (*forward* i *reverse*), odrzucano SNP poniżej wartości 0,2 – analiza w programie IGV;
- istotnie statystyczna różnica ($p < 0,05$) między licznościami poszczególnych genotypów oraz częstości alleli pomiędzy porównywanymi grupami (zdrowi vs pacjenci MetS oraz zdrowi vs pacjenci T2DM)
- rozkład zgodny z HWE

W **Tabela 16** oraz w **Tabela 17** przedstawiono podsumowanie zidentyfikowanych wariantów genu *UCPI*. Znalaziono 25 wariantów, które wydają się być interesujące pod względem wpływu danego polimorfizmu na ryzyko wystąpienia T2DM, w odniesieniu do różnic licznosci genotypów czy też alleli między grupą kontrolną a grupą T2DM. Jeden z polimorfizmów znajduje się w regionie 3'UTR, kolejne 18 w regionie kodującym oraz sześć w regionie 5'. 12 spośród 25 polimorfizmów posiada swój rs oraz jest dostępna w bazach danych (np. *Ensembl*). Pozostałe 13 polimorfizmów nie zostało do tej pory zidentyfikowane i nie posiada swojego numeru rs. Dodatkowo rozpoznano dwie insercje – jedną w regionie kodującym (rs3138733) oraz drugą w regionie 5' (rs1434525671).

Porównując grupę kontrolną z grupą osób ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym wybrano 14 polimorfizmów, które wydają się być związane z ryzykiem wystąpienia MetS ($p < 0,1$): jeden w regionie 3' UTR, trzy w regionie kodującym oraz 10 w regionie 5'. Dwa warianty nie zostały do tej pory badane i nie istnieją dane na ich temat w bazie danych *Ensembl*.

Wśród zidentyfikowanych pozycji znalazły się miejsca polimorficzne, które zostały wcześniej genotypowane. Sekwencjonowanie NGS potwierdziło wcześniej otrzymane wyniki dla genotypowanych SNP: A-3826G, A-1766G, Ala64Thr, A-112C, Met229Leu.

Tabela 16 Wybrane warianty genu *UCPI* dla grupy kontrolnej oraz grupy pacjentów T2DM, zidentyfikowane dzięki analizie wyników sekwencjonowania NGS. Istotność statystyczną obliczono testem χ^2 dla poszczególnych alleli oraz genotypów. W tabeli umieszczono polimorfizmy, których istotność statystyczna (porównanie genotypów w modelu dominującym oraz alleli) wynosiła $p \leq 0,1$. Pogrubioną czcionką zaznaczono istotność statystyczną $p \leq 0,05$.

Region	Pozycja na chr. 4 (GRCh38)	rs	allel	zdrowi	T2DM	OR	CI95%	p	genotyp	zdrowi	T2DM	OR	CI95%	p
3'UTR	140 558 375	rs77149926	A	55 (89%)	53 (98%)	1			AA	25 (81%)	26 (96%)	1		
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,21	0,03-1,25	0,05	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,22	0,03-1,42	0,07
Region kodujący	140 560 701	nie odnaleziono	A	68 (97%)	21 (75%)				AA	33 (94%)	7 (50%)	1		
			B	2 (3%)	7 (25%)	9,56	2,11-43,32	0,0006	AB+BB	2 (6%)	7 (50%)	13,40	2,61-68,79	0,0003
	140 561 033	nie odnaleziono	A	65 (93%)	23 (82%)	1			AA	30 (86%)	9 (65%)	1		
			B	5 (7%)	5 (18%)	2,79	0,78-9,95	0,12	AB+BB	5 (14%)	5 (35%)	3,21	0,80-12,87	0,09
	140 561 203	nie odnaleziono	A	64 (91%)	20 (71%)	1			AA	29 (83%)	6 (43%)	1		
			B	6 (9%)	8 (29%)	4,11	1,32-12,81	0,01	AB+BB	6 (17%)	8 (57%)	5,93	1,57-22,4	0,006
	140 561 340	nie odnaleziono	A	58 (83%)	16 (57%)	1			AA	23 (66%)	2 (15%)	1		
			B	12 (17%)	12 (43%)	3,55	1,36-9,22	0,008	AB+BB	12 (34%)	12 (85%)	9,40	2,05-43,04	0,0013
	140 561 713	rs183105785	A	69 (99%)	25 (89%)	1			AA	34 (97%)	11 (79%)	1		
			B	1 (1%)	3 (11%)	6,39	0,89-45,41	0,04	AB+BB	1 (3%)	3 (21%)	7,00	0,92-53,08	0,04
	140 561 965	nie odnaleziono	A	56 (80%)	16 (57%)	1			AA	21 (60%)	2 (14%)	1		
			B	14 (20%)	12 (43%)	2,95	1,16-7,51	0,02	AB+BB	14 (40%)	12 (86%)	7,41	1,63-33,64	0,004
	140 562 566	nie odnaleziono	A	68 (97%)	25 (89%)	1			AA	33 (94%)	11 (79%)	1		
			B	2 (3%)	3 (11%)	3,76	0,70-20,29	0,11	AB+BB	2 (6%)	3 (21%)	4,08	0,70-23,61	0,10
	140 562 854	nie odnaleziono	A	65 (93%)	23 (82%)	1			AA	30 (85%)	9 (65%)	1		
			B	5 (7%)	5 (18%)	2,79	0,78-9,95	0,12	AB+BB	5 (15%)	5 (35%)	3,21	0,80-12,87	0,09
	140 563 271	rs1241007909	A	66 (94%)	23 (82%)	1			AA	31 (89%)	9 (65%)	1		
			B	4 (6%)	5 (18%)	3,46	0,91-13,10	0,06	AB+BB	4 (11%)	5 (35%)	4,05	0,96-17,13	0,05
	140 563 477	nie odnaleziono	A	69 (99%)	23 (82%)	1			AA	34 (97%)	9 (65%)	1		
			B	1 (1%)	5 (18%)	10,8	1,68-70,01	0,002	AB+BB	1 (3%)	5 (35%)	13,32	1,91-92,94	0,002
	140 564 690	nie odnaleziono	A	55 (79%)	15 (54%)	1			AA	20 (57%)	1 (7%)	1		
			B	15 (21%)	13 (46%)	3,12	1,24-7,84	0,01	AB+BB	15 (43%)	13 (93%)	11,90	1,95-72,83	0,002
	140 566 246	rs13128910	A	59 (84%)	20 (71%)	1			AA	25 (71%)	6 (43%)	1		
			B	11 (16%)	8 (29%)	3,18	0,91-11,07	0,06	AB+BB	10 (29%)	8 (57%)	2,15	0,77-5,94	0,14
	140 566 820	rs1270966988	A	59 (84%)	19 (68%)	1			AA	24 (69%)	5 (36%)	1		
			B	11 (16%)	9 (32%)	2,52	0,93-6,85	0,07	AB+BB	11 (31%)	9 (64%)	3,68	1,04-13,0	0,03
	140 567 294	nie odnaleziono	A	63 (90%)	21 (75%)	1			AA	28 (80%)	7 (50%)	1		
			B	7 (10%)	7 (25%)	2,95	0,96-9,09	0,06	AB+BB	7 (20%)	7 (50%)	3,80	1,04-13,84	0,04

	140 567 310	nie odnaleziono	A	67 (96%)	24 (86%)	1			AA	32 (92%)	10 (71%)	1		
			B	3 (4%)	4 (14%)	3,54	0,81-15,43	0,08	AB+BB	3 (8%)	4 (29%)	3,98	0,84-18,95	0,07
	140 567 641	rs7688743	A	68 (97%)	25 (89%)	1			AA	33 (94%)	11 (79%)	1		
			B	2 (3%)	3 (11%)	3,76	0,70-20,29	0,11	AB+BB	2 (6%)	3 (21%)	4,08	0,70-23,61	0,1
	140 568 108	rs3138733 (insercja GTGTGTGT)	A	44 (63%)	23 (82%)	1				14 (40%)	10 (71%)	1		
			B	26 (37%)	5 (18%)	0,39	0,14-1,12	0,07		21 (60%)	4 (29%)	0,29	0,08-1,05	0,05
	140 568 337	nie odnaleziono	A	52 (74%)	15 (54%)	1			AA	19 (54%)	1 (7%)			
			B	18 (26%)	13 (46%)	2,47	1,0-6,09	0,05	AB+BB	16 (46%)	13 (93%)	10,65	1,74-64,98	0,002
5'UTR	140 569 265	rs3811787	A	57 (92%)	42 (78%)	1			AA	26 (84%)	17 (63%)			
			B	5 (8%)	12 (22%)	3,07	1,05-9,04	0,03	AB+BB	5 (16%)	10 (37%)	2,89	0,87-9,55	0,07
	140 569 304	rs36207410	A	55 (89%)	53 (98%)	1			AA	25 (81%)	26 (96%)			
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,21	0,03-1,25	0,05	AB+BB	6 (9%)	1 (4%)	0,22	0,03-1,42	0,07
	140 573 371	rs6536992	A	55 (89%)	39 (72%)	1			AA	25 (81%)	16 (59%)	1		
			B	7 (11%)	15 (28%)	2,90	1,11-7,60	0,02	AB+BB	6 (19%)	11 (41%)	2,73	0,87-8,58	0,08
	140 573 392	rs6536993	A	55 (89%)	39 (72%)	1			AA	25 (81%)	16 (59%)	1		
			B	7 (11%)	15 (28%)	2,90	1,11-7,60	0,02	AB+BB	6 (19%)	11 (41%)	2,73	0,87-8,58	0,08
	140 573 402	rs1434525671 (delecja ACCT)	A	57 (92%)	43 (80%)	1				27 (87%)	20 (74%)			
			B	5 (8%)	11 (20%)	2,76	0,93-8,22	0,06		4 (13%)	7 (26%)	2,24	0,61-8,21	0,21
140 573 493	rs6536994	A	55 (89%)	39 (72%)	1			AA	25 (81%)	16 (59%)	1			
		B	7 (11%)	15 (28%)	2,90	1,11-7,60	0,02	AB+BB	6 (19%)	11 (41%)	2,73	0,87-8,58	0,08	

A – allel referencyjny, B – allel zmutowany, potencjalny allel ryzyka

Tabela 17 Wybrane warianty genu *UCPI* dla grupy kontrolnej oraz grupy pacjentów ze zdiagnozowanym MetS, zidentyfikowane dzięki analizie wyników sekwencjonowania NGS. Istotność statystyczną obliczono testem χ^2 dla poszczególnych alleli oraz genotypów. W tabeli umieszczono te polimorfizmy, których istotność statystyczna (porównanie genotypów w modelu dominującym oraz alleli) wynosiła $p \leq 0,11$. Pogrubioną czcionką zaznaczono istotność statystyczną $p \leq 0,05$.

Region	Pozycja na chromosomie 4 (GRCh38)	rs	allel	zdrowi	MetS	OR	CI95%	p	genotyp	zdrowi	MetS	OR	CI95%	p
3'UTR	140 558 375	rs77149926	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1		
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61	0,1
Region kodujący	140 567 149	nie znaleziono	A	67 (96%)	58 (100%)	1			AA	32 (92%)	29 (100%)	1		
			B	3 (4%)	0 (0%)	0,16	0,01-3,26	0,11	AB+BB	3 (8%)	0 (0%)	0,16	0,01-3,18	0,11
	140 567 294	nie znaleziono	A	63 (90%)	57 (98%)	1			AA	28 (80%)	28 (97%)	1		
			B	7 (10%)	1 (2%)	0,22	0,04-1,32	0,06	AB+BB	7 (20%)	1 (3%)	0,20	0,03-1,24	0,05
140 568 108	rs3138733	A	44 (63%)	28 (48%)	1			AA	14 (40%)	7 (24%)	1			

		B	26 (37%)	30 (52%)	1,80	0,89-3,62	0,1	AB+BB	21 (60%)	22 (76%)	2,02	0,70-5,85	0,18
5' UTR	140 569 304	rs36207410	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140 569 942	rs191838863	A	60 (97%)	42 (88%)	1			AA	29 (94%)	19 (79%)	1	
			B	2 (3%)	6 (13%)	3,33	0,67-16,5	0,12	AB+BB	2 (6%)	5 (21%)	3,70	0,82-16,8
	140 570 776	rs36207408	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140 571 476	rs76129861	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140 572 036	rs56724370	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140 572 113	rs77178927	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140573371	rs6536992	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140573392	rs6536993	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
	140573493	rs6536994	A	55 (89%)	47 (98%)	1			AA	25 (81%)	23 (96%)	1	
			B	7 (11%)	1 (2%)	0,23	0,04-1,41	0,07	AB+BB	6 (19%)	1 (4%)	0,25	0,04-1,61
140573614	rs79430751	A	56 (90%)	47 (98%)	1			AA	26 (84%)	23 (96%)	1		
		B	6 (10%)	1 (2%)	0,27	0,04-1,69	0,11	AB+BB	5 (16%)	1 (4%)	0,31	0,05-2,03	0,16

A – allel referencyjny, B – allel zmutowany, potencjalny allel ryzyka



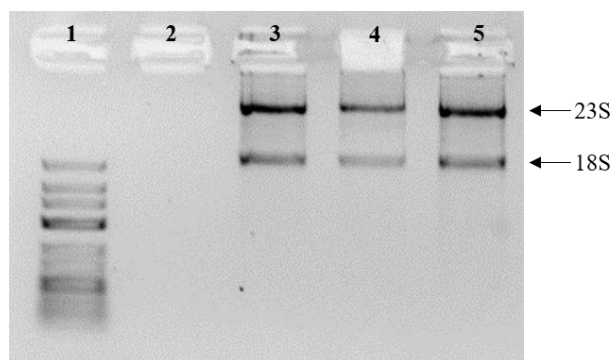
Ryc. 23 Przykładowy obraz mutacji genu *UCPI* w programie IGV_2.8.0 (genotyp AA; pozycja na chromosomie 4: 140 571 632; pacjent z T2DM nr 26). Sekwencja referencyjna przestawiona jest na dole ryciny.

Podsumowując, zidentyfikowano 25 wariantów, które mogą mieć potencjalny wpływ na ryzyko zachorowania na T2DM (jeden w 3'UTR, 18 w regionie kodującym *UCPI*, sześć w regionie 5') oraz 14 wariantów o potencjalnym wpływie na ryzyko zachorowania na MetS i tym samym otyłości (jeden w 3'UTR, trzy w regionie kodującym oraz 10 w regionie 5'). Cztery warianty zidentyfikowano podczas porównywania grupy kontrolnej z MetS jak i T2DM - mogą one stanowić czynniki ryzyka dla obu jednostek chorobowych.

5.3 Ocena poziomu mRNA *UCPI* i *UCP2* w grupie osób z T2DM, otyłych i zdrowych

5.3.1 Analiza jakościowa wyizolowanego RNA

Wyizolowano RNA z próbek PBMC pochodzących od grupy osób ze zdiagnozowaną T2DM ($n = 20$), osób otyłych bez T2DM ($n = 19$) i od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej ($n = 22$). Ocenę jakościową wyizolowanego RNA przeprowadzono przez wizualizację 18:23S rybosomalnego RNA w 2% żelu agarozowym (Ryc. 24). Wykazano, że wyizolowane RNA spełnia kryteria ilościowe i jakościowe ($A_{260/280} = 1,87 - 2,12$) do dalszych badań związanych z ekspresją genów.



Ryc. 24 Frakcje małej podjednostki rRNA: 23S i 18S. Rozdział elektroforetyczny RNA w 2% żelu agarozowym. 1 - marker, 2 - blank, 3,4,5 – analizowane RNA.

5.3.2 Analiza poziomu ekspresji *UCP1* i *UCP2*

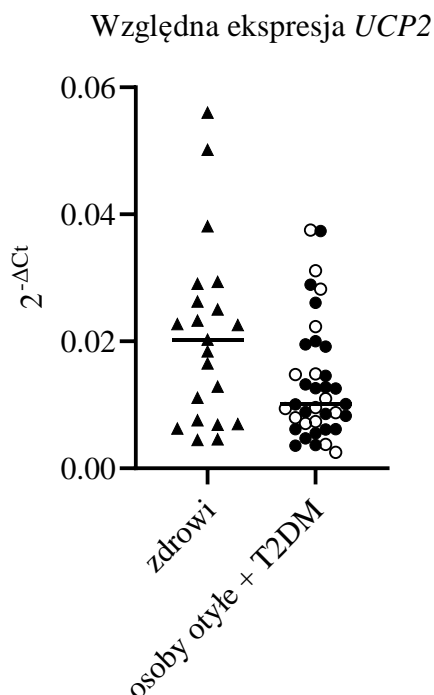
Za pomocą metody Real Time - PCR zbadano poziom ekspresji *UCP1* i *UCP2* w trzech badanych grupach w odniesieniu do ekspresji $\beta 2M$. Wykazano brak ekspresji *UCP1* w PBMC osób zdrowych i z cukrzycą typu 2. Co ciekawe, wykrywalną aczkolwiek na bardzo niskim poziomie, ekspresję *UCP1* stwierdzono u trzech osób w grupie osób otyłych (mediana: $2,88 \cdot 10^{-8}$, SD = $3,15 \cdot 10^{-8}$).

Zaobserwowano ekspresję *UCP2* w PBMC we wszystkich badanych grupach. Wynik Ct został znormalizowany względem ekspresji $\beta 2M$ (ΔCt) i wyrażony jako $2^{-\Delta Ct}$. Wyniki poziomu mRNA *UCP2* dla poszczególnych grup zostały zaprezentowane w **Tabela 18**. Poziom ekspresji *UCP2* nie różni się istotnie statystycznie między trzema badanymi grupami.

Tabela 18 Statystyka opisowa poszczególnych grup: mediana, wartość minimalna (min), maksymalna (max), kwartyle Q1, Q3 dla poziomu mRNA *UCP2* w badanych grupach: osób z T2DM i otyłych oraz w grupie kontrolnej wyrażona w $2^{-\Delta Ct}$. W analizie odrzucono dwa najbardziej odstające wyniki.

grupa	n	mediana	min	max	Q ₁	Q ₃	SD
osób zdrowych	21	0,020	0,004	0,056	0,007	0,028	0,014
osób z T2DM	19	0,009	0,003	0,038	0,007	0,022	0,010
osób otyłych	19	0,013	0,004	0,038	0,006	0,019	0,009
T2DM + osoby otyłe (zaburzenia metaboliczne)	38	0,010	0,003	0,038	0,007	0,019	0,009

Jednakże, porównując wyniki grupy osób zdrowych z zsumowanymi wynikami osób otyłych i z T2DM (osób z zaburzeniami metabolicznymi) zaobserwowano istotnie statystyczną ($p \leq 0,05$) różnicę w ekspresji *UCP2* między badanymi grupami (mediana 0,020 vs. 0,010) - **Wykres 1**.



Wykres 1 Względny poziom mRNA *UCP2* ($2^{-\Delta Ct}$) dla grupy osób zdrowych i osób z zaburzeniami metabolicznymi (T2DM i otyłością). Linia poziomą zaznaczono medianę w obu grupach.

