



**UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie**

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biochemii Ogólnej

Praca Doktorska

Barbara Lipert

“Rola MCPIP1 w różnicowaniu preadipocytów”

**Promotor:
Prof. dr hab. Jolanta Jura**

**Recenzenci:
Dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Prof. dr hab. med. Julian Świerczyński**

Kraków 2015

**Niniejsza praca została wykonana w ramach projektów naukowych
finansowanych przez:
Ministerstwo Nauki i Szkolnictw Wyższego: 336/N-COST/2008/0
Unię Europejską: COST action BM0602**

PODZIĘKOWANIA

*Chciałabym serdecznie podziękować:
Pani Profesor dr hab. Jolancie Jurze
za cierpliwość, wsparcie naukowe i nieustającą mobilizację.*

*Dziękuję
Zespołowi Zakładu Biochemii Ogólnej,
a także **Zespołowi Zakładu Biochemii Komórki**
za wspaniałą atmosferę pracy.*

*W szczególności wdzięczna jestem
Mateuszowi Wawro i Jakubowi Kochan
za gotowość do merytorycznej dyskusji i pomocy w kwestiach
technicznych,
a **Łukaszowi Skalniakowi** za jego zaraźliwy stoicyzm.*

*Dziękuję
Pracownikom Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
za życzliwość i sympatię.*

*Wdzięczna jestem też moim Dzieciom za to, że na co dzień
przypominają mi uśmiechem o tym, co ważne.*

SPIS TREŚCI

PODZIĘKOWANIA	2
SPIS TREŚCI	3
I. Rozwinięcia skrótów i nazwy linii komórkowych.	5
II. Wstęp	8
1. Tkanka tłuszczowa.....	8
1.1. Typy tkanki tłuszczowej.....	8
1.2. Adipogeneza.....	8
1.2.1. Modelowe komórki prekursorowe adipocytów.....	9
1.2.2. Podłoże molekularne adipogenezy.....	10
1.3. Stan zapalny tkanki tłuszczowej.....	14
2. Białko MCPIP1.....	18
2.1. Odkrycie MCPIP1 i charakterystyka ogólna.....	18
2.2. Regulacja ekspresji MCPIP1.....	19
2.3. Mechanizm działania MCPIP1.....	22
2.4. Efekty komórkowe MCPIP1.....	26
III. Cel prowadzonych badań.	31
IV. Techniki i narzędzia zastosowane w badaniach.	32
1. Materiały i odczynniki.....	32
2. Tworzenie konstruktów genetycznych.....	32
3. Mutageneza ukierunkowana.....	34
4. Przygotowanie wektorów retrowirusowych.....	35
4.1. Przygotowanie konstruktów retrowirusowych.....	35
4.2. Pakowanie wektorów retrowirusowych.....	36
4.3. Oznaczanie miana wektorów retrowirusowych.....	37
5. Hodowle komórkowe.....	39
6. Różnicowanie preadipocytów.....	40
7. Barwienie czerwienią oil-red O.....	40
8. Stymulacja komórek 3T3-L1 IL-1 β	41
9. Modyfikacje genetyczne linii komórkowej 3T3-L1.....	41
9.1. Utworzenie linii komórkowej 3T3-L1 z wyciszoną ekspresją <i>Mcpip1</i>	41
9.2. Utworzenie linii komórkowej 3T3-L1 z ekspresją egzogennego MCPIP1.....	42
10. Izolacja RNA z komórek eukariotycznych.....	43
11. Izolacja RNA z wycinków tkanki tłuszczowej.....	43
12. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym.....	44
13. Western blot.....	46
14. Aktywność lucyferazy.....	47
14.1. Wektor reporterowy aktywacji Creb.....	47
14.2. Wektor reporterowy degradacji 3' UTR.....	48
15. Uzyskanie bakterii kompetentnych oraz ich transformacja.....	48
16. Analiza statystyczna.....	49
V. Wyniki	50
1. Aktywacja genu <i>Mcpip1</i> w czasie adipogenezy.....	50
1.1. Poziom mRNA <i>Mcpip1</i> zmienia się w czasie adipogenezy.....	50
1.2. Indukcja ekspresji <i>Mcpip1</i> następuje tylko pod wpływem wszystkich trzech czynników adipogennych.....	51
2. Poziom białka <i>Mcpip1</i> zmienia się w czasie adipogenezy.....	52
3. Aktywność NF- κ B zmniejsza się w późnych etapach adipogenezy.....	53
4. Wyciszeniu <i>Mcpip1</i> w preadipocytach towarzyszy podniesiony poziom czynników transkrypcyjnych C/ebp β i Ppary.....	54
5. Wpływ ekspresji MCPIP1 w preadipocytach na poziom czynników transkrypcyjnych C/ebp β i Ppary.....	55
5.1. Stabilna ekspresja w preadipocytach.....	56

5.2. Ekspresja egzogenego MCPIP1 wywołana po indukcji różnicowania.....	58
6. Modulacja poziomu C/ebpβ zależy od RNazowej aktywności MCPIP1.....	60
6.1. Ekspresja mutantu MCPIP1ΔPIN nie zmniejsza poziomu transkryptu C/ebpβ.....	60
6.2. MCPIP1 nie wpływa na aktywację czynnika transkrypcyjnego Creb.....	61
6.3. MCPIP1 nie wpływa na wiązanie Creb do promotora C/EBPβ.....	62
6.4. MCPIP1 skraca czas półtrwania transkryptu C/EBPβ.....	63
6.5. MCPIP1 degradowuje 3'UTR transkryptu C/EBPβ.....	64
7. IL-1β indukuje ekspresję <i>Mcpip1</i> w preadipocytach ale nie w adipocytach.....	67
8. Poziom transkryptu MCPIP1 jest podwyższony w otyłości.....	68
VI. Dyskusja.....	70
1. Zastosowany model badawczy.....	70
2. Ekspresja genu <i>Mcpip1</i> w czasie adipogenezy.....	71
3. Wpływ MCPIP1 na poziom C/ebpβ i Ppary w różnicujących komórkach 3T3-L1.....	74
3.1 Efekt ekspresji egzogenego MCPIP1 i wyciszenia ekspresji endogenego <i>Mcpip1</i> w preadipocytach.....	74
3.2. Efekt ekspresji egzogenego MCPIP1 w różnicujących preadipocytach.....	77
4. Wpływ MCPIP1 na poziom transkryptu <i>C/ebpβ</i>	78
4.1. Mechanizm obniżenia ilości transkryptu C/ebpβ przez MCPIP1.....	78
5. <i>Mcpip1</i> jest indukowany przez stan zapalny w tkance tłuszczowej.....	81
6. Perspektywy rozwoju badań nad rolą MCPIP1 w otyłości.....	83
6.1. Inhibicja NF-κB.....	83
6.2. Zahamowanie adipogenezy.....	84
VII. Dane uzupełniające.....	85
VIII. Wnioski.....	87
IX. Streszczenie.....	88
X. Summary.....	90
XI. Bibliografia.....	92

I. Rozwinięcia skrótów i nazwy linii komórkowych.

3T3-F442A – linia fibroblastycznych preadipocytów uzyskana z mysich embrionów

3T3-L1 – linia fibroblastycznych preadipocytów uzyskana z mysich embrionów

AF – domena transaktywacji ekspresji w białkach PPAR

AKT – serynowo/treoninowa kinaza białkowa

ANOVA – metoda statystyczna analizy wariancji

AP-1 – czynnik transkrypcyjny

ARE – sekwencje RNA bogate w nukleotydy adeninowe i uracylowe

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – trifosforan adenozyne

BAT – brązowa tkanka tłuszczowa

BCA – metoda oznaczania stężenia białka wykorzystująca kwas bis-cynchoninowy

BMDMs – komórki makrofagów szpikowych

BMPs – białka morfogenetyczne kości

BSA – bydlęca albumina surowicza

bZip – domena zamka leucynowego

C/EBP – czynnik transkrypcyjny wiążący sekwencję *CCAAT*

C3H10T1/2 – linia komórkowa uzyskana z embrionów myszy typu C3H

cAMP – 3',5'-cykliczny adenozynomonofosforan

CCR – silnie zakonserwowany C-końcowy region w białku MCP1

CD34 – białko powierzchniowe komórek hematopoetycznych

cDNA – komplementarne DNA

ChIP – metoda immunoprecypitacji chromatyny

CHOP – homolog białek C/EBP

CREB – czynnik transkrypcyjny wiążący sekwencję odpowiedzi na cAMP

DBD – domena białek PPAR wiążąca DNA

DEN – wirus dengi

DEPC – dwuwęglan dietylu

DH5 α – szczep bakterii *E. Coli*, opisany przez Douglas Hanahan

DMEM – pożywka hodowlana receptury Eagle, zmodyfikowana przez Dulbecco

DMI – pożywka różnicująca do komórek 3T3-L1

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DNaza – enzym nukleolityczny trawiący DNA

dNTP – trifosforan deoksynukleotydu

DUB – alternatywna nazwa obszaru domeny PIN w białku MCP1, nawiązująca do hipotetycznej aktywności deubikwitynującej

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGFP – białko zielonej fluorescencji, mutant GFP

EMSA – test retardacji żelowej

ER – retikulum endoplazmatyczne

ERK1/2 – kinazy białkowe aktywowane czynnikami zewnątrzkomórkowymi

EV71 – enterowirus 71

Fabp4 – białko wiążące kwasy tłuszczowe

FBS – surowica bydlęca płodowa

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów

GFAP – kwaśne białko włókienkowe

GFP – białko zielonej fluorescencji

GLUT4 – regulowany insuliną transporter glukozy

GSK3 β – kinaza syntezy glikogenu

GTC – izotiocyanian guanidyny

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C
HEK293 – linia komórkowa wyprowadzona z nerki ludzkiego embrionu
HeLa – linia ludzkiego raka szyjki macicy
HepG2 – linia komórek ludzkiego wątrobiaka
HIV – ludzki wirus niedoboru odporności
HT1080 – linia ludzkich komórek włókniakomięsaka
HUVEC – linia ludzkich komórek nabłonka żyły pępowinowej
IBMX – 3-izobutylo-1-metyloksantyna
IGF1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1
IKK – kinaza IκB
IL – interleukina
IκBα – inhibitor NF-κB
JAK – tyrozynowa kinaza białkowa
JEV – wirus Japońskiego zapalenia mózgu
KLF4 – czynnik transkrypcyjny
LAP – jedna z izoform C/EBPβ
LAP* – jedna z izoform C/EBPβ
LB – pożywka bakteryjna opracowana przez Bertani w 1954 r.
LBD –C-końcowa domena białek PPAR wiążąca ligand
LIP – jedna z izoform C/EBPβ
LPS – lipolisacharyd, element ściany bakterii Gram(-)
LTA – kwas lipotejchowy
Malt1 – parakaspaza
MAP – kinazy aktywowane mitogenami
MCE – klonalna ekspansja mitotyczna
MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów
MDA-MB-231 – linia ludzkiego gruczolaka (adenocarcinoma)
MEM – pożywka hodowlana
MG-132 – inhibitor proteasomu
miRNA – mikro RNA, pojedyncza, krótka nić RNA regulująca ekspresję innych genów
M-MLV RT – odwrotna transkryptaza pochodząca z małpiego wirusa białaczki
mRNA – matrycowy RNA
MSCs – mezenchymalne komórki macierzyste
NCBI – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej w USA
NEMO – białko modulujące aktywność *NF-κB*
NF-κB – czynnik transkrypcyjny κB
NLS – sygnał lokalizacji jądrowej
NT2D1 – linia ludzkich komórek neuroprogenitorowych
NYN – alternatywna nazwa domeny PIN w białku MCPIP1
PAMPs – wzorce molekularne związane z patogenami
PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy
PEI – polietylenoamina
PEPCK – karboksykinaza fosfoenolopirogronianu
Pfu – polimeraza termostabilna izolowana z *Pyrococcus furiosus*
PIN – domena o aktywności rybonukleolitycznej
PMA – 12-mirystylo-13-octan forbolu
PPARγ – steroidowy receptor jądrowy, czynnik transkrypcyjny
PPRE – element DNA wiązany przez białka PPAR
Pre-miRNA – RNA w postaci spinki, prekursor mikro RNA
PRR – region w białku bogaty w prolinę
PVDF – polifluorek winylidenu

Rb - białko retinoblastoma
RIPA – bufor lizujący do komórek
RNA – kwas rybonukleinowy
RNaza – enzym nukleolityczny trawiący RNA
RXR – kofaktor białka PPAR
S6K1 – serynowo/treoninowa kinaza białkowa
SCD1 – desaturaza stearylo-CoA
SDS – dodecylosiarczan sodu
SINV – wirus Sindbis
siRNA – RNA w postaci spinki, regulujące ekspresję innych genów
SOX9 – czynnik transkrypcyjny
SRF – kofaktor czynnika transkrypcyjnego Elk-1
STAT3 – czynnik transkrypcyjny
TAK1 – kinaza aktywowana TGF β
TBS – sól fizjologiczna buforowana TRIS
TCR – receptor limfocytów T
TGF β – transformujący czynnik wzrostu β
Th CD4+ – subpopulacja limfocytów
THP-1 – linia ludzkiej ostrej białaczki monocytarnej
TLR – receptory toll-like
TNF – czynnik nekrozy nowotworów
TRIS – organiczny związek buforujący
tRNA – transportujący RNA
TTP – tristetraprolina
U0126 – inhibitor ERK1/2
U937 – linia ludzkiej białaczki monoblastycznej
UBA – jedna z domen białka MCPIP1
UCP1 – termogenina, białko rozprzegające gradient protonów
USP10 – deubikwitynaza 10
UTR – rejon transkryptu nie podlegający translacji
VSV - wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej
VV – wirus ospy i półpaśca
WAT – biała tkanka tłuszczowa
ZF – palec cynkowy

II. Wstęp.

1. Tkanka tłuszczowa.

1.1. Typy tkanki tłuszczowej.

U człowieka wyróżniono dwa zasadnicze typy tkanki tłuszczowej – białą i brązową. Różnią się one morfologią i funkcją oraz rozmieszczeniem w ciele. Biała tkanka tłuszczowa (WAT, ang. *white adipose tissue*) budowana jest przez adipocyty wypełnione dużą, najczęściej pojedynczą kroplą tłuszczową. Objętość cytoplazmy jest w tych komórkach znikoma. WAT kumulowana jest przede wszystkim pod skórą oraz wokół organów wewnętrznych. Oprócz adipocytów w jej skład wchodzi również fibroblasty, preadipocyty, komórki śródbłonka, komórki nerwowe i komórki odpornościowe (18). Zmagazynowane w komórkach tłuszczowych lipidy (trójglicerydy *alias* triacyloglicerole) są substratami energetycznymi uwalnianymi w stanie głodu po zadziałaniu odpowiednich sygnałów hormonalnych. Jednakże WAT pełni również ważną funkcję wydzielniczą - syntezowane przez nią hormony i cytokiny regulują homeostazę energetyczną organizmu. Stąd, dysfunkcja WAT stanowi główną przyczynę chorób metabolicznych takich jak otyłość, cukrzyca typu 2, kacheksja w chorobie nowotworowej i lipodystrofia (29).

Dla odmiany, brązowa tkanka tłuszczowa (BAT, ang. *brown adipose tissue*) bierze udział głównie w termogenezie. Występuje w postaci małych depozytów wokół kręgosłupa, nad obojczykami i przy nadnerczach, ale jej objętość zwiększa się w czasie ekspozycji ciała na chłód. Adipocyty tkanki brązowej wypełnione są wieloma drobnymi kroplami tłuszczowymi i posiadają dużą liczbę mitochondriów (54). Białkiem najbardziej istotnym dla funkcji BAT jest termogenina, nazywana też białkiem UCP1 (ang. *uncoupling protein 1*), umożliwiająca egzotermiczne rozprężenie gradientu protonów bez generowania ATP.

Omówione w dalszej części pracy procesy powstawania komórek tłuszczowych (adipogenezy) będą dotyczyły adipocytów białych. Specyfika różnicowania adipocytów brązowych omówiona została szeroko m.in. przez Seale i wsp. (129).

1.2. Adipogeneza.

Rozwój białej tkanki tłuszczowej u ludzi rozpoczyna się już w czternastym tygodniu rozwoju płodowego (157) i gwałtownie przyspiesza po urodzeniu wskutek zwiększonej podaży pokarmu. U zwierząt, liczba adipocytów rośnie u osobników młodocianych, ale u

osobników dorosłych pozostaje stała (46). Jednakże u zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową, wykazano zarówno przyrost objętości adipocytów, jak i ich liczby (71, 81). Wciąż bez jednoznacznej odpowiedzi pozostaje pytanie, czy jest podobnie w przypadku ludzi. W interesującym badaniu przeprowadzonym z użyciem izotopów węgla ^{14}C pokazano, że u dorosłych ludzi pula adipocytów jest wprawdzie stała, ale podlega ciągłemu odnowieniu, szacowanemu na 10 % komórek rocznie. Co ciekawe, tempo tego procesu nie zależy od stosowanej diety (139). Ponadto, w innym badaniu wykazano, że nawet po znaczącej utracie wagi przez otyłych dorosłych, liczba adipocytów jest zachowana, a zmniejsza się jedynie objętość komórek (90). Ponieważ zmniejszenie objętości adipocytów pociąga za sobą deficyt leptyny, wzmagają się apetyt i jednocześnie zmniejsza się tempo metabolizmu. W niedługim czasie prowadzi to do przywrócenia wyjściowej masy tkanki tłuszczowej (90). Nie dziwi więc fakt, że 2/3 otyłych dzieci pozostaje otyła również w dorosłości, a tylko około 10 % dzieci szczupłych rozwija otyłość w wieku dorosłym (27). Wziąwszy pod uwagę powyższe doniesienia, można przypuszczać, że powiększanie się tkanki tłuszczowej u dorosłych ludzi następuje głównie wskutek pęcznienia adipocytów, bez udziału aktywnej adipogenezy. Pęcznienie komórek postępuje do czasu osiągnięcia pewnej krytycznej objętości, zdefiniowanej we wczesnych etapach życia. Dopiero przyjmowanie stałych nadwyżek energetycznych, przekraczających tę pojemność, wymusza powstanie nowych adipocytów z komórek prekursorowych – preadipocytów i macierzystych komórek mezenchymalnych.

1.2.1. Modelowe komórki prekursorowe adipocytów.

Adipocyty, podobnie jak osteoblasty, chondrocyty i mioblasty, pochodzą od mezenchymalnych komórek macierzystych (32). Proces ich różnicowania, zwany adipogenezą, można podzielić na dwie fazy. W fazie pierwszej, macierzysta komórka mezenchymalna podlega ukierunkowaniu tkankowemu (ang. *commitment*), traci wówczas multipotencjalny charakter i przekształca się w komórkę zdeterminowaną do adipogenezy – preadipocyt. Faza druga adipogenezy to różnicowanie końcowe (ang. *terminal differentiation*), w czasie którego preadipocyt, pod wpływem czynników adipogennych, takich jak glukokortykoidy i insulina, przekształca się w komórkę wypełnioną tłuszczem – adipocyt.

Z badań nad identyfikacją markerów białkowych, charakteryzujących mysie i ludzkie komórki macierzyste zasiedlające tkankę tłuszczową wiadomo, że podstawowym markerem progenitorów preadipocytów jest ekspresja CD34 i Zfp423 (8, 40). Oprócz

CD34 wyróżniono jeszcze i inne markery powierzchniowe, pozwalające na selekcjonowanie i hodowlę *in vitro* progenitorów adipocytów. Jednakże ze względów praktycznych, w badaniach rzadko stosuje się hodowle pierwotne, kierując uwagę w stronę modeli komórkowych. Spośród modeli komórek progenitorowych (macierzystych), szeroko stosowanym jest linia C3H10T1/2. Uzyskano je z mysich embrionów C3H (121). Są to komórki multipotencjalne, zdolne do różnicowania w kierunku miocytów, osteocytów, chondrocytów i adipocytów (116).

Spośród modeli preadipocytów, a więc komórek bardziej dojrzałych i ukierunkowanych tkankowo, używa się najczęściej linii 3T3-F442A i 3T3-L1. Podobnie jak C3H10T1/2, zostały one uzyskane z mysich embrionów, w tym przypadku szczepu Swiss (37). Dojrzałe adipocyty rozwijają się z nich *in vitro* w ciągu 8-10 dni po zadziałaniu stymulantów - insuliny, glukokortykosteroidu (deksametazonu) i inhibitora fosfodiesterazy cAMP (IBMX, tj. 3-izobutylo-1-metyloksantyny). 3T3-F442A i 3T3-L1 są zdolne do różnicowania także *in vivo* po wszczępieniu myszom bezgrasicznym (92, 131). Uważa się, że spośród tych dwu linii preadipocytarnych, 3T3-L1 są mniej dojrzałe, gdyż ekspresjonują więcej inhibitora adipogenezy - Wnt-10b. Gwałtowne obniżenie ekspresji Wnt-10b jest konieczne dla różnicowania preadipocytów i następuje pod wpływem hormonalnej stymulacji adipogenezy (123).

Stosowanie linii klonalnych w badaniach niesie ze sobą pewne ograniczenia. Pierwszym jest to, że rozwijają one wyłącznie adipocyty białe. Po drugie, linie preadipocytów są aneuploidalne, co może wpływać na ich potencjał do różnicowania, a badania z ich użyciem nie uwzględniają kontekstu tkankowego. Ponadto, nie ma jak dotąd linii odzwierciedlających różny status adipocytów w zależności od lokalizacji tkanki tłuszczowej. Tymczasem adipocyty izolowane z depozytów białej tkanki tłuszczowej rozmieszczonych pod skórą, na jelitach i na gonadach różnią się potencjałem do adipogenezy i aktywnością metaboliczną (91, 127).

Pomimo ograniczeń, badania z użyciem obu linii komórkowych umożliwiły określenie mechanizmów genetycznych rządzących adipogenezą. Wiele z odkryć zostało potem potwierdzonych *in vivo*. Przede wszystkim udało się opisać molekularne mechanizmy rządzące ekspresją genów w czasie różnicowania.

1.2.2. Podłoże molekularne adipogenezy.

Wiele czynników zewnątrzkomórkowych wpływa na to czy komórka macierzysta przekształci się w adipocyt. Wśród nich są m.in. białka morfogenetyczne kości,

transformujący czynnik wzrostu β (TGF β), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF1), interleukina 17 (IL-17), czynniki wzrostu fibroblastów 1 i 2 (FGF1, FGF2) (20). Również czynniki fizyczne, jak kształt komórki regulują proces różnicowania (26), stąd różnicowaniu towarzyszy aktywna przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej (22). Z badań prowadzonych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wynika, że podczas adipogenezy konieczne jest wyciszenie szlaku WNT oraz szlaku hedgehog (HH) (20).

Zdefiniowano część wewnątrzkomórkowych regulatorów adipogenezy. Są wśród nich glutation, szlak JAK-STAT3, szlak przekazu sygnału z udziałem białek SMAD, S6K1 oraz elementy kaskady sygnałowej receptora insuliny, tj. AKT i pirofosforan inozytolu. Spośród regulatorów transkrypcji wyróżnia się: białko retinoblastoma (Rb), p53, protoonkogen c-Maf, białko ZFP423 i SOX9 (33).

Końcowym różnicowaniem preadipocytów steruje sieć czynników transkrypcyjnych. Działając synchronicznie, czynniki te uruchamiają i podtrzymują procesy syntezy i akumulacji tłuszczów. Są one także odpowiedzialne za sprzężenie sygnału od insuliny z odpowiedzią metaboliczną, m.in. z transportem glukozy i kwasów tłuszczowych.

Wśród tych czynników transkrypcyjnych są: rodzina białek C/EBP i białko PPAR γ .

Czynniki transkrypcyjne z rodziny C/EBP.

Białka C/EBP (ang. *CCAAT/enhancer binding protein*) należą do dużej rodziny czynników transkrypcyjnych typu bZip (ang. *basic leucine zipper*). Wszystkie C/EBP posiadają C-kończącą domenę zamka leucynowego, niezbędną do dimeryzacji i domenę zasadową umożliwiającą przyłączenie białka do DNA (77). Scharakteryzowano sześciu członków rodziny C/EBP: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ i CHOP. W tkance tłuszczowej białej oraz brązowej ekspresji ulegają białka C/EBP α , β i δ . Białka z rodziny C/EBP mogą tworzyć homodimery lub heterodimery i wiązać te same sekwencje konsensusowe DNA (143).

Jak wynika z badań nad linią 3T3-L1, ekspresja białek C/EBP w trakcie adipogenezy uruchamiana jest w ściśle określonych, sekwencyjnie następujących przedziałach czasowych. Najpierw, wskutek stymulacji hormonalnej inicjującej różnicowanie, syntezowane są C/EBP β i δ . Następnie oba białka aktywują ekspresję C/EBP α i białka PPAR γ . Dalej, C/EBP α i PPAR γ wzajemnie podtrzymują swoją ekspresję i wspólnie uruchamiają syntezę białek efektorowych, odpowiedzialnych za fenotyp dojrzałych adipocytów (20).

Dla białka C/EBP β opisano trzy izoformy. Różni je długość łańcuchów polipeptydowych,

wynikająca z obecności alternatywnych kodonów startu translacji. Najczęściej występującą izoformą C/EBP β jest LAP (35 kDa), następnie LAP* (38 kDa) i LIP (20 kDa). LIP może działać jako inhibitor aktywności transkrypcyjnej pozostałych białek z rodziny C/EBP poprzez formowanie niefunkcjonalnych heterodimerów (111).

Pierwsze badania nad funkcją C/EBP β ujawniły jego zaangażowanie w szlak inicjacji procesów zapalnych. Późniejsze eksperymenty *in vivo* i *in vitro* udowodniły, jak ważne jest to białko również z perspektywy powstawania adipocytów. Pokazano, że fibroblasty izolowane z embrionów myszy z wyłączonymi allelami (ang. *knock-out*) genów *C/ebp β* i *C/ebp δ* (*C/ebp β ^{-/-}*, *C/ebp δ ^{-/-}*) nie ulegają adipogenezie pomimo prawidłowej ekspresji *C/ebp α* i *Ppar γ* (144). Wyłączenie ekspresji genu *C/ebp δ* nie powstrzymuje różnicowania i komórki przekształcają się w dojrzałe adipocyty. Jednak wyłączenie ekspresji genu *C/ebp β* zatrzymuje adipocyty we wczesnej fazie różnicowania, a myszy *C/ebp β ^{-/-}* nie wykazują przyrostu tkanki tłuszczowej, nawet pod wpływem diety wysokotłuszczowej (98).

