

## STRESZCZENIE

Insulinooporność i towarzysząca jej otyłość są poważnym i stale narastającym problemem współczesnej cywilizacji dotyczącym zarówno osoby dorosłe, jak i dzieci. Poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój insulinooporności ze współistniejącą otyłością, która w sprzyjających warunkach może przyczynić się do rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy typu 2, może stać się punktem wyjścia dla opracowania skutecznego leczenia.

Rozwojowi insulinooporności towarzyszą zmiany w ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego i metabolizmu glukozy. Modyfikacje epigenetyczne zarówno na poziomie DNA, jak i histonów mogą wykazywać znaczący wpływ na regulację transkrypcji genów. Regulacja epigenetyczna jest silnie powiązana z czynnikami zewnętrznymi i nie wynika ze zmian w sekwencji samego DNA, a modyfikacje epigenetyczne mogą pojawić się w trakcie życia organizmu. Jest to najważniejszy powód, dla którego analiza epigenomu stała się obiektem zainteresowania w analizie mechanizmów molekularnych rozwoju wielu chorób, w tym chorób metabolicznych. Coraz więcej doniesień naukowych wskazuje na znaczącą rolę modyfikacji epigenetycznych, przede wszystkim metylacji DNA, w patogenezie insulinooporności ze współistniejącą otyłością. Przeprowadzone w ostatnich latach badania dokumentują funkcjonalną zależność pomiędzy otyłością a metylacją DNA w obrębie promotorów genów regulujących wrażliwość na insulinę. Co więcej, opublikowane do tej pory wyniki badań wskazują na wpływ otyłości na metylację promotorów ponad 30 genów istotnych dla szlaku insulinowego.

Głównym celem pracy doktorskiej była ocena zmian na poziomie regulacji epigenetycznej związanych z indukcją insulinooporności przy współistniejącej otyłości zachodzących w ludzkiej tkance tłuszczowej z uwzględnieniem różnic metabolicznych pomiędzy jej frakcją trzewną i podskórną, oszacowanie szybkości pojawiania się zmian epigenetycznych w komórkach tłuszczowych w warunkach *in vitro*, a także ocena uniwersalności zaobserwowanych mechanizmów poprzez uwzględnienie modelu komórkowego w postaci linii mysich preadipocytów 3T3-L1 i przeprowadzenie na nich odpowiednich badań.

Pracę doktorską stanowią trzy publikacje o charakterze badawczym tworzące spójny cykl tematyczny realizujący wszystkie przedstawione założenia projektu badawczego.

Ludzki materiał biologiczny do przeprowadzenia badań stanowiły biopaty brzusznej oraz podskórnej tkanki tłuszczowej pobrane od 47 pacjentów obojga płci w przedziale wiekowym 40-60 lat, w szerokim zakresie BMI w trakcie planowanych zabiegów chirurgicznych. Założone kryteria wykluczenia: zespoły metaboliczne przebiegające z insulinoopornością o innym podłożu (PCOS, zespół Cushinga itp.), miażdżyca, choroby tarczycy i wątroby, choroby zakaźne, neurologiczne, nowotworowe oraz przewlekłe stany zapalne. Wykluczone zostały osoby nadużywające alkoholu oraz abstynenci wtórni. Od każdego pacjenta uzyskano pisemną zgodę na włączenie jego materiału biologicznego do projektu badawczego. Pacjenci zostali podzielni na grupy badane na podstawie określonych parametrów oceniających stopień zaawansowania insulinooporności (HOMA-IR, QUICKI) oraz otyłości (BMI).

Do badań wykorzystano także hodowlę mysich preadipocytów komercyjnej linii 3T3-L1 oraz pierwotną hodowlę komórkową z wyizolowanych ludzkich preadipocytów pochodzących z frakcji podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej, które zostały pobrane od trzech zdrowych mężczyzn w wieku 30-60 lat, mieszczących się w przedziale BMI 20-25 kg/m<sup>2</sup>, niewykazujących zaburzeń metabolicznych w postaci otyłości czy insulinooporności. Od wszystkich pacjentów uzyskano pisemną zgodę na dołączenie ich materiału biologicznego do projektu badawczego.