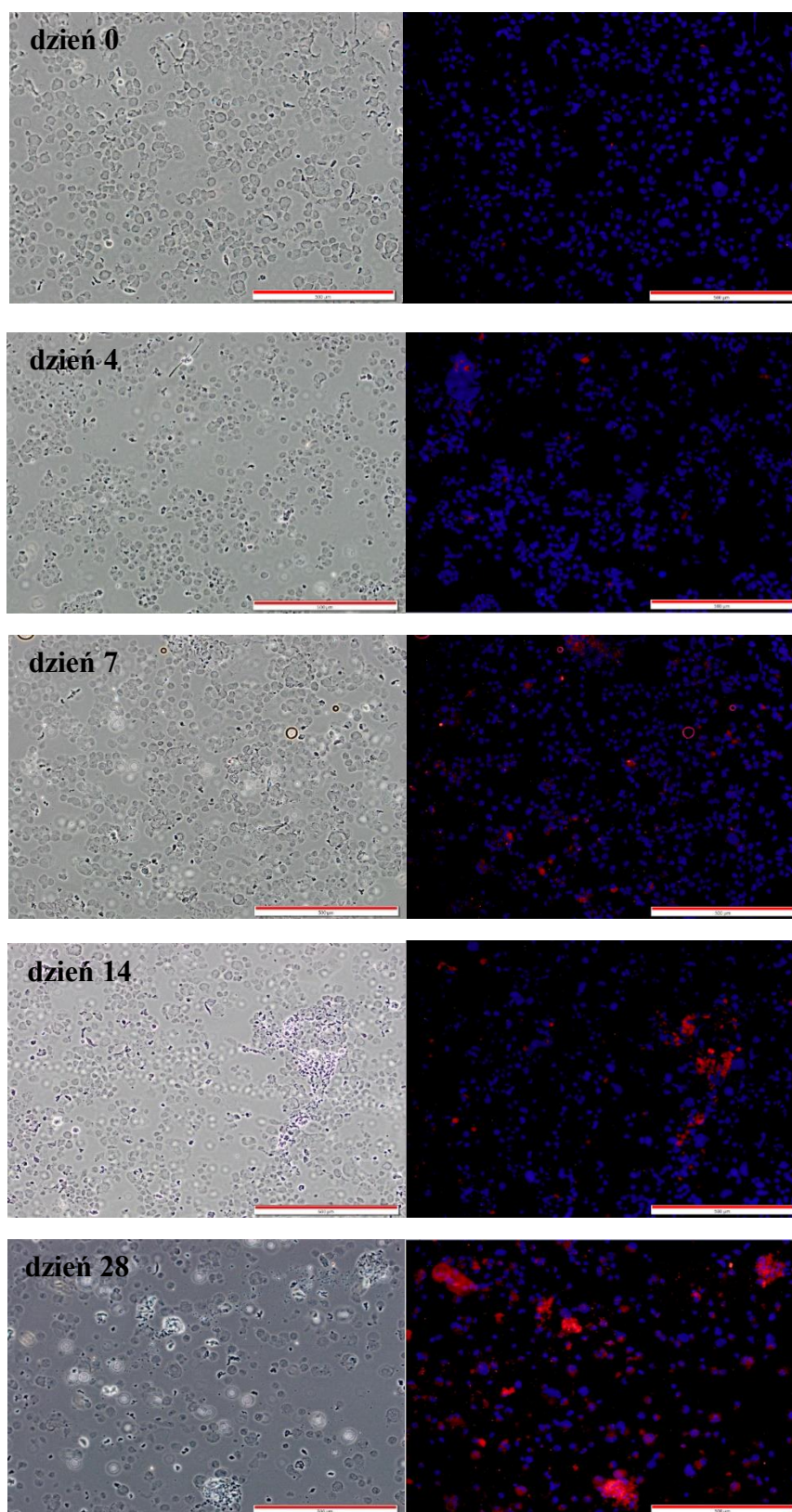
Reasumując, wykazano, iż w grupie osób z zaburzeniami metabolicznymi (T2DM oraz otyłością) ekspresja mRNA *UCP2* z PBMC jest na niższym poziomie niż w grupie osób zdrowych. Nie zaobserwowano ekspresji *UCP1* w PBMC w badanych grupach (oprócz trzech osób w grupie osób otyłych).

5.4 Ocena funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP genu *UCP1*

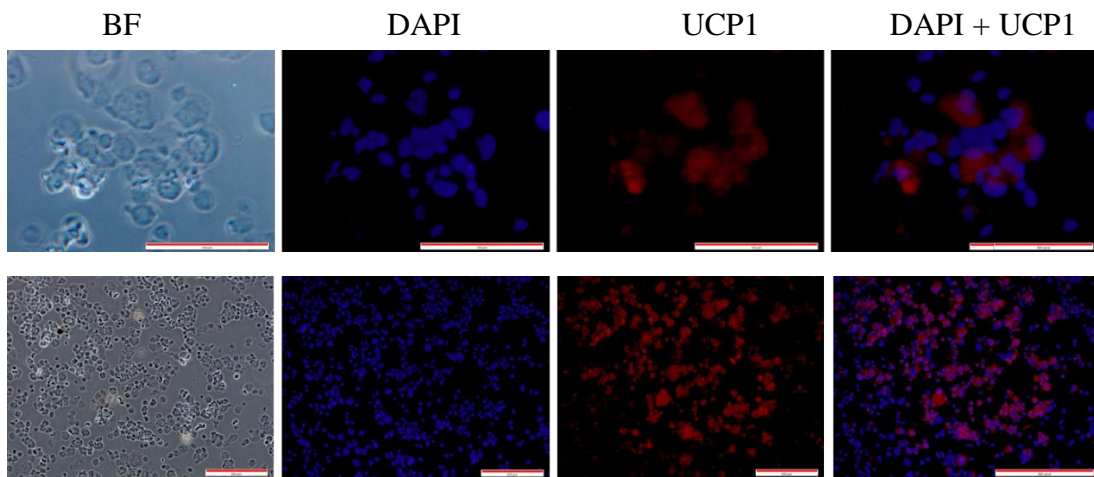
Do badań funkcjonalnych wytypowano dwie linie komórkowe, wykazujące ekspresję *UCP1*: HepG2 oraz PAZ6. W pierwszym etapie badań scharakteryzowano linię PAZ6 w trakcie jej 28-dniowego różnicowania z preadipocytów w kierunku dojrzałych komórek BAT. Zbadano poziom ekspresji genów markerowych dla komórek tłuszczowych (*$\beta 3AR$* , *leptin*, *zic1*) oraz markera brązowej tkanki tłuszczowej - *UCP1*. Zebrano komórki w formie cytospinów w kolejnych dniach różnicowania linii PAZ6, w celu wykonania barwienia immunofluorescencyjnego białka *UCP1* (procedura opisana w podrozdziale 4.4.3). Różnicowanie PAZ6 pozwoliło sprawdzić, w którym dniu ekspresja mRNA *UCP1* jest na najwyższym poziomie, a to z kolei umożliwiło wybranie dnia, w którym przeprowadzona była transfekcja, a następnie test lucyferazowy. Poziom mRNA genu *UCP1* oznaczono również w linii komórkowej HepG2.

5.4.1 Ocena poziomu białka UCP1 w trakcie różnicowania linii komórkowej PAZ6

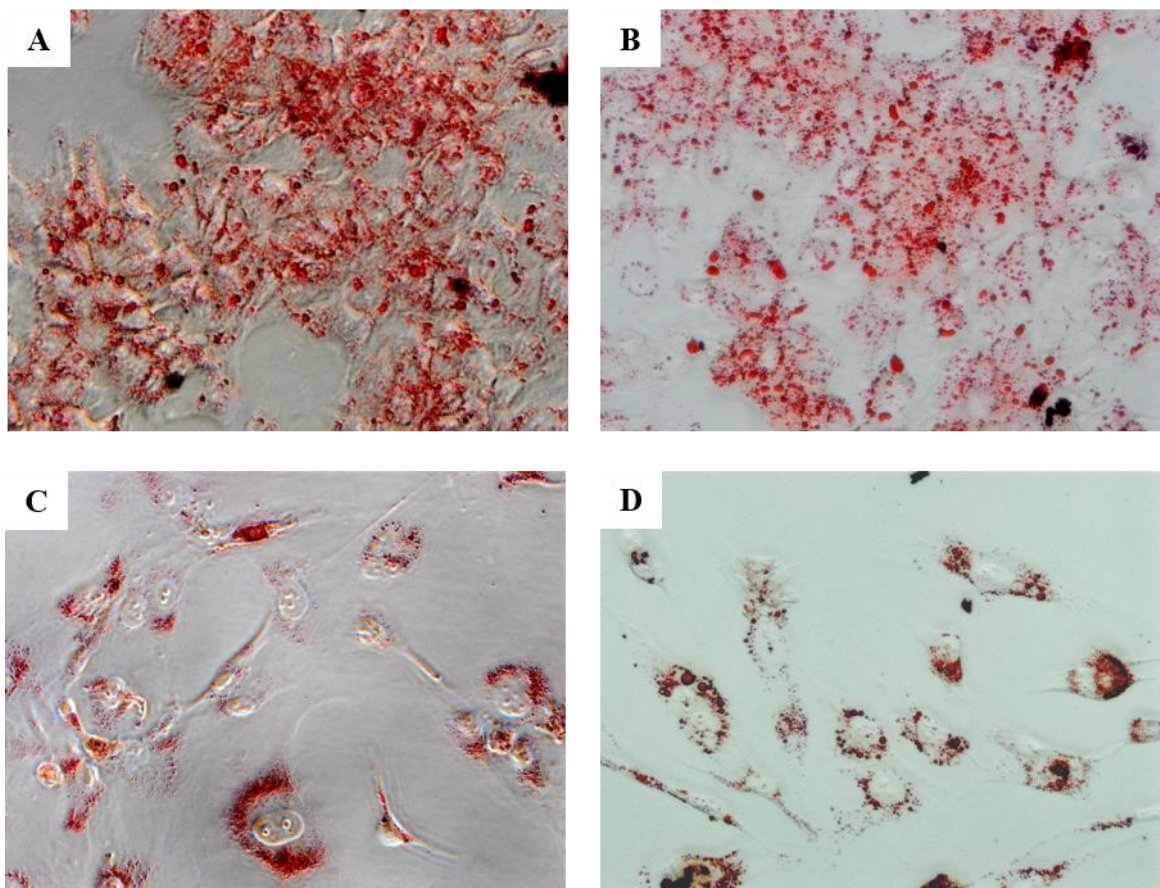
W trakcie 28-dniowego różnicowania komórki PAZ6 hodowane były w specjalnym medium, zawierającym suplementy niezbędne do dyferencjacji preadipocytów w kierunku BAT. Na podstawie barwienia IF oraz obserwacji mikroskopowej zauważono wzrost poziomu białka UCP1 w kolejnych dniach różnicowania w porównaniu z komórkami nieróżnicowanymi (dzień 0). Najwyższy poziom termogeniny 1 wykazały zróżnicowane komórki PAZ6 w ostatnim dniu różnicowania (**Ryc. 25**). Dodatkowo przeprowadzono barwienie Oil Red O obu linii komórkowych – PAZ6 oraz HepG2. Barwnik ten charakteryzuje się możliwością barwienia triacylogliceroli oraz lipidów. Na podstawie obserwacji mikroskopowej potwierdzono obecność kropli tłuszczu w obu modelach badawczych (**Ryc. 27**).



Ryc. 25 Zmiana ilości białka UCP1 w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6 – barwienie immunofluorescencyjne (po prawej). Na czerwono – UCP1, na niebiesko – jądro komórkowe (DAPI). Zdjęcia mikroskopowe cytospinów (powiększenie 10x) zebranych w dniu: 0, 4, 7, 14, 28. Po lewej - zdjęcia komórek niebarwionych.



Ryc. 26 Lokalizacja białka UCP1 (na czerwono) oraz jądra komórkowego (na niebiesko) w komórkach PAZ6 w 28 dniu różnicowania. Na górze – powiększenie 40x, na dole – powiększenie 10x. BF – ang. *bright field* (jasne pole).



Ryc. 27 Barwienie komórek Oil Red O. A, B – linia komórkowa HepG2. C – linia PAZ6 nieróżnicowana, D – linia PAZ6 w czwartym dniu różnicowania.

5.4.2 Analiza poziomu ekspresji genów markerowych BAT i WAT w trakcie różnicowania linii komórkowej PAZ6 oraz genu *UCPI* w linii HepG2

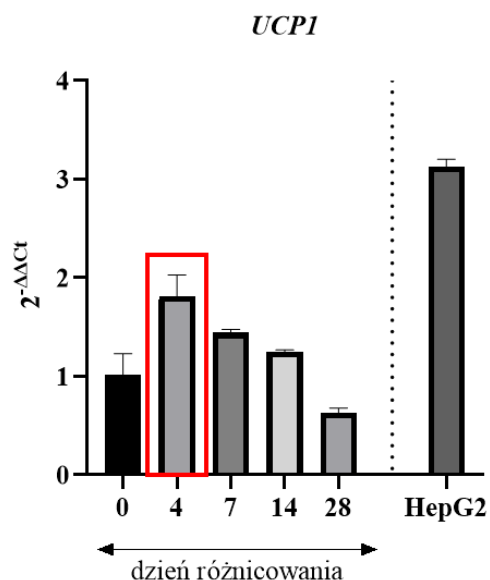
Analizę ekspresji wybranych genów markerowych tkanki tłuszczowej rozpoczęto od obliczenia stabilności genów referencyjnych (genów metabolizmu podstawowego) – *HPRT* oraz *GAPDH*. W tym celu użyto narzędzia RefFinder¹²³, które łączy w sobie wyniki programów do analizy Ct genów referencyjnych, takich jak: geNorm, NormFinder, BestKeeper. Na podstawie wykonanych obliczeń do dalszej analizy wybrano wyniki Ct dla genu referencyjnego *HPRT*.

Tabela 19 Wybrane geny markerowe

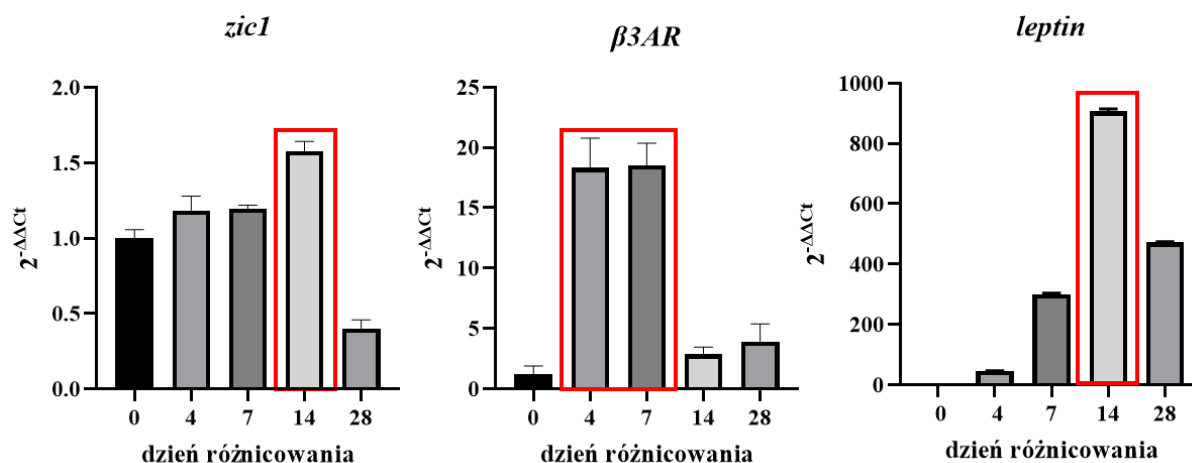
skrót	nazwa kodowanego białka	funkcja białka	marker
<i>UCPI</i>	termogenina 1	wydzielanie ciepła	BAT
<i>β3AR</i>	receptor β3 adrenergiczny	aktywacja cykazy adenylowej	WAT i BAT
<i>leptin</i>	leptyna	regulacja gospodarki energetycznej (regulacja apetytu)	WAT i BAT
<i>zic1</i>	białko z rodziny palca cynkowego 1	udział w transdiferencjacji WAT w BAT	BAT

Wyniki $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (średnia \pm odchylenie standardowe) przedstawiono na **Wykres 2**. Względna zmianę ekspresji mRNA *UCPI* oraz innych genów markerowych BAT i WAT obliczano w stosunku do dnia 0, dla którego wartość $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wyniosła 1. Wykazano, że w czwartym dniu różnicowania ekspresja mRNA genu *UCPI* jest na najwyższym poziomie, dlatego zdecydowano, iż transfekcja zostanie przeprowadzona w tym dniu różnicowania. Dodatkowo oznaczono ekspresję genów *β3AR*, *leptin* oraz *zic1* (**Wykres 3**). Wykazano, że najwyższa ekspresja genu receptora β3 adrenergicznego zachodzi między 4 a 7 dniem różnicowania. Wzrost ten był ponad 18-krotny w porównaniu do ekspresji *β3AR* w dniu 0. W przypadku genu leptyny (*leptin*), najwyższy poziom mRNA zaobserwowano w połowie 28-dniowego różnicowania, czyli w 14 dniu. Wzrost ten był ponad 900-krotny w stosunku do komórek niezróżnicowanych (dzień 0). Najwyższy poziom ekspresji *zic1* również zaobserwowano w 14 dni różnicowania - był on o połowę wyższy niż przed różnicowaniem.

Dodatkowo sprawdzono ekspresję mRNA *UCPI* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) w komórkach HepG2 w odniesieniu do wyników otrzymanych w dniu 0 linii komórkowej PAZ6. W komórkach HepG2 zaobserwowano 3-krotnie większą ekspresję mRNA genu *UCPI* w porównaniu do komórek PAZ6 nieodróżnicowanych. W ten sposób ekspresja *UCPI* w HepG2 została potwierdzona.



Wykres 2 Ekspresja mRNA *UCPI* w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6.