W eksperymentach *in vitro* pokazano, że ekspresja egzogenna genu *C/ebp β* , ale nie *C/ebp δ* , wywołuje w komórkach 3T3-L1 spontaniczne różnicowanie, tj. nawet przy braku hormonalnych czynników inicjujących. Co więcej, normalnie nie podlegające adipogenezie fibroblasty NIH-3T3 różnicują pod wpływem hormonów jeśli wywoła się ekspresję egzogenego *C/ebp β* . Podobny, choć słabszy efekt wywołuje również ekspresja egzogenego *C/ebp δ* (167). Pokazuje to, że *C/ebp β* jest białkiem niezbędnym nie tylko w indukcji różnicowania preadipocytów, ale i we wcześniejszym etapie, to jest w determinacji ścieżki różnicowania komórek pluripotentnych.

Ekspresja *C/ebp β* w nieróżnicujących preadipocytach jest na niskim poziomie, a samo białko związane jest z DNA w rejonach „adipogennych” (ang. *adipogenic hotspots*), które tymczasowo jednak nie ulegają ekspresji. W przeciągu kilku godzin od stymulacji hormonalnej, ekspresja genu *C/ebp β* (oraz *C/EBP δ*) gwałtownie rośnie (167). Ekspresja *C/ebp β* indukowana jest przez cAMP i jego agonistów poprzez fosforylację i aktywację czynnika transkrypcyjnego Creb (ang. *cAMP-responsive element-binding protein*) (175). Wiadomo, że także szlak JAK2/STAT3 promuje ekspresję *C/ebp β* (176), oraz że bezpośrednim induktorem, sprzężonym zwrotnie negatywnie z ekspresją *C/ebp β* jest czynnik Klf4 (ang. *Krüppel-like factor 4*) (9). Oprócz regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji, *C/ebp β* podlega w adipogenezie również regulacji potranslacyjnej. Niezbędna do oddziaływania z DNA fosforylacja *C/ebp β* prowadzona jest przez kinazy MAP i kinazę syntazy glikogenu GSK3 β (145). Z kolei aktywująca acetylacja *C/ebp β* następuje w

wyniku działania glukokortykosteroidów (160).

Po indukcji ekspresji genów *C/ebpβ* i *C/ebpδ*, różnicujące preadipocyty linii 3T3-L1 i 3T3-F442A podlegają średnio dwóm rundom podziałów komórkowych w procesie określanym jako klonalna ekspansja mitotyczna (ang. *mitotic clonal expansion, MCE*). Jest to krok konieczny w różnicowaniu końcowym. Zahamowanie przejścia do fazy S w czasie MCE blokuje dalszy program adipogenezy w komórkach 3T3-L1, podobnie jak zahamowanie syntezy DNA w komórkach 3T3-F442A (146). Preadipocyty podlegają MCE jednocześnie, ponieważ w czasie stymulacji do różnicowania zsynchronizowane są w cyklu komórkowym na skutek kontaktowej inhibicji wzrostu. Po 1-2 rundach mitozy, komórki wychodzą z cyklu komórkowego i w przeciągu kolejnych 4-6 dni przekształcają się w dojrzałe adipocyty (146). MCE została dobrze opisana dla linii 3T3-F442A i 3T3-L1, nie zaobserwowano jej natomiast dla pierwotnych preadipocytów ludzkich, izolowanych z tkanki tłuszczowej i stymulowanych do różnicowania *in vitro*. Być może dlatego, że takie preadipocyty są komórkami bardziej dojrzałymi i faza MCE przebiegła u nich jeszcze w tkance.

Podziały klonalne zatrzymują się wraz ze spadkiem ilości i aktywności *C/ebpβ* i wzrostem aktywności transkrypcyjnej *C/ebpα*. *C/ebpα* jest regulatorem transkrypcyjnym ekspresji wielu genów późniejszej fazy różnicowania, m.in. desaturazy stearylo-CoA (SCD1) (17), karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (PEPCK) (114), transportera glukozy (GLUT4) (59) i białka UCP1 (173). W eksperymentach *in vitro* pokazano, że wyciszenie ekspresji *C/ebpα* blokuje adipogenezę, natomiast ekspresja egzogennej *C/ebpα* w preadipocytach 3T3-L1 blokuje podziały mitotyczne i indukuje różnicowanie do adipocytów niezależnie od stymulacji hormonalnej. Podobny efekt wywołuje ekspresja egzogennej *C/ebpα* w fibroblastach NIH-3T3 (28). Istotność *C/ebpα* dla adipogenezy potwierdzono w badaniach *in vivo* - myszy z wyłączonym genem *C/ebpα* mają silnie zredukowaną masę brązowej i białej tkanki tłuszczowej (155).

Czynnik transkrypcyjny PPARγ.

Jak wspomniano, końcowe różnicowanie do adipocytów nie byłoby możliwe bez udziału receptora jądrowego PPARγ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) (13). PPARγ (podobnie jak PPARα i PPARβ/δ) jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym ligandem i zalicza się do nadrodziny receptorów jądrowych. Choć każdy z PPAR kodowany jest przez inny gen, białka mają podobną strukturę domen. W N-końcowej części znajduje się domena transaktywacji niezależna od liganda (AF1), po niej jest

wysoce konserwatywna domena wiążąca DNA (DBD) i C-końcowa domena wiążąca ligand (LBD), posiadająca element zdolny do transaktywacji ekspresji zależnej od liganda (AF2) (7). Alternatywne składanie pre-mRNA i różne miejsca inicjacji transkrypcji powodują, że PPAR γ występuje w dwóch izoformach: PPAR γ 1 i dłuższej o 30 N-końcowych aminokwasów PPAR γ 2. PPAR γ 1 ulega ekspresji w adipocytach, preadipocytach, a także w innych tkankach pochodzenia mezenchymalnego (80). Ekspresja PPAR γ 2 ograniczona jest do adipocytów i to właśnie ono odgrywa kluczową rolę w adipogenezie.

Ligandy syntetyczne PPAR γ to tiazolidinediony, stosowane powszechnie w leczeniu insulinooporności (79). Z kolei aktywatorem endogennym jest np. metabolit szlaku syntezy prostaglandyn 15d-PGJ2. Ligandy umożliwiają dimeryzację PPAR γ i innego receptora jądrowego – białka RXR (ang. *retinoid-X receptor*). Powstały heterodimer wiąże się w rejonie promotora do specyficznych sekwencji DNA określanych jako PPRE (ang. *PPAR responsive elements*). Aktywność kompleksu PPAR γ /RXR jest regulowana na wielu poziomach i może odbywać się wskutek asocjacji odpowiednio z korepresorami (np. (NCoR)/deacetylaza 3 histonowa; HDAC3) lub koaktywatorami (np. białko związane z receptorem hormonu tarczycy; TRAP220), a także wskutek potranslacyjnych modyfikacji PPAR γ , w tym fosforylacji, SUMO-ilacji i ubikwitynacji (64).

Oprócz bezpośredniej aktywacji ekspresji genów związanych z dojrzewaniem i funkcją adipocytów, PPAR γ działa również jako transrepresor, to jest hamuje aktywność innych czynników transkrypcyjnych, w tym NF- κ B i AP-1. Pozwala to PPAR γ na zmniejszanie stanu zapalnego (115).

Zmianom ekspresji genów w czasie adipogenezy towarzyszy efekt fenotypowy - komórki prekursorowe ulegają konwersji morfologicznej i funkcjonalnej, przekształcając się z wydłużonych fibroblastycznych preadipocytów w wypełnione kroplami lipidowymi dojrzałe adipocyty.

1.3. Stan zapalny tkanki tłuszczowej.

Od kilkadziesiątu lat znany jest klinicystom związek między otyłością a cukrzycą typu 2, nazywaną też cukrzycą insulinozależną (58). Mechanizm tej zależności długo pozostawał nieodgadniony. Prace ostatniego dziesięciolecia pokazują, że może nim być stan zapalny rozwijający się w tkance tłuszczowej. Pierwszy raz stan zapalny i jego skutki zdrowotne powiązано z tkanką tłuszczową gdy odkryto, że tkanka tłuszczowa osób otyłych posiada wysoką ekspresję TNF (50). Później zidentyfikowano również inne cząsteczki

prozapalne, tj. IL-1 β i IL-6, IL-18, iNOS, TGF- β 1, białko CRP i MCP-1 (3, 62, 149). Okazało się również, że w otyłości często podwyższone jest stężenie białek układu krzepnięcia krwi. Zaburzona jest również produkcja hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową – rezystyny i adiponektyny (66, 75).

Choć niektóre ze wskazanych chemokin i cząsteczek prozapalnych syntezowane są przez powiększone adipocyty (138), głównym źródłem ich syntezy są makrofagi i inne leukocyty rezydujące w tkance tłuszczowej. Wykazano, że liczba makrofagów oraz komórek T (CD4⁺ i CD8⁺) i komórek NK zwiększa się w tkance trzewnej u ludzi i myszy wraz z tyciem (108, 130, 158). Co ciekawe, w obrębie nadmiernie rozrośniętej tkanki tłuszczowej wzmożona jest konwersja makrofagów typu 2, wydzielających cytokiny przeciwzapalne (m.in. IL-10), do makrofagów typu 1, o charakterze prozapalnym, wydzielających m.in. IL-1 β , TNF, IL-6. Konwersji sprzyjają obecne już w bardzo wczesnej fazie insulinooporności komórki odpowiedzi nabytej - limfocyty cytotoksyczne T CD8⁺, limfocyty pomocnicze Th1, Th17 (130, 159). Z kolei chudnięciu, a więc zmniejszaniu objętości tkanki tłuszczowej, towarzyszy zmniejszenie infiltracji tkanki przez komórki odpornościowe i obniżenie ekspresji genów kodujących białka prozapalne. Klinicznym efektem towarzyszącym tym zmianom jest zwiększenie wrażliwości na insulinę, obniżenie ryzyka cukrzycy typu 2 i miażdżycy serca (72).

1.3.1. Geneza stanu zapalnego w otyłości.

Zaobserwowano, że makrofagi w tkance tłuszczowej kumulują się wokół martwych adipocytów. Wysznuło więc przypuszczenie, że infiltracja leukocytów wywoływana jest nekrozą/apoptozą adipocytów, a dochodzi do niej wskutek stresu komórkowego (19). Jedną z możliwych przyczyn stresu komórkowego adipocytów jest lipotoksyczność. Przejawia się ona aktywacją receptora TLR4 (ang. *Toll-like receptor 4*) przez wolne kwasy tłuszczowe, aktywacją kinazy białkowej C lub JNK przez pochodne kwasów tłuszczowych (diacyloglicerol, ceramidy) i aktywacją inflamasomu NLRP3 przez lipidy (119, 141).

Drugą z możliwych przyczyn stanu zapalnego jest stres retikulum endoplazmatycznego (ER) w adipocytach. Stres retikulum endoplazmatycznego występuje gdy komórka poddana jest fluktuacji substratów energetycznych i odżywczych, działaniu toksyn, infekcji wirusowych, hipoksji, akumulacji niesfałdowanych białek, a także konieczności ich zwiększonej syntezy, przy jednoczesnym braku możliwości powiększania się samego organellum. Te ostatnie czynniki występują podczas hipertrofii adipocytów, kiedy to gromadzeniu nadmiaru substratów energetycznych nie towarzyszy aktywna adipogeneza i

powiększające się krople lipidowe zmniejszają przestrzeń cytoplazmatyczną. Stres ER indukuje w komórce złożoną odpowiedź nazywaną UPR (ang. *Unfolded Protein Response*), która ma na celu przywrócić retikulum prawidłowej funkcji. Szlaki UPR są powiązane z układami prozapalnymi JNK–AP-1 i IKK–NF- κ B (93).

Trzecim niepodważalnym czynnikiem dysfunkcji metabolicznej i endokrynnej, jakie towarzyszą otyłości i przyczyniają się do powstania stanu zapalnego tkanki tłuszczowej jest hipoksja. Skojarzone z otyłością obniżenie przepływu krwi przez tkankę tłuszczową u ludzi opisano po raz pierwszy w 1966 roku (78). Efekt ten potwierdzono potem zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Badania na szczurach pokazały, że hipoksja występuje u zwierząt otyłych diabetycznych, ale nie u zwierząt diabetycznych o prawidłowej masie ciała (61). Badania populacyjne ludzi również wskazują na istnienie zależności między otyłością, hipoksją a opornością na insulinę (36, 151). Hipoksja tkanki tłuszczowej występuje gdy zapotrzebowanie na tlen przekracza możliwości jego dostarczenia. W otyłości niewystarczająca dostępność tlenu w tkance tłuszczowej jest efektem jej niewystarczającej waskularyzacji. Wykazano, że spośród dwóch kluczowych w angiogenezie czynników - Vegf i Pdgf, ekspresja ostatniego jest w tkance tłuszczowej otyłych myszy znacząco obniżona (113). Słabemu utlenowaniu tkanki sprzyja ponadto wazokonstrykcja wynikająca z podwyższonego poziomu TNF i angiotensyny II (2). Niedotlenieniu adipocytów sprzyja również wzrost hipertroficzny. Adipocyty hipertroficzne mogą w tkance osiągnąć rozmiar nawet 150 μ m (u myszy) (11), tymczasem tlen dyfunduje w tkance na odległość około 120 μ m (43).

Hipoksja aktywuje stan zapalny za pośrednictwem dwóch czynników transkrypcyjnych: HIF-1 α i NF- κ B. Każdy z nich zawiaduje transkrypcją szeregu genów prozapalnych i angiogennych. Z tego powodu uważa się, że hipoksja nie tylko może być skutkiem, ale i pierwotną przyczyną stanu zapalnego tkanki tłuszczowej w otyłości. Przemawia za tym także obserwacja, że hipoksji tkanki tłuszczowej towarzyszy stres ER, stres oksydacyjny, apoptoza i nekroza adipocytów, a także zmniejszenie syntezy adiponektyny i indukcja syntezy leptyny (47, 150).

1.3.2. Zahamowanie adipogenezy przez stan zapalny.

Negatywny wpływ stanu zapalnego na przebieg adipogenezy dobrze ilustruje eksperyment, w którym preadipocyty stymulowano do różnicowania w obecności TNF. Po pierwsze, TNF obniżał ekspresję adipogennych czynników transkrypcyjnych C/EBP α , C/EBP β i C/EBP δ . W sposób pośredni obniżona została również ekspresja transportera glukozy

GLUT4 i głównego genu późnego różnicowania - PPAR γ (126). Oprócz zmniejszenia ekspresji, TNF obniżał także aktywność transkrypcyjną PPAR γ (31). Powyższe efekty zależały od aktywacji szlaku IKK/NF- κ B i były zniesione w obecności represora NF- κ B - I κ B α (ang. *Inhibitor kappa B alfa*) (126). Oprócz aktywacji szlaku NF- κ B, TNF, jak również IL-6, hamuje ścieżkę sygnałową insuliny poprzez obniżenie ekspresji i dezaktywację białka IRS-1. Powoduje tym powstanie oporności adipocytów na insulinę, co skutkuje przesunięciem równowagi od lipogenezy w kierunku lipolizy i uniemożliwia akumulację kropeł lipidowych przez różnicujące preadipocyty (159).

Mediatory stanu zapalnego obecne w tkance tłuszczowej prowadzą również do zmniejszenia liczby preadipocytów. Zaobserwowano, że w podskórnej tkance tłuszczowej otyłych ludzi jest mniej preadipocytów niż u osób szczupłych (53). Przyczyny upatruje się w transwersji preadipocytów do komórek innego typu, m.in. do komórek fenotypowo zbliżonych do makrofagów. Tezę tę popiera obserwacja, że u otyłych nawet 50 % komórek tkanki tłuszczowej charakteryzuje ekspresja CD68, markera makrofagów (158), oraz że preadipocyty *in vitro* zdolne są do nabycia cech makrofagów (14). Oprócz tego dowiedziono, że otyłość koreluje pozytywnie z liczbą komórek macierzystych (prekursorowych) (53). Możliwe więc, że w otyłości adipogeneza zahamowana jest zarówno na etapie przekształcania komórek prekursorowych w preadipocyty, jak i na etapie różnicowania preadipocytów do adipocytów. Zamiast podlegać adipogenezie, preadipocyty konwertują natomiast do makrofagów. Koncepcja o upośledzeniu adipogenezy wskutek obecności chronicznego stanu zapalnego w tkance tłuszczowej jest obecnie szeroko akceptowana (3, 94,130).

2. Białko MCPIP1.

2.1. Odkrycie MCPIP1 i charakterystyka ogólna.

Białko MCPIP1 zostało odkryte niezależnie przez dwie grupy badawcze podczas eksperymentów mających na celu identyfikację genów regulowanych przez cytokiny prozapalne. Badano wpływ MCP-1 na ekspresję genów w monocytach krwi obwodowej człowieka (177) oraz wpływ IL-1 β na ludzkie makrofagi (57). Posługując się techniką mikromacierzy odkryto pulę transkryptów stymulowanych wymienionymi cytokinami, w tym transkrypty jeszcze nie scharakteryzowane. Wśród nich, najsilniejszej stymulacji podlegał transkrypt genu *ZC3H12A*, kodujący białko o długości 599 aminokwasów. Nazwa *Monocyte Chemotactic Protein 1 – Induced Protein 1* (MCPIP1) została nadana białku w konsekwencji pierwszego opublikowanego induktora ekspresji genu *ZC3H12A*, MCP-1 (177).

W toku dalszych badań wyróżniono w obrębie białka MCPIP1 kilka rejonów, odmiennych strukturalnie i funkcjonalnie. Są to:

- domena UBA (ang. *ubiquitin-associated*) rozciągająca się w zakresie aminokwasów 43-89 (177), oddziałuje z białkiem podlegającym deubikwitynacji prowadzonej przez enzym USP10 (105, 156).
- domena PIN (ang. *PilT N-terminus domain*). Domenie przypisywany jest różny zakres aminokwasów: 139-297 (96), 130-280 (100), 100-300 (162). Określana jest również jako domena DUB lub NYN (zakres aminokwasów 133-300) (162). Domena PIN odpowiedzialna jest za aktywność rybonukleolityczną (96, 100) i wiązanie partnera białkowego – deubikwitynazy USP10 (105, 156).
- domena palca cynkowego (ZF) typu CCCH, od której pochodzi nazwa genu *ZC3H12A*. Domena rozciąga się w zakresie aminokwasów 305-325 i umożliwia oddziaływanie białka z kwasem rybonukleinowym.
- regiony bogate w prolinę PRR (ang. *proline-rich region*), rozciągające się w zakresie aminokwasów 100-126 (PRR1) i 458-536 (PRR2), funkcjonują jako domeny oligomeryzacji (83) i najprawdopodobniej transaktywacji (177).
- region CCR (ang. *C-terminal conserved region*) obejmujący zakres aminokwasów 545-598 (177).

2.2. Regulacja ekspresji MCPIP1.

2.2.1. Aktywacja transkrypcji genu *Mcpip1*.

Ekspresja genu *Mcpip1* następuje bardzo szybko po ekspozycji komórek na czynniki prozapalne i osiąga swój maksymalny poziom 1-4 godziny od stymulacji, po czym zanika (85, 100, 177). W niektórych przypadkach podniesiony poziom ekspresji może się jednak utrzymać powyżej 24 godzin (100, 177).

Spośród czynników aktywujących ekspresję *Mcpip1*, wymienić można:

- MCP-1, co pokazano na komórkach monocytów krwi obwodowej (177), HUVECs (103) mysich fibroblastach linii komórkowej 3T3-L1 (169), prekursorach osteoklastów (154) oraz *in vivo* na tkance serca u myszy z ekspresją egzogennej MCP-1 w kardiomiocytach (177),
- TNF α , w komórkach THP-1 (linia ludzkiej ostrej białaczki monocytarnej) (177), w komórkach U937 (linia ludzkiej białaczki monoblastycznej) (100) i mysich pierwotnych hepatocytach (140),
- IL-1 β , co pokazano na komórkach makrofagów obwodowych (57), na komórkach wątrobiaka linii komórkowej HepG2 (100), na komórkach monocytów linii U937 (100), na komórkach monocytów linii THP-1 (85) i na komórkach mysich hepatocytów pierwotnych (140) oraz fibroblastach błony maziowej (21),
- LPS, co pokazano na makrofagach szpikowych (85), monocytach linii komórkowej U937 (100), na komórkach monocytów linii THP-1 (85), na makrofagach RAW264.7 i monocytach krwi obwodowej (21) oraz *in vivo* w mózgu myszy, po obwodowym podaniu LPS (86),
- PMA (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*), co pokazano na komórkach monocytów linii U937 (100),
- IL-17, co pokazano na komórkach mysich hepatocytów pierwotnych (140) i komórkach HeLa(21),
- składowe bakteryjne, w tym agoniści receptorów TLR, jak kwas lipotejchowy (LTA) z *S. aureus*, dsRNA i flagellina bakteryjna oraz PAMPs bakterii gram-pozytywnych (*S. Aureus*) i negatywnych (*E. Coli*), co pokazano na komórkach makrofagów obwodowych (10),
- DNA wirusowe (adenowirus typu 1) i drożdżowe (*C. Albicans*), co pokazano na komórkach makrofagów obwodowych (10),
- wirusy JEV (wirus japońskiego zapalenia mózgu) i DEN (wirus dengi) w komórkach linii

A549 (87), wirus HIV w komórkach Th CD4+ (89),
- czynniki genotoksyczne, jak etopozyd w komórkach linii HEK293T, włókniakomięsaka (fibrosarcoma) HT1080 i doksorubicyna w komórkach linii gruczolaka MDA-MB-231 (105),
-inhibitory proteasomu (MG-132, epoksomycyna) (133, 134).

Mechanizm molekularny aktywacji transkrypcji genu *Mcpip1* badano posługując się modelem komórkowym - linią wątrobiaka (hepatoma) HepG2. Pokazano, że blokada aktywacji NF- κ B (uzyskana poprzez ekspresję egzogenną dominującego negatywnego mutanta I κ B α) zmniejsza aktywację *Mcpip1* po stymulacji IL-1 β o około 70 % (135). Podobny efekt wywołuje zahamowanie aktywacji kinaz ERK1/2 inhibitorem U0126 (63). Analizy bioinformatyczne sekwencji genu *Mcpip1* ujawniły cztery miejsca wiązania czynnika NF- κ B w obrębie drugiego intronu i jedno miejsce wiązania czynników Elk-1/SRF. Regulacja ekspresji MCPIP1 przez NF- κ B i Elk-1 została potwierdzona poprzez immunoprecypitację chromatyny (ChIP) oraz testem EMSA (63).

2.2.2. Regulacja potranskrypcyjna ekspresji MCPIP1.

Wykazano, że transkrypt genu *Mcpip1* może być degradowany przez swój produkt białkowy. Możliwe to jest dzięki obecności w 3'UTR transkryptu MCPIP1 konserwatywnego ewolucyjnie regionu, tworzącego strukturę „spinki”, podobną do struktury zidentyfikowanej w mRNA mysiej IL-6 (100). Ponadto, *miR-9* może wiązać się do transkryptu *Mcpip1* kierując go do degradacji (163, 164). W obu przypadkach degradacja transkryptu skutkuje obniżeniem ilości białka.

2.2.3. Regulacja na poziomie translacji.

Pojedyncza praca wskazuje na możliwość regulacji poziomu MCPIP1 na poziomie translacji (21). Transkrypt MCPIP1 zawiera w rejonie 5'-UTR dwa kodony AUG powyżej kodonu start, co tworzy dodatkowe dwie otwarte ramki odczytu. Pomiar aktywności lucyferazy w komórkach transfekowanych wektorami reporterowymi wskazał silne obniżenie sygnału dla wektora zawierającego pełny 5'-UTR mRNA kodującego MCPIP1. Natomiast mutacja kodonów AUG w obrębie 5'-UTR przywracała aktywność lucyferazy do poziomu kontroli, jaką był wektor pozbawiony elementów mRNA MCPIP1. Eksperyment ten wskazuje na możliwość represji translacji transkryptu MCPIP1 w wyniku obecności dodatkowych dwóch ramek odczytu (21).

2.2.4. Regulacja potranslacyjna ekspresji MCPIP1.

Aktywacja transkrypcji genu *Mcpip1* poprzez szereg czynników została wykazana na wielu typach komórek. W nielicznych badaniach udało się jednak pokazać towarzyszący jej przyrost na poziomie białka. Skalniak i wsp. pokazali, że blokada proteasomu poprzez inhibitor MG-132 powoduje w komórkach linii nowotworowych HeLa i HepG2 wzrost ilości MCPIP1, właśnie na skutek aktywacji transkrypcji (134). Również infekcja wirusami dengi (DEV) i Japońskiego zapalenia mózgu (JEV) komórek linii A549 pociąga za sobą wzrost poziomu transkryptu i białka (87).

Natomiast w badaniach Akiry i wsp. pokazano, że wskutek stymulacji komórek HeLa przez IL-1 β , lub stymulacji embrionalnych fibroblastów przez LPS oraz stymulacji makrofagów przez wszystkie ligandy TLR z wyjątkiem poly (I:C) dochodzi w ciągu kilkudziesięciu minut do degradacji MCPIP1, po której następuje resynteza białka (54). Wykazano, że degradacja poprzedzona jest fosforylacją MCPIP1 przez kinazy IKK α i IKK β . Fosforylacji podlegają seryny w obrębie motywu DSGXXS. Umożliwia to przyłączenie ubikwityny i proteasomalną degradację białka (54). Choć żadnej innej grupie nie udało się dotąd pokazać spadku ilości MCPIP1 po stymulacji cytokinami, możliwość degradacji MCPIP1 przez proteasom została potwierdzona w badaniach Skalniaka i wsp. (133,134). Oprócz proteasomalnej degradacji odkryto również inny mechanizm negatywnej regulacji aktywności MCPIP1. W limfocytach Th CD4 $^{+}$ stymulacja receptora TCR prowadzi do proteolitycznego cięcia *Mcpip1* w rejonie R111 przez parakaspazę Malt1 (152). Unieczynnienie białka umożliwia ekspresję cytokin prozapalnych.