Szczegółowe cele badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Ocena zmian ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego, metabolizmu lipidów, regulacji transkrypcji i adipogenezy w materiale badanym.
2. Ocena poziomu globalnej metylacji DNA w materiale badanym.
3. Ocena poziomu metylacji DNA w obrębie regionów promotorowych genów kluczowych dla szlaku insulinowego, metabolizmu lipidów, regulacji transkrypcji i adipogenezy w materiale badanym.
4. Ocena modyfikacji epigenetycznych (metylacji, acetylacji) w obrębie histonów w materiale badanym.
5. Określenie mechanizmów rozwoju insulinooporności indukowanej otyłością poprzez zmiany na poziomie epigenetycznym w ludzkiej tkance tłuszczowej z uwzględnieniem różnic metabolicznych pomiędzy trzewną i podskórną tkanką tłuszczową.
6. Oszacowanie czasu powstawania modyfikacji epigenetycznych w adipocytach poprzez obserwacje przeprowadzone na hodowli ludzkich preadipocytów izolowanych z tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej, które zostały poddane różnicowaniu do dojrzałych

adipocytów i indukcji insulinooporności z wykorzystaniem kwasu palmitynowego w odpowiednim stężeniu.

7. Ocena uniwersalności zaobserwowanych mechanizmów poprzez uwzględnienie modelu komórkowego w postaci linii mysich preadipocytów 3T3-L1 i przeprowadzenie na nich odpowiednich badań.

Kluczowe wnioski i obserwacje przedstawione w pracy doktorskiej:

1. Insulinooporności ze współistniejącą otyłością towarzyszą zaburzenia ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego, metabolizmu lipidów, regulacji transkrypcji oraz kodujących adipokiny i enzymy biorące udział w generowaniu metylacji DNA w tkance tłuszczowej, zarówno w komponentie podskórnej jak i trzewnej.
2. Metylacja DNA może stanowić czynnik regulujący ekspresję genów u osób otyłych z insulinoopornością o czym świadczy zaobserwowana zwiększona metylacja DNA w adipocytach osób otyłych z insulinoopornością, zwiększony poziom metylacji regionów promotorowych genów kluczowych dla szlaku insulinowego (*SLC2A4*), a także regulacji adipogenezy i metabolizmu glukozy (*PPARG*, *ADIPOQ*), który korelował ujemnie z poziomem ekspresji tych genów. Analiza korelacji uzyskanych wyników ze wskaźnikiem BMI również sugeruje te zależności.
3. Modyfikacje epigenetyczne w obrębie histonów mają bezpośredni wpływ na regulację ekspresji genów kluczowych dla insulinooporności.
4. Obniżony poziom modyfikacji epigenetycznych u pacjentów z insulinoopornością i zaburzenia w ekspresji badanych genów został potwierdzony na modelu komórkowym bazującym na ludzkich komórkach frakcji trzewnej i podskórnej.
5. Większość zmian epigenetycznych zarówno na poziomie DNA, jak i histonów pojawia się po 72 h od wyidukowania insulinooporności w ludzkim i mysim modelu komórkowym.
6. Tkanka tłuszczowa trzewna wykazuje szybszą podatność na zmiany w regulacji o podłożu epigenetycznym niż jej komponenta podskórna co może świadczyć o jej zwiększonej podatności na zaburzenia o podłożu metabolicznym.
7. Mysi model 3T3-L1 wykazuje większą spójność z wynikami uzyskanymi z komórek komponenty podskórnej.
8. PPAR $\gamma$  jako czynnik transkrypcyjny odgrywa kluczową rolę w rozwoju insulinooporności u osób otyłych poprzez regulację ekspresji innych genów istotnych dla utrzymania wrażliwości na insulinę w komórkach tłuszczowych. Co więcej,

regulacja epigenetyczna ekspresji *PPARG* może stanowić pomost łączący współzależność molekularną pomiędzy otyłością i insulinoopornością.