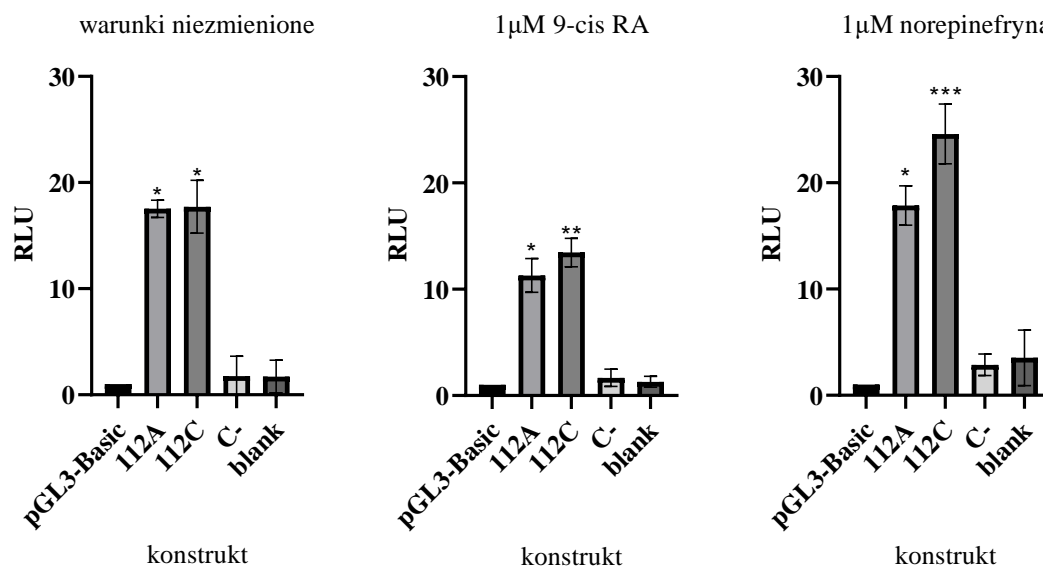


Wykres 3 Ekspresja mRNA markerów tkanki tłuszczowej w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6.

5.4.3 Analiza aktywności promotorowej genu *UCPI* mierzonej testem lucyferazowym dla linii komórkowej HepG2

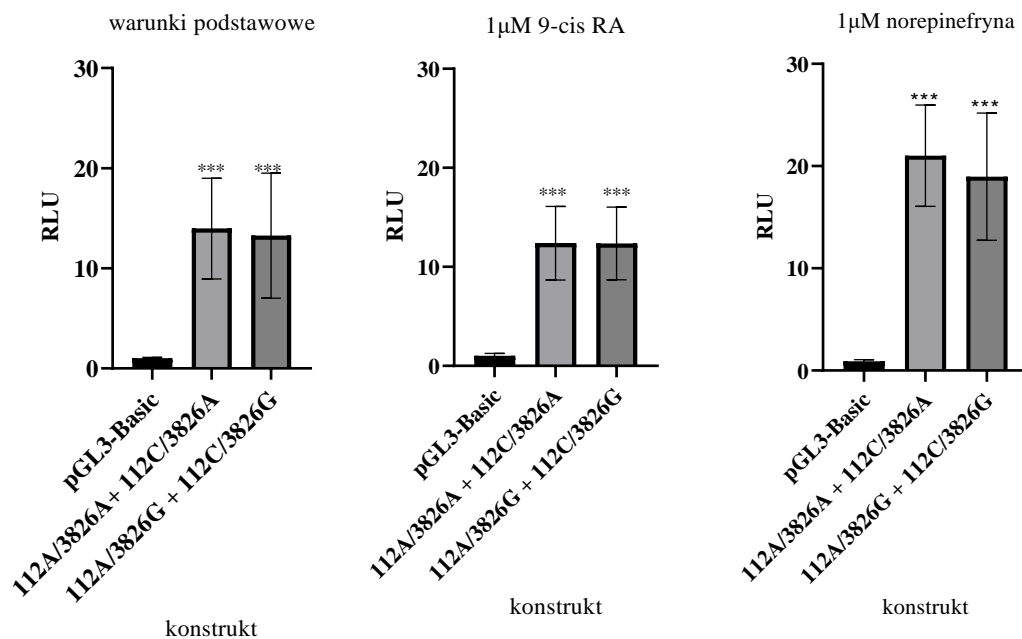
Linie komórkową HepG2 transfekowano wektorami reporterowymi pGL3-Basic zawierającymi odpowiedni wariant genetyczny (4.4.5.1) odczynnikami FuGENE HD w stosunku zalecanym przez producenta, który wynosił 4,5:1 (transfektant: plazmidowe DNA). Po 10h od transfekcji hodowlę komórkową dodatkowo stymulowano 9-cis RA oraz NE. Poziom luminescencji lucyferazy ze świetlika (*luc*) oraz *Renilla reniformis* (*Renilla*) mierzono po 48 h. Przy wykonywaniu doświadczenia uwzględniono próby kontrolne: komórki transfekowane wektorem pGL3-Basic oraz komórki nietransfekowane (C-). Dodatkowo przeprowadzono odczyty dla dołków na białej 96-dołkowej płytce z samym medium hodowlanym (blank). Odczyt luminescencji otrzymano we względnej jednostce luminescencji (ang. *Relative Luminescence Unit*, RLU). Przedstawione wyniki prezentują znormalizowany stosunek RLU_{luc} do $RLU_{Renilla}$ badanych konstruktów do $RLU_{luc}/RLU_{Renilla}$ wektora pGL3-Basic. Wyniki stanowią średnią \pm SD z eksperymentów przeprowadzonych trzykrotnie w tryplikacie. Analizę statystyczną (test Kruskalla Wallisa, post test Dunn'a) przeprowadzono porównując znormalizowane wyniki RLU wektorów badanych z wynikami wektora pGL3-Basic. W analizie nie uwzględniono wyników dla grupy prób kontrolnych C- i blank.

Intensywność luminescencji komórek transfekowanych konstruktami zawierającymi fragment promotorowy genu *UCPI* jest na wyższym poziomie w stosunku do wektora pGL3-basic, w każdym z badanych warunków hodowlanych: w warunkach podstawowych (tj. w danym medium hodowlanym), podczas stymulacji 1 μ M 9-cis RA oraz podczas stymulacji 1 μ M norepinefryną (**Wykres 4**). Dla konstruktów zawierających wariant 112A jest to wzrost odpowiednio o 17,5 (SD \pm 0,82); 11,3 (SD \pm 1,59); 17,9 (SD \pm 1,85) w stosunku do wektora pGL3-Basic. W przypadku komórek transfekowanych plazmidami posiadającymi wariant 112C wartości te są następujące: 17,7 (SD \pm 2,49); 13,5 (SD \pm 1,33) oraz 24,6 (SD \pm 2,82), odpowiednio dla warunków hodowli podstawowych, stymulujących 9-cis RA oraz stymulujących NE.



Wykres 4 Wpływ wariantów 112A i 112C na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego oraz norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi konstrukcjami.

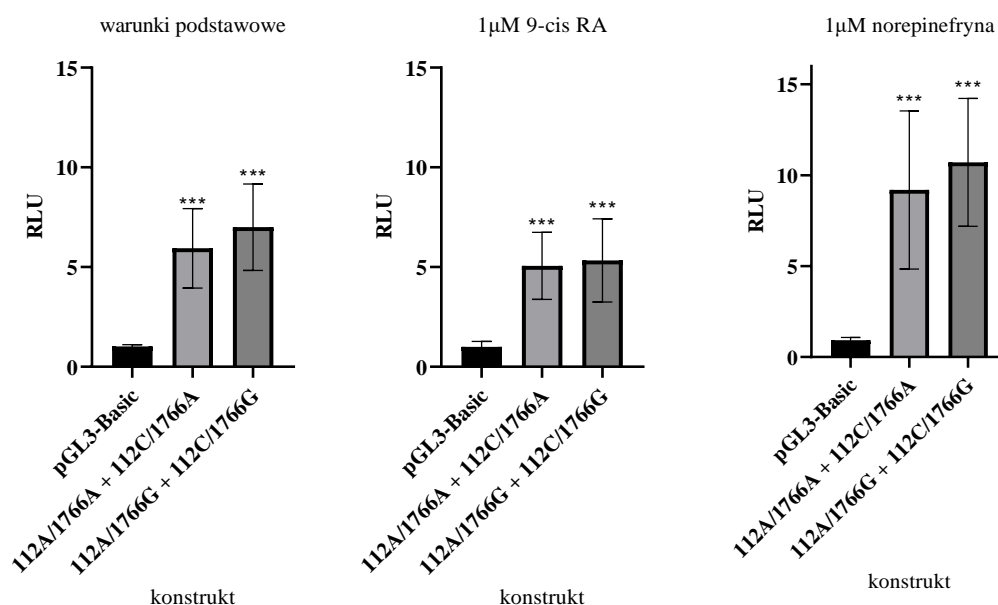
Nie zaobserwowano istotnie statystycznie różnicy między wynikami RLU otrzymanymi dla linii HepG2 z konstrukcjami zawierającymi region promotorowy *UCPI* z wariantem 112A a wariantem zmutowanym C w żadnym z warunków hodowlanych. Z tego względu do dalszej analizy wyniki RLU odpowiadające konstruktom zawierającym wariant 112A lub 112C połączono ze sobą, a następnie przeprowadzono analizę statystyczną dla pozostałych konstrukcji.



Wykres 5 Wpływ wariantów 112A/3826A lub 112C/3826A, oraz 112A/3826G lub 112C/3826G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi grupami konstruktyw.

Na **Wykres 5** przedstawiono wyniki RLU normalizowane do wektora pGL3-Basic dla komórek transfekowanych dwoma grupami konstruktyw. Pierwszą grupę stanowiły plazmidy zawierające wariant A w dystalnym regionie regulatorowym 5' (-3826) oraz allel A lub C w proksymalnym regionie promotorowym (-112): 112A/3826A lub 112C/3826A. Drugą grupę stanowią plazmidy z allelem G w miejscu -3826 w regionie regulatorowym oraz wariant A lub C w regionie promotorowym (-112): 112A/3826G lub 112C/3826G. Podobnie jak w przypadku plazmidów zawierających tylko fragment promotorowy (112A lub 112C), zauważono istotny wzrost intensywności luminescencji komórek posiadających badane konstrukty w porównaniu do wektora pGL3-Basic ($p > 0,001$) – najwyższą aktywność promotorową wykazano dla komórek hodowanych w medium stymulującym zawierającym 1 μM norepinefryny (dla grupy 112A/3826A lub 112C/3826A RLU = 21,0; SD ± 4,96, dla grupy 112A/3826G lub 112C/3826G RLU = 18,9; SD ± 6,22). Nie zaobserwowano natomiast istotnie statystycznie różnicy między wynikami RLU otrzymanymi dla HepG2 z konstrukty zawierającymi region enhancerowy *UCPI* z wariantem 3826A a wariantem zmutowanym 3826G w żadnym z warunków hodowlanych.

W analogiczny sposób analizowano RLU komórek transfekowanych konstrukcjami zawierającymi fragment regionu promotorowego genu *UCP1* z wariantem A i C oraz konstrukty z wariantem 1766A lub 1766G w regionie regulatorowym 5'. Wyniki przedstawiono na wykresie poniżej (**Wykres 6**).



Wykres 6 Wpływ wariantów 112A/1766A lub 112C/1766A oraz 112A/1766G lub 112C+1766G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi grupami konstrukcji zawierającymi warianty alleliczne -1766 A/G.

Obecność insertu w postaci fragmentu promotorowego i/lub fragmentu regulatorowego okalającego miejsce polimorficzne 1766A/G wpływa na wzrost aktywności lucyferazy w stosunku do pGL3-Basic w komórkach HepG2. Wartość RLU komórek transfekowanych obiema grupami konstrukcji jest ponad dwukrotnie niższa (5,9; SD \pm 1,99 dla grupy z 1766A oraz 7,0; SD \pm 2,17 dla grupy z 1766G) niż ta, obserwowana dla komórek transfekowanych konstrukcjami zawierającymi insert z miejscem regulatorowym 3826A/G (14,0; SD \pm 5,00 dla grupy z 3826A oraz 13,3; SD \pm 6,25 dla grupy z 3826G) oraz ponad 3-krotnie niższa od RLU konstrukcji 112A (17,5; SD \pm 0,82) oraz 112C (17,7; SD \pm 2,49) w warunkach podstawowych. W przypadku komórek HepG2 hodowanych w warunkach stymulujących (9-cis RA lub NE) transfekowanych plazmidami zawierającymi region promotorowy 112A/C oraz region regulatorowy 5' 1766A/G również zaobserwowano niższą aktywność lucyferazową w stosunku do plazmidów zawierających 112A/C lub 3826A/G lub

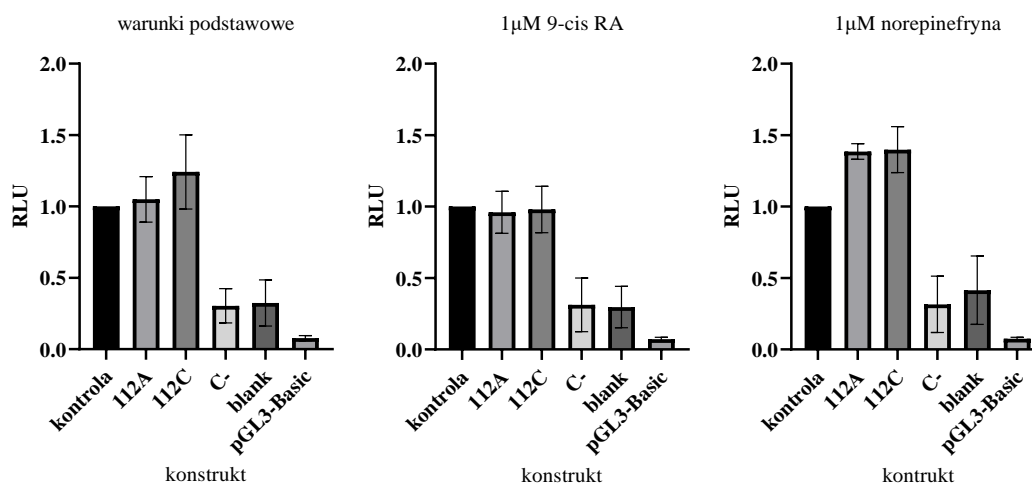
plazmidów zawierających tylko insert regionu promotorowego 112A/C. Nie zaobserwowano natomiast istotnie statystycznie różnicy między wynikami RLU otrzymanymi dla HepG2 z konstrukcjami zawierającymi region enhancerowy *UCPI* z wariantem 1766A a wariantem zmutowanym 1766G w żadnym z warunków hodowlanych.

5.4.4 Analiza aktywności promotorowej genu *UCPI* mierzonej testem lucyferazowym dla linii komórkowej PAZ6

Przed przeprowadzeniem właściwych testów lucyferazowych, wykonano optymalizację procesu transfekcji niezróżnicowanej linii komórkowej PAZ6, w celu określenia optymalnej proporcji FuGENE HD do ilości plazmidowego DNA. Komórki transfekowano mieszaniną o różnym stosunku transfektanta do wektora (testowane stosunki - 3:1, 4:1, 5:1, 6:1), zawierającego gen kodujący GFP. Obserwacja mikroskopowa pozwoliła na określenie optymalnych warunków, dla których wydajność transfekcji była największa. Dodatkowo sprawdzano, w którym dniu po transfekcji (24h, 48h, 72h) poziom fluorescencji GFP jest najwyższy. Dla komórek PAZ6 stosunek ten wynosił 4:1, natomiast najwyższy wynik fluorescencji zaobserwowano po 48h (wyników dotyczących optymalizacji nie przedstawiono w pracy).

Doświadczenie z wykorzystaniem różnicujących się komórek PAZ6 zostało zaprojektowane i przeprowadzone w analogiczny sposób jak testy na komórkach HepG2. Doświadczenie uwzględniało próby kontrolne: komórki transfekowane wektorem pGL3-Basic, komórki nietransfekowane (C-), komórki traktowane tylko transfektantem (FuGENE HD). W testach lucyferazowych przeprowadzanych na różnicujących się komórkach PAZ6 uwzględniono dodatkową kontrolę - komórki transfekowane wektorem kontrolnym (kontrola) zawierającym нефункциональную sekwencję w miejscu insercji sekwencji regionu regulatorowego 5', poniżej genu *luc*. Przedstawione wyniki prezentują znormalizowany stosunek RLU_{luc} do $RLU_{Renilla}$ badanych konstrukcji do $RLU_{luc}/RLU_{Renilla}$ wektora kontrolnego (kontrola). Wyniki stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów w tryplikacie. Wyniki dla prób stymulowanych norepinefryną (średnia \pm SD) otrzymano w dwóch niezależnych doświadczeniach w tryplikacie. Analizę statystyczną (test Kruskala Wallisa, post test Dunn'a) przeprowadzono porównując znormalizowane wyniki

RLU_{luc}/RLU_{Renilla} wektorów badanych z wynikami wektora kontrolnego. W analizie nie uwzględniono wyników dla grupy C-, blank i pGL3-Basic.

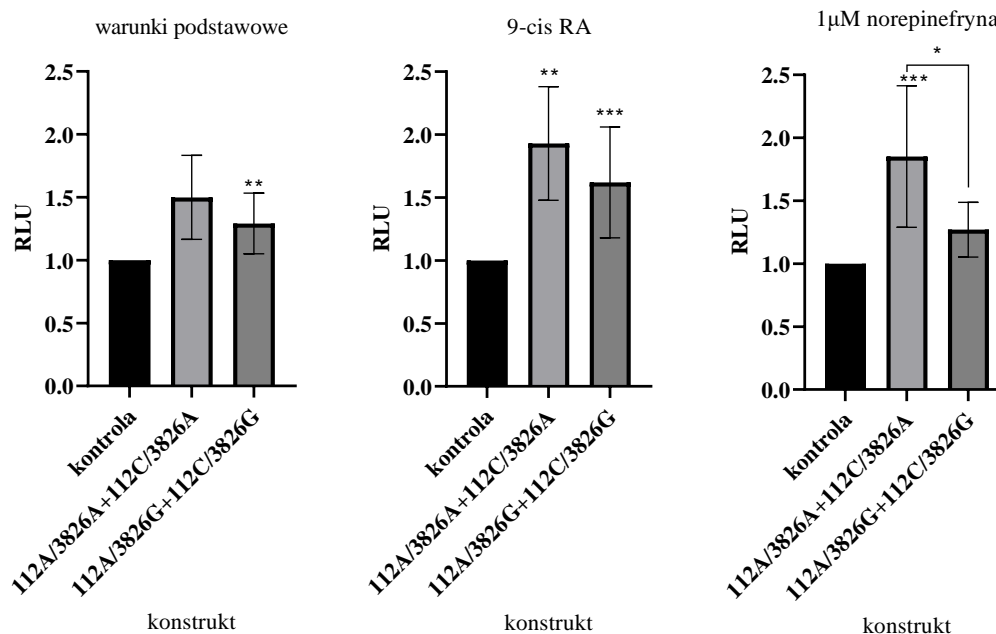


Wykres 7 Wpływ wariantów 112A i 112C na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego oraz norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM. C-, blank i pGL3-Basic nie porównywano do próbki kontrolna i nie analizowano pod kątem statystycznym.