Podsumowując doniesienia dotyczące regulacji ekspresji i stabilności MCPIP1 uznaje się, że MCPIP1 jest w komórce elementem utrzymania równowagi między stanem podstawowym i stanem zapalnym. Pod wpływem cytokin lub aktywacji receptorów TCR lub TLR dochodzi do szybkiej degradacji MCPIP1. Zniesienie blokady szlaków prozapalnych umożliwia aktywację komórek układu immunologicznego. Ponieważ w czasie odpowiedzi immunologicznej aktywowany jest NF- κ B, możliwy jest ponowny przyrost poziomu transkryptu genu *MCPIP1* i resynteza białka. Dalszy przyrost mRNA kodującego MCPIP1 jest zablokowany wskutek zwrotnej, negatywnej regulacji NF- κ B oraz wskutek degradacji własnego transkryptu.

2.3. Mechanizm działania MCPIP1.

2.3.1. Aktywność rybonukleolityczna.

Obecność palca cynkowego, dwóch rejonów bogatych w prolinę i przewidywanego sygnału lokalizacji jądrowej (NLS) spowodowały, że pierwotnie białku MCPIP1 przypisano rolę czynnika transkrypcyjnego (83). Autorzy postulowali lokalizację jądrową białka, w oparciu o mikrofotografie białka fuzyjnego MCPIP1-GFP w komórkach linii nerki HEK293. W swojej następnej pracy grupa z Florydy pokazała interakcję MCPIP1 z rejonem promotorowym kadheryn 12 i 19 (177). Autorzy zasugerowali jakoby MCPIP1 indukował transkrypcję genów kodujących kadheryny, promując w ten sposób angiogenezę (103). Jednakże późniejsze prace tej grupy (106) oraz prace innych badaczy (100, 142) wykazały głównie cytoplazmatyczną lokalizację MCPIP1, również w komórkach linii HEK293 (100). Szczegółowa analiza przeprowadzona przez Mino i wsp. ujawniła, że MCPIP1 występuje w cytoplazmie, gdzie kolokalizuje z retikulum endoplazmatycznym szorstkim i z rybosomami (103).

Szybko zauważono, że lokalizacja cytoplazmatyczna i palec cynkowy typu C3H upodabnia MCPIP1 do tristetraproliny (TTP), zaangażowanej w degradację transkryptów (96). Tristetraprolina rozpoznaje sekwencje ARE (ang. *AU-rich elements*), obecne w mRNA niektórych krótko żyjących transkryptów w ich 3' – końcowym rejonie niepodlegającym translacji (3' UTR, ang. *untranslated region*). Po związaniu ARE, tristetraprolina rekrutuje egzosom, który trawi cząsteczkę przyłączonego mRNA (12). Istotnie, niedługo potem pokazano, że zarówno mRNA Il-6, Il-12b (96) jak i IL-1 β (100) czy IL-2 (82) są degradowane przez MCPIP1. Jednakże, inaczej niż w przypadku tristetraproliny, degradacja mRNA przez MCPIP1 okazała się niezależna od ARE i egzosomu (96, 100). Zamiast specyficznej sekwencji, MCPIP1 rozpoznaje w obrębie 3'UTR strukturalny motyw typu „spinka do włosów” (ang. *stem-loop*). Motyw ten jest niezbędny, by MCPIP1 mogło związać RNA, ale nie jest konieczny do jego trawienia (54). Trawienie mRNA prowadzone jest przez MCPIP1 dzięki endorybonukleolitycznej aktywności domeny PIN (54, 100). Co ciekawe, rozpoznawany przez MCPIP1 motyw spinki odkryto także w 3'UTR jego własnego mRNA (54) i rzeczywiście udowodniono, że ekspresja białka podlega zwrotnej, negatywnej autoregulacji (100).

Analiza wykonana przez Mino i wsp. wykazała, że degradacja RNA przez MCPIP1 zachodzi wówczas, gdy MCPIP1 tworzy kompleks z helikazą UPF1 a motyw spinki jest odległy o co najmniej 20 nukleotydów od kodonu STOP. Badania prowadzone przez tę

samą grupę w celu identyfikacji sekwencji rozpoznawanej przez MCPIP1 ujawniły, że z największą specyficznością wiązane są spinki, w których pętla zbudowana jest z trzech nukleotydów, przy czym muszą one być uszeregowane pirymidyna-puryna-pirymidyna. Trzon spinki buduje natomiast trzy, pięć albo siedem par nukleotydów (99).

Specyficzność MCPIP1 względem motywu strukturalnego, a nie sekwencji, poszerza spektrum możliwych RNA, podlegających regulacji przez tę rybonukleazę. Na przykład, struktura spinki rozpoznawanej przez MCPIP1 obecna jest też w niektórych prekursorowych mikro RNA (pre-miRNA). Pokazano na komórkach linii HepG2, że wyciszenie MCPIP1 skutkuje podniesieniem poziomu szerokiej gamy miRNA, podczas gdy ekspresja egzogennej MCPIP1 wywołuje efekt odwrotny. Dalej, posługując się analizami *in vitro* wykazano, że efekt ten jest bezpośredni, to znaczy MCPIP1 wiąże a następnie trawi pre-miRNA. Ponieważ MCPIP1 działa przy tym antagonistycznie do rybonukleazy Dicer, blokuje powstawanie funkcjonalnych cząsteczek miRNA, w tym *miR-21*, *miR-26a*, *miR-146a*, *miR-155*, *let-7g*, *miR-135b*, *miR-143*, *miR-16-1* (142). Badania prowadzone na komórkach nabłonka z żyły pępowinowej (HUVEC) ujawniły kolejne pre-miRNA rozpoznawane przez MCPIP1 - *miR-20b* i *miR-34a*. Badania te wykazały ponadto, że hamowanie biosyntezy tych pre-miRNA przez MCPIP1 wiąże się z efektem fenotypowym - stymulacją angiogenezy (125). Warto jednak zaznaczyć, że wyniki opublikowane przez Mino i wsp. negują zdolność MCPIP1 do degradacji pre-miRNA w komórkach fibroblastów *Mcpip*^{-/-} (99).

Oprócz endogennych RNA, MCPIP1 rozpoznaje i trawi również RNA pochodzenia wirusowego. Pokazano na komórkach linii HEK293T, że infekcja wirusem Japońskiego zapalenia mózgu (JEV), wirusem dengi (DEN) (87) i wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) (88) indukują ekspresję MCPIP1. Ekspresja egzogennej MCPIP1 hamuje replikację tych wirusów, z kolei wyciszenie ekspresji MCPIP1 potęguje ich namnażanie (87, 88). Inni autorzy pokazali natomiast, że MCPIP1 poprzez degradację wirusowego RNA obniża replikację wirusa HIV w limfocytach Th CD4⁺ (89). Ekspresja egzogennej MCPIP1 przeciwdziała ponadto infekcji innym wirusami RNA, w tym wirusem Sindbis (SINV), wirusem zapalenia mięśnia sercowego, wirusem grypy oraz adenowirusem, czyli wirusem DNA (87). Antywirusowych efektów nie powoduje jednak mutant MCPIP1/D141N. W tamtym czasie przypuszczano, że domena PIN oprócz własności rybonukleazy posiada też własność deubikwinyazy. Aby rozsądzić czy antywirusowe

własności MCPIP1/D141N wynikają z zahamowanej aktywności RNazy czy deubikwitynazy, posłużono się mutantem MCPIP1/C157A (zniesiona deubikwitynacja, zachowana aktywność RNazy) i mutantem MCPIP1/D225,226A (zniesiona aktywność RNazy, zachowana deubikwitynacja). Wykazano, że do hamowania infekcji wirusowej niezbędna jest aktywność rybonukleolityczna MCPIP1 (87). Dalej, naukowcy pokazali, że mutacje w rejonie palca cynkowego MCPIP1/C312R lub MCPIP1/C318R, ale nie MCPIP1/C306R czy MCPIP1/H322R uniemożliwiają wiązanie i degradację RNA wirusowego (88). Również mutant delecyjny MCPIP Δ 458-536, w którym usunięto domenę PRR2, uniemożliwiając oligomeryzację białka, nie jest aktywny nukleolitycznie (88). Materiał genetyczny nie wszystkich wirusów jest jednak podatny na trawienie. MCPIP1 nie wpływa na replikację enterowirusa 71 (EV71), wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) oraz wirusa ospy i półpaśca (VV) (87).

2.3.2. Inhibicja NF- κ B.

Zanim scharakteryzowano rybonukleolityczne własności MCPIP1, Liang i wsp. zaobserwowali, że ekspresja egzogenego białka fuzyjnego MCPIP1-EGFP zmniejsza sekrecję IL-6 i TNF ze stymulowanych LPS komórek Raw264.7 (85), a wyciszenie MCPIP1 poprzez siRNA powoduje efekt odwrotny. W przeciwieństwie do obserwacji poczynionych dla IL-6, nie zaobserwowano aby ekspresja MCPIP1-EGFP wpływała na zmniejszenie stabilności transkryptu TNF. Autorzy, poszukując mechanizmu molekularnego uzasadniającego ten efekt, odkryli, że MCPIP1 w sposób stały i silny obniża aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (85). W serii eksperymentów z użyciem konstruktów reporterowych, zawierających w rejonie promotora miejsca wiązania specyficzne dla NF- κ B, pokazano, że MCPIP1 obniża aktywność NF- κ B zarówno konstytutywną, jak i indukowaną LPS czy ekspresją egzogenną podjednostki p65 NF- κ B (85). Negatywna regulacja aktywności NF- κ B przez białko MCPIP1 została też pokazana po stymulacji komórek IL-1 β (135).

Niedługo po opublikowaniu pierwszych wyników, zaproponowany został mechanizm negatywnej regulacji szlaku NF- κ B przez MCPIP1 (83). Postulowano, że MCPIP1 działa jako deubikwitynaza i usuwa podjednostki ubikwityny ze zaktywowanych białek TRAF, unieczynniając tym samym kompleks aktywujący NF- κ B (83). Hipotezę tę wysnuto w oparciu o dane eksperymentalne pokazujące, że ekspresja egzogenego MCPIP1 blokuje fosforylację IKK β w komórkach linii Raw 264.7. (83). Natomiast w komórkach makrofagów szpikowych pochodzących od myszy z wyłączoną ekspresją genu kodującego

Mcpip1 fosforylacja IKK β jest wyższa (83). Krytyczna dla aktywności deubikwitynazy domena DUB zmapowana została w obrębie domeny nukleolitycznej PIN. Aktywność deubikwitynazy znoszą: mutacja palca cynkowego (C306R) oraz unieczynnijająca rybonukleazę mutacja w domenie PIN (D141N). Tymczasem mutant MCPIP1/D225A,D226A, choć pozbawiony aktywności rybonukleolitycznej, posiada aktywność deubikwitynazy (83). Grupa opublikowała potem kolejną pracę, w której wykazała, że fosforylacja IKK po stymulacji LPS jest mniejsza w komórkach mięśnia sercowego z kierunkową ekspresją MCPIP1 (106). Trzeba jednakże zaznaczyć, że grupa nie wykazała aby ekspresja MCPIP1 zaburzała status fosforylacji IKK β , czy wpływała na degradację I κ B α w komórkach linii HepG2 (83), mimo wykazywanej w nich silnej inhibicji aktywności NF- κ B przez MCPIP1 (135). Tymczasem praca Matsushity i wsp. nie pokazała zmian aktywności NF- κ B w makrofagach pochodzących od myszy z wyłączoną ekspresją genu MCPIP1 w porównaniu z myszami typu dzikiego (96). Niu i wsp. potwierdzili testami EMSA i pomiarem aktywności lucyferazy zmniejszoną aktywację NF- κ B w komórkach linii HEK293T i HT1080 z ekspresją egzogennej MCPIP1 po zadziałaniu stresu genotoksycznego (105). Potwierdzili też, że mutant MCPIP1/D225,226A również wykazuje efekt hamowania aktywacji NF- κ B, podczas gdy mutanty MCPIP1/D141N i MCPIP1/C306R nie wykazują takiej właściwości. Wyniki tych eksperymentów wskazują więc, że w hamowaniu aktywacji NF- κ B potencjalna aktywność deubikwitynacji jest bardziej istotna niż aktywność RNAzy. Jednakże w kontraście do hipotezy o bezpośredniej degradacji łańcuchów poliubikwityny przez MCPIP1 postulowanej przez Liang i wsp. (83), Niu i wsp. pokazali, że rekombinowane MCPIP1 nie posiada aktywności deubikwitynazy *in vitro*. Zidentyfikowali natomiast deubikwitynazę USP10, oddziałującą z MCPIP1, ale nie z MCPIP1/D141N, czy MCPIP1/C306R. Seria eksperymentów pozwoliła Autorom na zaproponowanie mechanizmu, w którym USP10 blokuje szlak aktywacji NF- κ B odcinając łańcuch poliubikwityny z białka NEMO (*alias* IKK γ) oraz z białka TRAF6, co blokuje aktywację kinaz TAK1 i IKK. Udowodnili tym samym, że MCPIP1 oprócz degradacji szeregu RNA bierze udział w deubikwitynacji białek. Funkcjonuje wówczas jako niezbędne białko dokujące, wiążące enzym (poprzez domenę PIN) i substrat (poprzez domenę UBA) (105, 156).

Bez względu na mechanizm molekularny, bezsprzecznym przejawem obecności MCPIP1 w komórce jest blokada sygnałów prozapalnych. Jednakże efekty fenotypowe wywoływane przez to białko są dużo szersze. Dla wielu typów komórek z ekspresją

egzogenego MCPIP1 zaobserwowano indukcję apoptozy lub różnicowania. Poniżej przedstawiono rezultaty badań nad komórkowymi efektami MCPIP1.

2.4. Efekty komórkowe MCPIP1.

2.4.1. Apoptoza.

Pierwsze doniesienie o proapoptotycznym efekcie MCPIP1 pochodzi z badań *in vitro*. Pokazano, że ekspresja fuzyjnego białka MCPIP1-GFP w komórkach linii HEK293 powoduje śmierć komórek (177). Warto jednak zaznaczyć, że w jednej z prac tej grupy pokazano, że komórki mięśnia sercowego myszy z ekspresją egzogenego MCPIP1 nie wykazują zwiększonej śmiertelności w porównaniu do komórek izolowanych od myszy typu dzikiego (106). Co więcej, Autorzy pokazali, że tkankowo-specyficzna ekspresja MCPIP1 w sercu myszy chroni komórki przed indukowanym przez LPS zaburzeniem ich kurczliwości, charakterystycznym dla przebiegu sepsy. W komórkach mięśnia sercowego z ekspresją egzogenego MCPIP1 obserwowano zmniejszenie aktywacji NF- κ B, zmniejszenie ekspresji iNOS i prowadzących do apoptozy prozapalnych cytokin: TNF, IL-1 β i IL-6 (106) i mi-RNA (177). Konstytutywna ekspresja MCPIP1 w sercu wyraźnie poprawiała również przeżywalność myszy po zablokowaniu tętnicy. Niestety, Autorzy nie dyskutują dysonansu między wnioskami z prowadzonych przez nich eksperymentów *in vitro* i *in vivo*.

Antyapoptotyczną rolę przypisano białku Mecip1 również podczas niedokrwienia mózgu. Wiadomo, że stymulacja LPS przed wywołaniem niedokrwienia mózgu ma właściwości neuroprotektoryjne. Przypisuje się je odpowiedzi przeciwzapalnej, zmniejszającej negatywne skutki niedotlenowania (148). Autorzy pokazali, że podanie myszom LPS wywołuje wzrost ekspresji Mecip1 w mózgu, natomiast brak ekspresji Mecip1 w komórkach pochodzących od myszy *Zc3h12a*^{-/-} powoduje zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych wskutek zwiększonej aktywności kinazy JNK (86). Autorzy uważają, że ochronny dla mózgu w stanie niedokrwienia efekt prestymulacji LPS związany jest z indukcją Mecip1 i jego właściwościami przeciwzapalnymi. Mecip1 indukowany jest w mózgu również po stymulacji elektrycznej i wykazuje właściwości ochronne dla mózgu, w przypadku następującego niedokrwienia (55).

Inne badania wykazały z kolei, że ekspresja fuzyjnego białka MCPIP1-GFP aktywuje kaspazy 3/7 i zmniejsza żywotność komórek linii szczurzych kardiomioblastów H9c2 (171). Ponadto, wyciszenie Mecip1 przez siRNA chroni przed apoptozą indukowaną przez MCP-1 lub hiperglikemię (171), (172). Według Autorów MCPIP1 indukuje produkcję

reaktywnych form tlenu (RFT) i stres retikulum endoplazmatycznego w komórkach, co prowadzi do autofagii i apoptozy (171).

Ekspresja MCPIP1-GFP obniża żywotność i aktywuje apoptozę także w komórkach linii NT2D1 (ludzki nowotwór zarodkowy jądra), co wykazano testami MTT, TUNEL i barwieniem błękitem trypanu (153).

Z kolei na komórkach linii HepG2 i HeLa pokazano, że inhibicja proteasomu inhibitorem MG-132 albo epoksomycyną aktywuje transkrypcję genu kodującego MCPIP1 i prowadzi do znacznego przyrostu MCPIP1 na poziomie białka (133, 134). Indukcja MCPIP1 obniża przeżywalność komórek HeLa, ale nie HepG2, co wykazano testem MTT. Natomiast wyciszenie ekspresji MCPIP1 w komórkach linii HeLa znosi różnice w przeżywalności pomiędzy komórkami traktowanymi inhibitorami proteasomu a kontrolnymi.

Nie wykazano wpływu MCPIP1 na żywotność komórek progenitorowych neuronów (163). Jednakże egzogenna ekspresja MCPIP1 powoduje obniżenie przeżywalności oraz tempa proliferacji wybranych linii neuroblastoma (132).

W niektórych przypadkach sama ekspresja MCPIP1 nie prowadzi do śmierci komórek, sprzyja natomiast apoptozie w warunkach stresowych. Podanie arseniku do komórek linii RAW 264.7 przy jednoczesnej ekspresji MCPIP1-GFP zwiększa odsetek martwych komórek, podczas gdy fibroblasty izolowane z myszy *Zc3h12a*^{-/-} są odporne na takie traktowanie (118).

Biorąc pod uwagę rozbieżność doniesień dotyczących wpływu MCPIP1 na przeżywalność komórek, należy przypuszczać, że rola MCPIP1 w inicjacji i przebiegu apoptozy jest specyficzna komórkowo.

2.4.2. Różnicowanie komórek.

Pierwszym doniesieniem na temat zaangażowania MCPIP1 w proces różnicowania była praca Vrotsos i wsp. (153). Zasugerowano w niej, że MCPIP1 jest białkiem wykonawczym podczas różnicowania neuroprogenitorowych komórek NT2D1 w komórki podobne do astrocytów przebiegającego po stymulacji MCP-1. Pokazano, że ekspresja fuzyjnego białka MCPIP1-GFP jest wystarczająca aby indukować różnicowanie. Proces monitorowano jednak wyłącznie ekspresją pojedynczego markera molekularnego – białka GFAP – o którym wiadomo, że ulega ekspresji w komórkach centralnego systemu nerwowego, w tym w astrocytach. Autorzy wysnuli przypuszczenie, że w różnicowaniu indukowanym przez ekspresję MCPIP1-GFP pośrednim czynnikiem jest najprawdopodobniej indukcja apoptozy.

Udział MCPIP1 w różnicowaniu komórek układu nerwowego został potwierdzony kilka lat później w pracach Yang i wsp. (163) oraz Yao i wsp. (164). Autorzy, posługując się pierwotną hodowlą komórek progenitorowych neuronów, wykazali, że indukcja neurogenezy wywołuje wzrost ekspresji *miR-9*, który reguluje poziom transkryptu genu *MCPIP1*. Zmniejszenie ekspresji MCPIP1, wywołane ekspresją egzogennej *miR-9* skutkuje różnicowaniem w kierunku neuronów, podczas gdy wyciszenie ekspresji *miR-9* prowadzi do zwiększenia poziomu MCPIP1 i skutkuje różnicowaniem w kierunku astrocytów (163). Co więcej, ekspresja egzogennej MCPIP1 wpływa ujemnie nie tylko na neurogenezę, ale też na potencjał do proliferacji i migracji progenitorów neuronów w wyniku zmniejszenia aktywacji dwóch ważnych dla indukcji neurogenezy białek - NF- κ B i CREB (163).

Oprócz neurogenezy, MCPIP1 bierze udział również w angiogenezie. Pierwsze doniesienie na ten temat ukazało się w 2008 roku, kiedy rybonukleolityczne właściwości MCPIP1 były jeszcze nieodkryte. Nju i wsp. zasugerowali wówczas, że MCPIP1 działa jako czynnik transkrypcyjny wiążący się do odcinków promotorowych genów kadheryn 12 i 19. Na poparcie tej tezy Autorzy przedstawili wyniki immunoprecypitacji chromatyny (103). Hipoteza później okazała się błędna, jednak we wspomnianej pracy pokazano, że komórki HUVEC z wyciszoną ekspresją MCPIP1 nie tworzą *in vitro* kapilar po stymulacji MCP-1, a ekspresja kluczowych dla procesu białek - HIF-1 α i VEGF - jest obniżona. W przypadku wywołania ekspresji egzogennej MCPIP1, komórki HUVEC natomiast tworzą kapilary w sposób spontaniczny, a ekspresja HIF-1 α i VEGF jest podwyższona. Związek MCPIP1 z angiogenezą został potwierdzony w kolejnych pracach grupy z Florydy, gdzie pokazano, że oprócz MCP-1 również inne cytokiny – TNF α , IL-1 β oraz IL-8 – indukują w komórkach HUVEC ekspresję MCPIP1 i formowanie kapilar. Grupa wskazała mechanizm molekularny procesu. Według Nich, MCPIP1 indukuje w komórkach stres oksydacyjny, po którym następuje stres retikulum endoplazmatycznego i autofagia (107). W następnej swojej pracy natomiast Autorzy pokazali, że kluczową własnością MCPIP1, pozwalającą na kontrolę angiogenezy, jest aktywność rybonukleolityczna. Badając komórki HUVEC wykazano, że MCPIP1 degraduje *pre-miRNA 20b* oraz *pre-miRNA 34a*, które hamują translację, odpowiednio, HIF-1 α oraz SIRT-1c. Ponadto implikowano, że MCPIP1 prowadzi deubikwitynację HIF-1 α (124). W tym kontekście jednak trzeba mieć na uwadze późniejsze doniesienia o tym, że MCPIP1 nie ma właściwości deubikwitynazy. Asocjuje jednakże z deubikwitynazą USP10, jak i wiąże jej substraty (99).

Proangiogenne właściwości MCPIP1 wykazano również na komórkach macierzystych

pochodzenia mezenchymalnego. Jednojądrzaste komórki szpiku kostnego z egzogenną ekspresją MCPIP1 nabierają fenotypu komórek endotelialnych. Wykazują zmniejszoną ekspresję markerów monocytów (Cd14, Cd11b), a zwiększoną ekspresję markerów komórek endotelialnych (Tie-2, Flk-1, kadheryny 12 i 19). Co więcej, wszczepione do myszy z wywołanym niedokrwieniem kończyny, wywołują zwiększoną neowaskularyzację (105, 156). Również mysie mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego (BM-MSC) posiadające egzogenną ekspresję MCPIP1 wykazują zwiększoną ekspresję markerów angiogennych i zwiększoną tendencję tworzenia kapilar po stymulacji w kierunku angiogenezy. Co więcej, ekspresja MCPIP1 w komórkach BM-MSC może także sprzyjać różnicowaniu do kardiomiocytów, jako że komórki poddane odpowiedniej stymulacji, wykazują większą ekspresję markerów kardiomiocytarnych niż komórki kontrolne (73).

Wpływ MCPIP1 na różnicowanie pokazano również w odniesieniu do jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka, w których MCPIP1 promuje różnicowanie w kierunku osteoklastów. Również i tu Autorzy z Florydy za kluczową uznają zdolność MCPIP1 do indukcji stresu oksydacyjnego, prowadzącego do stresu retikulum i w końcu autofagii (154).

W 2009 roku Younce i wsp. wykazali udział MCPIP1 w procesie powstawania adipocytów (169). Autorzy pokazali, że stymulacja komórek 3T3-L1 standardową mieszaniną różnicującą, zawierającą insulinę, deksametazon i IBMX (DMI), wywołuje w ciągu kilkudziesięciu minut przyrost ilości transkryptu *Mcp-1*, utrzymujący się przez kolejne dni różnicowania. Co więcej, stymulacja fibroblastów 3T3-L1 cytokiną *Mcp-1* ale bez koktajlu różnicującego indukuje adipogenezę, o czym świadczył wzrost poziomu białek markerowych - *C/ebp β* , *Ppar γ* , *Lpl*, *Fabp4* i adiponektyny. Autorzy sugerowali, że *Mcp-1* autokrynnie indukuje ekspresję białka efektorowego, jakim jest *Mcpip1*. Wykazali, że po stymulacji *Mcp-1* wzrasta poziom mRNA kodującego *Mcpip1*, choć nie pokazali czy przekłada się to na zmianę ilości białka. Aby zgłębić rolę *Mcpip1* w adipogenezie Autorzy badali różnicowanie komórek 3T3-L1 z wyciszoną przy użyciu siRNA ekspresją *Mcpip1* lub z egzogenną ekspresją fuzyjnego białka MCPIP1-GFP. Udowodnili, że komórki 3T3-L1 z wyciszoną ekspresją *Mcpip1* różnicują mniej wydajnie niż komórki kontrolne. Z kolei ekspresja białka fuzyjnego MCPIP1-GFP w preadipocytach okazała się wystarczająca do różnicowania i uruchamiała adipogenezę nawet przy braku pożywki różnicującej DMI (169). Co ciekawe, posługując się pierwotnymi fibroblastami od myszy z wyłączoną ekspresją genu *Ppar γ* (*Ppar γ ^{-/-}*) Autorzy pokazali, że ekspresja MCPIP1-GFP wywołuje

adipogenezę nawet przy braku kluczowego w różnicowaniu końcowym czynnika *Pparγ*. Opublikowane wyniki pozwoliły autorom wnioskować, że MCPIP1 jest w adipogenezie białkiem nadrzędnym i niezbędnym dla prawidłowego przebiegu procesu (169).