9. IL-10 jako czynnik przeciwzapalny może pełnić kluczową rolę w poprawie wrażliwości komórek na insulinę. Ekspresja genu kodującego IL-10 może podlegać regulacji epigenetycznej, o czym świadczy obecność modyfikacji epigenetycznych na poziomie DNA i na poziomie histonów w komórkach tłuszczowych z wyindukowaną insulinoopornością.
10. Metylotransferaza DNA kodowana przez gen *DNMT1* i deacetylazy należące do grupy sirtuin (*SIRT1* i *SIRT7*) mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji epigenetycznej na poziomie DNA i histonów w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych.

Podsumowując, w pracy doktorskiej wykazano znaczący wpływ regulacji epigenetycznej, zarówno na poziomie DNA jak i histonów, na zmiany w ekspresji genów kluczowych dla szlaku insulinowego, regulacji adipogenezy i metabolizmu glukozy. Zaburzenia w transkrypcji prowadzące do zmian w syntezie ważnych metabolicznie białek mogą bezpośrednio zakłócać działanie określonych szlaków, jednocześnie prowadząc do rozwoju chorób metabolicznych. Wykazano również, że w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych istotną rolę odgrywa strategiczny czynnik transkrypcyjny w postaci  $PPAR\gamma$ , którego ekspresja genu również podlega regulacji epigenetycznej.

## SUMMARY

Insulin resistance and obesity are serious and growing problems of modern civilization affecting both adults and children. The understanding of molecular mechanisms responsible for the development of insulin resistance with coexisting obesity, which in favorable conditions may contribute to the development of type 2 diabetes, may become a starting point for the development of effective treatment.

The development of insulin resistance is accompanied by changes in the expression of genes crucial for the insulin pathway and glucose metabolism. Epigenetic modifications at both the DNA and histone levels can exhibit significant effects on the regulation of gene transcription. Epigenetic regulation is strongly linked to external factors and is not due to changes in the sequence of DNA itself. Because epigenetic modifications can occur during the life of an organism they become an object of interest in the analysis of molecular mechanisms of the development of many diseases, including metabolic diseases. An increasing number of scientific reports indicate a significant role of epigenetic modifications, primarily DNA methylation, in the pathogenesis of insulin resistance with coexisting obesity. Recent studies document a functional relationship between obesity and DNA methylation within the promoters of genes regulating insulin sensitivity. Moreover, results published so far indicate that obesity affects the methylation of promoters of more than 30 genes relevant to the insulin pathway.

The main objective of this doctoral thesis was to evaluate changes in human adipose tissue at the level of epigenetic regulation related to the induction of insulin resistance in the presence of coexisting obesity, taking into account metabolic differences between its visceral and subcutaneous fractions, to estimate the rate of occurrence of epigenetic changes in adipose cells *in vitro*, as well as to assess the universality of the observed mechanisms by taking into account a cell model in the form of mouse preadipocyte line 3T3-L1 and carrying out appropriate tests on them.

A doctoral thesis consists of three research publications forming a coherent thematic series realizing all presented assumptions of the research project.

The study material consisted of biopsy specimens of visceral and subcutaneous adipose tissue taken from 47 patients of both sexes, aged 40-60 years, in a wide range of BMI at the time of planned surgery. Exclusion criteria were established: metabolic syndromes running with insulin resistance of other causes (PCOS, Cushing's syndrome, etc.), atherosclerosis, thyroid

disease, hepatitis of various causes, infectious diseases, neurological diseases, cancer, and chronic inflammatory conditions. Alcohol abusers and secondary abstainers were also excluded. Written informed consent was obtained from each patient to include their biological material in the research project. Patients were divided into study groups based on specific parameters assessing the severity of insulin resistance (HOMA-IR, QUICKI) and obesity (BMI).

Mouse preadipocyte culture of the commercial 3T3-L1 line and primary cell culture from isolated human preadipocytes derived from the subcutaneous and visceral adipose tissue fractions, which were collected from three healthy men aged 30-60 years, falling within the BMI range of 20-25 kg/m<sup>2</sup>, and not exhibiting metabolic disorders such as obesity or insulin resistance, were also used for this study. Written informed consent was obtained from all patients to include their biological material in the research project.