We wszystkich badanych warunkach hodowlanych nie zaobserwowano różnic w intensywności luminescencji, wynikających z obecności fragmentu promotorowego 112A lub 112C w wektorze pGL3-Basic w stosunku do wektora kontrolnego z niefunkcjonalną sekwencją w rejonie wzmacniającym (enhancerowym) - **Wykres 7**. W przypadku hodowli PAZ6 w medium różnicującym, bez dodatkowej stymulacji oraz ze stymulacją 9-cis RA, znormalizowane RLU dla komórek transfekowanych konstrukcjami posiadającymi insert 112A lub 112C są na poziomie RLU komórek transfekowanych wektorem kontrolnym (warunki podstawowe: 112A RLU = 1,1; SD ± 0,16, 112C RLU = 1,2. SD ± 0,26, stymulacja 9-cis RA: 112A RLU = 1,0; SD ± 0,15, 112C RLU = 1,0; SD ± 0,16). Aktywność lucyferazy w komórkach PAZ6 transfekowanych plazmidami z wklonowanym fragmentem promotorowym 112A lub 112C w warunkach stymulujących norepinefryną jest zauważalnie wyższa od aktywności promotorowej wektora kontrolnego (112A RLU = 1,4; SD ± 0,05, 112C RLU = 1,4; SD ± 0,16), jednak różnica ta nie jest istotna statystycznie.

Podobnie jak w przypadku komórek HepG2, poziom aktywności lucyferazy nie różni się w komórkach PAZ6 transfekowanych konstrukcjami z insercją 112A, a z insercją 112C w żadnym z badanych warunków hodowlanych w stosunku do RLU

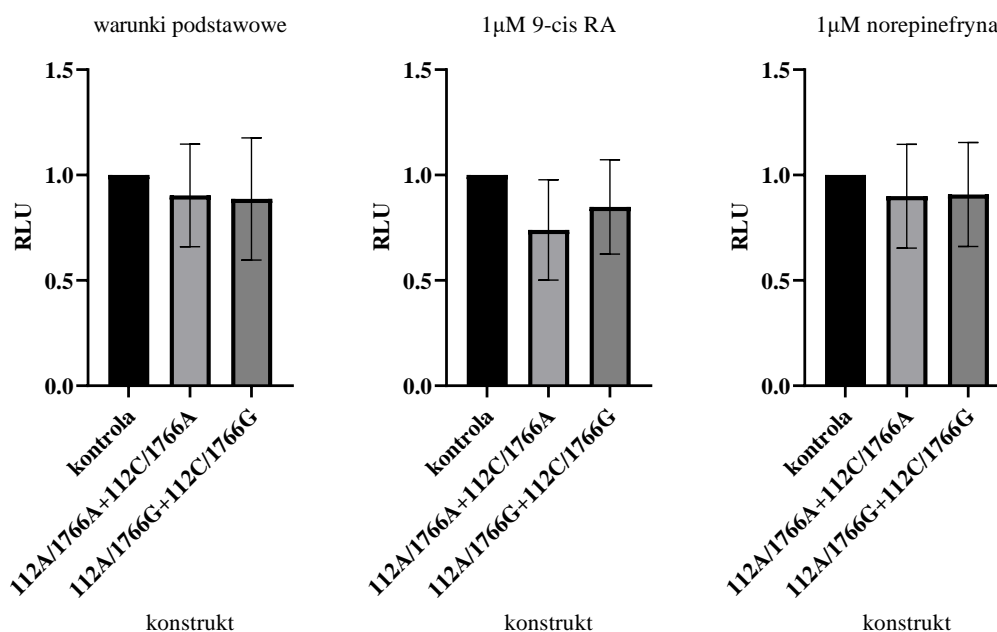
otrzymanego dla komórek transfekowanych wektorem kontrolnym. Z tego względu do dalszej analizy wyniki RLU konstruktów zawierających wariant 112A lub 112C połączone ze sobą, a następnie przeprowadzono analizę statystyczną.



Wykres 8 Wpływ wariantów 112A/3826A lub 112C/3826A, 112A/3826G lub 112C/3826G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z wektorem kontrolnym przy $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) – test Kruskala Wallisa, post test Dunn'a.

W analizie porównano dwie grupy: komórki PAZ6 transfekowane plazmidami 112A/3826A lub 112C/3826A z PAZ6 transfekowanymi 112A/3826G lub 112C/3826G w trzech warunkach hodowlanych. Wyniki przedstawiono na **Wykres 8**. W każdym przypadku zaobserwowano wzrost aktywności promotorowej w badanych grupach w stosunku do kontroli, tzn. wprowadzane fragmenty niezależnie od ich specyficzności allelicznych zwiększały aktywność promotorową w stosunku do wektora kontrolnego. Zauważono również, iż wyniki RLU dla grupy posiadającej zmutowany wariant G we fragmencie regulatorowym w wektorze pGL3-Basic są niższe od grupy z wariantem dzikim – A (warunki podstawowe: 112A/3826G lub 112C/3826A RLU = 1,5 (SD ± 0,33) vs. 112A/3826G lub 112C/3826G RLU = 1,3 (SD ± 0,24), stymulacja 9-cis RA: 1,9 (SD ± 0,45) vs. 1,6 (SD ± 0,44), odpowiednio. Istotnie statystycznie różnicę ($p = 0,03$) w aktywności *luc* zaobserwowano w warunkach stymulujących NE. W grupie

112A/3826A lub 112C/3826A RLU wynosi 1,85 ($SD \pm 0,51$) w stosunku do grupy 112A/3826G lub 112C/3826G, gdzie $RLU = 1,2$ ($SD \pm 0,21$).



Wykres 9 Wpływ wariantów 112A/1766A+112C/1766A, 112A/1766G+112C/1766A na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μM.

Wyniki testów lucyferazowych z wykorzystaniem grup plazmidów z insertem fragmentu promotorowego 112A/C oraz insertem fragmentu regulatorowego 5', zawierającego miejsce polimorficzne 1766A/G nie wskazują, aby badane konstrukty miały wpływ na aktywność *luc* w komórkach PAZ6 w stosunku do kontroli, w żadnym z badanych warunków. Dla warunków podstawowych RLU 112A/1766A lub 112C/1766A wynosi 0,9 ($SD \pm 0,24$) a dla 112A/1766G lub 112C/1766G RLU = 0,9 ($SD \pm 0,29$), dla warunków stymulujących 9-cis RA: 112A/1766A lub 112C/1766A RLU = 0,8 ($SD \pm 0,24$), 112A/1766G lub 112C/1766G RLU = 0,85 ($SD \pm 0,22$), dla warunków stymulujących NE: 112A/1766A lub 112C/1766A RLU = 0,9 ($SD \pm 0,25$), 112A/1766G lub 112C/1766G RLU = 0,9 ($SD \pm 0,25$). W każdym z badanych warunków zaobserwowano obniżenie aktywności *luc* w komórkach z plazmidem posiadającym insercję fragmentu regulatorowego 1766 w stosunku do plazmidu kontrolnego, jednak różnica ta nie jest ufna statystycznie (**Wykres 9**).

Podsumowując, wykonano barwienie IF UCP1 w trakcie 28-dniowego różnicowania linii komórkowej PAZ6, w którym wykazano, iż największa ilość tego

białka jest w ostatnim dniu różnicowania. Poziom ekspresji mRNA genów markerowych dla BAT i WAT zmienia się w trakcie dyferencjacji. Dla głównego markera BAT, czyli termogeniny 1, wykazano, iż najwyższy poziom ekspresji występuje w 4 dniu. Dodatkowo potwierdzono ekspresję *UCPI* w komórkach HepG2. Dokonano oceny funkcjonalnego znaczenia wybranych SNP genu *UCPI*: A-112C, A-3826G oraz A-1766G, przy użyciu testu lucyferazowego z wykorzystaniem podwójnych genów reporterowych w dwóch modelach badawczych: linii komórkowej HepG2 oraz różnicującej się linii PAZ6. W przypadku linii HepG2 nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu konstruktów zawierających różne kombinacje alleliczne w pozycjach -112, -1776, -3826 na aktywność lucyferazy. Stwierdzono, że obecność wprowadzonych insertów (w postaci fragmentu regionu promotorowego czy fragmentu regulatorowego 5') do wektora pGL3-Basic powoduje wzrost luminescencji w komórkach HepG2. Podobne wyniki otrzymano dla linii komórkowej PAZ6.

Komórki transfekowane plazmidami z insercją fragmentu promotorowego (z SNP A-112AC) oraz fragmentu enhancerowego, okalającego miejsce polimorficzne 3826 w warunkach stymulujących norepinefryną w linii komórkowej PAZ6, pozwoliły wykazać funkcjonalne różnice dla wariantów A i G w miejscu polimorficznym zlokalizowanym w pozycji 3826. Stymulacja agonistą receptora β 3AR spowodowała istotną różnicę w aktywności *luc* dla badanych grup konstruktów: 112A/3826A lub 112C/3826A oraz 112A/3826G lub 112C/3826G, $p = 0,03$, co wskazuje na obniżoną zdolność do wzmacniania aktywności promotorowej fragmentu dystalnego okalającego pozycję -3826G w warunkach stymulacji norepinefryną.

VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Zespół metaboliczny, a wraz z nim wszystkie choroby wchodzące w skład tego schorzenia m.in. otyłość, zaburzona gospodarka cukrowa, lipidowa (podwyższony poziom trójglicerydów, zaburzona gospodarka HDL i LDL), występowanie T2DM czy podwyższone ciśnienie tętnicze, to poważny problem dotykający milionów osób na całym świecie. Ryzyko wystąpienia tego zaburzenia metabolicznego wzrasta wraz z wiekiem i jest szczególnie wysokie u osób prowadzących niezdrowy styl życia. Prognozy epidemiologiczne dotyczące rozpowszechnienia MetS nie są optymistyczne – częstość występowania tego schorzenia będzie ciągle wzrastać, jeśli świadomość ludzi na temat niebezpieczeństw wynikających z MetS nie wzrośnie. W raporcie Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (IDF) z 2021 ¹²⁰ przedstawiono prognozy częstości występowania T2DM, która jest wynikiem zaburzeń metabolicznych w tym MetS czy otyłości, do 2045 roku. Dostępne dane wyraźnie wskazują, iż liczba osób z cukrzycą będzie cały czas rosła. Widoczne to będzie głównie w państwach o średnich i niskich dochodach, w których według szacunków liczba ludności będzie się zwiększać. Dodatkowo przewiduje się, iż ryzyko zachorowania na cukrzycę będzie częściej obserwowane u mężczyzn oraz u osób mieszkających w miastach.

W szczególności w ostatnich dwóch latach, w dobie pandemii SARS-COV-2, przykładą się ogromną wagę do badań nad zaburzeniami metabolicznymi oraz ich wpływem na zachorowanie na COVID-19. Wszystkie dostępne dane wskazują, iż osoby ze schorzeniami metabolicznymi czy T2DM są predysponowane do większej podatności na ciężki przebieg zakażenia koronawirusem z Wuhan ^{124,125}. Dodatkowo zwalczanie wirusa przez organizm nie pozostaje bez wpływu na układ sercowo-naczyniowy. Dotyczy to zarówno stosowanego w trakcie infekcji leczenia, jak i bezpośredniego czy pośredniego wpływu samego wirusa ¹²⁶. Szacuje się, iż prawie 50% osób hospitalizowanych ze względu na ciężki przebieg COVID-19 to osoby otyłe lub/i cierpiące na nadciśnienie tętnicze, prawie 35% to osoby chore na cukrzycę ¹²⁷. Jako wspólny mianownik dla chorób współistniejących w ciężkim przebiegu SARS-COV-2 wymienia się zespół metaboliczny. To wszechobecne schorzenie, które z roku na rok przybiera na sile, stało się epidemią XXI wieku. W kontekście przedstawionych danych oraz z uwagi na fakt, iż MetS stanowi bardzo ważny czynnik ryzyka zakażenia i ciężkiego przebiegu COVID-19 badacze starają się opracować nowe, nieinwazyjne metody leczenia zaburzeń metabolicznych, jako jednostkowych chorób oraz MetS, jako

grupy schorzeń o podłożu metabolicznym i jak najlepiej poznać mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie wymienionych zaburzeń.

W dobie otyłości uwaga badaczy na całym świecie skupiona jest na jak najlepszym poznaniu tkanki tłuszczowej oraz jej różnych odmian, w tym brązowej tkanki tłuszczowej. O tym zainteresowaniu może świadczyć fakt, iż ilość prac dotycząca tkanki tłuszczowej w kontekście występowania otyłości oraz cukrzycy typu 2, podwoiła się w przeciągu ostatnich 10 lat w porównaniu z pierwszą dekadą XXI wieku (dane pochodzą z bazy <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). Oprócz oczywistej funkcji tkanki tłuszczowej (a dokładniej WAT), jaką jest akumulacja energii, skoncentrowano się na poznaniu roli brązowej tkanki tłuszczowej (BAT) w patogenezie chorób o podłożu metabolicznym. Białko termogenina 1 (UCP1) jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy w aspekcie zaburzonej pracy BAT, a wynika to z faktu, iż jest ona bezpośrednio związana i odpowiedzialna za przekształcenie TG w energię w postaci ciepła.

UCP1 należy do rodziny białek rozprzegających (UCPs, ang. *uncoupling proteins*), będących transporterami mitochondrialnymi, zlokalizowanymi w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ssaki ekspresjonują pięć białek UCPs (UCP1-UCP5). U ludzi, trzy z nich (UCP1 - UCP3) wykazują wysoki stopień homologii w stosunku do UCP1 (dla UCP2 jest to 59%, dla UCP3 57%)¹²⁸, jednak różnią się one pod względem charakteru oraz wielkości przenoszonych przez nie substratów¹²⁹. Wszystkie z nich uczestniczą w transporcie protonów w poprzek błony do macierzy mitochondrialnej, jednak w przeciwieństwie do UCP1, UCP2 oraz UCP3 nie mają funkcji termogenicznej. W niniejszej pracy skupiono się na UCP1 i UCP2, gdyż odgrywają one rolę w patogenezie chorób metabolicznych takich jak otyłość czy cukrzyca typu 2¹³⁰⁻¹³². Najlepiej poznanym białkiem jest termogenina 1, której główną funkcją jest produkcja ciepła w brązowej tkance tłuszczowej (UCP1 jest markerem BAT), w procesie zwanym termogenezą bezdrzeniową. Inną funkcją UCP1, wynikającą z obniżenia potencjału błonowego, jest zmniejszenie produkcji ROS, a w konsekwencji ochrona przed stresem oksydacyjnym^{125,126}. Obecnie istnieją dowody, że u ludzi UCP1 ulega ekspresji na poziomie mRNA w: tkankach endokrynnych (nadnerczach), gruczołach ślinowych, jelicie cienkim, pęcherzyku żółciowym, jądrach, komórkach gruczołu piersiowego, łożysku, komórkach mięśni gładkich w mięśniu sercowym (dane na podstawie <https://www.proteinatlas.org>). UCP2 również zaangażowane jest

w kontrolę produkcji ROS, dodatkowo reguluje sekrecję insuliny oraz reguluje oksydację kwasów tłuszczowych w mitochondrium¹³¹. UCP2 jest ekspresjonowane na poziomie mRNA i/lub białka w wielu tkankach m.in.: w komórkach β trzustki, komórkach układu odpornościowego, mięśniach szkieletowych, śledzionie, wątrobie, płucach, mózgu czy skórze (dane na podstawie <https://www.proteinatlas.org>).

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC), składające się głównie z limfocytów i monocytów, stanowią łatwo dostępną frakcję komórek krwi (mniej niż 0,1% całości krwinek)¹³³. Badania z wykorzystaniem PBMC wykazały, iż w komórkach tych dochodzi do ekspresji nawet 80% genów zakodowanych w ludzkim genomie¹³⁴. Dodatkowo ekspresja w krążących w układzie krwionośnym PBMC modulowana jest przez różne bodźce metaboliczne i immunologiczne, takie jak glukoza, wolne kwasy tłuszczowe, aminokwasy i witaminy, odzwierciedlając tym samym adaptacje metaboliczne i fizjologiczne organizmu^{133,135}. PBMC stanowią ciekawy model badawczy w badaniach określających fenotyp metaboliczny, ponieważ mogą odzwierciedlać wpływ określonej diety, warunków żywienia czy czynników środowiskowych (np. ekspozycję na zimno) na ekspresję genów związanych z metabolizmem w określonych tkankach (WAT czy BAT)¹³⁶. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej są również interesujące w celach diagnostycznych - mogą stanowić źródło wczesnych biomarkerów otyłości¹³⁷ czy cukrzycy typu 2¹³⁸.

W świetle powyższych informacji, zasadnym było sprawdzenie czy w PBMC poziom ekspresji mRNA *UCPI* oraz *UCP2*, które zaangażowane są w regulację homeostazy energetycznej, różni się w grupie osób zdrowych oraz osób z zaburzeniami metabolicznymi (otyłymi oraz z T2DM). W niniejszej pracy zbadano ekspresję mRNA *UCPI* w ludzkich PBMC pobranych i wyizolowanych od 60 osób, wykorzystując metodę Real Time PCR. Spośród wszystkich analizowanych próbek, wykryto ekspresję *UCPI* tylko w trzech próbkach – bardzo niski poziom ekspresji stwierdzono w PBMC pobranych od osób z otyłością. Ta zaskakująca obserwacja powinna zostać potwierdzona na większej grupie osób otyłych.

Brak ekspresji mRNA *UCPI* w PBMC został potwierdzony w badaniach na modelach zwierzęcych^{136,139}. Istnieje jednak ograniczona liczba badań dotyczących ekspresji *UCPI* w ludzkich PBMC. W pracy Pinhel i wsp.¹⁴⁰ badano ekspresję genów odpowiadających za adipogenezę oraz za metabolizm energetyczny, w tym *UCPI* oraz

UCP2, w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz adipocytów WAT pobranych od grupy osób otyłych. Wykazano, iż *UCPI* jest ekspresjonowane na bardzo niskim poziomie w PBMC w stosunku do komórek WAT. Zaobserwowano jednak podwyższoną ekspresję mRNA *UCP2* w PBMC w porównaniu do adipocytów białej tkanki tłuszczowej, dzięki czemu udowodniono, iż PBMC mogą stanowić łatwo dostępny materiał biologiczny, odzwierciedlający zmiany ekspresji wybranych markerów metabolizmu energetycznego, wynikające z wpływu czynników zewnętrznych np. diety. W eksperymentach francuskich naukowców¹³⁵ badano ekspresję mRNA, wyizolowanego z PBMC, dla 182 genów (w tym *UCPI*), będących potencjalnymi markerami genetycznymi istotnymi w patogenezie chorób układu krążenia. Materiał pobrano od osób zdrowych, od osób otyłych oraz z nadciśnieniem tętniczym. Niską ekspresję *UCPI* w PBMC zaobserwowano tylko w 20% wszystkich analizowanych próbek, co stanowi kolejny dowód na to, iż *UCPI* nie jest ekspresjonowane w PBMC w taki sposób, aby można było dokonać rzetelnej analizy otrzymanych wyników.