Wyjaśnienie mechanizmu indukcji adipogenezy przez MCPIP1 Autorzy przedstawili w kolejnej pracy (168). Pokazali mianowicie, że ekspresja egzogenego MCPIP1 w ciągu kilkunastu pierwszych godzin wywołuje w komórkach 3T3-L1 stres oksydacyjny, przejawiający się m.in. ekspresją iNOS. Pod wpływem stresu oksydacyjnego dochodzi do ekspresji czynników transkrypcyjnych *C/ebpβ* i *C/ebpδ* oraz stresu retikulum endoplazmatycznego (ER). Stres ER z kolei prowadzi do autofagii, która według autorów sprzyja ekspresji *Pparγ* i przenosi komórkę w fazę końcowego różnicowania. Pokazano, że farmakologiczna blokada któregokolwiek z wyżej wymienionych procesów hamuje różnicowanie, pomimo ekspresji MCPIP1-GFP (168). Autorzy nie odnieśli się jednak do wcześniej uzyskanego wyniku i nie wyjaśnili w jaki sposób po ekspresji MCPIP1-GFP możliwe jest pełne zróżnicowanie komórek *Pparγ*^{-/-}.

III. Cel prowadzonych badań.

Celem opisanych w niniejszej rozprawie badań było poszerzenie wiedzy na temat roli białka MCPIP1 w fizjologicznych procesach komórkowych. Obserwacji poddano adipogenezę, to jest różnicowanie preadipocytów do komórek tłuszczowych (adipocytów). W momencie rozpoczęcia prac, rola MCPIP1 w tym kontekście była jedynie hipotetyczna. Jej istnienie sugerowały jednakże doniesienia o funkcji MCPIP1 w różnicowaniu innych typów komórek - neurogleju oraz komórek śródbłonna. Za nadrzędny cel postawiono sobie odpowiedź na pytanie czy modulacja poziomu MCPIP1 wpływa na adipogenezę oraz jaki jest mechanizm molekularny obserwowanych zmian.

Poznanie ewentualnego wpływu MCPIP1 na adipogenezę wydawało się szczególnie istotne z perspektywy udowodnionej w licznych układach badawczych indukcji MCPIP1 przez mediatory stanu zapalnego. Stan zapalny tymczasem prawie zawsze współistnieje z nadmiernie rozbudowaną tkanką tłuszczową. Dlatego drugim założeniem badawczym było znalezienie odpowiedzi na pytanie czy MCPIP1 podlega zwiększonej ekspresji w adipocytach i preadipocytach pod wpływem mediatorów stanu zapalnego. Ponadto, analizując wycinki tkanki tłuszczowej pochodzących od pacjentów otyłych o rozpoznanej insulinooporności, podjęto próbę skorelowania wyników badań *in vitro* z warunkami *in vivo*.

IV. Techniki i narzędzia zastosowane w badaniach.

1. Materiały i odczynniki.

Rekombinowana ludzka IL-1 β i TNF - Promokine (Heidelberg, Germany)

Enzymy restrykcyjne - New England Biolabs (Ipswich, USA)

Ligaza T4 - Promega (Madison, USA)

Polimeraza *Pfu* - Life Technologies (New York, USA)

dNTPs - EurX (Gdańsk, Polska)

Odczynniki do reakcji PCR w czasie rzeczywistym - A&A Biotechnology (Gdynia, Polska) oraz Nippon (Dueren, Niemcy)

Odwrotna transkryptaza MMLV-RT - Promega (Madison, USA)

Odczynniki do BCA, aktynomycyna D i PEI - Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Materiały plastikowe do hodowli komórkowych - BD Falcon (San Jose, USA)

Pożywki DMEM, PBS, FBS i roztwór trypsyny/EDTA do hodowli komórkowych - Lonza (Bazylea, Szwajcaria)

Pożywka Opti-MEM - Gibco/LifeTechnologies (Waltham, USA)

Antybiotyki do hodowli bakteryjnych - Bioshop (Kanada)

2. Tworzenie konstruktów genetycznych.

W celu wykonania eksperymentów przedstawionych w tej rozprawie przygotowano 8 konstruktów genetycznych. Ich listę wraz z sekwencjami starterów zawarto w Tabeli 1. Poniżej opisano wspólne etapy tworzenia konstruktów genetycznych z wyłączeniem wektora pmir-C/EBP β _e.

Sekwencje mRNA wszystkich genów, które posłużyły do zaprojektowania starterów pobrano z serwera NCBI. W celu namnożenia wybranej sekwencji mRNA wykorzystywano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) używając polimerazy DNA *Pfu* (Thermo Scientific) zgodnie z instrukcjami producenta. Matrycą w PCR był nowo zsyntezowany cDNA, uzyskany w reakcji odwrotnej transkrypcji z 1 μ g całkowitego RNA i z użyciem 0,25 μ g startera oligo(dT) (por. IV.12). Produkt PCR rozdzielano w żelu agarozowym, w buforze 1 x TAE. Po elektroforezie pojedynczy prążek o właściwej masie wycinano w świetle UV o długości fali 254 nm. Następnie produkt PCR izolowano przy pomocy zestawu do izolacji DNA z żelu agarozowego (Wizard® SV Gel and PCR Clean-

UP System, Promega). Elucję z kolumny prowadzono używając 25 µl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Otrzymaną wstawkę trawiono wybranymi enzymami restrykcyjnymi (5 U enzymu/reakcję) w czasie i w temperaturze właściwej dla enzymu. Następnie DNA oczyszczano zestawem kolumnkowym (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega). Elucję z kolumny prowadzono używając 25 µl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Wektor docelowy trawiono używając 2 µg DNA i 20 U enzymu/reakcję w czasie i w temperaturze odpowiedniej dla enzymów. DNA rozdzielano w 1 % lub w 1,5 % żelu agarozowym, a prążek o odpowiedniej masie wycinano w świetle UV o długości fali 254 nm i oczyszczano zestawem kolumnkowym (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega). Elucję z kolumny prowadzono używając 25 µl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Ligację wstawkę i wektora prowadzono w obecności 400 U ligazy DNA T4 (New England Biolabs), 1x stężonego buforu do ligazy, 50-100 ng wektora docelowego oraz wstawkę w stosunku molowym 3:1 względem wektora docelowego. Reakcję prowadzono w objętości 15 µl, w temperaturze pokojowej przez noc. Mieszaniną reakcyjną transformowano 100 µl bakterii kompetentnych i wysiewano na płytkę z odpowiednim antybiotykiem (por. IV.15). Po całonocnej hodowli w 37°C pojedyncze kolonie przenoszono do 3 ml pożywki płynnej LB z odpowiednim antybiotykiem i hodowano przez noc w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (220 obr./min). DNA plazmidowe izolowano z bakterii przy użyciu zestawu do oczyszczania plazmidów DNA mini kit (A&A Biotechnology). Plazmidy poddawano analizie restrykcyjnej i wybrane z nich wysyłało do sekwencjonowania w firmie Genomed S.A. W eksperymentach używano tylko takich konstruktów, których wstawka była w 100 % komplementarna z klonowanym mRNA.

Wektor pmir-GLO-C/EBPβ_UTR_e utworzono z pominięciem etapu PCR. 1 µg wektora pmir-GLO trawiono enzymem *PmeI* (20 U, 37°C, 1 godzina). Produkty reakcji rozdzielono w żelu agarozowym i oczyszczono zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Utworzono mieszaninę starterów „forward” i „reverse” o stosunku molowym 1:1. Mieszaninę ogrzano w 95°C przez 5 minut, a następnie schłodzono na lodzie przez 5 minut umożliwiając hybrydyzację starterów. Rozcięty wektor i utworzony dupleks starterów zmieszano w stosunku molowym 1:50 i poddano ligacji zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Po transformacji bakterii (por IV 15), wyizolowano pojedyncze klony i sprawdzono poprawność konstruktów poprzez sekwencjonowanie.

Tabela 1. Zestawienie konstruktów genetycznych wraz z sekwencjami starterów użytych do ich otrzymania. W obrębie sekwencji startera małymi literami zaznaczone jest wprowadzone miejsce restrykcyjne. Podkreślono fragment startera komplementarny do klonowanego odcinka mRNA.

nazwa wektora	plazmid	nr mRNA w bazie NCBI	klonowany rejon mRNA	matryca	starter "forward"	starter "reverse"	m-ca restr.
pmir-C/EBPβ_a	pmirGLO (Promega)	NM_005194.3	1504-2113	cDNA HepG2	ATTtctcgagCGT CCCCCTGCCGG CC	ATTgtcgacTTTT TTTACTGCCCC AAAAGGC	XhoI/ SalI
pmir-C/EBPβ_b	pmirGLO (Promega)	NM_005194.3	1504-1756	cDNA HepG2	ATTtctcgagCGT CCCCCTGCCGG CC	ATTgtcgacGGCA GAGGGAGAAGC AGAGA	XhoI/ SalI
pmir-C/EBPβ_c	pmirGLO (Promega)	NM_005194.3	1756-1939	cDNA HepG2	ATTtctcgagTCT CTGCTTCTCCC TCTGCC	ATTgtcgacCATC AACAGCAACAA GCC	XhoI/ SalI
pmir-C/EBPβ_d	pmirGLO (Promega)	NM_005194.3	1920-2113	cDNA HepG2	ATTtctcgagGGC TTGTTGCTGTT GATG	ATTgtcgacTTTT TTTACTGCCCC AAAAGGC	XhoI/ SalI
pmir-C/EBPβ_e	pmirGLO (Promega)	NM_005194.3	1487-1511	nie dotyczy	ttaAAGCTTtagc cgcgccccgcgcgc gtcGAATTCtta	taaGAATTCgacg cgcgccccgcgcgc ctaAAGCTTtaa	PmeI
pMX-puro	pMX-hST2	w celu uzyskania wektora pMX-puro, wycięto enzymami BamHI i NotI wstawkę hST2 z wektora pMX-hST2, stępiono końce fragmentem Klenowa polimerazy I, po czym zamknięto wektor „na tępo”.					
pMX-MCPIP1	pMX-hST2	NM_025079.2	140-1960	cDNA HepG2	ATggatccGAGT CTGAGCTATGA GTGG	ATgeggccgcCAC AGGCAGCTTAC TCACTG	BamHI / NotI
pMX-MCPIP1 /ΔPIN	pMX-hST2	NM_025079.2	(137-565; 1138-2048)	plazmid pcDNA3.1/MCPIP ΔPIN-myc	CGGGATCCCGG AGTCTGAGCTA TGAGTG	GGAATTCCTC ACTGGGGTGCT GG	BamHI / NotI

3. Mutageniza ukierunkowana.

Do wprowadzenia mutacji użyto reakcji PCR, w której amplifikowano obie nici plazmidu przy użyciu starterów o długości 30-40 pz, w których niekomplementarny fragment (zmutowane nukleotydy) znajdowały się w połowie ich długości. Do pojedynczej reakcji przeprowadzonej w 20 µl wykorzystywano 10 ng plazmidu kodującego prawidłową formę genu (pcDNA3.1/MCPIP1-myc), 50 ng każdego ze starterów, 2 mM każdego z dNTP, 2 µl buforu 10 x stężonego oraz 1 U polimerazy DNA *Pfu* (Thermo Scientific). Reakcja PCR rozpoczynała się wstępną denaturacją matrycy w 95°C przez 30 sekund, a następnie przeprowadzano 13 cykli reakcji składającej się z: denaturacji (95°C, 30 sekund), przyłączania starterów (55°C, 1 minuta), wydłużania (68°C, 7 minut) i końcowego etapu wydłużania (68°C, 7 minut). Następnie do reakcji dodawano enzymu restrykcyjnego DpnI i inkubowano 1 godzinę, w 37°C, w celu fragmentacji metylowanego plazmidu matrycowego. Mieszaniną reakcyjną transformowano bakterie kompetentne DH5a (por.

IV.15). Obecność mutacji stwierdzano poprzez sekwencjonowanie uzyskanych konstruktów genetycznych. W Tabeli 2 przedstawiono utworzony konstrukt, wraz z sekwencjami starterów.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w mutagenezie kierunkowej sekwencji kodującej MCPIP1. Czcionką pogrubioną zaznaczono mutowany nukleotyd.

nazwa wektora	użyta matryca	nr mRNA w bazie NCBI	starter "forward"	starter "reverse"
pcDNA3-MCPIP1/D141N	pcDNA3.1/MCPIP1-myc	NM_025079.2	AGACCAGTGGTCATC A ATGGGAGCAACGTGGCC	GGCCACGTTGCTCCCAT T GATGACCACTGGTCT

4. Przygotowanie wektorów retrowirusowych.

4.1. Przygotowanie konstruktów retrowirusowych.

W celu uzyskania cząstek retrowirusowych, będących wektorem sekwencji kodującej ludzki MCPIP1, użyto systemu pMX, opracowanego przez Dr Toshio Kitamura z Uniwersytetu Tokijskiego (69). Wektory pMX, to jest pMX-ekspresyjny (z wbudowanym genem oporności na puromycynę), wektor pMX-GFP (kodujący białko zielonej fluorescencji) i wektor pomocniczy (kodujący białka *gag*, *pol*) udostępniła dr Xiao Xia Li z Cleveland Clinic Foundation, USA. Do wektora ekspresyjnego pMX, w rejonie oflankowanym miejscami restrykcyjnymi enzymów BamHI/NotI, wprowadzono sekwencję MCPIP1 lub MCPIP1 Δ PIN, kodującą mutanta delecyjnego MCPIP1. Sekwencję kodującą MCPIP1 Δ PIN wycięto enzymami BamHI/NotI z wektora pcDNA3.1/MCPIP1 Δ PIN-myc, wykonanego przez dr Danutę Mizgalską, która swoją pracę doktorską wykonała pod opieką prof. dr hab. Jolanty Jury. Mutant pozbawiony jest regionu aminokwasowego 137–296, odpowiadającego rybonukleazowej domenie PIN. Sekwencje użytych starterów i klonowany rejon MCPIP1 wskazano w Tabeli 1. Pusty wektor pMX-puro przygotowano następująco: 2 μ g plazmidu hST2 trawiono enzymami BamHI i NotI w 37°C przez 1,5 godziny. Produkty trawienia rozdzielono w 1 % żelu agarozowym, a prążek o odpowiedniej masie wycięto w świetle UV o długości fali 254 nm i oczyszczono zestawem kolumnkowym (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega). Elucję z kolumny prowadzono używając 25 μ l wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Aby uzupełnić wolne końce 5' pozostawione przez oba enzymy restrykcyjne, wyizolowany DNA poddano reakcji z dużym fragmentem polimerazy DNA I (fragment Klenowa) (New England Biolabs). W tym celu zmieszano: 500 ng wektora, 0,5 U polimerazy Klenowa, 1,5 μ l buforu „2” 10x stężonego (NEB), dNTP w stężeniu końcowym 33 μ M każdy. Mieszaninę uzupełniono wodą do objętości 15 μ l. Reakcję

proawodono w temperaturze 25°C przez 15 minut. Reakcję zakończono przez dodanie roztworu EDTA (Sigma Aldrich) wolnego od RNaz i DNaz w stężeniu końcowym 10 mM i inkubację mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 75°C przez 20 minut. Następnie DNA oczyszczono zestawem kolumnkowym (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega). Elucję z kolumny prowadzono używając 25 µl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Tak przygotowany wektor poddano ligacji: do 20 µl roztworu DNA dodano 1 µl ligazy T4 (400 U) (Promega) i 1,1 µl buforu do ligazy 10x stężonego (Promega). Mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie 10 µl mieszaniny ligacyjnej użyto do transformacji 100 µl bakterii kompetentnych (por. IV.15). Po całonocnej hodowli w 37°C na płytce z ampicyliną pojedyncze kolonie przeniesiono do hodowli płynnych o objętości 3 ml z ampicyliną w stężeniu 100 µg/ml i hodowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem (220 obr./min.). DNA plazmidowe izolowano z bakterii przy użyciu zestawu do oczyszczania plazmidów (DNA mini kit, A&A Biotechnology). Plazmidy poddano analizie restrykcyjnej poprzez trawienie enzymem EcoRI. Enzym rozcina oryginalny plazmid hST2 w dwóch rejonach, z czego jeden leży między sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy BamHI i NotI. Zatem prawidłowy produkt przedstawiał w obrazie elektroforetycznym pojedynczy prążek, natomiast produkt nieprawidłowy – dwa prążki. Do dalszych eksperymentów wybrano jeden z klonów o prawidłowym wzorze elektroforetycznym.

4.2. Pakowanie wektorów retrowirusowych.

Pakowanie wirusów prowadzono w komórkach linii HEK293 - Phoenix Amphotropic. Komórki wysiewano w gęstości $2,5 \times 10^6$ na powierzchnię 55 cm². Transfekcję prowadzono z użyciem polietylenoiminy (PEI). W tym celu, 16 µg plazmidu pMX i 8 µg wektora pomocniczego zawieszonych w 300 µl pożywki opti-MEM (Life Technologies) mieszano z roztworem PEI (1 mg/ml) w stosunku masowym DNA:PEI 1:4. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mieszaninę podawano kroplami do komórek rosnących w 10 ml pożywki wzrostowej. Po 16 godzinach od transfekcji pożywkę hodowlaną zmieniano na świeżą pożywkę wzrostową (DMEM z glukozą 4,5 g/l, 10 % FBS). Pożywkę podawano do naczynia bardzo ostrożnie, żeby zapobiec odklejaniu się komórek. Po upływie 48 godzin od transfekcji pożywka z nad komórek pakujących była zbierana, a komórkom podano 10 ml świeżej pożywki wzrostowej. Zebrana pożywka była wirowana (10 min., 125 g) i filtrowana przez filtr celulozowy 0,45 µm. Pożywkę przechowywano w 4°C do następnego dnia. Po 72 godzinach od transfekcji, pożywka z nad

komórek pakujących była ponownie zbierana, wirowana (10 min., 125 g) i filtrowana przez filtr celulozowy 0,45 μm . Porcje pożywki zebranej po 48 i 72 godzinach od transfekcji łączono ze sobą i dzielono na porcje o objętości 3 ml, które mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C .

Przygotowanie roztworu PEI: Roztwór PEI 1 mg/ml, gotowy do transfekcji przygotowywano rozpuszczając naważkę PEI (Sigma Aldrich) w wodzie czystej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich) ogrzanej do około 80°C . Po ochłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej ustalano pH 7 z użyciem 5 M kwasu solnego. Roztwór filtrowano przez filtr celulozowy 0,20 μm w celu sterylizacji i usunięcia ewentualnych precypitatów PEI. Roztwór porcjonowano po 1,5 ml i przechowywano w -20°C . Przed użyciem, porcję roztworu rozmrażano i inkubowano w temperaturze 75°C przez 15 minut. Pojedynczą porcję PEI używano do trzech razy, każdorazowo zamrażając po użyciu.

4.3. Oznaczanie miana wektorów retrowirusowych.

4.3.1 Oznaczanie stężenia retrowirusowego RNA w supernatantach infekcyjnych

W celu zachowania powtarzalnych warunków transdukcji, oznaczano fizyczne stężenie RNA retrowirusowego w supernatantach infekcyjnych z użyciem metody PCR w czasie rzeczywistym. Zmodyfikowano w tym celu metodę opisaną przez Sanburn i wsp. (128): RNA izolowano z 300 μl supernatantu infekcyjnego z użyciem Trizolu (Life Technologies) precypitację osadu wspomagając dodatkiem drożdżowego tRNA (0,8 μg) (Sigma Aldrich). W tym celu, z rozmrożonej porcji supernatantu infekcyjnego pobierano dokładnie 300 μl i przenoszono do próbówki zawierającej 800 μl Trizolu. Mieszaninę worteksowano przez 10 sekund. Następnie próbówkę krótko wirowano i do mieszaniny dodawano 160 μl chloroformu. Mieszaninę worteksowano przez 30 sekund, a następnie wirowano przez 15 minut, przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C . Z próbówki pobierano dokładnie 600 μl fazy wodnej i przenoszono do nowej próbówki. Do roztworu dodawano 8 μg tRNA drożdżowego (Sigma Aldrich) i 650 μl izopropanolu. Mieszaninę worteksowano przez 10 sekund i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbówki wirowano przez 30 minut, przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C . Nadsącz odciągano pipetą, a do osadu dodawano 300 μl 75 % roztworu etanolu w wodzie traktowanej DEPC. Probówki wirowano 5 minut, przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C . Nadsącz odciągano pipetą, a osad pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej na około 5 minut.

Po wysuszeniu, do preparatu RNA dodawano 17,5 μl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich), 0,5 μl DNazy (2 U) (Stratagene) oraz 2 μl buforu do DNazy (Stratagene).

Reakcję prowadzono w 37°C przez 30 minut. Trawienie DNazą miało na celu wyeliminowanie plazmidowego DNA pozostałego po transfekcji komórek HEK293. Enzym hamowano poprzez dodanie 4 µl wolnego od RNaz i DNaz roztworu EDTA (końcowe stężenie 5 mM) (Stratagene) i inkubację w temperaturze 65°C przez 15 minut. Tak przygotowane RNA poddano reakcji PCR w czasie rzeczywistym z jednoczesną syntezą mRNA (ang. *one-step real-time PCR*).

Skład mieszaniny reakcyjnej:

SKŁADNIK REAKCJI	OBJĘTOŚĆ
RNA po reakcji trawienia DNazą	2,50
woda	0,65
roztwór MgCl ₂ 25 mM (Sigma Aldrich)	1,20
starter F (PAC_F)	0,30
starter R (PAC_R)	0,30
odczynnik SybrGreen (EurX)	5,00
odwrotna transkryptaza MMLV-RT (Promega)	0,05

Każdorazowo przygotowywano również dwie reakcje kontrolne – w jednej z nich wodą zastępowano odwrotną transkryptazę, a w drugiej RNA.

Warunki reakcji:

ETAP REAKCJI	TEMPERATURA [°C]	CZAS [sek.]
odwrotna transkrypcja	42	30
wstępna denaturacja i aktywacja	94	
cykl powtarzany 40x:		
denaturacja produktu	94	15
przyłączanie starterów i elongacja	62	60

W celu potwierdzenia specyficzności produktów po zakończeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym wyznaczano krzywą topnienia produktów. Rezultaty reakcji PCR w czasie rzeczywistym pozwalały na określenie względnej ilości retrowirusowego RNA w poszczególnych supernatantach infekcyjnych.

4.3.2. Oznaczanie miana biologicznego retrowirusów.

Miano wirusów w wymiarze [TU/ml] (ang. *transforming units/ml*) oznaczano dla wektora pMX-GFP. W tym celu komórki linii HeLa transdukowano używając odpowiednio 0 ml, 1 ml, 0,7 ml, 0,5 ml, 0,3 ml supernatantu infekcyjnego uzupełnionego pożywką wzrostową (DMEM z 1 g/l glukozy, 5 % FBS) do objętości 2 ml. Do mieszaniny dodawano polibrenu (Millipore) o stężeniu końcowym 4 µg/ml. 100 tysięcy komórek HeLa zawieszonych w

300 μ l pożywki wzrostowej dodawano do 2 ml pożywki zawierającej supernatant infekcyjny i wysiewano na dołek 6-dołkowej płytki hodowlanej. Po 24 godzinach pożywkę wymieniano na świeżą pożywkę wzrostową. Po trzech dniach od transdukcji komórki odklejano od podłoża z użyciem trypsyny. W tym celu, pożywkę odciągano pipetą pasterowską, a komórki płukano dwukrotnie PBS o objętości 0,5 ml. Po odciążeniu PBS, do komórek dodawano 200 μ l roztworu trypsyny/EDTA (0,05 %/0,02 %) i inkubowano przez około 2 minuty w temperaturze 37°C. Działanie trypsyny blokowano zwieszając odklejone komórki w 1 ml 2 % FBS w PBS. Komórki wirowano (3 minuty, 1000 obr./min.), a osad komórek zawieszano w 0,5 ml 2 % FBS w PBS. Liczbę komórek GFP-pozytywnych w populacji oznaczano cytometrem przepływowym, z pomocą mgr Ani Łabędź-Masłowskiej z Zakładu Biologii Komórki, WBBIB, UJ. Na podstawie uzyskanych danych wykreślano krzywą standardową, odkładając na osi *OX* objętość supernatantu infekcyjnego użytego do transdukcji, a na osi *OY* liczbę cząstek wirusowych. Przyjmowano przy tym, że 1 % GFP-pozytywnych komórek oznacza, że w objętości supernatantu infekcyjnego użytego do transdukcji HeLa znajdowało się 1 tysiąc cząstek wirusowych. Miano obliczano według formuły:

$$T = (PxN)/D, \text{ gdzie } T = \text{miano [TU/ml]};$$

P = odsetek komórek GFP-pozytywnych, N = liczba komórek HeLa w momencie transdukcji (tj. 100,000), D = objętość medium infekcyjnego [ml].

Stężenie efektywne pozostałych wektorów (pMX-puro, pMX-MCPIP1 i pMX-MCPIP1 Δ PIN) wyliczano odnosząc określone dla nich stężenia retrowirusowego RNA do stężenia RNA określonego dla wektora pMX-GFP.

5. Hodowle komórkowe.

Linie komórkowe 3T3-L1 (nr kat. CL-173) i HepG2 (nr kat. HB-8065) zakupiono w ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) (Manassas, VA). Komórki linii HEK-293 otrzymano od prof. dr. hab. Józefa Dulaka, z Zakładu Biotechnologii Medycznej, WBBIB, UJ. Komórki linii HeLa otrzymano od prof. dr. hab. Jerzego Dobruckiego z Zakładu Biofizyki, WBBIB, UJ. Komórki linii HeLa wykorzystywane do oznaczania miana retrowirusów oraz komórki HepG2 hodowano w pożywce DMEM zawierającej glukozę o stężeniu 1 g/l z dodatkiem 5 % surowicy bydlęcej (FBS) (pożywka wzrostowa). Komórki linii HEK-293 oraz 3T3-L1 hodowano w pożywce DMEM zawierającej glukozę o stężeniu

4,5 g/l z dodatkiem 10 % FBS (pożywka wzrostowa). Komórki hodowano w atmosferze nasyconej parą wodną, 5 % CO₂, w temperaturze 37°C. Pasaże prowadzono tak, aby gęstość komórek na naczyniu hodowlanym nie przekroczyła 80 % powierzchni. W celu odklejenia komórek od podłoża używano roztworu trypsyny/EDTA (0,05 %/0,02 %) w PBS. Po odciążeniu pożywki hodowlanej, komórki przepłukiwano roztworem PBS o temperaturze 37°C. Po odciążeniu PBS, do komórek dodawano roztworu trypsyny/EDTA w ilości 1 ml/75 cm² powierzchni hodowlanej. Trypsynizację prowadzono w temperaturze 37°C przez kilka minut - do czasu zaokrąglenia się komórek, co obserwowano pod mikroskopem. Po tym czasie działanie trypsyny blokowano poprzez dodanie do komórek pożywki wzrostowej zawierającej FBS. Komórki spłukiwano z naczynia hodowlanego pipetą serologiczną i przenoszono do probówki wirówkowej. Po odwirowaniu komórek (5 minut, 1000 obr./min.), odciągano płyn z nad osadu a komórki zawieszano przez kilkunastokrotne pipetowanie w 1-5 ml pożywki hodowlanej. Komórki liczone z użyciem licznika automatycznego Cell Countess (Life Technologies) i wysiewano w odpowiedniej liczbie do eksperymentu lub do dalszej hodowli.