The specific aims of the research:

1. Evaluation of changes in the expression of genes that are essential for the insulin pathway, lipid metabolism, transcriptional regulation, and adipogenesis in the biological material.
2. Assessment of the level of global DNA methylation in the biological material.
3. Assessment of the level of DNA methylation within the promoter regions of genes involved in the insulin pathway, lipid metabolism, transcriptional regulation, and adipogenesis in the biological material.
4. Evaluation of epigenetic modifications (methylation, acetylation) of histones in the biological material.
5. Determine the mechanisms of obesity-induced insulin resistance development through epigenetic alterations in human adipose tissue, taking into account metabolic differences between visceral and subcutaneous adipose tissue.
6. Estimate of the timing frame of epigenetic modifications in adipocytes through observations made on cultures of human preadipocytes isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue that have been differentiated into mature adipocytes in which insulin resistance was induced using palmitic acid at appropriate concentrations.
7. Evaluation of the universality of the observed mechanisms by considering a cellular model in the form of the 3T3-L1 mouse preadipocyte line and performing appropriate experiments on them.

### Key findings and observations:

1. Insulin resistance with coexisting obesity is accompanied by impaired expression of genes that are essential for the insulin pathway, lipid metabolism, transcriptional regulation, and that encode adipokines and enzymes involved in the generation of DNA methylation in adipose tissue, both in the subcutaneous and visceral components.
2. DNA methylation may be a factor regulating gene expression in obese subjects with insulin resistance by the observed increased DNA methylation in adipocytes of obese subjects with insulin resistance, increased level of methylation of promoter regions of genes key for the insulin pathway (*SLC2A4*), and regulation of adipogenesis and glucose metabolism (*PPARG*, *ADIPOQ*), which correlated negatively with the expression level of these genes. The analysis of the correlation of the obtained results with the BMI index also suggests this relationship.
3. Epigenetic modifications within histones have a direct impact on the regulation of the expression of genes crucial for insulin resistance.
4. Reduced levels of epigenetic modifications in patients with insulin resistance and impaired expression of the genes studied have been confirmed in a cell model based on human visceral and subcutaneous fraction cells.
5. The majority of epigenetic changes at both DNA and histone levels appear 72h after insulin resistance in human and mouse cell models.
6. Visceral adipose tissue is more rapidly affected by epigenetic regulation than its subcutaneous component, which may reflect its increased susceptibility to metabolic disorders.
7. The mouse model of 3T3-L1 shows greater consistency with the results obtained from cells of the subcutaneous component.
8. PPAR $\gamma$  as a transcription factor plays a key role in the development of insulin resistance in obese individuals by regulating the expression of other genes important for maintaining insulin sensitivity in adipose cells. Moreover, epigenetic regulation of *PPARG* expression may bridge the molecular interdependence between obesity and insulin resistance.
9. IL-10 as an anti-inflammatory factor may play a key role in improving cellular insulin sensitivity. Expression of the gene encoding IL-10 may be epigenetically regulated, as evidenced by the presence of epigenetic modifications at the DNA level and the histone level in fat cells with induced insulin resistance.

10. DNA methyltransferase encoded by the *DNMT1* gene and deacetylases belonging to the sirtuin group (SIRT1 and SIRT7) may play a key role in epigenetic regulation at the DNA and the histone level in the development of insulin resistance in fat cells.

In summary, this doctoral thesis demonstrated the significant impact of epigenetic regulation, both at the DNA and histone levels, on changes in gene expression of genes crucial for the insulin pathway, regulation of adipogenesis, and glucose metabolism. Disturbances in transcription leading to changes in the synthesis of metabolically important proteins can directly interfere with specific pathways while leading to the development of metabolic diseases. It has also been shown that a strategic transcription factor PPAR $\gamma$ , whose gene expression is also epigenetically regulated, plays an important role in the development of insulin resistance in fat cells.