Białko *UCP2*, będące kluczowym białkiem regulującym produkcję ROS w mitochondriach, poprzez obniżenie potencjału błonowego¹⁴¹, ekspresjonowane jest w wielu tkankach. Zaburzona gospodarka reaktywnych form tlenu przyczynia się do powstawania stresu oksydacyjnego, który z kolei prowadzi do stanu zapalnego danej tkanki. Mechanizm ten został szczegółowo opisany w Rozdziale 1.1.3. W niniejszej pracy wykazano ekspresję mRNA *UCP2* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, potwierdzając tym samym doniesienia literaturowe^{134–136}. Istnieje niewielka liczba doniesień dotyczących ekspresji *UCP2* w PBMC w grupie osób z zaburzeniami metabolicznymi. Obniżoną ekspresję *UCP2* wykazano w badaniach Telle-Hansen i wsp.¹⁴² w grupie osób otyłych, mających zaburzone parametry biochemiczne (np. podwyższony poziom cholesterolu całkowitego, LDL, TG, obniżony poziom HDL) w stosunku do osób zdrowych lub osób otyłych niewykazujących zaburzeń metabolicznych. Co ciekawe, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w ekspresji mRNA *UCP2* w grupie kontrolnej i w grupie osób otyłych, bez zaburzeń metabolicznych. W niniejszej pracy wykazano obniżoną ekspresję mRNA *UCP2* w grupie pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi w porównaniu do grupy kontrolnej. Analizując trzy grupy oddzielnie (otyli vs T2DM vs kontrola) różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Na podstawie otrzymanych wyników oraz analizy

literaturowej można wysnuć wniosek, iż obniżona aktywność UCP2 u osób z zaburzeniami metabolicznymi, wpływa na zaburzoną regulację ROS i tym samym aktywuje mechanizm powstawania przewlekłego stanu zapalnego, charakterystycznego w patogenezie otyłości i T2DM prowadzących do zespołu metabolicznego.

Bardzo częstym modelem do badania fizjologii adipocytów są linie komórkowe. W niniejszej pracy wykorzystano ludzką linię komórkową PAZ6, której komórki w odpowiednich warunkach różnicują się z preadipocytów do dojrzałych komórek BAT. Pozwoliło to na poszerzenie wiedzy na temat funkcji markera BAT - UCP1. Linia PAZ6 została scharakteryzowana przez kilka grup badawczych na całym świecie^{115,143,144}. Wyniki otrzymane przy wykorzystaniu linii PAZ6 mogą stanowić odpowiedź na istotne pytania dotyczące procesów zachodzących w BAT i tym samym dostarczyć informacji o potencjale terapeutycznym tej tkanki. Pierwsze doniesienie dotyczące linii komórkowej PAZ6 pochodzi już 1997 roku¹¹⁵. Zilberfarb i wsp. otrzymali unieśmiertelnioną linię komórkową PAZ6, wyprowadzoną z BAT z frakcji naczyńniowej podścieliska ludzkiego noworodka i unieśmiertelnioną przez transfekcję genami kodującymi duży i mały antygen SV40 pod kontrolą promotora wimentyny. Molekularnymi markerami dla tej nieodróżnicowanej linii były receptory z rodziny β adrenergicznych (β 1-, β 2-AR), lipaza hormonozależna, adipsyna, która odpowiedzialna jest za utrzymanie homeostazy tkanki tłuszczowej poprzez zwiększenie wydzielania insuliny w odpowiedzi na glukozę¹⁴⁵ oraz transportery glukozy Glut1 i Glut4. Różnicowanie PAZ6 indukowane było poprzez dodanie do medium hodowlanego insuliny, deksametasonu i pioglitazonu. Zróżnicowane adipocyty BAT, oprócz zwiększonej ekspresji ww. białek, dodatkowo produkowały β 3AR oraz leptynę, czego nie obserwowano u nieodróżnicowanych komórek. Ekspresja UCP1 była na stałym poziomie zarówno w nieodróżnicowanych jak i zróżnicowanych komórkach. Inkubacja zróżnicowanych komórek z NE powodowała wzrost ekspresji UCP1. W innej pracy tego samego autora¹⁴⁶ badano wpływ czynnika różnicującego PAZ6 – deksametasonu, na ekspresję różnych markerów BAT, w tym: HSL, leptyny czynników transkrypcyjnych: PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ . Zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji ww. białek w komórkach hodowanych z dodatkiem deksametasonu, co dowodzi ich kluczowej roli w procesie różnicowania. W moich badaniach dotyczących znaczenia funkcjonalnego regionu enhancerowego *UCP1* z wykorzystaniem linii komórkowej PAZ6 wykazałam, iż kwas retinowy (zarówno forma *trans* jak i *cis*)

odgrywa istotną rolę w różnicowaniu adipocytów. Stymulacja komórek RA wywołała silniejszą odpowiedź transkrypcyjną *UCPI* przez PGC-1 α , mierzoną testem lucyferazowym w porównaniu do komórek niestymulowanych ¹⁴⁷.

Na podstawie danych literaturowych wiadomo również, że dystalny region 5' genu *UCPI* posiada kilka sekwencji rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne należące do nadrodziny receptorów jądrowych. Do tych sekwencji należą: PPRE, RARE, CREB oraz TRE ¹⁴³. Dodatkowo, w pracy Rose i wsp. ¹¹⁰ wskazano, iż sekwencja RARE, znajdująca się między -3842 a -3826 powyżej miejsca startu transkrypcji *UCPI* zawiera miejsce polimorficzne A-3826G.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny, czy polimorfizmy genu *UCPI* znajdujące się w części regulatorowej 5' mają istotny wpływ na funkcję tego białka wykorzystując linię PAZ6, jako model badawczy do testu lucyferazowego. Badania rozpoczęto od charakterystyki linii komórkowej PAZ6 i jej różnicowania z preadipocytów do dojrzałych komórek BAT według protokołu dyferencjacji opisanego w pracy Zilberfarb z 1997 ¹¹⁵. W trakcie 28-dniowego różnicowania zaobserwowano, iż poziom białka *UCPI* wzrastał w komórkach wraz z ich kolejnymi dniami różnicowania. Największą ilość tego białka wykazano w ostatnim dniu różnicowania. Co ciekawe, analiza ekspresji mRNA *UCPI* nie pokrywa się z wynikami otrzymanymi dla ekspresji tego białka. W trakcie różnicowania, najwyższy poziom ekspresji mRNA *UCPI* zaobserwowano już w 4 dniu różnicowania, w kolejnych dniach następował spadek ekspresji. Przyczyną braku korelacji między poziomami ekspresji na poziomie mRNA oraz białka mogą być różne mechanizmy regulacyjne obu cząsteczek. Na powstawanie mRNA mogą wpływać czynniki wewnętrzne samej sekwencji kodującej oraz zewnętrzne, takie jak mikroRNA. W przypadku powstawania białka należy uwzględnić wydajność translacji oraz mechanizmy potranslacyjne ¹⁴⁸. Drugim modelem badawczym w tej pracy była linia komórkowa HepG2, w której również została potwierdzona ekspresja mRNA *UCPI*. Oprócz analizy ekspresji *UCPI* w PAZ6, zbadano poziom ekspresji takich markerów BAT i WAT jak: gen białka palca cynkowego *zic1*, *β 3AR* oraz leptyny. W przypadku tych białek, najwyższą ekspresję mRNA zaobserwowano w 14 dniu dla *zic1* oraz leptyny i między 4 a 7 dniem dla *β 3AR*. Przeprowadzono barwienie obu linii odczynnikami Oil Red O, który jest barwnikiem azowym barwiącym krople lipidowe oraz TG. Potwierdzono obecność cząsteczek lipidowych, które stanowią niezbędny substrat dla białka ¹⁴⁹.

Otrzymane wyniki są zgodne z danymi zawartymi w dostępnych źródłach literaturowych ^{115,143,146}. W badaniach Guennon i współpracowników ¹⁴⁴ przeprowadzono 14-dniowe różnicowanie linii PAZ6, w trakcie którego również sprawdzano ekspresję UCP1 na poziomie mRNA oraz białka. Barwienie fluorescencyjne UCP1 w niezróżnicowanych oraz zróżnicowanych komórkach PAZ6 w dniu 7 oraz 14 potwierdziło wzrost ekspresji białka w kolejnych dniach różnicowania. Dodatkowo, określono poziom ekspresji mRNA leptyny, i β 3AR w 14 dniu różnicowania, w stosunku do niezróżnicowanych preadipocytów. W przypadku wszystkich markerów BAT czy WAT zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA w ostatnim dniu dyferencjacji. Ważnym markerem potwierdzającym zmianę preadipocytów w dojrzałe komórki BAT jest *zic1*. W badaniach *in vivo* ¹⁴³ oraz *in vitro* ^{149,150} zaobserwowano ekspresję mRNA *zic1* w dojrzałych adipocytach brązowej tkanki tłuszczowej, czego nie można było zaobserwować w przypadku komórek WAT oraz beżowych komórek tkanki tłuszczowej. W niniejszej pracy wykazano wzrost ekspresji tego markera, potwierdzając tym samym, że zróżnicowane komórki PAZ6 posiadają klasyczne cechy BAT.

Badania z zakresu biologii molekularnej wskazują, że zmiany w sekwencjach kluczowych genów, a w przypadku BAT jest to *UCPI*, mogą zwiększać podatność na rozwój wielu chorób oraz prowadzić do ujawnienia zmienionego fenotypu. W jednym z etapów badań, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, podjęto próbę oceny związku wybranych zmian w sekwencji genu *UCPI*, zwanych polimorfizmami a ryzykiem zachorowania na zespół metaboliczny w populacji polskiej. Dane literaturowe wskazują, że polimorfizmy: A-3826G, A-1766G, A-112C, Ala64Tgr oraz Met229Leu mogą odgrywać rolę w kształtowaniu się predyspozycji do zaburzeń metabolicznych (np. podwyższone BMI, zaburzona gospodarka węglowodanowo-lipidowa) oraz w samym zachorowaniu na MetS ¹⁵¹. Na przestrzeni ostatnich 25 lat powstała duża liczba prac (*case - control studies*) dotyczących związku A-3826G (rs1800592) z ryzykiem wystąpienia zaburzeń metabolicznych, głównie otyłości i T2DM, mogących prowadzić do MetS. W wielu badaniach zaobserwowano istotną statystycznie korelację między wariantem G w A-3826G a zaburzonymi parametrami, takimi jak: wskaźnik BMI ¹⁵²⁻¹⁵⁴, zawartość tkanki tłuszczowej ^{111,154}, profil lipidowy ¹⁵⁵ czy podwyższone ciśnienie tętnicze ^{153,154}. Pomimo wielu doniesień wykazujących związek tego SNP z zaburzeniami prowadzącymi do zespołu metabolicznego, istnieją

również dane niepotwierdzające tej tezy. Badania na populacji polskiej nie wykazały związku A-3926G z podwyższonym BMI ¹⁵⁶, podobnie jak wcześniej przeprowadzone badania na populacji duńskiej ¹⁵⁷, szwedzkiej ¹⁵⁸, fińskiej ¹⁵⁹ czy niemieckiej ¹⁶⁰. W niniejszej pracy przeprowadzono genotypowanie polimorfizmu A-3826G w grupie 281 osób z MetS oraz 316 osób zdrowych populacji polskiej. Co ciekawe, wykazano, że wariant G w badanym SNP występuje istotnie statystycznie częściej ($p = 0,034$) w grupie kontrolnej, niż w grupie badanej. Porównując genotypy (AA vs. AG + GG) również zaobserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy analizowanymi grupami. Otrzymany wynik stoi w sprzeczności z analizowaną dotychczas literaturą. Najnowsze badanie, które ukazało się w Plos One, będące wynikiem współpracy ośrodków badawczych pięciu państw: Polski (IITD PAN), Armenii, Rosji, Wielkiej Brytanii oraz Grecji potwierdziło, iż polimorfizm A-3826G jest najbardziej rozpowszechniony spośród 4 analizowanych SNP. Wykonano genotypowanie próbek pobranych od 2283 osób. Zaobserwowano, że częstość występowania A-3826G u osób z MetS waha się od 34% (w Wielkiej Brytanii) do 43% (w Armenii i Rosji). Analiza *case – control* nie wykazała, aby ten SNP związany był ze zwiększonym ryzykiem występowania MetS, jednak stwierdzono, iż prowadzi do wzrostu BMI w grupie osób zdrowych. Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że polimorfizm ten sprzyja rozwojowi otyłości, a w konsekwencji MetS, w obecności czynników środowiskowych lub innych uwarunkowań genetycznych ¹⁶¹.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania z wykorzystaniem testu lucyferazowego pozwoliły określić funkcjonalne różnice dla wariantów A i G w miejscu polimorficznym zlokalizowanym w pozycji 3826 powyżej miejsca startu transkrypcji genu *UCPI*. Przeprowadzono transfekcję komórek HepG2 oraz PAZ6 konstrukcjami, zawierającymi różne kombinacje alleliczne -112, -3826. Komórki hodowano w różnych warunkach: warunkach podstawowych, stymulujących kwasem 9-cis retinowym oraz przy stymulacji norepinefryną. W przypadku linii HepG2 (we wszystkich analizowanych warunkach hodowlanych) nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w intensywności luminescencji dla konstrukcji zawierających badane miejsce alleliczne. Pewnym ograniczeniem tej części badań jest brak zastosowania kontroli w postaci wektora, zawierającego niefunkcjonalną sekwencję w miejscu insercji sekwencji regionu regulatorowego 5' poniżej genu *luc*. Przez to nie można stwierdzić, czy podwyższona aktywność lucyferazy dla komórek, zawierających badane konstrukty

w stosunku do wektora pGL3-Basic, wynika z konkretnej sekwencji insertu, czy z samego faktu insercji przypadkowej sekwencji w wektorze pGL3-Basic. Odpowiedzią na to pytanie było przeprowadzenie doświadczeń z wykorzystaniem różnicującej się linii komórkowej PAZ6 wraz z odpowiednimi kontrolami. Zaobserwowano, iż komórki hodowane w warunkach stymulujących (9-cis RA oraz NE), transfekowane konstruktami zawierającymi zarówno proksymalny region promotorowy (-112) oraz dystalny fragment 5' (-3826), mają podwyższoną aktywność promotorową w porównaniu do wektora kontrolnego, posiadającego нефункциональную sekwencję w miejscu enhancerowym 5'. Warto wspomnieć, że polimorfizm A-3826G znajduje się w rejonie enhancerowym, w miejscu RARE, rozpoznawanym przez jądrowe czynniki transkrypcyjne RAR α , RAR β , RXR, które do swojej aktywacji potrzebują retinoidów (all-trans lub kwasu 9-cis retinowego) ¹¹⁰. Przeprowadzone badania świadczą o kluczowej roli czynników stymulujących (9-cis RA oraz NE) w mechanizmie aktywacji UCP1.

Oprócz wzrostu aktywności promotorowej komórek PAZ6, zawierających badane konstrukty zaobserwowano istotne obniżenie aktywności *luc* dla konstruktów zawierających dystalny fragment 5' z allelem zmutowanym G w miejscu -3826 w obecności stymulanta – norepinefryny. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, iż obecność allelu G w opisywanym miejscu allelicznym obniża aktywność UCP1, skutkując niższą aktywnością brązowej tkanki tłuszczowej i może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia otyłości czy MetS. Teza ta znajduje potwierdzenie w wynikach badań Rose ¹¹⁰, gdzie wykazano wyraźny spadek aktywności *luc* dla konstruktów zawierających allel zmutowany wariantu A-3826G w stosunku do allelu dzikiego. W badaniach Esterbauer i wsp. ¹⁰⁸ zaobserwowano, iż allel G związany jest ze zmniejszoną ekspresją mRNA *UCP1* w śródtrzewnej tkance tłuszczowej osób otyłych, wskazując tym samym, iż polimorfizm ten ma znaczenie funkcjonalne.

Norepinefryna, będąca naturalnym agonistą receptora β 3AR, pobudza kaskadę sygnałową w adipocytach BAT, która wpływa na aktywację UCP1 (mechanizm aktywacji przedstawiony w Rozdziale 1.2.3). Już dziś wiadomo, że miejsce polimorficzne A-3826G znajduje się w bliskiej odległości od miejsca wiązania jądrowych czynników transkrypcyjnych (w tym miejsce PPRE). W badaniach na modelu zwierzęcym Puigserver i współpracownicy udowodnili, że ekspresja mRNA

PGC-1 α - koaktywatora PPAR γ (rozpoznające miejsce PPRE) znacząco wzrasta w warunkach stymulacji zimnem, powodując uwolnienie norepinefryny z SNS, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu aktywności samego UCP1¹⁶². W innej pracy tego samego autora wykazano, iż PGC-1 α , za pośrednictwem kinazy p38-MAPK modulowanej stężeniem cAMP, oddziałuje z PPRE w dystalnym odcinku enhancerowym 5' i tym samym stanowi niezbędny czynnik indukujący ekspresję genu *UCP1*¹⁶³. Badania filogenetyczne wykazały, iż sekwencja PPRE, rozpoznawana przez jądrowe czynniki transkrypcyjne aktywowane norepinefryną, jest jest wysoce konserwatywna, czyli nieróżniącą się wśród ssaków (m.in. u ludzi i u myszy)^{164,165}. W świetle przytoczonych badań można stwierdzić, iż norepinefryna ma kluczowe znaczenie w mechanizmie aktywacji UCP1 w komórkach brązowej tkanki tłuszczowej, a obecność allelu zmutowanego w polimorfizmie -3826, znajdującego się w bliskiej odległości wiązania czynników transkrypcyjnych, obniża aktywność tego białka.