6. Różnicowanie preadipocytów.

Do różnicowania komórek 3T3-L1 wysiewano 50 tysięcy komórek na 1 cm² powierzchni hodowlanej. Po osiągnięciu monowarstwy (dzień 0) komórki indukowano do różnicowania poprzez zmianę pożywki wzrostowej na pożywkę różnicującą - DMEM (4,5 g/l glukozy, 10 % FBS) z dodatkiem: insuliny 5 µg/ml (Eli Lilly), deksametazonu 0,25 µM (Sigma Aldrich) i 3-izobutylo-1-metyloksantyny (IBMX) 0,5 mM (Sigma Aldrich). Po dwóch dniach hodowli pożywkę zmieniano na świeżą pożywkę wzrostową, wzbogaconą jedynie w insulinę (10 µg/ml). Pożywkę z insuliną wymieniało co dwa dni, do czasu wykształcenia się dojrzałych morfologicznie adipocytów (dzień 8. od indukcji różnicowania).

7. Barwienie czerwienią oil-red O.

W celu mikroskopowej i ilościowej oceny wydajności różnicowania, po zakończeniu różnicowania, krople tłuszczowe wypełniające komórki 3T3-L1 barwiono czerwienią oil-red O (Sigma Aldrich). W tym celu do pożywki, w której rosły komórki dodawano w stosunku 1:1 (v/v) 10 % roztworu formaldehydu w PBS (POCH) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie płyn z nad komórek odciągano, dodawano 10 %

roztworu formaldehydu i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej lub przez noc w 4°C. Utrwalone komórki płukano dwa razy po 15 sekund 60 % roztworem izopropanolu w wodzie. Po płukaniu izopropanol odciągano, a naczynie z komórkami pozostawiano do wysuszenia. Następnie, bezpośrednio na komórki, dodawano barwnika oil-red O rozpuszczonego w izopropanolu (0,18 % roztwór przygotowany na świeżo z roztworu 0,3 %). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej komórki płukano pięć razy pod bieżącą wodą. Wykonywano mikrofotografie wybarwionych komórek, po czym barwnik ekstrahowano 100 % izopropanolem. Absorbancję barwnika mierzono w świetle o długości fali 490 nm przy użyciu spektrofotometru XMark Microplate Spectrofotometer (BioRad).

8. Stymulacja komórek 3T3-L1 IL-1 β .

Wodny roztwór cytokiny o stężeniu 100 ng/ μ l rozcieńczany był każdorazowo w pożywce wzrostowej do końcowego stężenia 10 ng/ml. Pożywka hodowlana znad komórek była odciągana, po czym dodawano pożywki zawierającej cytokinę. Komórki przed stymulacją nie były wyciszane poprzez zmniejszenie ilości surowicy, a liczę komórek wykonywano w czasie właściwym dla każdego zaznaczonego punktu pomiarowego.

9. Modyfikacje genetyczne linii komórkowej 3T3-L1.

9.1. Utworzenie linii komórkowej 3T3-L1 z wyciszoną ekspresją *Mcpip1*.

Spośród czterech komercyjnie zamówionych shRNA przeciw *Mcpip1* (SABiosciences nr kat. KH16134N) tylko sh2 okazało się wydajnie wyciszać ekspresję *Mcpip1* i zostało użyte w dalszych eksperymentach. Plazmid zawierał sekwencję shRNA kodowaną pod promotorem U1 i gen oporności na neomycynę.

Komórki transfekowano kompleksami shRNA i Lipofektaminy 2000 (Life Technologies) w pożywce pozbawionej FBS. Zastosowano stosunek DNA do lipofektaminy i procedurę transfekcji opisaną w instrukcji producenta. Transfekcję prowadzono na szalce hodowlanej Φ 10 cm. 60 μ l Lipofektaminy 2000 zmieszano z 1,5 ml pożywki opti-MEM (Life Technologies) i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zawiesinę Lipofektaminy 2000 w Opti-MEM dodano do 24 μ g DNA zmieszanego z 1,5 ml pożywki Opti-MEM, delikatnie zamieszano i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Komórkom wysianym 24 godziny wcześniej i rosnącym na szalce w gęstości 60-70 % zmieniono pożywkę na 10 ml świeżej pożywki wzrostowej (DMEM z 4,5 g/l

glukozy i 10 % FBS). Przygotowane kompleksy DNA-Lipofektamina 2000 dodawano do komórek kroplami bezpośrednio na pożywkę. Kilka razy poruszono szalkę, żeby umożliwić równomierne zmieszanie kompleksów z pożywką, po czym szalkę odstawiono do inkubatora hodowlanego. Po 4 godzinach od transfekcji komórki odklejono od podłoża z użyciem trypsyny. W tym celu odciągnięto pożywkę hodowlaną, komórki przepłukano 3 ml PBS o temperaturze 37°C i dodano 1 ml roztworu trypsyny/EDTA (0,05 %/0,02 %) w PBS o temperaturze pokojowej. Komórki inkubowano z roztworem trypsyny przez ok. 3 minuty, tj. do czasu zaokrąglenia się komórek, po czym zablokowano działanie trypsyny przez dodanie 3 ml pożywki wzrostowej. Komórki zwirowano (5 minut, 1000 obr./min.), zawieszono w pożywce wzrostowej i rozdzielono na 4 nowe szalki hodowlane Φ 10 cm. W celu wyeliminowania komórek nietransfekowanych, po 24 godzinach od transfekcji do pożywki hodowlanej, w której rosły komórki dodano gentamycyny G418 (Sigma Aldrich) (600 μ g/ml). Hodowlę w obecności antybiotyku prowadzono przez 14 dni, pasażując komórki tak, by nie przekroczyły gęstości 70 %. Po 14 dniach selekcji komórki wysiewano do eksperymentów w pożywce wzrostowej zawierającej gentamycynę (300 μ g/ml).

9.2. Utworzenie linii komórkowej 3T3-L1 z ekspresją egzogennej MCPIP1.

W celu wywołania ekspresji MCPIP1 w preadipocytach 3T3-L1, komórki transdukowano wektorami retrowirusowymi. Użyto wektorów: pMX-MCPIP1 kodującego kompletne białko, pMX-MCPIP1 Δ PIN kodującego mutanta delecyjnego oraz pMX-puro jako wektora kontrolnego. Objętość supernatantu infekcyjnego zawierającą 68×10^3 TU (ang. *transforming units*) (por. IV.4.3) pobrano z porcji rozmrożonej w temperaturze 37°C i uzupełniono do 10 ml pożywką wzrostową (DMEM z 4,5 g/l glukozy, 10 % FBS). Do mieszaniny dodano 2 ml pożywki wzrostowej zawierającej $1,5 \times 10^6$ komórek i polibrenu (Millipore) o końcowym stężeniu 4 μ g/ml. Komórki wysiano na powierzchnię 150 cm². Po 24 godzinach od infekcji pożywkę zmieniono na świeżą pożywkę wzrostową. Po 72 godzinach od infekcji do pożywki dodano puromycyny w stężeniu selekcyjnym (3 μ g/ml). Selekcję prowadzono przez 5 kolejnych dni, w razie konieczności komórki pasażowano tak, aby ich gęstość nie przekroczyła 70 % powierzchni naczynia. Eksperymenty rozpoczynano po 5 dniach hodowli komórek w obecności antybiotyku.

W przypadku eksperymentów z opóźnioną ekspresją egzogennych MCPIP1 i MCPIP1 Δ PIN, infekcję prowadzono równocześnie ze stymulacją do różnicowania. Komórki 3T3-L1 rosnące w monowarstwie na powierzchni 3,8 cm² (dołek 12-dołkowej płytki hodowlanej) transdukowano mieszaniną supernatantu infekcyjnego zawierającego

17×10^3 TU i pożywki wzrostowej w 2 ml objętości całkowitej. Do mieszaniny dodawano polibren (4 $\mu\text{g/ml}$) i czynniki adipogenne (insulina, deksametazon, IBMX) w stężeniach właściwych dla pożywki różnicującej (por. IV.6). Po 24 godzinach od infekcji pożywkę zmieniano na pożywkę różnicującą, a po 48 godzinach od infekcji na pożywkę wzrostową wzbogaconą jedynie w insulinę (10 $\mu\text{g/ml}$). Pożywkę z insuliną wymieniano co dwa dni, do czasu wykształcenia się dojrzałych morfologicznie adipocytów (dzień 8-11).

10. Izolacja RNA z komórek eukariotycznych.

RNA z komórek 3T3-L1 lub HepG2 izolowano używając metody Chomczynski-Sacchi (16). Komórki rosnące na naczyniu hodowlanym płukano zimnym roztworem PBS. W przypadku adipocytów 3T3-L1 używano PBS w temperaturze pokojowej, aby uniknąć odklejania się komórek. Po odciągnięciu PBS komórki lizowano roztworem GTC zawierającym 4 M tiocyjanian guanidyny, 25 mM octan sodu, pH 7,0, 0,5 % m/o N-laurynian sarkozyny i 100 mM β -merkaptoetanol. Lizaty komórkowe przenoszono do probówek i mrożono w -20°C . W następnym etapie izolacji do 500 μl rozmrożonych lizatów dodawano kolejno: 50 μl 2 M octanu sodu, pH 4,0, 500 μl fenolu i 130 mieszaniny chloroform/alkohol izoamyłowy (49:1). Próbkę wortexowano przez 5 sekund i po 10 minutach inkubacji na lodzie wirowano przy 12 tys. g, przez 20 minut w temperaturze 4°C . Fazę wodną przenoszono do nowej probówki, dodawano 600 μl izopropanolu 100 %. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wytrącone RNA wirowano przez 30 minut przy 15 tys. g, w temperaturze 4°C . Po odciągnięciu supernatantu, do osadu dodano 500 μl roztworu 75 % etanolu w wodzie traktowanej DEPC. Probówkę wirowano przez 5 minut przy 15 tys. g, w temperaturze 4°C . Po dwóch rundach przemywania osadu, etanol odciągano pipetą a oczyszczone RNA suszono około 10 minut w temperaturze pokojowej. Osad rozpuszczano w 15-30 μl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Stężenie RNA mierzono z użyciem spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop), natomiast integralność RNA sprawdzano prowadząc elektroforezę w 1 % żelu agarozowym.

11. Izolacja RNA z wycinków tkanki tłuszczowej.

Wycinki podskórnej tkanki tłuszczowej od ludzi pobierane były podczas operacji ginekologicznych lub gastrologicznych. Tkanki zanurzone w odczynniku RNA Later (Life Technologies) dzielono na mniejsze fragmenty i około 50 mg tkanki przenoszono do probówki zakręcannej o objętości 2 ml. Do probówki dodawano 1 ml odczynnika Trizol

(Life Technologies) i natychmiast homogenizowano z użyciem mechanicznego homogenizatora kulkowego (Qiagen) przy częstotliwości 300 Hz przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po homogenizacji próbówki wirowano przez 10 minut przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C. Górną fazę lipidową odciągano, a pozostały supernatant przenoszono do nowej próbówki. Do supernatantu dodawano 200 µl chloroformu i worteksowano przez 10 sekund. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 15 minut przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C. Fazę wodną przenoszono do nowej próbówki i mieszano z 500 µl 100 % izopropanolu. Probówkę wytrząsano przez 10 sekund, po czym wirowano przez 30 minut przy 12 tys. g, w temperaturze 4°C. Nadsącz odciągano, a do osadu dodawano 500 µl roztworu 75 % etanolu w wodzie traktowanej DEPC. Probówkę wirowano przy 12 tys. g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Po dwóch rundach przemywania osadu, etanol odciągano pipetą, a oczyszczone RNA suszono przez około 10 minut w temperaturze pokojowej. Osad rozpuszczano w 30 µl wody wolnej od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich). Stężenie RNA mierzono z użyciem spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop), integralność RNA sprawdzano prowadząc elektroforezę w 1 % żelu agarozowym.

Wycinki tkanki trzewnej od myszy db/db oraz myszy typu dzikiego pobierano tuż po dekapitacji zwierząt i mrożono w ciekłym azocie. Około 50 mg zamrożonej tkanki przenoszono w parach ciekłego azotu do zakręcanej próbówki o objętości 2 ml. Do próbówki dodawano 1 ml odczynnika Trizol (Life Technologies) i natychmiast homogenizowano tkankę oraz izolowano RNA według procedury opisanej powyżej. Myszy pochodziły z hodowli Zakładu Biotechnologii Medycznej, WBBIB, UJ. Materiał został grzecznościowo udostępniony do badań przez prof. dr hab. Alicję Józkowicz.

Badania dotyczące tkanek pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego były prowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

12. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym.

Do syntezy cDNA używano 1 µg preparatu RNA rozpuszczonego w wodzie. Reakcję prowadzono z użyciem 0,25 µg startera oligo(dT): T₂₀VN, gdzie V: {A,C,G}, N: {A,C,G,T} i odwrotnej transkryptazy M-MLV (Promega), zgodnie z instrukcją producenta. Jeśli nie zaznaczono inaczej, cDNA było rozcieńczane pięciokrotnie wodą wolną od RNaz i DNaz (Sigma Aldrich) i przechowywane do czasu analiz w -20°C. Reakcja PCR w czasie

rzeczywistym była prowadzona w termocyklerze RotorGene 3000 (Corbett), z użyciem odczynnika sybr-green KAPA Sybr (Nippon) (Ryc.1, Ryc.5, Ryc.6, Ryc.16) lub w termocyklerze Eco (Illumina), z użyciem odczynnika sybr-green A (A&A Biotechnology) (Ryc.2, Ryc.7, Ryc.8, Ryc.10, Ryc.12, Ryc.15). Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl. Reakcje prowadzono w duplikatach lub w triplikatach według programu:

ETAP REAKCJI PCR W CZASIE RZECZYWISTYM	TEMP. [°C]	CZAS [sek.]
denaturacja wstępna i aktywacja polimerazy	95	600
cykl powtarzany 40x:		
denaturacja produktu	95	15
przyłączanie starterów	wykaz w Tabeli 3	15
wydłużanie	72	20

Sygnal fluorescencji mierzony był po zakończeniu etapu wydłużania. Aby potwierdzić specyficzność produktu, po zakończonej reakcji wykresowano krzywą topnienia produktu. Startery projektowano z użyciem programu SnapGene (GSL Biotech), a parametry biofizyczne, takie jak tworzenie hetero/homodimerów i struktur drugorzędowych, weryfikowano programem OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies). Temperaturę przyłączania starterów określano poprzez przeprowadzenie reakcji PCR w gradiencie temperatur przyłączania i elektroforezę produktów w żelu agarozowym. Następnie określano wydajność reakcji PCR dla tej temperatury, poprzez przeprowadzenie PCR w czasie rzeczywistym na matrycy sześciu seryjnych rozcieńczeń ($1 - 10^{-5}$) cDNA. Do analiz wykorzystano tylko takie pary starterów, dla których wydajność reakcji mieściła się w zakresie 0,98-1,02 a powstały produkt był homogeny i specyficzny. Sekwencje starterów wraz z temperaturą przyłączania podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Sekwencje starterów używanych w PCR w czasie rzeczywistym wraz z temperaturą przyłączania do matrycy.

nazwa genu	nr dostępu w bazie NCBI	starter "forward"	starter "reverse"	temp. przył. [°C]
Eef2	NM_007907.2	GACATCACCAAGGGT GTGCAG	TCAGCACA CTGGCAT AGAGGC	60
C/ebp beta, 1. wariant transkrypcyjny	NM_001287738.1	CAAGCTGAGCGACGA GTACA	CAGCTGCTCCACCTT CTTCT	62
Ppar gamma, 1. i 2. wariant transkrypcyjny	NM_001127330.1	AGGCCGAGAAGGAGA AGCTGTTG	TGGCCACCTCTTTGC TCTGCTC	62

Fabp4	NM_024406.2	AAGGTGAAGAGCATC ATAACCTT	TCACGCCTTTCATAA CACATTCC	62
Adiponektyna	NM_009605.4	CCTGGAGAAGCCGCT TATGT	GAACGGCCTTGTCTT TCTTG	62
Leptyna	NM_008493.3	GGGTCACTGGCTTGG ACTTC	AGCAGATGGAGGAG GTCTCG	62
Rezystyna, 1. i 2. wariant transkrypcyjny	NM_022984.4	AAGAACCTTTCATTT CCCCTCCT	GTCCAGCAATTTAA GCCAATGTT	62
Vegfa, 1./2./4./5. wariant transkrypcyjny	NM_001110267. 1	CTTGTTTCAGAGCGGA GAAAGC	ACATCTGCAAGTAC GTTTCGTT	60
Il-6	NM_031168.1	GACAAAGCCAGAGTC CTTCAGAG	TTGGATGGTCTTGGT CCTTAGCC	66
Cd14	NM_009841.4	CTCTGTCTTAAAGC GGCTTAC	GTTGCGGAGGTTCA AGATGTT	62
Lpl	NM_008509.2	CTTTCACTCGGATCCT CTCG	AGGTGGACATCGGA GAACTG	62
Mcp1l (Zc3h12a)	NM_153159.2	CAGCCTCGACCAGAT GTGCC	CAGCCGCTCCTCGAT GAAGC	62
Crp	NM_007768.4	ATGGAGAAGCTACTC TGGTGC	ACACACAGTAAAGG TGTTTCAGTG	62
Tnf	NM_013693.3	AATTCGAGTGACAAG CCTGTAGCC	TGTCTTTGAGATCCA TGCCGTTGG	62
Mcp-1	NM_011333.3	TTAAAAACCTGGATC GGAACCAA	GCATTAGCTTCAGAT TTACGGGT	62

13. Western blot.

Komórki rosnące na naczyniu hodowlanym płukano zimnym roztworem PBS. W przypadku adipocytów 3T3-L1 używano PBS w temperaturze pokojowej, aby uniknąć odklejania się komórek. Po odciągnięciu PBS komórki lizowano roztworem RIPA (25 mM Tris•HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % deoksycholan sodu, 0,1 % SDS) wzbogaconym w inhibitory proteaz (Roche lub Sigma Aldrich) i fosfataz (Roche). Pozostałości komórkowe odseparowywano poprzez wirowanie lizatów przez 10 minut przy 15 tys. g, w temperaturze 4°C i przeniesienie nadsącza do nowych probówek. Stężenie całkowitego białka w klarownych lizatach oznaczano metodą BCA na płytce 96-dółkowej.

Lizaty o równym stężeniu całkowitego białka (10-30 µg) mieszano z buforem obciążającym (0,375 M Tris•HCl pH 6,8, 12 % SDS, 60 % glicerol, 0,6 M DTT, 0,06 % błękit bromofenolowy) i rozdzielano w 10 % żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE). Następnie białka elektrotransferowano na membranę PVDF (Millipore) używając aparatu do mokrego transferu (BioRad). Membrany blokowano w 3 % mleku rozpuszczonym w buforze TBS zawierającym 0,1 % Tween (Bioshop) dla przeciwciał anti-Mcp1l (Santa

Cruz) lub w 2 % BSA (BioShop) rozpuszczonym w buforze TBS zawierającym 0,1 % Nonidet (BioShop) dla pozostałych przeciwciał. Membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami przez noc w 4 °C. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano 3 x 8 minut buforem TBS zawierającym odpowiednio Tween lub Nonidet.

Tabela 4. Zestawienie przeciwciał używanych w western blot.

rozpoznawane białko	bioreaktor	producent	nr kat.	rozcieńczenie
MCPIP1	królik	produkcja własna	-	2000 x
Mcpip1	koza	Santa Cruz Bt.	sc-	100 x
fosfo-p65 (Ser536)	królik	Cell Signaling	3033	1000 x
a-aktyna	mysz	Sigma Aldrich	A2066	10000 x
tubulina	mysz	Abcam	ab6160	2000 x
Ppar γ	królik	Cell Signaling	2435	1000 x
C/ebp β	królik	Cell Signaling	3082	500 x
p65	królik	Abcam	Ab16502	1000 x
fosfo-ERK1/2	królik	Cell Signaling	9101	1000 x
kozio IgG	królik	R&D	HAF017	30000 x
mysie IgG	koza	BD Pharminogen	554002	20000 x
królicze IgG	koza	Cell Signaling	7074	30000 x

Następnie membrany inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi rozpuszczonymi w takim samym buforze jak przeciwciała pierwszorzędowe. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano 4 x 8 minut buforem TBS zawierającym odpowiednio Tween lub Nonidet. Detekcji sygnału dokonywano z użyciem substratu Luminata Crescendo (Millipore) i detektora ChemiDoc (Bio-Rad). Analizę densytometryczną wykonano z użyciem programu Image Lab 4.1 (Bio-Rad). Intensywność sygnałów normalizowano względem sygnału aktyny po odjęciu tła. Używane w western blot przeciwciała przedstawione są w Tabeli 4.

14. Aktywność lucyferazy.

14.1. Wektor reporterowy aktywacji Creb.

Komórki 3T3-L1 hodowane na płytkach 48-dołkowych transfekowano w pożywce Opti-MEM kompleksami Lipofektaminy 2000 (Life Technologies) i wektora reporterowego pCI-6.24 (Addgene kat. 41003), kodującego lucyferazę firefly pod promotorem minimalnym z dodatkowymi czterema miejscami wiązania dla Creb. Konstruktu reporterowego użyto w stosunku molowym 10:1 względem konstruktu normalizującego

pEF1/Myc-His/Gal kodującego galaktozydazę. Do transfekcji komórek rosnących na pojedynczym dołku użyto 0,8 µg całkowitego DNA i 2 µl Lipofektaminy 2000. Kompleksy przygotowywano w 50 µl Opti-MEM tak jak opisano w rozdziale IV 9.1. Po 24 godzinach od transfekcji komórki stymulowano do różnicowania poprzez zmianę pożywki wzrostowej na pożywkę różnicującą. Po 2 godzinach od indukcji różnicowania przeprowadzono analizę chemiluminescencji używając zestawu Dual-Light System (Applied Biosystems) według instrukcji producenta. Pomiaru luminescencji dokonano na aparacie MiniLuminat LB 96P (EG&G Berthold). Aktywność lucyferazy była normalizowana względem aktywności β-galaktozydazy, jako wewnętrznej kontroli transfekcji, a następnie porównywana między próbkami.

14.2. Wektor reporterowy degradacji 3' UTR.

Komórki 3T3-L1 hodowane na płytkach 24-dołkowych transfekowano w pożywce Opti-MEM kompleksami Lipofektaminy 2000 (Life Technologies) i mieszaniną wektora pcDNA3.1 z wektorem reporterowym pmir-GLO (Promega), kodującego lucyferazę firefly pod promotorem PGK oraz lucyferazę *Renilla* pod promotorem SV40. szczegóły dotyczące konstrukcji wektorów reporterowych opisano w Rozdz. IV.2. Do transfekcji komórek rosnących na pojedynczym dołku użyto 4 µl Lipofektaminy 2000 i 0,8 µg całkowitego DNA (0,7 µg wektora reporterowego i 0,1 µg wektora pcDNA3.1). W przypadku kotransfekcji wektorami kodującym MCPIP1 (formy dzikiej lub z mutacją punktową) użyto mieszaniny plazmidów w składzie: 0,7 µg wektora reporterowego, 0,075 µg wektora pcDNA3.1 i 0,025 µg wektora pcDNA3.1-MCPIP1 albo pcDNA3.1-MCPIP1/D141A. Kompleksy przygotowywano w 50 µl Opti-MEM tak jak opisano w rozdziale IV 9.1. Po 24 godzinach od transfekcji przeprowadzono analizę chemiluminescencji używając zestawu Dual-Luciferase Reporter System (Promega). Pomiarów dokonywano na aparacie MiniLuminat LB 96P (EG&G Berthold). Aktywność lucyferazy firefly była normalizowana względem aktywności lucyferazy *Renilla*, jako wewnętrznej kontroli transfekcji, a następnie porównywana między próbkami.

15. Uzyskanie bakterii kompetentnych oraz ich transformacja.

W celu uzyskania bakterii kompetentnych pojedynczą kolonię szczepu DH5α pozyskaną z bezantybiotykowej hodowli płytkowej hodowano w 20 ml pożywki TYM. Po osiągnięciu gęstości optycznej OD₆₀₀ w przedziale od 0,5 do 0,8 hodowlę przenoszono do 100 ml

pożywki TYM. Po osiągnięciu OD_{600} od 0,5 do 0,9, hodowlę ponownie rozcieńczano 5-krotnie pożywką TYM i hodowano do gęstości $OD_{600} = 0,6$. Następnie bakterie chłodzono i wirowano przez 15 minut w przyspieszeniu 4500 g, w temperaturze 4°C. Osad bakteryjny przepłukiwano na lodzie dodając 100 ml schłodzonego buforu Tfb1. Bakterie ponownie wirowano przez 8 minut w przyspieszeniu 4500 g, w temperaturze 4°C. Następnie osad bakterii zawieszano w 20 ml Tfb2, porcjowano do probówek po 0,1 ml i mrożono w ciekłym azocie. Porcję bakterii kompetentnych przechowywano w temperaturze -80°C.

W celu przeprowadzenia transformacji bakterii plazmidowym DNA, porcję bakterii kompetentnych rozmrażano na lodzie i dodawano do nich 50 ng plazmidowego DNA lub 10 μ l mieszaniny ligacyjnej, co odpowiadało 50-100 ng DNA. Inkubowano na lodzie przez 15 minut, po czym bakterie poddawano szokowi termicznemu inkubując probówkę bez wytrząsania przez 45 sekund w temperaturze 42°C. Następnie, do probówki dodawano 500 μ l sterylnej pożywki LB bez antybiotyku i inkubowano z wytrząsaniem (200 obr./min.) przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po tym czasie bakterie krótko wirowano w 4500 g, osad zawieszano w 50 μ l pożywki LB i rozprowadzano głaszczką na szalce Petriego zawierającej zestaloną agarową pożywkę LB z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym.

Pożywki i bufor:

Luria-Bertrani (LB): 1 % (m/o) trypton, 0,5 % (m/o) ekstrakt drożdżowy, 0,5 % (m/o) NaCl, oraz 1,5 % (m/o) agar w przypadku podłoża stałego.

TYM: 2 % (m/o) trypton, 0,5 % (m/o) ekstrakt drożdżowy, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$,

Tfb1: 100 mM KCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM CH_3COOK , 10 mM $CaCl_2$, 15 % glicerol

Tfb2: 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % glicerol

16. Analiza statystyczna.

Dla oznaczenia istotności statystycznej różnic między dwoma średnimi używano testu ANOVA, przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Przy porównywaniu średnich więcej niż dwóch grup używano testu ANOVA w połączeniu z testem Bonferoniego. Analizę statystyczną prowadzono programem GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

V. Wyniki.

1. Aktywacja genu *Mcpip1* w czasie adipogenezy.

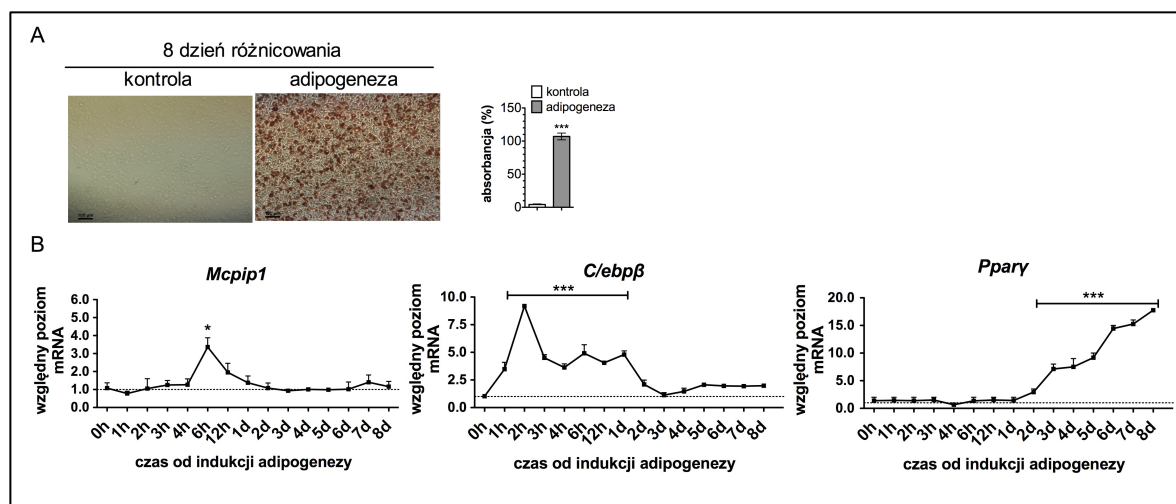
1.1. Poziom mRNA *Mcpip1* zmienia się w czasie adipogenezy.

W celu sprawdzenia czy *Mcpip1* może być czynnikiem zaangażowanym w adipogenezę, sprawdzono, czy jego ekspresja zmienia się po stymulacji różnicowania. W tym celu komórki 3T3-L1 hodowano na płytkach hodowlanych i dwa dni po uzyskaniu pełnej gęstości, stymulowano do różnicowania dodatkiem insuliny (INS), deksametazonu (DEX) i IBMX do pożywki wzrostowej (pożywka różnicująca). Różnicowanie prowadzono przez 6 dni. W ostatnim dniu różnicowania komórki indukowane do adipogenezy i komórki kontrolne (nieróżnicujące) poddano barwieniu oil-red O i wykonano zdjęcia mikroskopowe. Analiza mikroskopowa ujawniła komórki wypełnione kroplami tłuszczu, wskazując na wydajną indukcję i przebieg różnicowania. Następnie barwnik wyekstrahowano z komórek i zmierzono jego absorbancję [Ryc.1A].

W celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu różnicowania na poziomie biochemicznym, w określonych punktach czasowych po indukcji różnicowania (0, 1, 2, 3, 4, 6, 12 godzin i 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 dni) komórki różnicujące i kontrolne lizowano i izolowano z nich RNA, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała w komórkach różnicujących przyrost ilości transkryptów głównych białek adipogennych - *C/ebpβ* i *Pparγ* [Ryc.1B]. Ekspresja *Pparγ* następowała począwszy od drugiego dnia różnicowania i stale rosła. Ekspresja *C/ebpβ* natomiast rozpoczęła się tuż po indukcji różnicowania, osiągając maksimum w drugiej godzinie stymulacji, a następnie zmniejszyła się do połowy, utrzymując jednak zwiększony poziom przez kolejne dwa dni. Począwszy od trzeciego dnia różnicowania, ilość transkryptu *C/ebpβ* w komórkach stymulowanych była już tylko nieznacznie wyższa w porównaniu z komórkami kontrolnymi (nieróżnicującymi). Charakter zmian ekspresji obu czynników transkrypcyjnych zgadzał się z danymi literaturowymi (25, 64), wskazując na skuteczną indukcję różnicowania i postęp procesu w czasie.

Analiza poziomu transkryptu *Mcpip1* metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że podanie pełnego koktajlu różnicującego powodowało gwałtowne lecz tymczasowe podniesienie się poziomu mRNA dla *Mcpip1* [Ryc.1B]. Wzrost osiągał maksimum w szóstej godzinie różnicowania, następnie ilość transkryptu malała, osiągając po 24

godzinach poziom porównywalny do komórek niestymulowanych.

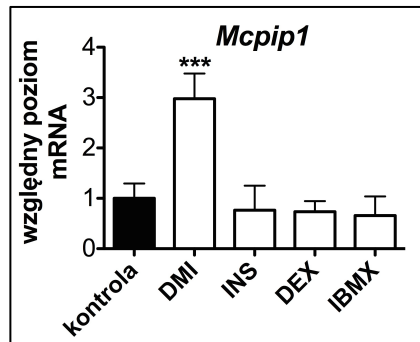


Ryc.1. Analiza poziomu mRNA *Mcpip1* w czasie adipogenezy.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania (adipogeneza) lub pozostawiono niestymulowane (kontrola). **A.** Fotografije mikroskopowe komórek w ósmym dniu różnicowania wybarwionych czerwienią oil-red O oraz wykres przedstawiający absorbancję wyekstrahowanego barwnika. Linia na mikrofotografiach odpowiada 100 μ m. **B.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów genów *Mcpip1*, *C/ebpβ* i *Pparg* w komórkach w czasie różnicowania w odniesieniu do poziomu w komórkach nieróżnicujących, ustalonego dla każdego punktu czasowego jako 1 (oznaczono linią przerywaną). Wykresy przedstawiają średnią \pm SEM z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. * $p < 0,05$; *** $p < 0,002$ liczone względem komórek nieróżnicujących.

1.2. Indukcja ekspresji *Mcpip1* następuje tylko pod wpływem wszystkich trzech czynników adipogennych.

Koktajl indukujący różnicowanie preadipocytów składa się z trzech składników, które uruchamiają osobne ścieżki sygnałowe. Sprawdzone, który ze składników pożywki różnicującej odpowiada za indukcję ekspresji *Mcpip1* w czasie adipogenezy. W tym celu komórki 3T3-L1 hodowano do osiągnięcia pełnej konfluencji i po dwóch dniach pożywkę wymieniono na pożywkę różnicującą, zawierającą wszystkie trzy czynniki adipogenne (INS, DEX, IBMX) albo na pożywkę zawierającą w tylko jeden z wyżej wymienionych czynników. Po sześciu godzinach od stymulacji komórki lizowano i izolowano z nich RNA, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że aktywacja transkrypcji genu *Mcpip1* następowała tylko pod wpływem pożywki różnicującej zawierającej wszystkie trzy składniki adipogenne. Natomiast insulina, deksametazon i IBMX podane osobno nie wpływały na poziom transkryptu *Mcpip1* [Ryc.2].



Ryc.2. Analiza poziomu mRNA Mcpip1 po stymulacji pojedynczymi czynnikami adipogennymi. Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania koktajlem trzech czynników adipogennych (DMI) lub każdym z czynników osobno. INS - insulina, DEX - deksametazon, IBMX - 3-izobutylo-1-metyloksantyna. Kontrolę stanowiły komórki nieróżnicowane. Wykres przedstawia poziom ekspresji genu *Mcpip1* mierzony w szóstej godzinie od stymulacji. Pokazano średnią \pm SEM z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. *** $p < 0,002$ (względem komórek nieróżnicujących).

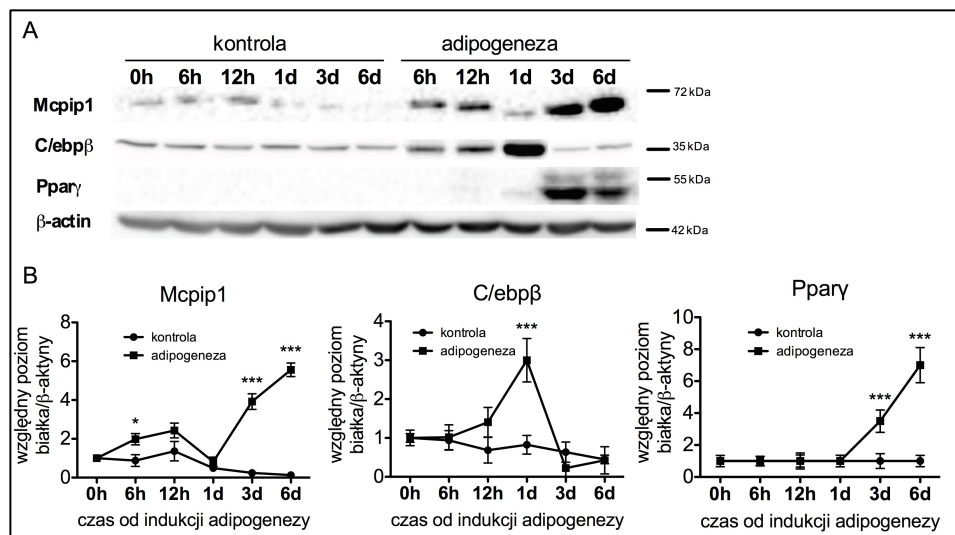
2. Poziom białka Mcpip1 zmienia się w czasie adipogenezy.

Aby sprawdzić czy zmiany poziomu transkryptu *Mcpip1* obserwowane w czasie różnicowania pociągają za sobą zmiany na poziomie białka, komórki 3T3-L1 hodowano do pełnej gęstości i dwa dni później stymulowano do różnicowania pożywką różnicującą zawierającą INS, DEX, IBMX. Różnicowanie prowadzono przez 6 dni. W określonych punktach czasowych (0, 6, 12 godzin, 1, 3, 6 dni po indukcji różnicowania) komórki lizowano.

Analiza western blot wykazała właściwy dla różnicowania wzór ekspresji czynników transkrypcyjnych *C/ebp β* i *Ppar γ* [Ryc.3]. *C/ebp β* przyrastało począwszy od dwunastej godziny różnicowania, osiągając maksymalny poziom w dniu pierwszym, po czym pod koniec różnicowania (dzień trzeci i szósty) poziom *C/ebp β* obniżył się i był porównywalny z komórkami nieróżnicującymi. *Ppar γ* przyrastało począwszy od trzeciego dnia i utrzymywało wysoki poziom w komórkach zróżnicowanych.

Analiza western blot wykazała również, że poziom *Mcpip1* pod koniec różnicowania jest średnio 6-krotnie wyższy w porównaniu z komórkami nieróżnicującymi [Ryc.3]. Przyrost ilości białka widoczny był już w szóstej godzinie od indukcji różnicowania. Jednakże w pierwszym dniu różnicowania obserwowano tymczasowy spadek ilości *Mcpip1* do poziomu porównywalnego z komórkami nieróżnicującymi. Co ciekawe, *Mcpip1* w tym punkcie czasowym różnicowania wykazało inny wzór migracji w żelu niż *Mcpip1* w pozostałych punktach pomiarowych różnicowania czy też *Mcpip1* w komórkach

nieróżnicujących.



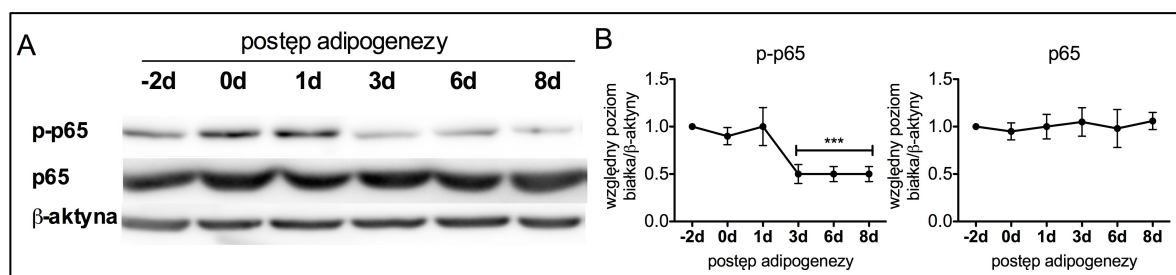
Ryc.3. Analiza poziomu białka Mcpip1 w czasie adipogenezy.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania (adipogeneza) lub pozostawiono niestymulowane (kontrola). **A.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μg) zebranych z komórek 3T3-L1 w czasie różnicowania. Oznaczono poziom Mcpip1, C/ebpβ, Pparγ oraz β-aktyny jako kontroli załadowania studzienek. Pokazano wynik reprezentatywny dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **B.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Wykres przedstawia średnią ± SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (względem komórek nieróżnicujących).

3. Aktywność NF-κB zmniejsza się w późnych etapach adipogenezy.

Wiadomo, że ekspresja genu *MCPIP1* w komórkach HepG2 regulowana jest przez czynnik NF-κB (135). W celu sprawdzenia czy aktywacja ekspresji Mcpip1 w czasie adipogenezy wynika z aktywacji Nf-κB, zbadano ekspresję oraz aktywność Nf-κB w różnicujących komórkach 3T3-L1. W tym celu komórki 3T3-L1 hodowano na płytkach hodowlanych i dwa dni po uzyskaniu pełnej gęstości, stymulowano do różnicowania.

W określonych punktach czasowych adipogenezy (-2, 0, 1, 3, 6 i 8 dzień) komórki różnicujące lizowano i izolowano z nich białko. Metodą western blot sprawdzono poziom fosforylacji i poziom ekspresji podjednostki p65 Nf-κB. Wykazano, że poziom fosforylacji p65 w preadipocytach i w komórkach różnicujących w początkowej fazie, tj. do dnia trzeciego jest podobny. Natomiast począwszy od trzeciego dnia różnicowania poziom fosforylacji p65 ulega obniżeniu o połowę. Poziom ekspresji p65 nie zmienia się w czasie adipogenezy [Ryc.4].



Ryc.4. Analiza aktywności Nf-κB w czasie adipogenezy.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (dzień 0) komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania. **A.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μg) z komórek 3T3-L1 zebranych w zaznaczonych punktach czasowych w czasie różnicowania. Oznaczono poziom fosforylowanej formy p65 (p-p65), całkowitego p65 oraz β-aktyny jako kontroli załadowania studzienek. Pokazano obraz reprezentatywny dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **B.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Wykres przedstawia średnią ± SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. ***p < 0,002 (względem komórek w dniu -2).

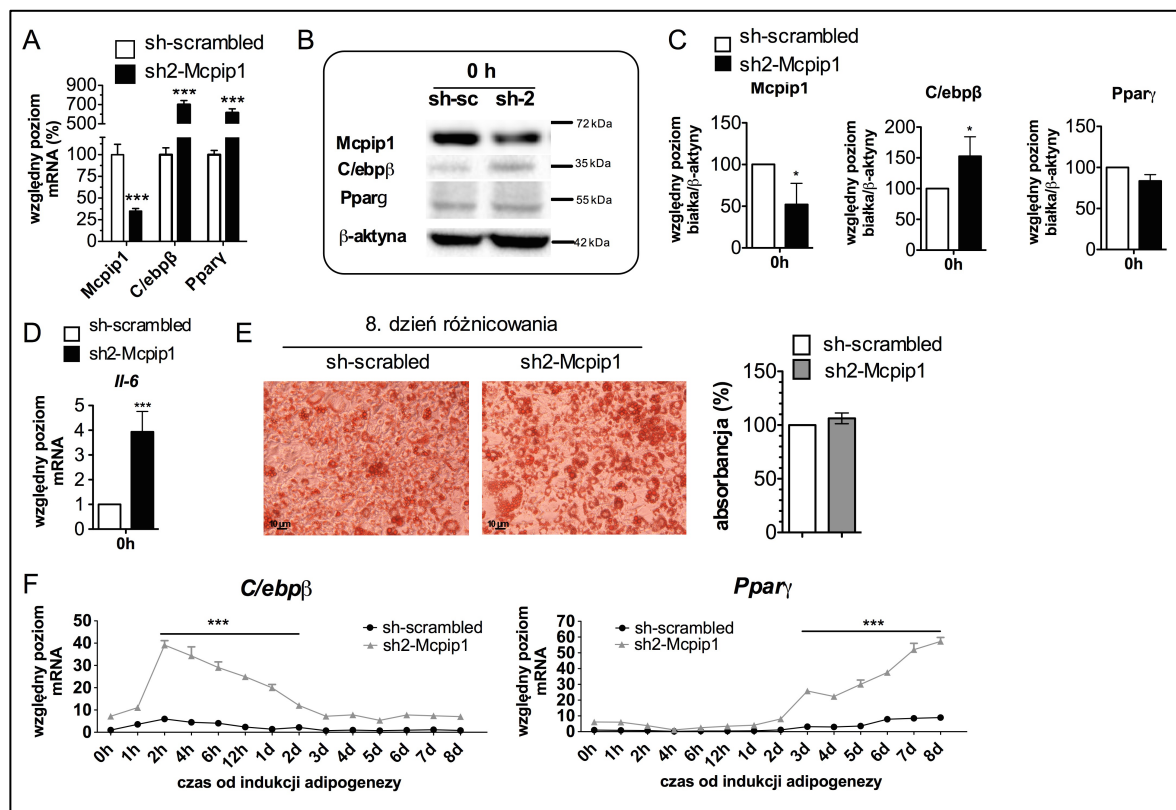
4. Wyciszeniu Mcpip1 w preadipocytach towarzyszy podniesiony poziom czynników transkrypcyjnych C/ebpβ i Pparγ.

Jak pokazano, indukcji adipogenezy w preadipocytach 3T3-L1 towarzyszy wzrost poziomu Mcpip1 [Ryc.3]. Sprawdzone, czy wyciszenie ekspresji Mcpip1 wpłynie na przebieg różnicowania. W eksperymencie posłużono się pulą preadipocytów ze stabilną ekspresją plazmidu kodującego sekwencję sh RNA skierowanego przeciw Mcpip1 (sh2-Mcpip1). Komórki kontrolne były stabilnie transfekowane plazmidem kodującym sekwencję sh niespecyficzną dla mysich transkryptów (sh-scrambled).

Uzyskano pulę komórek, w których poziom mRNA kodującego Mcpip1 był prawie czterokrotnie niższy w porównaniu do komórek kontrolnych [Ryc.5A]. Wyciszenie ekspresji Mcpip1 potwierdzono również metodą western blot. Poziom ekspresji Mcpip1 na poziomie białka był średnio dwukrotnie niższy w porównaniu do komórek kontrolnych [Ryc.5B,C]. Aby ocenić czy wyciszenie ekspresji Mcpip1 jest funkcjonalne, sprawdzono poziom jednego z substratów Mcpip1 - mRNA kodującego Il-6. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że preadipocyty z wyciszoną ekspresją Mcpip1 cechuje prawie czterokrotnie wyższy poziom transkryptu Il-6 w porównaniu do komórek kontrolnych [Ryc.5D].

Do różnicowania wysiano w identycznej liczbie komórki z wyciszoną ekspresją Mcpip1 i komórki kontrolne. Dwa dni po osiągnięciu pełnej konfluencji, komórki stymulowano do różnicowania pożywką różnicującą zawierającą INS, DEX, IBMX. Różnicowanie prowadzono przez 8 dni. W ostatnim dniu różnicowania komórki poddano barwieniu oil-red O. Analiza mikroskopowa wykazała, że odsetek dojrzałych adipocytów jest

porównywalny między komórkami z wyciszoną ekspresją *Mcpip1* a kontrolnymi. Ilość barwnika akumulowanego przez komórki z wyciszeniem *Mcpip1* była średnio wyższa niż w komórkach kontrolnych, ale różnica ta była nieistotna statystycznie [Ryc.5E].



Ryc.5. Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 z obniżoną ekspresją *Mcpip1*.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki z wyciszoną ekspresją *Mcpip1* (sh2-*Mcpip1*) oraz komórki kontrolne (sh-scrambled) stymulowano do różnicowania. **A.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów *Mcpip1*, *C/ebpβ* i *Pparγ* w komórkach przed indukcją różnicowania (0h). **B.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μ g) zebranych przed indukcją różnicowania z komórek kontrolnych (sh-sc) i z komórek z wyciszoną ekspresją *Mcpip1* (sh-2). Oznaczono poziom *Mcpip1*, *C/ebpβ*, *Pparγ* oraz β -aktyny jako kontroli załadowania studzienek. **C.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Obliczono średnią \pm SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **D.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptu *Il-6* w komórkach przed indukcją różnicowania. **E.** Fotografie mikroskopowe komórek w ósmym dniu różnicowania wybarwionych czerwienią oil-red O oraz wykres przedstawiający absorbancję wyekstrahowanego barwnika. Linia na mikrofotografiach odpowiada 10 μ m. **F.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów *C/ebpβ* i *Pparγ* w czasie różnicowania. A, D i F przedstawiają średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. * $p < 0,05$; *** $p < 0,002$ (względem komórek kontrolnych sh-scrambled).

W określonych punktach czasowych (0, 6, 12 godzin, 1, 3, 6 dni po indukcji różnicowania), z różnicujących komórek izolowano całkowite RNA, poddane następnie odwrotnej transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że w preadipocytach z wyciszeniem *Mcpip1* poziom transkryptu *C/ebpβ* był średnio 7-krotnie wyższy, a poziom transkryptu *Pparγ* był średnio 5-krotnie wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych

[Ryc.5A]. Różnica w poziomie mRNA obu czynników utrzymywała się przez cały okres różnicowania [Ryc.5F].

5. Wpływ ekspresji MCPIP1 w preadipocytach na poziom czynników transkrypcyjnych C/ebp β i Ppar γ .

5.1. Stabilna ekspresja w preadipocytach.

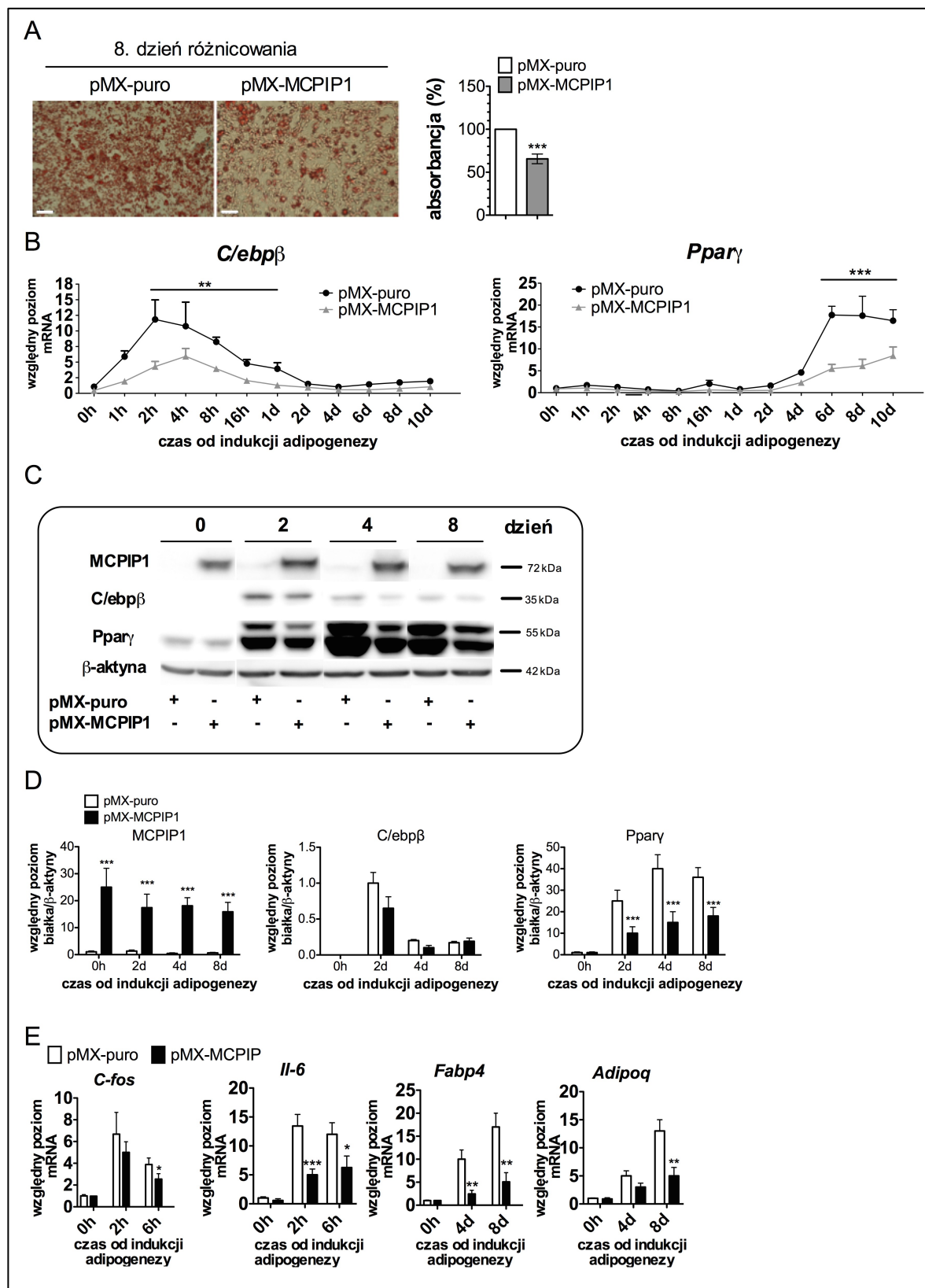
Wyciszeniu ekspresji *Mcpip1* w komórkach 3T3-L1 towarzyszył wzrost ilości mRNA kodujących C/ebp β i Ppar γ . Sprawdzone, czy ekspresja egzogenego MCPIP1 powoduje efekt odwrotny. W tym celu preadipocyty transdukowano retrowirusem niosącym sekwencję kodującą ludzkie białko MCPIP1 (pMX-MCPIP1) lub pustym retrowirusem (pMX-puro). Komórki pozytywnie transdukowane wyselekcjonowano antybiotykiem i namnożono uzyskując pulę komórek stabilnie ekspresjonujących transgen i pulę komórek kontrolnych. Ekspresję egzogenego MCPIP1 potwierdzono metodą western blot [Ryc.6C,D].