Innym polimorfizmem znajdującym się w regionie 5' genu UCP1 jest polimorfizm A-177G. W jednym z pierwszych badań nad polimorfizmem A-1766G zaobserwowano, iż allel G związany jest z wyższym WHR oraz BMI, zwiększoną masą tkanki tłuszczowej oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej¹¹². Wyniki te zostały potwierdzone przez Shin i współpracowników w grupie koreańskich kobiet – osoby z allelem G miały podwyższone parametry związane z otyłością, m.in.: WHR, BMI, zawartość tkanki tłuszczowej, procent tkanki tłuszczowej¹⁶⁶. W badaniu na populacji Południowo Arabskiej, grupie osób umiarkowanie otyłych zaobserwowano istotny wpływ polimorfizmu A-1766G na występowanie otyłości. Zależności takiej nie zaobserwowano wśród grupy osób skrajnie otyłych¹⁶⁷. Ostatnie badanie przeprowadzone w Chinach wykazało związek opisywanego polimorfizmu z ryzykiem wystąpienia T2DM oraz podwyższonego poziomu TG¹⁶⁸. Do tej pory nie pojawiły się badania dotyczące analizy wpływu A-1766G na ryzyko wystąpienia zaburzeń metabolicznych w Europie. Wyniki genotypowania będące częścią niniejszej pracy pokazały, że w populacji polskiej to *loci* nie jest miejscem polimorficznym, jeśli zdefiniujemy polimorfizm, jako występowanie danej zmiany w populacji na poziomie powyżej 1%¹⁶⁹. W grupie badanej oraz w grupie kontrolnej (n = 597) zmutowany allel wystąpił tylko u dwóch osób (0,3%). Stąd, wyniki dla grupy osób z MetS nie spełniały założeń prawa Hardy'ego Weinberga. Można przypuszczać, iż występowanie tego SNP jest uwarunkowane etnicznie i najprawdopodobniej nie ma znaczącego wpływu na

ryzyko wystąpienia MetS w populacji europejskiej. Najnowsze badanie Dinas i współpracowników również potwierdziło tę tezę – otrzymane wyniki nie wykazały związku tego SNP z ryzykiem pojawienia się zaburzeń metabolicznych ¹⁶¹.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny funkcjonalnego znaczenia A-1776G na aktywność promotorową genu *UCP1* mierzoną testem lucyferazowym. W tym celu transfekowano komórki HepG2 oraz PAZ6 zaprojektowanymi konstruktami zawierającymi proksymalny fragment promotorowy (posiadający miejsce polimorficzne -112) oraz fragment regionu 5' genu *UCP1* okalający miejsce polimorficzne -1766. Zaobserwowany wzrost aktywności promotorowej *luc* dla badanych konstruktów w komórkach HepG2 w stosunku do pGL3-Basic nie dał odpowiedzi, czy podwyższona luminescencja komórek wynika z faktu obecności konkretnego insertu, czy wklonowania przypadkowej sekwencji w wektorze pGL3-Basic. W wyniku kolejnych badań z wykorzystaniem różnicujących się komórek PAZ6, nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w intensywności luminescencji między komórkami transfekowanymi badanymi konstruktami oraz tymi, zawierającymi wektor kontrolny. Do tej pory nie stwierdzono, aby polimorfizm ten znajdował się w kluczowym miejscu odpowiedzialnym za regulację transkrypcji, dlatego otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, iż występowanie tego SNP nie wpływa na zaburzoną ekspresję oraz aktywność *UCP1*.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy genotypowanie miejsca A-112C (region promotorowy genu *UCP1*), które jest w silnym LD z miejscem Ala64Thr, znajdującym się regionie kodującym, nie wykazało statystycznie istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną. Warto podkreślić, iż grupę badaną stanowiły głównie osoby z zespołem metabolicznym, jednak bez stwierdzonej T2DM (252 osoby). Cukrzycę typu 2 zdiagnozowano u 29 pacjentów chorych na MetS. Analizując dostępną literaturę należy zwrócić uwagę, iż we wszystkich pracach grupami badanymi byli pacjenci ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2, a prace te dotyczyły związku polimorfizmu A-112C z ryzykiem występowania zaburzeń gospodarki węglowodanowej, czy zachorowania na T2DM. W pracy japońskich naukowców zaobserwowano, iż wśród grupy pacjentów z T2DM nosiciele allelu C mieli wyższy wskaźnik insulinooporności na czczo, podwyższony wskaźnik HOMA (ang. *homeostasis model assessment*) oraz wysoką zawartość lipidów w wątrobie. Nie wykryto istotnego wpływu wariantu zmutowanego na BMI czy zawartość tłuszczu trzewnego ¹⁷⁰. W badaniu na populacji

indyjskiej nosiciele genotypu CC mieli wyższe ciśnienie skurczowe niż osoby posiadające genotyp AA. Polimorfizm ten sam w sobie nie wpływał na ryzyko wystąpienia T2DM, jednak obecność haplotypu A-C-Met trzech polimorfizmów: A-3826G, A-112C i Met229Leu, istotnie zwiększała ryzyko wystąpienia tej choroby¹⁷¹. W populacji chińskiej allel C został zidentyfikowany, jako czynniki ryzyka retinopatii cukrzycowej¹⁷².

Badania nad polimorfizmem Ala64Thr, który został po raz pierwszy opisany w 1988 roku¹¹⁴, potwierdziły wcześniejsze doniesienia – zamiana Ala na Thr w pozycji 64 w genie *UCPI* powodowała zwiększenie wskaźnika WHR wśród niemieckich kobiet i tym samym przyczyniała się do powstawania otyłości¹⁷³. Odwrotne wyniki otrzymali badacze z Azji – Koreanki posiadające mutację punktową w polimorfizmie Ala64Thr miały mniejszą zawartość tkanki tłuszczowej oraz niższy wskaźnik WHR od kobiet posiadających niezmutowany allel¹⁷⁴.

W ostatnim badaniu *case - control* na populacji kaukaskiej (kraje: Polska, Armenia, Wielka Brytania, Grecja, Rosja) nie wykazano związku występowania polimorfizmu Ala64Thr z ryzykiem zachorowania na MetS. Co ciekawe, analiza wyników genotypowania dla poszczególnych krajów pozwoliła stwierdzić, iż u Ormian osoby z genotypem GA stanowią 24,4% osób ze zdiagnozowanym MetS oraz 13,5% osób zdrowych ($p = 0,031$), co świadczy o zwiększonej podatności osób posiadających allel A na MetS. Rozbieżne wyniki mogą sugerować, iż wpływ tego polimorfizmu na ryzyko występowania zaburzeń metabolicznych zależy od badanych grup etnicznych¹⁶¹.

Innym wytłumaczeniem tej rozbieżności może być stosowanie odmiennej diety przez populację kaukaską i azjatycką. Tak jak już wspomniano, w przeprowadzonych w ramach tej pracy badaniach nie udowodniono, aby występowanie polimorfizmu Ala64Thr wpływało istotnie na ryzyko wystąpienia MetS w populacji polskiej. Dodatkowo wykazano, że w dość silnym LD z A-112C jest polimorfizm Met229Leu, co jest zgodne z wynikami badania Mori i wsp.¹¹³. W jego pracy grupą badaną były osoby z cukrzycą typu 2, u których wykazano, iż polimorfizmy w silnym LD, czyli A-112C oraz Met229Leu mogą mieć wpływ na ryzyko rozwoju T2DM. W badaniach Hamanna i wsp. grupą badaną były osoby otyłe narodowości niemieckiej. Analizowano trzy mutacje punktowe w regionie kodującym *UCPI*: Arg40Trp (ekson 1), Lys257Arg

(ekson 5) oraz Met229Leu (ekson 2), jednak żadna z nich nie wykazała istotnego związku z rozwojem otyłości.

Rozbieżne wyniki mogą wynikać z różnego pochodzenia etnicznego badanych grup – w poszczególnych grupach etnicznych te same geny mogą ulegać różnej ekspresji, dlatego też ocena danego polimorfizmu w różnych populacjach może dać odmienne wyniki. Należy również wziąć pod uwagę zmiany epigenetyczne wynikające z wpływu środowiska, stylu życia, czy diety. Inną przyczyną rozbieżności wyników jest stosowanie odmiennych kryteriów diagnostycznych w poszczególnych grupach lub analiza asocjacji polimorfizmów w odniesieniu do jednego zaburzenia metabolicznego. Jak wynika z przeglądu literatury, badania skupiają się głównie na zaburzeniach metabolicznych, jako osobnych jednostkach chorobowych, np. otyłość, T2DM, podwyższone ciśnienie krwi.

Należy również zwrócić uwagę, iż w niniejszej pracy dobór grup pod względem ich wieku nie został przeprowadzony w sposób precyzyjny. Wynikał on z trudności związanych ze znalezieniem osób w wieku około 60 lat, bez następujących obciążeń zdrowotnych: nadciśnienie tętnicze, zaburzony lipidogram, podwyższony poziom glukozy a dodatkowo niepalących, co może stanowić pewne ograniczenie w analizie otrzymanych wyników.

Oprócz tradycyjnego genotypowania wybranych miejsc polimorficznych metodą PCR-RFLP oraz Real-Time PCR, wykorzystano także metodę sekwencjonowania wysokoprzepustowego (NGS) do sekwencjonowania całego genu *UCPI*: od regionu 5' regulatorowe oddalonego o 5000 pz od miejsca startu transkrypcji, przez region kodujący, aż po region 3'UTR (300 pz) w celu identyfikacji nowych, nieopisanych dotąd w literaturze miejsc polimorficznych, potencjalnie związanych z ryzykiem MetS lub T2DM. Przeprowadzono analizę asocjacyjną nowo zidentyfikowanych miejsc, w celu sprawdzenia czy wybrane *loci* korelują z podatnością zachorowania na MetS lub T2DM. Zidentyfikowano 25 miejsc o potencjalnie istotnym wpływie na ryzyko wystąpienia T2DM, z czego 23 miejsca były polimorfizmami pojedynczego nukleotydu natomiast dwa miejsca to zmiany typu indel (ang. *insertion/deletion*, insercja delecja). Spośród 25 wariantów, 13 należało do wcześniej już wykrytych polimorfizmów, w związku z czym znajdowały się w bazie SNP NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Polimorfizmy znajdowały się

zarówno w regionie 5' regulatorowym (5) jak i regionie kodującym (19). Jeden z polimorfizmów o znanym rs znajdował się w regionie 3'UTR. Jak wiadomo najważniejsze pod względem funkcjonalnym są eksony w genie, które posiadają zapisaną informację o strukturze białka. Z tego powodu polimorfizmy znajdujące się w eksonach są interesujące pod kątem zmian w budowie i funkcji białka. Dodatkowo istotne jest poznanie czy badany wariant to mutacja typu zmiany sensu, czyli czy zmiana nukleotydu powoduje kodowanie innego aminokwasu, niż ma to miejsce w niezmutowanych regionach. Innym typem może być wariant nonsensowny, czyli powodujący powstawanie kodonu stop w transkrybowanym mRNA, co w efekcie powoduje powstanie białka krótszego i tym samym najprawdopodobniej o zaburzonej funkcji. Mutacje typu indel mogą prowadzić do zmiany ramki odczytu, jeśli doszłoby do insercji jednego lub większej, niepodzielnej przez 3, liczby nukleotydów. Skutkuje to zupełnie inną sekwencją aminokwasową a w rezultacie powstaje zmienione białko. Spośród 19 polimorfizmów znalezionych w regionie kodującym genu *UCPI* tylko jeden z nich znajdował się w eksonie 3, pozostałe znajdowały się w intronach. Była to zmiana typu SNP w pozycji 140563477 w odniesieniu do sekwencji referencyjnej Hg38. Polimorfizm ten nie został do tej pory opisany i nie posiada swojego numeru rs. Jest to zamiana tyminy na cytozynę, jednak nie udało się dotrzeć do informacji, czy jest to zmiana powodująca zamianę aminokwasu (zmiana sensu). Dokonano przeglądu literatury opisującej pozostałe zidentyfikowane polimorfizmy (bazy danych Ensembl oraz NCBI SNP). Spośród wszystkich zidentyfikowanych metodą NGS polimorfizmów, znajdujących się w bazie SNP NCBI, tylko dwa warianty (rs7688743 oraz rs3811787) zostały opisane w pracach badawczych. Oba warianty zostały analizowane pod kątem występowania retinopatii cukrzycowej w grupie osób z T2DM, jednak w pracy chińskich badaczy nie wykazano związku występowania opisywanych polimorfizmów z podwyższonym ryzykiem zachorowania na wyżej wymienione zaburzenie¹⁷². Miejsce polimorficzne rs3811787, gdzie dochodzi do zamiany A na C, w miejscu -412 pz powyżej miejsca startu transkrypcji genu *UCPI*, zostało genotypowane wśród 367 koreańskich, otyłych kobiet. Dodatkowo analizowano miejsce polimorficzne A-3826G. Wykazano, iż obecność obu zmutowanych alleli była istotnie związana z występowaniem zwiększonych obszarów podskórnej tkanki tłuszczowej brzucha w modelu dominującym, jednak nie wpływa na obszar tkanki tłuszczowej występującej w okolicy udowej, obszarami tkanki tłuszczowej trzewnej oraz profilem biochemicznym krwi¹⁶⁷.

Należy pamiętać, iż liczba zsekwencjonowanych prób w grupie osób ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 jest mniejsza w porównaniu ze zsekwencjonowanymi próbami grupy kontrolnej (w szczególności dotyczy to ilości prób, które zostały sekwencjonowane w regionie kodującym), co mogło wpłynąć na obliczenia statystyczne. Są to wstępne wyniki, które stanowią bardzo ciekawą podstawę do dalszych badań nad wpływem tych wariantów na ryzyko wystąpienia danej jednostki chorobowej; w tym przypadku T2DM, jednak należy je potwierdzić na większej grupie osób w badaniu *case - control*.

VII. WNIOSKI

1. Obecność allelu G w miejscu polimorficznym -3826 A/G genu *UCP1* jest związana z mniejszym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego w populacji polskiej, dla pozostałych SNP: -A-1766G, A-112C, Ala64Thr, Met229Leu nie wykazano związku z ryzykiem wystąpienia MetS czy otyłości.
2. Wpływ badanych polimorfizmów zależy od pochodzenia etnicznego badanych grup - w poszczególnych populacjach te same geny ulegają różnej ekspresji, dlatego też ocena danego polimorfizmu w różnych grupach etnicznych daje odmienne wyniki.
3. Obniżona aktywność UCP2 u osób z zaburzeniami metabolicznymi wpływa na zaburzoną regulację ROS i tym samym aktywuje mechanizm powstawania przewlekłego stanu zapalnego, charakterystycznego w patogenezie otyłości i T2DM prowadzących do zespołu metabolicznego.
4. mRNA *UCP1* **nie** jest ekspresjonowane w komórkach PBMC u ludzi.
5. Norepinefryna ma kluczowe znaczenie w mechanizmie aktywacji UCP1 w komórkach brązowej tkanki tłuszczowej, a obecność allelu zmutowanego G w polimorfizmie -3826, znajdującego się w bliskiej odległości wiązania czynników transkrypcyjnych, obniża aktywność promotorową tego białka w warunkach stymulujących PAZ6 NE - obniżona aktywność UCP1 jest związana z większym ryzykiem wystąpienia otyłości oraz MetS.
6. Zidentyfikowano 39 nowych, w większości przypadków nieopisanych w literaturze, wariantów genetycznych w rejonie niekodujących oraz kodującym *UCP1* potencjalnie związanych z ryzykiem wystąpienia MetS (14 wariantów) lub T2DM (25 wariantów). Otrzymane wyniki stanowią ciekawą podstawę do dalszych badań nad wpływem tych wariantów na ryzyko wystąpienia danej jednostki chorobowej.

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Kumar V, Hsueh WA, Raman SV. Multiorgan, Multimodality Imaging in Cardiometabolic Disease. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(11). doi:10.1161/CIRCIMAGING.117.005447
2. Pawłowska J, Witkowski JM, Bryl E. Zespół metaboliczny - rys historyczny i współczesność. *Forum Med Rodz*. 2009;3(3):222-228.
3. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
4. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-1607.
5. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14(3):173-194. doi:10.2337/diacare.14.3.173
6. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*. 1992;41(6):715-722. doi:10.2337/diab.41.6.715
7. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1998;15(7):539-553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
8. Oda E. Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations. *Acta Diabetol*. 2012;49(2):89-95. doi:10.1007/s00592-011-0309-6
9. Komperda J, Żurkowska J, Czapka M, Szczepańska M, Pierzak-Sominka J. Zespół metaboliczny: przegląd piśmiennictwa. *Probl Nauk Stosow*. 2014;2.
10. Alberti K.G.M.M., Eckel Robert H., Grundy Scott M., et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2009;120(16):1640-1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
11. Kalinowski P, Mianowana M. Zespół metaboliczny cz. II: Epidemiologia zespołu metabolicznego w Polsce i na świecie= Metabolic Syndrome part II: Epidemiology of metabolic syndrome in Poland and in the World. *J Educ Health Sport*. 2016;6(4):466-480.
12. Miller B, Fridline M. Metabolic syndrome prevalence and risk in the United States based on NHANES 2001-2012 data. *J Metab Syndr*. 2016;5(2):1-6.
13. Ranasinghe P, Mathangasinghe Y, Jayawardena R, Hills AP, Misra A. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. *BMC Public Health*. 2017;17(1):1-9.
14. Zdrojewski T, Rutkowski M, Bandosz P, et al. Ocena rozpowszechnienia i kontroli czynników ryzyka chorób serca i naczyń w Polsce-badania NATPOL 1997, 2002, 2011. Published online 2015.

15. Vishram JKK, Borglykke A, Andreasen AH, et al. Impact of Age and Gender on the Prevalence and Prognostic Importance of the Metabolic Syndrome and Its Components in Europeans. The MORGAM Prospective Cohort Project. *PLOS ONE*. 2014;9(9):e107294. doi:10.1371/journal.pone.0107294
16. Xu H, Li X, Adams H, Kubena K, Guo S. Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1):128. doi:10.3390/ijms20010128
17. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017;11(8):215-225. doi:10.1177/1753944717711379
18. Obesity and overweight. Accessed April 19, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
19. Drzycimska-Tatka B, Drab-Rybczyńska A, Kasprzak J. Zespół metaboliczny – epidemia XXI wieku. Published online 2011:8.
20. Pacholczyk M, Ferenc T, Kowalski J. Zespół metaboliczny. Część II: patogeneza zespołu metabolicznego i jego powikłań The metabolic syndrome. Part II: Its mechanisms of development and its complications. *Postepy Hig Med Doswonline*. 2008;62:543-558.
21. Matulewicz N, Karczewska-Kupczewska M. Insulinooporność a przewlekła reakcja zapalna. *Postepy Hig Med Dosw.*:13.
22. Hurre S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J*. 2017;40(5):257-262. doi:10.1016/j.bj.2017.06.007
23. Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D. Rola stresu oksydacyjnego i oksydazy NADPH w patogenezie miażdżycy. *Postepy Hig Med Dosw.*:12.
24. Zafar U, Khaliq S, Ahmad HU, Manzoor S, Lone KP. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones*. 2018;17(3):299-313. doi:10.1007/s42000-018-0051-3
25. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(5):e330-e341. doi:10.1016/j.orcp.2013.05.004
26. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2017;114(12):1752-1761. doi:10.1172/JCI121625
27. Cinti S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(9):651-666. doi:10.1016/j.tem.2018.05.007
28. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Dig Dis Sci*. 2009;54(9):1847-1856. doi:10.1007/s10620-008-0585-3
29. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(1):26-35. doi:10.1038/nrendo.2016.136
30. Jackson E, Shoemaker R, Larian N, Cassis L. Adipose Tissue as a Site of Toxin Accumulation. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1085-1135. doi:10.1002/cphy.c160038