Komórki z ekspresją MCPIP1 i komórki kontrolne wysiano w identycznej liczbie na naczynie hodowlane i 2 dni po osiągnięciu pełnej konfluencji, stymulowano do różnicowania pożywką różnicującą, zawierającą INS, DEX, IBMX. Różnicowanie prowadzono przez 10 dni. W ostatnim dniu różnicowania komórki poddano barwieniu oil-red O. Analiza mikroskopowa wykazała, że odsetek powstałych adipocytów był niższy w przypadku preadipocytów ze stabilną ekspresją MCPIP1. Obserwację tę potwierdził pomiar absorbancji wyekstrahowanego barwnika - komórki z ekspresją MCPIP1 cechowała o 1/3 niższa wartość absorbancji w porównaniu do komórek kontrolnych [Ryc.6A].

W czasie różnicowania, w określonych punktach czasowych (0, 1, 2, 4, 8, 16 godzin i 1, 2, 4, 6, 8, 10 dni po indukcji różnicowania), komórki lizowano i izolowano z nich całkowite RNA. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała obniżony poziom transkryptów głównych białek adipogennych - C/ebp β i Ppar γ - w komórkach z ekspresją MCPIP1. Poziom mRNA dla C/ebp β był średnio dwukrotnie niższy niż w komórkach kontrolnych, natomiast poziom mRNA dla Ppar γ był obniżony średnio trzykrotnie. Różnica w poziomie mRNA obu czynników utrzymywała się przez cały okres różnicowania [Ryc.6.B].

Zmiany ekspresji widoczne były również na poziomie białka. Całkowite białko izolowano z komórek tuż przed indukcją różnicowania (dzień 0) oraz 2, 4 i 8 dni później. Analiza western blot wykazała zmniejszenie ilości C/ebp β jak i Ppar γ w komórkach z ekspresją MCPIP1 w każdym z badanych punktów czasowych [Ryc.6C,D].

Ponadto, komórki z ekspresją MCPIP1 wykazywały niższą ekspresję genów regulowanych przez C/ebp β (*c-fos*, *Il-6*) i Ppar γ (*Fabp4*, *adiponektyna*) [Ryc.6E].



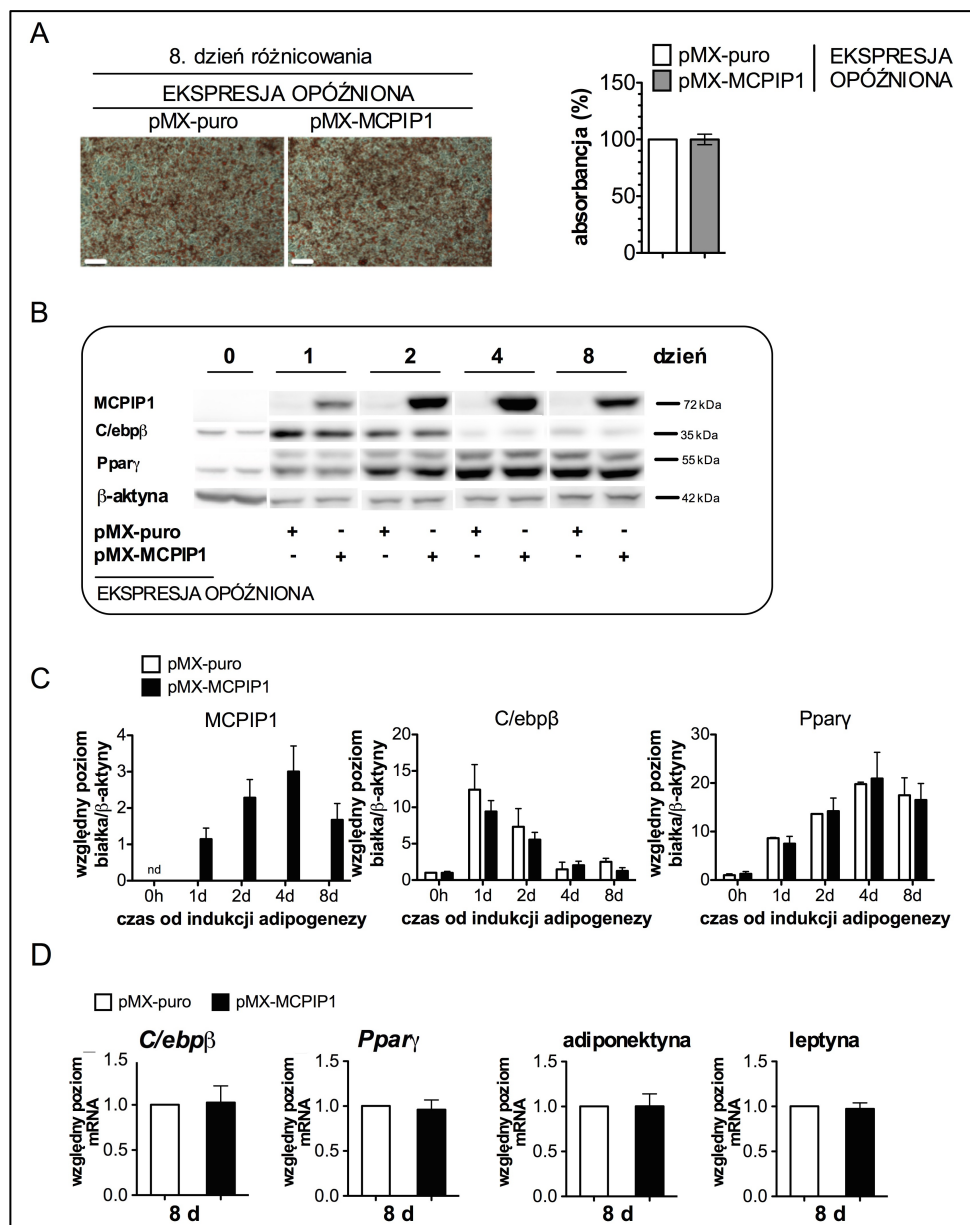
Ryc.6. Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki 3T3-L1 z ekspresją MCPIP1 (pMX-MCPIP1) oraz komórki kontrolne (pMX-puro) stymulowano do różnicowania. **A.** Fotografie mikroskopowe komórek w ósmym dniu różnicowania wybarwionych czerwienią oil-red O oraz wykres przedstawiający absorbancję wyekstrahowanego barwnika. Linia na mikrofotografiach odpowiada 100 μm . **B.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów C/ebp β i Ppar γ w komórkach w czasie różnicowania. **C.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μg) izolowanych z komórek w czasie różnicowania. Oznaczono poziom MCPIP1, C/ebp β , Ppar γ i β -aktyny, jako kontroli załadowania studzienek. Pokazano wynik reprezentatywny dla trzech niezależnych powtórzeń. **D.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Obliczono średnią \pm SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **E.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów wybranych genów regulowanych przez C/ebp β i Ppar γ w komórkach w czasie różnicowania. Wykresy przedstawiają średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. *p < 0,05 ; **p < 0,02, ***p < 0,002 (względem komórek kontrolnych pMX-puro).

5.2. Ekspresja egzogennej MCPIP1 wywołana po indukcji różnicowania.

Ponieważ retrowirusy infekują tylko komórki dzielące się, użycie systemu retrowirusowego do ekspresji MCPIP1 w połączeniu ze specyfiką procesu różnicowania komórek 3T3-L1 pozwoliło na wywołanie ekspresji MCPIP1 już po indukcji różnicowania. Preadipocyty transdukowano retrowirusem niosącym sekwencję kodującą ludzkie białko MCPIP1 (pMX-MCPIP1). Komórki kontrolne stanowiły preadipocyty transdukowane pustym wektorem (pMX-puro). Ponieważ transdukcję prowadzono równocześnie z indukcją adipogenezy, wprowadzenie transgenu MCPIP1 do komórek nastąpiło w fazie ekspansji klonalnej, której komórki 3T3-L1 podlegają po podaniu pożywki różnicującej. Analiza western blot wykazała, że synteza białka MCPIP1 nastąpiła w pierwszym dniu rozpoczęcia różnicowania, a najwyższy poziom osiągnęła w dniu drugim i czwartym różnicowania. W końcowej fazie różnicowania ekspresja obniżyła się.

W przeciwieństwie do różnicowania preadipocytów 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1, różnicowanie komórek z „opóźnioną” ekspresją MCPIP1 przebiegało porównywalnie do komórek kontrolnych. Barwienie czerwienią oil-red O nie wykazało różnic w ilości wytworzonych adipocytów [Ryc.7A]. Również analiza western blot lizatów białkowych zebranych w momencie indukcji różnicowania oraz po 1, 2, 4 i 8 dniach nie wykazała różnic w ekspresji białek adipogennych C/ebp β i Ppar γ [Ryc.7B,C]. Ponadto, analiza PCR w czasie rzeczywistym nie wykazała w dojrzałych adipocytach różnic w ekspresji mRNA kodującego C/ebp β ani Ppar γ i regulowanych przez niego genów - adiponektyny i leptyny [Ryc.7D].



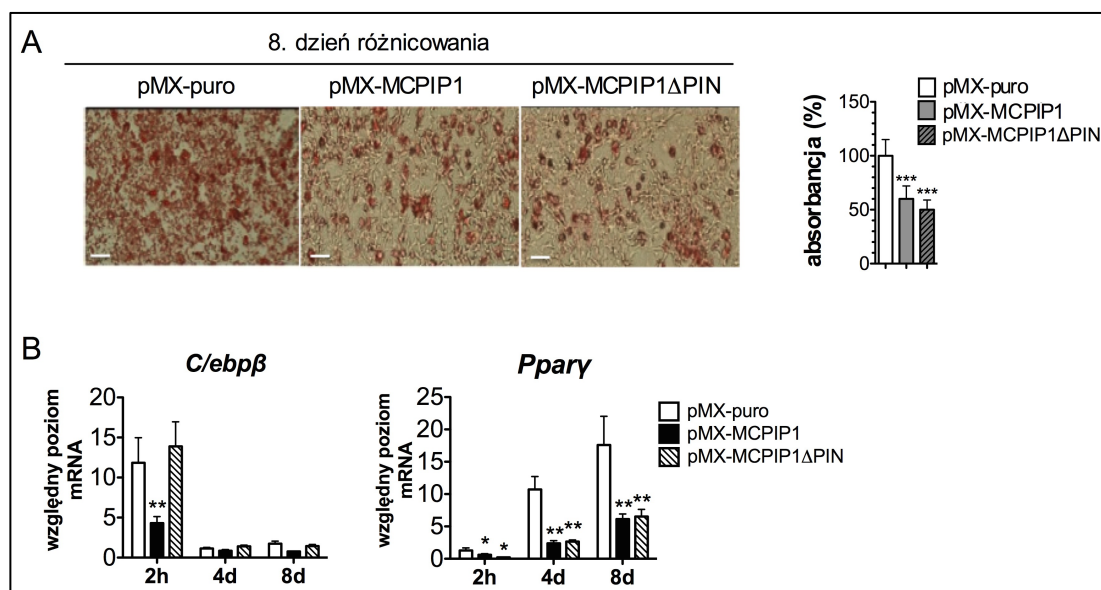
Ryc.7. Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 z ekspresją MCPIP1 wywołaną po indukcji różnicowania. Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki 3T3-L1 transdukowano retrowirusami niosącymi gen kodujący MCPIP1 (pMX-MCPIP1) lub wektorami kontrolnymi (pMX-puro) i stymulowano do różnicowania. **A.** Fotografie mikroskopowe komórek w ósmym dniu różnicowania wybarwionych czerwienią oil-red O oraz wykres przedstawiający absorbancję wyekstrahowanego barwnika. Linia na mikrofotografiach odpowiada 100 μ m. **B.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μ g) izolowanych z komórek w czasie różnicowania. Oznaczono poziom MCPIP1, C/ebp β , Ppar γ i β -aktyny, jako kontroli załadowania studzienek. Pokazano wynik reprezentatywny dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **C.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Obliczono średnią \pm SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. nd-brak sygnału. **D.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów C/ebp β , Ppar γ , adiponektyny i leptyny w komórkach zróżnicowanych. Wykresy przedstawiają średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.

6. Modulacja poziomu *C/ebpβ* zależy od RNazowej aktywności MCPIP1.

6.1. Ekspresja mutantu MCPIP1 Δ PIN nie zmniejsza poziomu transkryptu *C/ebpβ*.

Używając systemu retrowirusowego wywołano w preadipocytach 3T3-L1 ekspresję ludzkiego białka MCPIP1 (pMX-MCPIP1) lub ludzkiego białka MCPIP1 pozbawionego odcinka 137-296 tworzącego domenę PIN odpowiedzialną za degradację RNA (pMX-MCPIP1 Δ PIN). Komórki kontrolne transdukowane były pustym wektorem (pMX-puro). W eksperymencie posłużono się pulami komórek pozytywnie transdukowanych, wyselekcjonowanych antybiotykiem i namnożonych.

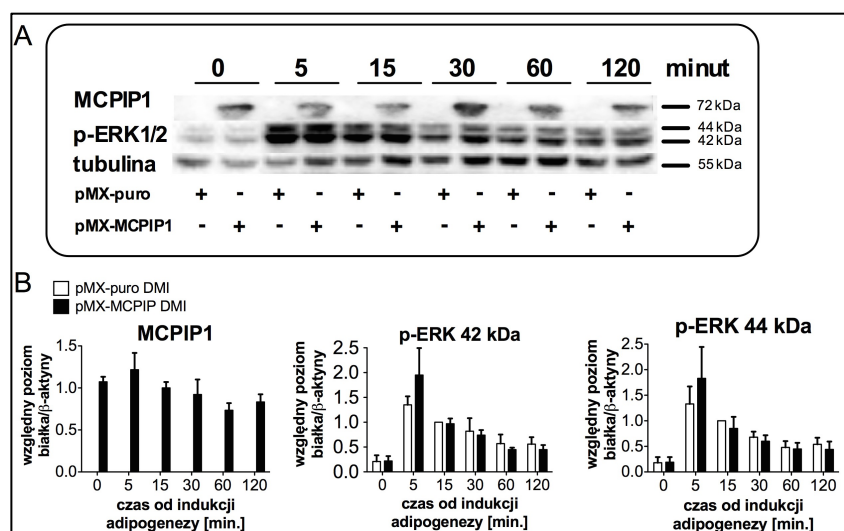
Komórki z ekspresją natywnej i zmutowanej formy MCPIP1 oraz komórki kontrolne wysiano w równej liczbie na naczynie hodowlane i dwa dni po osiągnięciu pełnej konfluencji, stymulowano do różnicowania pożywką różnicującą zawierającą INS, DEX, IBMX. Różnicowanie prowadzono przez 8 dni. W ostatnim dniu różnicowania komórki poddano barwieniu oil-red O. Wykazano, że stopień zróżnicowania preadipocytów z ekspresją MCPIP1 i MCPIP1 Δ PIN był porównywalny, ale obniżony względem komórek kontrolnych średnio o 40-50 % [Ryc.8A].



Ryc. 8. Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 z ekspresją MCPIP1 Δ PIN.

Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0h) komórki z ekspresją MCPIP1 (pMX-MCPIP1), mutantu MCPIP1 Δ PIN (pMX-MCPIP1 Δ PIN) oraz komórki kontrolne (pMX-puro) stymulowano do różnicowania. **A.** Fotografie mikroskopowe komórek w ósmym dniu różnicowania wybarwionych czerwienią oil-red O oraz wykres przedstawiający absorbancję wyekstrahowanego barwnika. Linia na mikro fotografiach odpowiada 100 μ m. **B.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu transkryptów genów *C/ebpβ* i *Pparγ* w komórkach w czasie różnicowania. Wykresy przedstawiają średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$ (względem komórek kontrolnych pMX-puro).

W czasie różnicowania, w określonych punktach czasowych (2 godziny i 4, 8 dni po indukcji różnicowania), komórki lizowano i izolowano z nich całkowite RNA, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że ekspresji zarówno dzikiej jak i zmutowanej formy MCPIP1 towarzyszył obniżony poziom mRNA Ppary w czasie różnicowania. W przeciwieństwie jednak do ekspresji pełnej formy MCPIP1, ekspresji MCPIP1 Δ PIN nie towarzyszyło obniżenie ilości mRNA C/ebp β [Ryc.8B].



Ryc.9. Aktywacja kinazy Erk1/2 po indukcji różnicowania w komórkach z ekspresją MCPIP1. Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości (0 minut) komórki 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 (pMX-MCPIP1) i komórki kontrolne (pMX-puro) stymulowano do różnicowania. **A.** Analiza western blot ekstraktów białkowych (30 μ g) izolowanych z komórek w wybranych punktach czasowych po indukcji różnicowania. Oznaczono poziom MCPIP1, fosforylowanej formy Erk1/2 (p-ERK1/2) oraz tubuliny, jako kontroli załadowania studzienek. Pokazano wynik reprezentatywny dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **B.** Analiza densytometryczna obrazu po western blot. Obliczono średnią \pm SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. nd- brak sygnału.

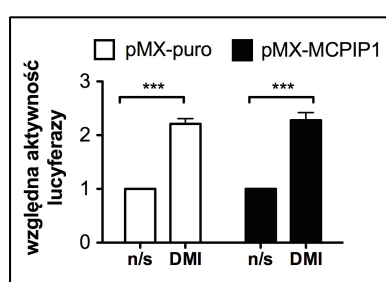
6.2. MCPIP1 nie wpływa na aktywację czynnika transkrypcyjnego Creb.

Białko Creb jest czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się do odcinków promotorowych w genach białek C/ebp, w tym C/ebp β . Kinaza Erk1/2 w początkowej fazie adipogenezy (1-2 godziny od indukcji) aktywuje białko Creb, przyczyniając się do aktywacji transkrypcji genu C/ebp β (4). Aby zbadać ewentualny wpływ MCPIP1 na aktywację promotora C/ebp β sprawdzono czy MCPIP1 zaburza aktywację (fosforylację) kinazy Erk1/2. Analizę fosforylacji Erk1/2 przeprowadzono metodą western blot w oparciu o 6 punktów czasowych (0-2 godziny od indukcji różnicowania) w trakcie różnicowania preadipocytów 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 (pMX-MCPIP1) oraz komórek kontrolnych, transdukowanych pustym wektorem (pMX-puro). Potwierdzono literaturowe

doniesienia o szybkiej aktywacji kinazy Erk1/2 po indukcji różnicowania (4). Obserwowane maksimum fosforylacji przypadło pięć minut po podaniu pożywki różnicującej, a podwyższony status fosforylacji utrzymywał się przez kolejne dwie godziny. Nie wykazano natomiast by ekspresja MCPIP1 zaburzała status lub kinetykę fosforylacji kinazy Erk1/2 w badanym przedziale czasu [Ryc.9].

6.3. MCPIP1 nie wpływa na wiązanie Creb do promotora C/EBP β .

Aby sprawdzić czy obniżony poziom mRNA dla C/ebp β wynika z zahamowania inicjacji transkrypcji przez MCPIP1, przeprowadzono eksperyment, w którym preadipocyty 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 (pMX-MCPIP1) i komórki kontrolne (pMX-puro) transfekowano przejściowo plazmidem reporterowym kodującym lucyferazę pod promotorem zawierającym 4 miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego Creb. Aby zniwelować wariację wynikającą z nieidentycznej wydajności transfekcji, komórki kotransfekowano plazmidem reporterowym pEF1/Myc-His/Gal kodującym β -galaktozydazę. W celu wywołania aktywacji Creb w preadipocytach, po 24 godzinach od transfekcji komórki stymulowano pożywką różnicującą, zawierającą INS, DEX, IBMX. Po upływie dwunastu godzin od stymulacji, tj. w chwili maksymalnej ekspresji C/ebp β , komórki lizowano i mierzono aktywność lucyferazy i β -galaktozydazy. Aktywność lucyferazy firefly znormalizowana względem aktywności β -galaktozydazy w komórkach z ekspresją MCPIP1 i w komórkach kontrolnych okazała się porównywalna, co wskazuje na brak wpływu MCPIP1 na aktywację transkrypcji C/ebp β przez czynnik transkrypcyjny Creb [Ryc.10].

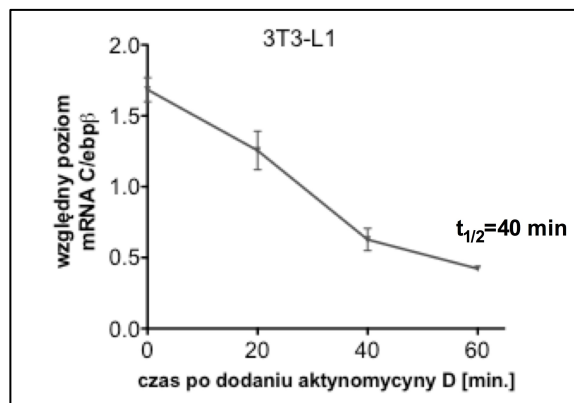


Ryc.10. Ekspresja konstruktów 4XCRE-lucyferaza w preadipocytach z ekspresją MCPIP1 w czasie różnicowania. Jeden dzień po uzyskaniu pełnej gęstości preadipocyty 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 (pMX-

MCPIP1) i komórki kontrolne (pMX-puro) transfekowano przejściowo plazmidem reporterowym kodującym lucyferazę pod promotorem zawierającym 4 miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego Creb. 24 godziny po transfekcji komórki stymulowano do różnicowania (DMI) lub pozostawiono bez stymulacji (n/s). Wykres przedstawia aktywność lucyferazy firefly znormalizowaną względem aktywności β -galaktozydazy. Obliczono średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu wykonanego w duplikacie.

6.4. MCPIP1 skraca czas półtrwania transkryptu C/EBP β .

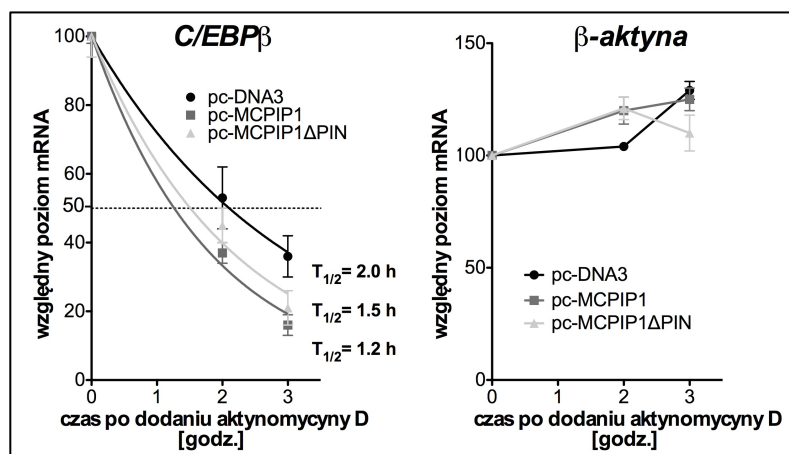
Bazalna ekspresja C/ebp β w preadipocytach jest niska. Aby zmierzyć czas półtrwania transkryptu C/ebp β w komórkach 3T3-L1 należało najpierw wyidukować jego ekspresję. W tym celu konfluentne komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania pożywką różnicującą, zawierającą INS, DEX, IBMX. Dwanaście godzin po indukcji różnicowania do komórek dodano aktynomycynę D i w określonych punktach czasowych lizowano komórki. Z lizatów wyizolowano RNA, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji. Krzywą zaniku transkryptu C/ebp β dla różnicujących komórek 3T3-L1 przedstawia Ryc.11.



Ryc.11. Czas półtrwania transkryptu C/ebp β w komórkach 3T3-L1 po indukcji różnicowania. Dwa dni po osiągnięciu pełnej gęstości komórki 3T3-L1 stymulowano do różnicowania. Jednocześnie podano komórkom aktynomycynę D. W określonych punktach czasowych oznaczono poziom mRNA C/ebp β w komórkach metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykres przedstawia średnią \pm SEM dla dwóch powtórzeń eksperymentu w duplikacie.

W następnym etapie postanowiono sprawdzić czy poziom transkryptu C/ebp β zależy od degradacji mRNA prowadzonej przez MCPIP1. Ponieważ ekspresja C/ebp β w komórkach linii 3T3-L1 jest ograniczona do kilku godzin po stymulacji, do eksperymentu wybrano komórki linii HepG2, cechujące się stałą i wysoką endogenną ekspresją C/EBP β . Komórki transfekowano przejściowo plazmidami kodującymi MCPIP1 (pc-MCPIP1) lub zmutowaną formę MCPIP1, pozbawioną odcinka 137-296 tworzącego domenę PIN, odpowiedzialną za degradację RNA (pc-MCPIP1 Δ PIN). Komórki kontrolne transfekowane były pustym plazmidem (pc-DNA3). 24 godziny po transfekcji w komórkach zablokowano transkrypcję przez dodanie do pożywki aktynomycyny D. Komórki w wybranych punktach czasowych (1, 2, 3 godziny od dodania aktynomycyny D) były lizowane, a wyizolowane z nich RNA poddano odwrotnej transkrypcji. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że transkrypt genu C/EBP β ma krótki czas półtrwania (2 godziny). Ulegał on skróceniu w obecności dzięki formie MCPIP1 (1,2 godziny) oraz –

choć w mniejszym stopniu – w obecności zmutowanej formy MCPIP1 Δ PIN (1,5 godziny) [Ryc.12]. Aby wykluczyć niespecyficzny efekt ekspresji egzogennych białek na poziom mRNA, w tym samym przedziale czasu zmierzono czas półtrwania transkryptu β -aktyny, nie będącego substratem MCPIP1. Czas półtrwania β -aktyny nie zmniejszył się w obecności MCPIP1 ani MCPIP1 Δ PIN. Powyższe dane wykazują zaangażowanie MCPIP1 w negatywną regulację transkryptu C/EBP β .