31. Wensveen FM, Valentić S, Šestan M, Wensveen TT, Polić B. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Semin Immunol.* 2015;27(5):322-333. doi:10.1016/j.smim.2015.10.006
32. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:22. doi:10.3389/fcvm.2020.00022
33. Cui XB, Chen SY. White adipose tissue browning and obesity. *J Biomed Res.* 2017;31(1):1-2. doi:10.7555/JBR.31.20160101
34. Klaus S. Adipose Tissue as a Regulator of Energy Balance. *Curr Drug Targets.* 2004;5(3):241-250. doi:10.2174/1389450043490523
35. Siemińska L. Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych. *Endokrynol Pol.* 2007;58(4):330-329.
36. Mariman ECM, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(8):1277-1292. doi:10.1007/s00018-010-0263-4
37. Farmer SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev.* 2008;22(10):1269-1275. doi:10.1101/gad.1681308
38. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M. Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. *Front Physiol.* 2019;10. doi:10.3389/fphys.2019.00094
39. Saely CH, Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23. doi:10.1159/000321319
40. Virtanen KA, Nuutila P. Brown adipose tissue in humans: *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(1):49-54. doi:10.1097/MOL.0b013e3283425243
41. Stock MJ, Cinti S. ADIPOSE TISSUE | Structure and Function of Brown Adipose Tissue. In: Caballero B, ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press; 2003:29-34. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00008-0
42. Lee P, Swarbrick MM, Ho KKY. Brown Adipose Tissue in Adult Humans: A Metabolic Renaissance. *Endocr Rev.* 2013;34(3):413-438. doi:10.1210/er.2012-1081
43. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 — is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2014;1837(7):1075-1082. doi:10.1016/j.bbabi.2014.02.008
44. Słownik terminów biologicznych. Accessed June 24, 2022. http://stareaneksy.pwn.pl/biologia/1477343_1.html
45. Murawska-Ciałowicz E. Tkanka tłuszczowa – charakterystyka morfologiczna i biochemiczna różnych depozytów. *Postepy Hig Med Dosw.:*19.
46. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr Engl Ed.* 2014;61(2):100-112. doi:10.1016/j.endoen.2014.02.001

47. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol.* 2016;7:30. doi:10.3389/fendo.2016.00030
48. Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *J Comp Physiol B.* 2015;185(6):587-606. doi:10.1007/s00360-015-0907-7
49. Luginbuehl I, Bissonnette B. Thermal Regulation. In: *A Practice of Anesthesia for Infants and Children.* Elsevier; 2009:557-567. doi:10.1016/B978-141603134-5.50029-9
50. Rosenbaum M, Leibel RL. Adaptive thermogenesis in humans. *Int J Obes.* 2010;34(1):S47-S55. doi:10.1038/ijo.2010.184
51. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, et al. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* 2015;21(1):33-38. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.009
52. Townsend K, Tseng YH. Brown adipose tissue. *Adipocyte.* 2012;1(1):13-24. doi:10.4161/adip.18951
53. Riis-Vestergaard MJ, Richelsen B, Bruun JM, Li W, Hansen JB, Pedersen SB. Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(4):e994-e1005. doi:10.1210/clinem/dgz298
54. Mattsson CL, Csikasz RI, Chernogubova E, et al. β 1-Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated β 3-adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1108-E1118. doi:10.1152/ajpendo.00085.2011
55. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
56. Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM, et al. Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: a review. *Clin Sci.* 2018;132(10):1039-1054. doi:10.1042/CS20170276
57. Montanari T, Poščić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obes Rev.* 2017;18(5):495-513. doi:10.1111/obr.12520
58. Roesler A, Kazak L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochem J.* 2020;477(3):709-725. doi:10.1042/BCJ20190463
59. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(5):969-985. doi:10.1016/j.bbali.2012.12.002
60. Alvarez-Crespo M, Csikasz RI, Martínez-Sánchez N, et al. Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab.* 2016;5(4):271-282. doi:10.1016/j.molmet.2016.01.008
61. Martínez-Sánchez N, Moreno-Navarrete JM, Contreras C, et al. Thyroid hormones induce browning of white fat. *J Endocrinol.* 2016;232(2):351-362. doi:10.1530/JOE-16-0425

62. Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol.* 2014;5. doi:10.3389/fphys.2014.00479
63. Smith RE, Hock RJ. Brown Fat: Thermogenic Effector of Arousal in Hibernators. *Science.* 1963;140(3563):199-200. doi:10.1126/science.140.3563.199
64. Dawkins MJR, Scopes JW. Non-shivering Thermogenesis and Brown Adipose Tissue in the Human New-born Infant. *Nature.* 1965;206(4980):201-202. doi:10.1038/206201b0
65. Hull D. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF BROWN ADIPOSE TISSUE. *Br Med Bull.* 1966;22(1):92-96. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a070447
66. Smith RE, Horwitz BA. Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev.* 1969;49(2):330-425. doi:10.1152/physrev.1969.49.2.330
67. Trayhurn P. Brown Adipose Tissue—A Therapeutic Target in Obesity? *Front Physiol.* 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.01672
68. Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat.* 1972;112(Pt 1):35-39.
69. Lean MEJ. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc.* 1989;48(2):243-257. doi:10.1079/PNS19890036
70. Ricquier D, Nechad M, Mory G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54(4):803-807. doi:10.1210/jcem-54-4-803
71. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol.* 1981;46(4):339-345. doi:10.1007/BF00422121
72. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002;29(10):1393-1398. doi:10.1007/s00259-002-0902-6
73. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2015;125(2):478-486. doi:10.1172/JCI78362
74. Sampath SC, Sampath SC, Bredella MA, Cypess AM, Torriani M. Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology.* 2016;280(1):4-19. doi:10.1148/radiol.2016150390
75. Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, et al. Impact of Age on the Relationships of Brown Adipose Tissue With Sex and Adiposity in Humans. *Diabetes.* 2010;59(7):1789-1793. doi:10.2337/db10-0004
76. Valle A, García-Palmer F, Oliver J, Roca P. Sex Differences in Brown Adipose Tissue Thermogenic Features During Caloric Restriction. *Cell Physiol Biochem.* 2007;19(1-4):195-204. doi:10.1159/000099207
77. Kern PA, Finlin BS, Zhu B, et al. The Effects of Temperature and Seasons on Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans: Evidence for Thermogenic Gene Induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):E2772-E2779. doi:10.1210/jc.2014-2440

78. Yoneshiro T, Matsushita M, Nakae S, et al. Brown adipose tissue is involved in the seasonal variation of cold-induced thermogenesis in humans. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310(10):R999-R1009. doi:10.1152/ajpregu.00057.2015
79. Green AL, Bagci U, Hussein S, et al. Brown adipose tissue detected by PET/CT imaging is associated with less central obesity. *Nucl Med Commun*. 2017;38(7):629-635. doi:10.1097/MNM.0000000000000691
80. Dewal RS, Stanford KI. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(1):71-78. doi:10.1016/j.bbalip.2018.04.013
81. Aldiss P, Betts J, Sale C, Pope M, Budge H, Symonds ME. Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism*. 2018;81:63-70. doi:10.1016/j.metabol.2017.11.009
82. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-1508. doi:10.1056/NEJMoa0808718
83. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*. 2011;14(2):272-279. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.012
84. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S35-S39. doi:10.1038/ijosup.2015.9
85. Young P, Arch JRS, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*. 1984;167(1):10-14. doi:10.1016/0014-5793(84)80822-4
86. Loncar D, Bedrica L, Mayer J, et al. The effect of intermittent cold treatment on the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue. *J Ultrastruct Mol Struct Res*. 1986;97(1-3):119-129. doi:10.1016/s0889-1605(86)80012-x
87. Lončar D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res*. 1991;266(1):149-161. doi:10.1007/BF00678721
88. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science*. 2010;328(5982):1113-1114. doi:10.1126/science.1190816
89. Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: Plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(10):823-835. doi:10.1007/BF03344046
90. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*. 1979;281(5726):31-35. doi:10.1038/281031a0
91. Himms-Hagen J, Desautels M. A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (obob) mouse: Reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold by an increase in binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;83(2):628-634. doi:10.1016/0006-291X(78)91036-7
92. Fernández-Verdejo R, Marlatt KL, Ravussin E, Galgani JE. Contribution of brown adipose tissue to human energy metabolism. *Mol Aspects Med*. 2019;68:82-89. doi:10.1016/j.mam.2019.07.003

93. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780
94. Vijgen GHEJ, Bouvy ND, Teule GJJ, Brans B, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Brown Adipose Tissue in Morbidly Obese Subjects. *PLoS ONE*. 2011;6(2). doi:10.1371/journal.pone.0017247
95. Christiansen EN, Pedersen JI, Grav HJ. Uncoupling and Recoupling of Oxidative Phosphorylation in Brown Adipose Tissue Mitochondria. *Nature*. 1969;222(5196):857-860. doi:10.1038/222857a0
96. Ricquier D, Kader JC. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;73(3):577-583. doi:10.1016/0006-291X(76)90849-4
97. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 1984;64(1):1-64. doi:10.1152/physrev.1984.64.1.1
98. Stosio M, Witkowicz A, Kowalska A, Karabon L. Genetic background of aberrant thermogenin expression (UCP1) in obesity leading to metabolic syndrome. *Postępy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 2016;70:1389-1403.
99. Crichton PG, Lee Y, Kunji ERS. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie*. 2017;134:35-50. doi:10.1016/j.biochi.2016.12.016
100. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemia, Fosforylacja Oksydacyjna*. Wydawnictwo Naukowe PWN; 2009.
101. Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A. Mitochondrialne białka rozprzegające: regulacja i rola fizjologiczna. *Postępy Biochem*. 2008;54(2). Accessed May 25, 2020. <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-a78ee44d-22f4-4f79-b87d-c30678a4da74>
102. Bertholet AM, Kirichok Y. The Mechanism FA-Dependent H⁺ Transport by UCP1. In: Pfeifer A, Klingenspor M, Herzig S, eds. *Brown Adipose Tissue*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer International Publishing; 2019:143-159. doi:10.1007/164_2018_138
103. Villarroya F, Peyrou M, Giral M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie*. 2017;134:86-92. doi:10.1016/j.biochi.2016.09.017
104. Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, et al. Cold-Inducible Zfp516 Activates UCP1 Transcription to Promote Browning of White Fat and Development of Brown Fat. *Mol Cell*. 2015;57(2):235-246. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.005
105. Hondares E, Mora O, Yubero P, et al. Thiazolidinediones and Rexinoids Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Coactivator (PGC)-1 α Gene Transcription: An Autoregulatory Loop Controls PGC-1 α Expression in Adipocytes via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivation. *Endocrinology*. 2006;147(6):2829-2838. doi:10.1210/en.2006-0070
106. Chi J, Cohen P. The Multifaceted Roles of PRDM16: Adipose Biology and Beyond. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(1):11-23. doi:10.1016/j.tem.2015.11.005

107. Brondani LA, Assmann TS, de Souza BM, Bouças AP, Canani LH, Crispim D. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability. *PloS One*. 2014;9(5):e96411. doi:10.1371/journal.pone.0096411
108. Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM, et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res*. 1998;39(4):834-844.
109. del Mar Gonzalez-Barroso M, Pecqueur C, Gelly C, et al. Transcriptional Activation of the Human ucpl Gene in a Rodent Cell Line. *J Biol Chem*. 2000;275(41):31722-31732. doi:10.1074/jbc.M001678200
110. Rose G, Crocco P, D'Aquila P, Montesanto A, Bellizzi D, Passarino G. Two variants located in the upstream enhancer region of human UCP1 gene affect gene expression and are correlated with human longevity. *Exp Gerontol*. 2011;46(11):897-904. doi:10.1016/j.exger.2011.07.011
111. Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, et al. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 1994;18(8):526-531.
112. Soo Kim K, Cho DY, Joo Kim Y, et al. The finding of new genetic polymorphism of UCP-1 A-1766G and its effects on body fat accumulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2005;1741(1):149-155. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.026
113. Mori H, Okazawa H, Iwamoto K, Maeda E, Hashiramoto M, Kasuga M. A polymorphism in the 5' untranslated region and a Met 229 ? Leu variant in exon 5 of the human UCP1 gene are associated with susceptibility to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001;44(3):373-376. doi:10.1007/s001250051629
114. Hamann A, Tafel J, Büsing B, et al. Analysis of the uncoupling protein-1 (UCP1) gene in obese and lean subjects: identification of four amino acid variants. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 1998;22(9):939-941. doi:10.1038/sj.ijo.0800725
115. Zilberfarb V, Piétri-Rouxel F, Jockers R, et al. Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci*. 1997;110(7):801-807.
116. Studzińska A, Tyburski J, Daca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *biotechnologia*. 2008;1(80):71-85.
117. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 2005;15(2):97-98. doi:10.1038/sj.cr.7290272
118. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007;28(61):500-510.
119. Romanek J. Real-time PCR-nowoczesna technika analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu. *Wiad Zootech*. 2011;49(1).
120. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-408.

121. Allard ST, Kopish K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*. 2008;21:23-26.
122. Dual-Glo® Luciferase Assay System. Accessed February 23, 2020. https://pl.promega.com/products/luciferase-assays/reporter-assays/dual_glo-luciferase-assay-system/
123. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. Published online January 31, 2012. doi:10.1007/s11103-012-9885-2
124. Costa FF, Rosário WR, Ribeiro Farias AC, de Souza RG, Duarte Gondim RS, Barroso WA. Metabolic syndrome and COVID-19: An update on the associated comorbidities and proposed therapies. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(5):809-814. doi:10.1016/j.dsx.2020.06.016
125. Chang WT, Toh HS, Liao CT, Yu WL. Cardiac Involvement of COVID-19: A Comprehensive Review. *Am J Med Sci*. 2021;361(1):14-22. doi:10.1016/j.amjms.2020.10.002
126. Stefan N, Birkenfeld AL, Schulze MB, Ludwig DS. Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(7):341-342. doi:10.1038/s41574-020-0364-6
127. Garg S, Kim L, Whitaker M, et al. Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 - COVID-NET, 14 States, March 1-30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(15):458-464. doi:10.15585/mmwr.mm6915e3
128. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):248-261. doi:10.1038/nrm1592
129. Echtay KS, Bienengraeber M, Mayinger P, et al. Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years. *Arch Biochem Biophys*. 2018;657:41-55. doi:10.1016/j.abb.2018.09.006
130. Moradi S, Khaje-Bishak Y, Alipour M, Alivand M, Alipour B. The review of the relationship between UCP2 and obesity: Focusing on inflammatory-obesity. *New Insights Obes Genet Beyond*. 2021;5(1):001-013. doi:10.29328/journal.niogb.1001015
131. Pascual-Gamarra JM, Salazar-Tortosa DF, Labayen I, et al. Association of UCP1, UCP2 and UCP3 gene polymorphisms with cardiovascular disease risk factors in European adolescents: the HELENA study. *Pediatr Res*. 2020;88(2):265-270. doi:10.1038/s41390-019-0735-7
132. Margaryan S, Witkowicz A, Partyka A, Yepiskoposyan L, Manukyan G, Karabon L. The mRNA expression levels of uncoupling proteins 1 and 2 in mononuclear cells from patients with metabolic disorders: obesity and type 2 diabetes mellitus. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 2017;71(0):895-900. doi:10.5604/01.3001.0010.5386
133. Petrov PD, Bonet ML, Reynés B, Oliver P, Palou A, Ribot J. Whole Blood RNA as a Source of Transcript-Based Nutrition- and Metabolic Health-Related Biomarkers. *PLOS ONE*. 2016;11(5):e0155361. doi:10.1371/journal.pone.0155361

134. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147(3):126-132. doi:10.1016/j.lab.2005.10.005
135. Calton EK, Keane KN, Soares MJ, Rowlands J, Newsholme P. Prevailing vitamin D status influences mitochondrial and glycolytic bioenergetics in peripheral blood mononuclear cells obtained from adults. *Redox Biol.* 2016;10:243-250. doi:10.1016/j.redox.2016.10.007
136. Reynés B, García-Ruiz E, Oliver P, Palou A. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells is affected by cold exposure. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(8):R824-R834. doi:10.1152/ajpregu.00221.2015
137. Oliver P, Reynés B, Caimari A, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflug Arch - Eur J Physiol.* 2013;465(4):459-468. doi:10.1007/s00424-013-1246-8
138. Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, et al. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene.* 2012;511(2):151-160. doi:10.1016/j.gene.2012.09.090
139. Reynés B, van Schothorst EM, Keijer J, Palou A, Oliver P. Effects of cold exposure revealed by global transcriptomic analysis in ferret peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):19985. doi:10.1038/s41598-019-56354-6
140. Pinhel MA de S, Noronha NY, Nicoletti CF, et al. Comparison of gene expression profile between blood cells and white adipose tissue of patients with obesity. *Nutr Hosp.* 2017;34(3):608. doi:10.20960/nh.438
141. Raffa S, Chin XLD, Stanzione R, et al. The reduction of NDUFC2 expression is associated with mitochondrial impairment in circulating mononuclear cells of patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol.* 2019;286:127-133. doi:10.1016/j.ijcard.2019.02.027
142. Telle-Hansen VH, Halvorsen B, Dalen KT, et al. Altered expression of genes involved in lipid metabolism in obese subjects with unfavourable phenotype. *Genes Nutr.* 2013;8(4):425-434. doi:10.1007/s12263-012-0329-z
143. Kazantzis M, Takahashi V, Hinkle J, et al. PAZ6 Cells Constitute a Representative Model for Human Brown Pre-Adipocytes. *Front Endocrinol.* 2012;3. doi:10.3389/fendo.2012.00013
144. Guennoun A, Kazantzis M, Thomas R, et al. Comprehensive molecular characterization of human adipocytes reveals a transient brown phenotype. *J Transl Med.* 2015;13(1):135. doi:10.1186/s12967-015-0480-6
145. Tafere GG, Wondafrash DZ, Zewdie KA, Assefa BT, Ayza MA. Plasma Adipsin as a Biomarker and Its Implication in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2020;13:1855-1861. doi:10.2147/DMSO.S253967
146. Zilberfarb V, Siquier K, Strosberg AD, Issad T. Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor- α expression in human PAZ6 cells. :10.

147. Oberkofler H, Esterbauer H, Linnemayr V, Strosberg AD, Krempler F, Patsch W. Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ Coactivator-1 Recruitment Regulates PPAR Subtype Specificity. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16750-16757. doi:10.1074/jbc.M200475200
148. Payne SH. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(1):1-3. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.010
149. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes *. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7153-7164. doi:10.1074/jbc.M109.053942
150. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(11):4401-4406. doi:10.1073/pnas.0610615104
151. Flouris AD, Shidlovskii YV, Shaposhnikov AV, et al. Role of UCP1 gene variants in interethnic differences in the development of cardio-metabolic diseases. *Front Genet.* 2017;8:7.
152. Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, Morris AM, Noakes M, Clifton PM. Association of -3826 G Variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia.* 2000;43(2):242-244. doi:10.1007/s001250050036
153. Dhall M, Chaturvedi MM, Rai U, Kapoor S. Sex-dependent effects of the UCP1 -3826 A/G polymorphism on obesity and blood pressure. *Ethn Dis.* 2012;22(2):181-184.
154. Forga L I, Corbalán M, Marti A, Fuentes C, Martínez-González MA, Martínez A. [Influence of the polymorphism 03826 A --> G in the UCP1 gene on the components of metabolic syndrome]. *An Sist Sanit Navar.* 2003;26(2):231-236. doi:10.23938/ASSN.0449
155. Oh HH, Kim KS, Choi SM, Yang HS, Yoon Y. The effects of uncoupling protein-1 genotype on lipoprotein cholesterol level in Korean obese subjects. *Metabolism.* 2004;53(8):1054-1059. doi:10.1016/j.metabol.2004.02.014
156. Kieć-Wilk B, Wybrańska I, Malczewska-Malec M, et al. Correlation of the -3826A >G polymorphism in the promoter of the uncoupling protein 1 gene with obesity and metabolic disorders in obese families from southern Poland. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(3):477-490.
157. Urhammer SA, Fridberg M, Sørensen TI, et al. Studies of genetic variability of the uncoupling protein 1 gene in Caucasian subjects with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4069-4074. doi:10.1210/jcem.82.12.4414
158. Gagnon J, Lago F, Chagnon YC, et al. DNA polymorphism in the uncoupling protein 1 (UCP1) gene has no effect on obesity related phenotypes in the Swedish Obese Subjects cohorts. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* 1998;22(6):500-505. doi:10.1038/sj.ijo.0800613
159. Sivenius K, Valve R, Lindi V, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and β 3 -adrenergic receptor genes on long-term

- body weight change in Finnish type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Int J Obes.* 2000;24(4):514-519. doi:10.1038/sj.ijo.0801194
160. Schäffler A, Palitzsch KD, Watzlawek E, et al. Frequency and significance of the A→G (-3826) polymorphism in the promoter of the gene for uncoupling protein-1 with regard to metabolic parameters and adipocyte transcription factor binding in a large population-based Caucasian cohort. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(9):770-779.
161. Dinas PC, Nintou E, Vliora M, et al. Prevalence of uncoupling protein one genetic polymorphisms and their relationship with cardiovascular and metabolic health. *PLOS ONE.* 2022;17(4):e0266386. doi:10.1371/journal.pone.0266386
162. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell.* 1998;92(6):829-839. doi:10.1016/S0092-8674(00)81410-5
163. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocr Rev.* 2003;24(1):78-90. doi:10.1210/er.2002-0012
164. Gaudry MJ, Campbell KL, Jastroch M. Evolution of UCP1. In: Pfeifer A, Klingenspor M, Herzig S, eds. *Brown Adipose Tissue.* Vol 251. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer International Publishing; 2018:127-141. doi:10.1007/164_2018_116
165. Pap A, Cuaranta-Monroy I, Peloquin M, Nagy L. Is the Mouse a Good Model of Human PPAR γ -Related Metabolic Diseases? *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1236. doi:10.3390/ijms17081236
166. Shin HD, Kim KS, Cha MH, Yoon Y. The effects of UCP-1 polymorphisms on obesity phenotypes among Korean female subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(2):624-630. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.096
167. Chathoth S, Ismail MH, Vatte C, et al. Association of Uncoupling Protein 1 (UCP1) gene polymorphism with obesity: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):203. doi:10.1186/s12881-018-0715-5
168. Dong C, Lv Y, Xie L, et al. Association of UCP1 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and their interaction with physical activity and sedentary behavior. *Gene.* 2020;739:144497. doi:10.1016/j.gene.2020.144497
169. Promoting Safe and Effective Genetic Testing in the United States - Glossary. Genome.gov. Accessed June 9, 2022. <https://www.genome.gov/10002399/genetic-testing-reportglossary>
170. Fukuyama K, Ohara T, Hirota Y, et al. Association of the -112A>C polymorphism of the uncoupling protein 1 gene with insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(4):1212-1216. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.140
171. Vimalaswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Rao MRS, Mohan V. A Haplotype at the *UCP1* Gene Locus Contributes to Genetic Risk for Type 2 Diabetes in Asian Indians (CURES-72). *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(1):63-68. doi:10.1089/met.2009.0039

172. Jin P, Li Z, Xu X, et al. Analysis of association between common variants of uncoupling proteins genes and diabetic retinopathy in a Chinese population. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):25. doi:10.1186/s12881-020-0956-y
173. Herrmann SM, Wang JG, Staessen JA, et al. Uncoupling protein 1 and 3 polymorphisms are associated with waist-to-hip ratio. *J Mol Med Berl Ger.* 2003;81(5):327-332. doi:10.1007/s00109-003-0431-1
174. Montesanto A, Bonfigli AR, Crocco P, et al. Genes associated with Type 2 Diabetes and vascular complications. *Aging.* 2018;10(2):178-196. doi:10.18632/aging.101375

IX. SPIS RYCIN, TABEL I WYKRESÓW

9.1 Spis rycin

Ryc. 1	Czynniki wpływające na zwiększony poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach tkanki tłuszczowej oraz skutki stresu oksydacyjnego. Rycina powstała przy użyciu <i>BioRender.com</i>	22
Ryc. 2	Skrawki histologiczne pokazujące różną morfologię adipocytów WAT (A) i BAT (B) ⁴³	25
Ryc. 3	Mechanizm aktywacji adipocytów brązowej tkanki tłuszczowej. Opracowanie własne na podstawie ⁵² . Rycina powstała przy użyciu <i>BioRender.com</i>	28
Ryc. 4	Obrazowanie BAT przy użyciu FDG PET/CT. Kolorem żółtym i czerwonym zobrazowano aktywne depozyty brązowego tłuszczu - obszar szyjny i nadobojczykowy (biała strzałka), obszar pachowy i przykręgowy (czarna strzałka) ⁷⁴	29
Ryc. 5	Uproszczony schemat fosforylacji oksydacyjnej eukariontów. Elektrony transportowane są w dół łańcucha oddechowego. Wytworzona w ten sposób siła protonomotoryczna ($\Delta\mu\text{H}^+$) napędza kompleks syntazy ATP (F_0F_1), która katalizuje reakcję fosforylacji ADP z wytworzeniem ATP. UCP1 wykorzystuje $\Delta\mu\text{H}^+$ do produkcji ciepła. Q - koenzym Q, c - cytochrom c ¹⁰¹	32
Ryc. 6	Mechanizm aktywacji transkrypcji <i>UCP1</i> jest procesem wieloczynnikowym. Wzrost stężenia cAMP poprzez stymulację współczulnego układu nerwowego prowadzi do aktywacji PKA, która oprócz uruchomienia szlaku lipolizy, fosforyluje czynnik transkrypcyjny CREB oraz aktywuje kinazę białkową aktywowaną mitogenami p38 (ang. <i>p38 mitogen-activated protein kinases</i> , p38 - MAPK). Kinaza ta z kolei uruchamia dwa niezależne szlaki: fosforyluje ATF-2, aktywując ekspresję <i>PGC-1α</i> (nie pokazano na rycinie) oraz fosforyluje <i>PGC-1α</i> i receptory jądrowe RAR. Po przyłączeniu się odpowiednich ligandów do dimerów receptorów jądrowych: <i>PPARα</i> / <i>PPARγ</i> , <i>PPAR/RXR</i> , <i>RAR/RXR</i> , <i>TR/RXR</i> , utworzone kompleksy rozpoznają i łączą się do im właściwym sekwencji DNA (elementów odpowiedzi) w dystalnym regionie regulatorowym. Aktywacja w proksymalnym regionie promotorowym zachodzi poprzez przyłączenie białek C/EBP oraz ufosforylowanego CREB do elementów odpowiedzi indukując transkrypcję <i>UCP1</i> . Opracowanie własne na podstawie ^{59,103} Rycina powstała przy użyciu <i>BioRender.com</i>	34
Ryc. 7	Uproszczony schemat genu <i>UCP1</i> z zaznaczonymi omawianymi polimorfizmami (skrót <i>Ex</i> oznaczono kolejne eksony w genie). Opracowanie własne na podstawie bazy <i>Ensembl</i>	35
Ryc. 8	Mapa wektora pGL3-Basic (<i>Promega</i>).	43
Ryc. 9	Mapa wektora pGL4.74 (<i>Promega</i>).	43

Ryc. 10	Układ prążków i odpowiadające im masy markera. Po lewej - GeneRuler Low Range DNA ladder (<i>ThermoFisher Scientific</i>), po prawej – GeneRuler 1 kb Plus Dna Ladder (<i>ThermoFisher Scientific</i>).	45
Ryc. 11	Mapy konstruktów przygotowanych do transfekcji. Po lewej – pGL3-Basic z wklonowanym rejonem promotorowym zawierającym wariant A lub C polimorfizmu -112A/C. W środku konstrukt zawierający fragment promotorowy z allelem A lub C oraz fragment regulatorowy 5' z miejscem polimorficznym -3826A lub -3826G. Po prawej konstrukt z fragmentem promotorowym -112A lub C oraz z fragmentem -1766A lub -1766G.	66
Ryc. 12	Analiza genotypów dla SNP A-3826G po cięciu restrykcyjnym enzymem BclI. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-homozygota AA, 3-heterozygota AG, 4-homozygota GG.	72
Ryc. 13	Analiza genotypów dla SNP A-1766G po cięciu restrykcyjnym enzymem BsiHKAI. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-heterozygota AG, 3-blank, 4-homozygota AA. Wśród badanych próbek nie znaleziono homozygoty drugiego rodzaju (GG).	72
Ryc. 14	Analiza genotypów dla SNP A-112C po cięciu restrykcyjnym enzymem MvaI (BstNI). 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-blank, 3-homozygota CC, 4-homozygota AA, 5-heterozygota AC.	73
Ryc. 15	Analiza genotypów dla SNP Ala64Thr po cięciu restrykcyjnym enzymem MspAI1. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2 - blank, 3- homozygota AA (Thr/Thr), 4-heterozygota GA (Ala/Thr), 5- homozygota GG (Ala/Ala), 594 pz – niestrawiony produkt po PCR.	73
Ryc. 16	Analiza genotypów dla SNP Met229Leu po cięciu restrykcyjnym enzymem HindIII. 1-marker O'GeneRuler Low Range DNA ladder, 2-blank, 3- homozygota TT (Met/Met), 4-homozygota AA (Met/Met), 5,6-heterozygota AT (Met/Leu).	73
Ryc. 17	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>UCPI</i> w badanej grupie pacjentów z MetS oraz grupie kontrolnej. Po lewej LD wyrażone wartością parametru D' w procentach, po prawej wartością współczynnika korelacji r ² w procentach. (kolor biały = 0, kolor czerwony 100%).	78
Ryc. 18	Na górze - przykładowy obraz automatycznej elektroforezy żelowej dla 15 próbek genomowego DNA (B1-H2). A1(L) - marker wielkości. DIN (DNA Integrity Number) – ocena integralności DNA. Na dole - przykładowy rozkład wielkości dla dwóch prób: o niskim DIN (3.8) - po lewej oraz wysokim DIN (8.8) - po prawej.	79
Ryc. 19	Na górze – przykładowy obraz automatycznej elektroforezy żelowej dla 15 próbek bibliotek przygotowanych zestawem <i>Truseq Custom Amplicon Low Input Kit</i> (A2-H2). EL1(L) - marker wielkości. Na dole - przykładowy rozkład wielkości dla dwóch wybranych bibliotek. Zielonym prostokątem zaznaczono obraz elektroforezy dla poprawnie przygotowanej biblioteki – widoczny produkt na wysokości 383 pz.	

	Czerwonym prostokątem zaznaczono obraz elektroforezy dla biblioteki, gdzie nie powstał oczekiwany produkt. Taka biblioteka, była odrzucana do dalszych kroków sekwencjonowania NGS.....	80
Ryc. 20	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym. 1 – marker wielkości GeneRuler 1 kb Plus Dna Ladder (<i>ThermoFisher Scientific</i>), 2-10 analizowane biblioteki przygotowane zestawem AmpliSeq (przykładowe próbki).	81
Ryc. 21	Jakość sekwencji na zasadę w próbce od pacjenta nr 1 ze zdiagnozowaną T2DM po użyciu narzędzia <i>Trimmomatic</i> – bibliotekę przygotowano zestawem AmpliSeq.....	82
Ryc. 22	Ocena jakości wszystkich odczytów próbki od pacjenta 1 w grupie T2DM. Bibliotekę przygotowano zestawem AmpliSeq. Wskaźnik Phred określa prawdopodobieństwo błędnego odczytu zasady i wyrażony jest, jako $-10\log_{10}(p)$, gdzie p to procent szans. Tutaj średni wskaźnik Phred wynosi 38, co oznacza, że prawdopodobieństwo błędnego odczytu zasady wynosi 1 na 6309 zasad, co stanowi bardzo dobry wynik i świadczy o dobrej jakości odczytów.	83
Ryc. 23	Przykładowy obraz mutacji genu <i>UCP1</i> w programie IGV_2.8.0 (genotyp AA; pozycja na chromosomie 4: 140 571 632; pacjent z T2DM nr 26). Sekwencja referencyjna przedstawiona jest na dole ryciny.	88
Ryc. 24	Frakcje małej podjednostki rRNA: 23S i 18S. Rozdział elektroforetyczny RNA w 2% żelu agarozowym. 1 - marker, 2 - blank, 3,4,5 – analizowane RNA.	89
Ryc. 25	Zmiana ilości białka UCP1 w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6 – barwienie immunofluorescencyjne (po prawej). Na czerwono – UCP1, na niebiesko – jądro komórkowe (DAPI). Zdjęcia mikroskopowe cytospinów (powiększenie 10x) zebranych w dniu: 0, 4, 7, 14, 28. Po lewej - zdjęcia komórek niebarwionych.	92
Ryc. 26	Lokalizacja białka UCP1 (na czerwono) oraz jądra komórkowego (na niebiesko) w komórkach PAZ6 w 28 dniu różnicowania. Na górze – powiększenie 40x, na dole – powiększenie 10x. BF – ang. <i>bright field</i> (jasne pole).	93
Ryc. 27	Barwienie komórek Oil Red O. A, B – linia komórkowa HepG2. C – linia PAZ6 nieróżnicowana, D – linia PAZ6 w czwartym dniu różnicowania.	93

9.2 Spis tabel

Tabela 1	Charakterystyka komórek tłuszczowych białej i brązowej tkanki tłuszczowej ³⁹	25
Tabela 2	Sekwencje stosowanych starterów i sond TaqMan do oznaczeń wybranych miejsc polimorficznych.....	41
Tabela 3	Sondy TaqMan wykorzystane do badania ekspresji mRNA wybranych genów.	41
Tabela 4	Skład mediów hodowlanych dla wybranych linii komórkowych wykorzystywanych w badaniach.	42
Tabela 5	Skład mieszaniny PCR.....	49
Tabela 6	Etapy oraz czas trwania reakcji PCR.....	49
Tabela 7	Zoptymalizowane warunki PCR-RFLP dla badanych polimorfizmów.	51
Tabela 8	Parametry biochemiczne oraz antropometryczne grupy badanej z podziałem na osoby bez oraz z T2DM.....	69
Tabela 9	Porównanie danych (średnia \pm SD) grupy kontrolnej i grupy pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym.	70
Tabela 10	Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu A-3826G genu <i>UCP1</i> w grupie badanej i kontrolnej.....	74
Tabela 11	Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu A-112C genu <i>UCP1</i> w grupie badanej i kontrolnej.	75
Tabela 12	Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Ala64Thr genu <i>UCP1</i> w grupie badanej i kontrolnej.....	75
Tabela 13	Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu Met229Leu genu <i>UCP1</i> w grupie badanej i kontrolnej.....	76
Tabela 14	Wyniki analizy haplotypów. Do analizy uwzględniono kolejno <i>loci</i> : A-3826G, Ala64Thr, A-112C oraz Met229Leu. Haplotypy o częstości występowania $<0,3$ zostały pominięte w analizie. Miejsce A-1766G zostało odrzucone, ponieważ nie spełnia prawa HWE. Analizę wykonano dzięki narzędziu SHEsis.	76
Tabela 15	Wyniki parametrów (D' oraz r^2) LD dla badanych SNP genu <i>UCP1</i>	77
Tabela 16	Wybrane warianty genu <i>UCP1</i> dla grupy kontrolnej oraz grupy pacjentów T2DM, zidentyfikowane dzięki analizie wyników sekwencjonowania NGS. Istotność statystyczną obliczono testem χ^2 dla poszczególnych alleli oraz genotypów. W tabeli umieszczono polimorfizmy, których istotność statystyczna (porównanie genotypów w modelu dominującym oraz alleli) wynosiła $p \leq 0,1$. Pogrubioną czcionką zaznaczono istotność statystyczną $p \leq 0,05$	85

Tabela 17 Wybrane warianty genu <i>UCPI</i> dla grupy kontrolnej oraz grupy pacjentów ze zdiagnozowanym MetS, zidentyfikowane dzięki analizie wyników sekwencjonowania NGS. Istotność statystyczną obliczono testem χ^2 dla poszczególnych alleli oraz genotypów. W tabeli umieszczono te polimorfizmy, których istotność statystyczna (porównanie genotypów w modelu dominującym oraz alleli) wynosiła $p \leq 0,11$. Pogrubioną czcionką zaznaczono istotność statystyczną $p \leq 0,05$	86
Tabela 18 Statystyka opisowa poszczególnych grup: mediana, wartość minimalna (min), maksymalna (max), kwartyle Q1, Q3 dla poziomu mRNA <i>UCP2</i> w badanych grupach: osób z T2DM i otyłych oraz w grupie kontrolnej wyrażona w $2^{-\Delta Ct}$. W analizie odrzucono dwa najbardziej odstające wyniki.	89
Tabela 19 Wybrane geny markerowe.....	94

9.3 Spis wykresów

- Wykres 1 Względny poziom mRNA *UCP2* ($2^{-\Delta Ct}$) dla grupy osób zdrowych i osób z zaburzeniami metabolicznymi (T2DM i otyłością). Linia poziomą zaznaczono medianę w obu grupach..... 90
- Wykres 2 Ekspresja mRNA *UCP1* w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6. 95
- Wykres 3 Ekspresja mRNA markerów tkanki tłuszczowej w kolejnych dniach różnicowania linii komórkowej PAZ6. 95
- Wykres 4 Wpływ wariantów 112A i 112C na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego oraz norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy p <0,05 (*); p <0,01 (**); p <0,001 (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi konstruktami. 97
- Wykres 5 Wpływ wariantów 112A/3826A lub 112C/3826A, oraz 112A/3826G lub 112C/3826G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy p <0,05 (*); p <0,01 (**); p <0,001 (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi grupami konstruktów. 98
- Wykres 6 Wpływ wariantów 112A/1766A lub 112C/1766A oraz 112A/1766G lub 112C+1766G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach HepG2 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z pGL3-Basic przy p <0,05 (*); p <0,01 (**); p <0,001 (***). Brak różnic istotnie statystycznych między badanymi grupami konstruktów zawierającymi warianty alleliczne -1766 A/G..... 99
- Wykres 8 Wpływ wariantów 112A i 112C na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego oraz norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M. C-, blank i pGL3-Basic nie porównywano do próbki kontrola i nie analizowano pod kątem statystycznym. 101
- Wykres 9 Wpływ wariantów 112A/3826A lub 112C/3826A, 112A/3826G lub 112C/3826G na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M. Różnica statystycznie istotna w porównaniu z wektorem kontrolnym przy p <0,05 (*); p <0,01 (**); p <0,001 (***) – test Kruskala Wallisa, post test Dunn’a. 102
- Wykres 10 Wpływ wariantów 112A/1766A+112C/1766A, 112A/1766G+112C/1766A na poziom aktywności lucyferazy w komórkach PAZ6 hodowanych w warunkach podstawowych, z dodatkiem kwasu 9-cis retinowego i norepinefryny o końcowym stężeniu 1 μ M... 103