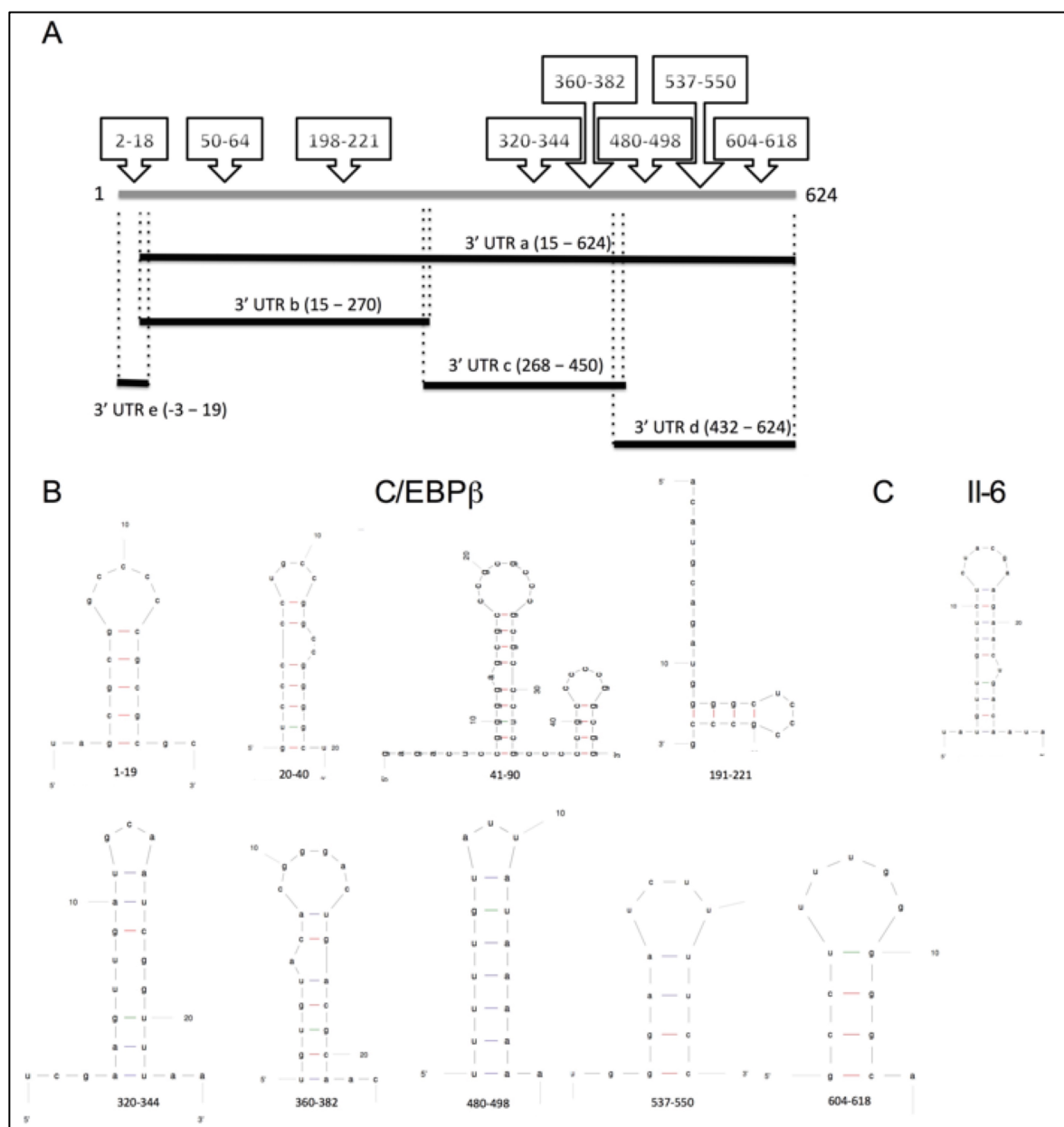


Ryc.12. Czas półtrwania transkryptu C/EBP β w komórkach HepG2 z ekspresją MCPIP1. Komórki HepG2 transfekowano plazmidami kodującymi MCPIP1 (pc-MCPIP1), MCPIP1 Δ PIN (pc-MCPIP1 Δ PIN) lub plazmidem kontrolnym (pc-DNA3). 24 godziny po transfekcji do komórek dodano aktynomycynę D i w zaznaczonych punktach czasowych oznaczono poziom mRNA C/EBP β i β -aktyny metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy przedstawiają średnią \pm SEM dla trzech powtórzeń eksperymentu wykonanego w duplikacie.

6.5. MCPIP1 degraduje 3'UTR transkryptu C/EBP β .

Aby sprawdzić czy MCPIP1 rozpoznaje sekwencję 3'UTR transkryptu ludzkiego C/EBP β , wykorzystano system reporterowy lucyferazy p μ ir-GLO. Do plazmidu, na końcu 3' sekwencji kodującej lucyferazę firefly wstawiono fragmentu sekwencji 3'UTR transkryptu C/EBP β . Podczas wyboru klonowanych fragmentów najpierw porównano 3'UTR mysiego i ludzkiego transkryptu C/EBP β . Następnie, w rejonach konserwacyjnych ewolucyjnie wyszukano z użyciem serwera mFOLD miejsca tworzące struktury drugorzędowe (spinki). Konstrukty genetyczne przygotowano tak, aby zawierały 2-3 potencjalne „spinki” [Ryc.13A,B). Komórki HepG2 kotransfekowano odpowiednim plazmidem reporterowym p μ ir-GLO i plazmidem pcDNA3.1-MCPIP1 lub plazmidem pcDNA3.1-MCPIP1/D141A, kodującym MCPIP1 z mutacją pojedynczego aminokwasu uszkadzającą aktywność RNazową białka. Komórki kontrolne kotransfekowane były odpowiednim plazmidem p μ ir-GLO i pustym wektorem pcDNA3.1. Jako pozytywnej kontroli w badaniu

aktywności MCPIP1 użyto plazmidu pmir-GLO z wklonowaną sekwencją 3'UTR transkryptu *Il-6*, będącego substratem MCPIP1.



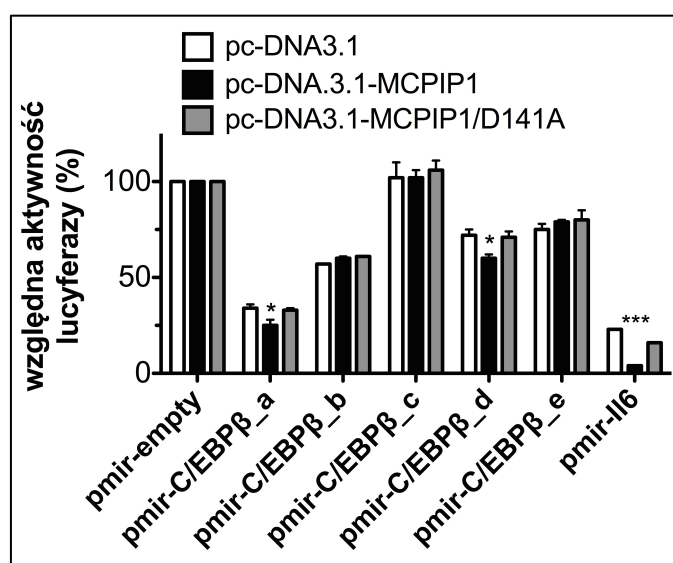
Ryc.13. **A.** Schematyczne przedstawienie rejonów 3'UTR C/EBP β klonowanych do wektorów reporterowych pmir-GLO wykorzystanych w eksperymencie. W ramkach zaznaczono rejon 3'UTR potencjalnie formujące struktury typu „spinka”. **B.** Struktury drugorzędowe mRNA C/EBP β powstające w obrębie klonowanych rejonów. **C.** Struktura „spinki” w 3'UTR *Il-6*, która jest rozpoznawana i trawiona przez MCPIP1.

Wyniki pomiaru aktywności lucyferazy [Ryc.14] wykazały, że UTR transkryptu C/EBP β zawiera rozproszone sekwencje obniżające jego stabilność i/lub translację. Spośród badanych fragmentów tylko rejon zawarty w konstrukcie pmir-C/EBP β _c był odporny na komórkowe (endogenne) mechanizmy regulacji. W przypadku pozostałych konstruktów,

sama obecność fragmentów 3'UTR *C/EBPβ* powodowała spadek aktywności lucyferazy. Najbardziej widoczny był on w przypadku najdłuższego fragmentu (pmir-C/EBPβ_a). Lucyferaza kodowana przez ten plazmid miała niemal czterokrotnie niższą aktywność w porównaniu do białka kodowanego przez pusty plazmid pmir-GLO. Obniżenie aktywności lucyferazy kodowanej przez plazmidy pmir-C/EBPβ_b, pmir-C/EBPβ_d i pmir_C/EBPβ_e zawierało się w przedziale 25-50 %.

Obecność MCPIP1 dodatkowo obniżała aktywność lucyferazy w przypadku konstruktów pmir-C/EBPβ_a i pmir-C/EBPβ_d. Oznacza to, że w 3'UTR *C/EBPβ* rejonem podatnym na regulację prowadzoną przez MCPIP1 jest rejon 432-624. Dla obu konstruktów obniżenie aktywności lucyferazy widoczne było tylko w przypadku ekspresji aktywnego MCPIP1, natomiast ekspresja MCPIP1 pozbawionego aktywności nukleolitycznej (MCPIP1/D141A) nie zaburzała aktywności lucyferazy.

Sama obecność 3'UTR transkryptu *Il-6* również działała destabilizująco na transkrypt lucyferazy. Dodatkową destabilizację powodowała ekspresja MCPIP1. Potwierdza to dotychczasowe doniesienia literaturowe o bezpośredniej degradacji RNA *Il-6* przez MCPIP1.

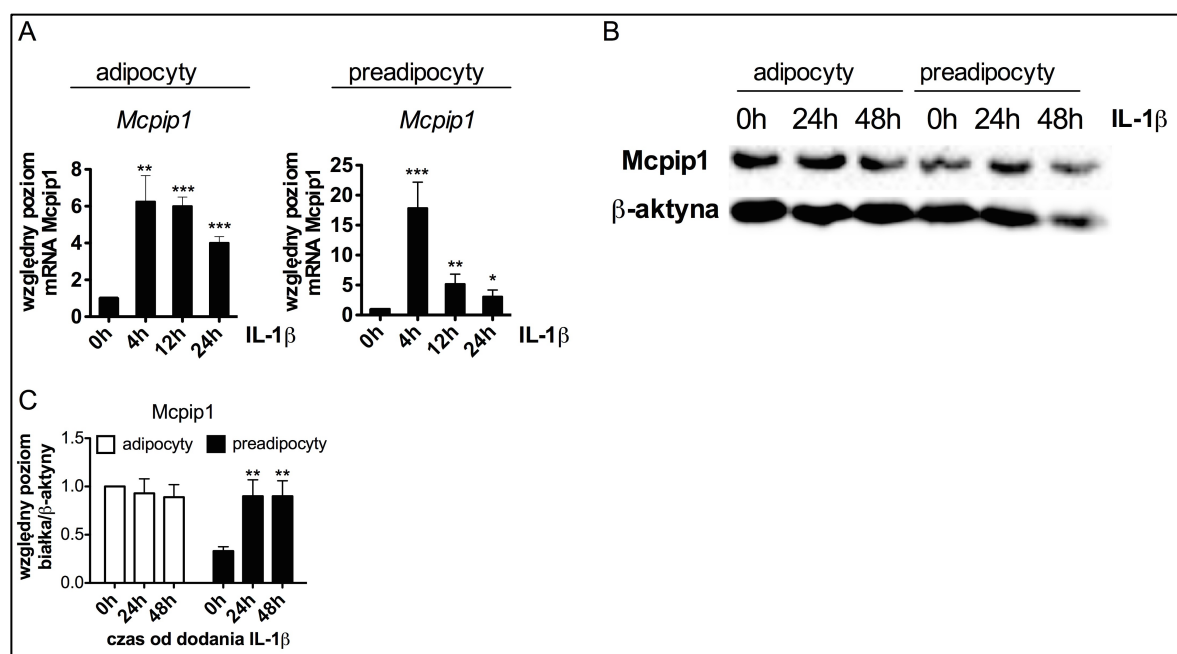


Ryc.14. Ekspresja konstruktyw pmi-GLO w komórkach HepG2 z ekspresją MCPIP1. Komórki HepG2 transfekowano mieszaniną odpowiedniego wektora pmi-GLO i wektora pcDNA kodującego MCPIP1 (pcDNA3.1-MCPIP1),

mutanta MCPIP1/D141A (pcDNA3.1-MCPIP1/D141A) lub plazmidem kontrolnym (pcDNA3.1). 24 godziny po transfekcji komórki lizowano i oznaczono aktywność lucyferazy reporterowej firefly i lucyferazy *Renilla* jako kontroli transfekcji. Wykres przedstawia aktywność lucyferazy firefly względem aktywności lucyferazy *Renilla*. Dla każdego z testowanych wektorów względną aktywność lucyferazy kodowanej przez wektor pmi-GLO-empty ustalono jako 100 %. Wykres przedstawia średnią ± SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu wykonanego w duplikacie. *p < 0,05, ***p < 0,002 obliczone względem komórek transfekowanych pustym pcDNA3.1.

7. IL-1 β indukuje ekspresję *Mcpip1* w preadipocytach, ale nie w adipocytach.

Z wcześniejszych badań wynikało, że prozapalna cytokina IL-1 β jest silnym induktorem ekspresji MCP1 (100). Ponadto pokazano, że IL-1 β moduluje metabolizm tkanki tłuszczowej, a produkowana może być zarówno przez preadipocyty, adipocyty jak i makrofagi (76). W celu sprawdzenia czy IL-1 β indukuje ekspresję *Mcpip1* w komórkach 3T3-L1, niezróżnicowane preadipocyty oraz komórki w ósmym dniu różnicowania (adipocyty) stymulowano IL-1 β . Po 4, 12 i 24 godzinach od podania cytokiny, komórki lizowano i wyizolowano z nich RNA. Białko izolowano z komórek stymulowanych cytokiną przez 24 i 48 godzin. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane.



Ryc.15. Ekspresja *Mcpip1* po stymulacji IL-1 β w adipocytach i w preadipocytach.

A. Komórki 3T3-L1 w ósmym dniu różnicowania (adipocyty) oraz komórki niezróżnicowane (preadipocyty) stymulowano IL-1 β . W wybranych punktach czasowych oznaczono poziom transkryptu *Mcpip1* metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy przedstawiają poziom transkryptu *Mcpip1* po stymulacji względem poziomu przed stymulacją ustalonego jako 1. Pokazano średnią \pm SEM dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. **B.** Analiza western blot ekstraktów białkowych zebranych z adipocytów i preadipocytów w zaznaczonych punktach czasowych po stymulacji IL-1 β . Pokazano wynik reprezentatywny dla trzech niezależnych eksperymentów. **C.** analiza densytometryczna obrazu po western blot. Wykresy przedstawiają średnią \pm SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. ** $p < 0,05$ liczone względem 0h.

Analiza ilości transkryptu *Mcpip1* wykonana metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że preadipocyty i adipocyty różnią się wzorem odpowiedzi na IL-1 β . Choć dla obu typów komórek indukcja ekspresji *Mcpip1* następowała bardzo szybko po dodaniu

cytokiny i osiągała maksymalny poziom już w czwartej godzinie, to w przypadku preadipocytów poziom mRNA *Mcpip1* obniżał się w kolejnych godzinach, a w przypadku adipocytów pozostawał zwiększony [Ryc.15A]. Trzeba zaznaczyć, że ekspresja *Mcpip1* wzrastała w adipocytach średnio siedemnastokrotnie, po czym w 12-tej i 24-tej godzinie po stymulacji wzrost był odpowiednio pięcio- i trzykrotny. Natomiast w adipocytach ekspresja *Mcpip1* indukowana cytokiną osiągała maksymalnie sześciokrotny wzrost i w badanym przedziale czasu tylko nieznacznie się obniżyła.

Analiza poziomu białka wykonana metodą western blot wykazała wzrost ilości *Mcpip1* w preadipocytach pod wpływem IL-1 β , widoczny zarówno w 24-tej, jak i w 48-ej godzinie od podania cytokiny. Analiza nie wykazała natomiast wzrostu ilości *Mcpip1* w adipocytach pod wpływem stymulacji IL-1 β [Ryc.15B,C].

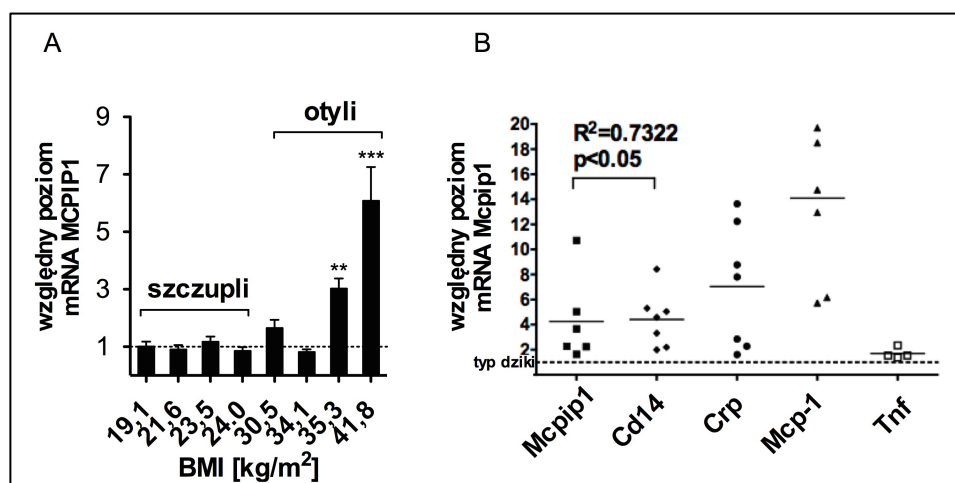
8. Poziom transkryptu MCPIP1 jest podwyższony w otyłości.

Metodą PCR w czasie rzeczywistym określono poziom transkryptu *MCPIP1* w wycinkach podskórnej tkanki tłuszczowej pochodzącej od czterech pacjentów o prawidłowej masie ciała oraz od czterech pacjentów otyłych. Wycinki z grupy kontrolnej pobrane były w czasie zabiegów ginekologicznych (resekcja macicy) lub gastrologicznych (operacja na jelicie cienkim) od pacjentów o BMI w zakresie normy tj. 20-24 kg/m². Wycinki od pacjentów otyłych pobrane zostały w trakcie operacji zmniejszania żołądka. Wskaźnik BMI u tych pacjentów przekraczał 30 kg/m².

Analiza wykazała, że u pacjentów o prawidłowej masie ciała poziom transkryptu *Mcpip1* w tkance tłuszczowej podskórnej jest podobny. Natomiast trzech na czterech badanych pacjentów otyłych charakteryzowało się wyższym poziomem ekspresji *MCPIP1*, a ekspresja *MCPIP1* była tym wyższa im wyższy był stopień otyłości [Ryc.16A].

Poziom transkryptu *Mcpip1* oraz wybranych genów związanych ze stanem zapalnym analizowano także w podskórnej tkance tłuszczowej myszy o fenotypie cukrzycowym. W eksperymencie wykorzystano 7 samców szczepu C57BL/6 o genotypie *db/db* i 4 samców typu dzikiego. Wyniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym pokazały, że poziom mRNA *Mcpip1* w podskórnej tkance tłuszczowej jest wśród osobników *db/db* bardzo zmienny, ale zawsze podwyższony w porównaniu z myszami kontrolnymi. Dużą zmiennością charakteryzował się także poziom ekspresji innych genów prozapalnych – *Crp* (*C-reactive protein*), *Mcp-1* i *Tnf- α* . Zmierzono również poziom ekspresji genu *Cd14*, kodującego białko powierzchniowe makrofagów i monocytów. Jego ekspresja była podwyższona u

mysz *db/db* i skorelowana dodatnio ($R^2=0,7322$) z ekspresją *Mcpip1* [Ryc.16B].



Ryc.16. Poziom ekspresji *Mcpip1* w tkance tłuszczowej w otyłości.

A. Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu mRNA MCPIP1 w podskórnej tkance tłuszczowej pobranej od osób szczupłych (n=4) i otyłych (n=4), o różnym indeksie BMI. Średni poziom mRNA w tkankach osób szczupłych oznaczono na wykresie linią przerywaną. Pokazano średnią \pm SD. **B.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym poziomu mRNA *Mcpip1* i wybranych genów związanych ze stanem zapalnym w podskórnej tkance tłuszczowej pobranej od myszy szczepu C57BL/6 o genotypie dzikim (n=4) i genotypie *db/db* (n=7). Średni poziom każdego z mRNA w tkance myszy typu dzikiego oznaczono na wykresie linią przerywaną. Pokazano średnią \pm SD. Na wykresie oznaczono również wartość współczynnika korelacji Pearsona R^2 . **p < 0.02, ***p < 0.002 (względem średniej dla osób szczupłych).

VI. Dyskusja.

1. Zastosowany model badawczy.

Adipogeneza to złożony proces przekształcania się komórki macierzystej w adipocyt, to jest komórkę wyspecjalizowaną w magazynowaniu trójglicerydów. Adipogenezę można badać *in vitro* stosując modelowe linie komórkowe. Do badań na poczet tej pracy wybrano komórki linii 3T3-L1. Są one najczęściej używanym modelem badawczym adipogenezy, przez co zakres doniesień literaturowych opisujących molekularne mechanizmy ich różnicowania jest dużo obrzerniejszy niż w przypadku innej linii preadipocytarnej - 3T3-F442A. Morfologicznie 3T3-L1 są podtypem fibroblastów (adipoblasty). Wyizolowano je z mysich embrionów szczepu Swiss (37). Ich potencjał do różnicowania jest ograniczony wyłącznie w kierunku adipocytów. Różnicują *in vitro* w ciągu 8-10 dni po zadziałaniu stymulantów- insuliny, glukokortykosteroidu (deksametazonu) i inhibitora fosfodiesterazy (IBMX, tj. 3-izobutylo-1-metyloksantyny). 3T3-L1, podobnie jak 3T3-F442A, różnicują także *in vivo* po wszczepieniu myszom bezgrasiczym (92, 131).

Należy pamiętać, że posługiwanie się linią klonalną w badaniu adipogenezy daje przybliżony obraz procesów zachodzących w organizmie. Pomija się na przykład tkankowy kontekst procesu. Tymczasem w tkance tłuszczowej adipocyty i komórki prekursorowe adipocytów pozostają w kontakcie z innymi typami komórek - fibroblastami, neuronami, komórkami odpornościowymi - modyfikującymi ich fenotyp i metabolizm. Kolejnym ograniczeniem stosowania linii klonalnej jest aneuploidalność komórek, która może wpływać na ich potencjał do różnicowania. Ponadto, z linii komórkowej powstają adipocyty białe o nieokreślonym typie. Tymczasem w organizmie istnieje kilka depozytów białej tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej, a ich komórki różnią się potencjałem do adipogenezy i aktywnością metaboliczną (91, 127). Co więcej, indukcja adipogenezy *in vivo* jest wypadkową sygnałów pochodzących od kilku organów – trzustki (poprzez insulinę), osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (poprzez kortyzol), gonad (poprzez hormony płciowe) i samej tkanki tłuszczowej (poprzez czynniki auto- i parakrynne). W opisanych tutaj badaniach adipogenezę indukowano stosując standardową pożywkę różnicującą, która jednak w sposób uproszczony symuluje systemowy sygnał do różnicowania. Pożywka zawiera bowiem insulinę, indukującą transport glukozy do komórek oraz deksametazon i IBMX, indukujące syntezę i gromadzenie lipidów. Różnicowaniu sprzyja też stała nadpodaż glukozy, jako że pożywka hodowlana zawiera

podwyższone stężenie tego cukru (4,5 g/l). Warto jednak pamiętać, że taka pożywka tworzy niefizjologiczne, stale hiperglikemiczne środowisko.

Pomimo wspomnianych ograniczeń poznawczych, zarówno linia komórkowa 3T3-L1, jak i 3T3-F442A, jest szeroko stosowana w badaniach nad różnicowaniem preadipocytów i w istotny sposób przyczyniły się do poznania molekularnych mechanizmów zawiadujących adipogenezą, w tym do rozpoznania białek kluczowych dla tego procesu.

2. Ekspresja genu *Mcpip1* w czasie adipogenezy.

W eksperymentach *in vitro* wykazano, że w wyniku ekspresji MCPIP1 neuroprogenitorowe komórki NT2D1 różnicują w komórki podobne do astrocytów (153), a komórki krwi obwodowej różnicują do osteoklastów (154). Nadekspresja MCPIP1 w komórkach macierzystych mezenchymalnych oraz HUVEC stymuluje angiogenezę (73, 107, 125). Z kolei obniżenie ekspresji MCPIP1 jest konieczne w czasie różnicowania komórek układu nerwowego (163, 164). Zważywszy na zaangażowanie MCPIP1 w procesy różnicowania wielu typów komórek, w niniejszej pracy podjęto się zbadania roli *Mcpip1* w różnicowaniu mysich preadipocytów.

Badając adipogenezę komórek 3T3-L1 wykazano, że ilość transkryptu *Mcpip1* rośnie w początkowej fazie różnicowania osiągając maksymalny poziom w szóstej godzinie po indukcji różnicowania, po czym powraca do poziomu podstawowego [Ryc.1B]. Podobny, choć nie identyczny wzór ekspresji *Mcpip1* w czasie adipogenezy przedstawiono w pracy Younce i wsp. Autorzy pokazali, że ekspresja *Mcpip1* jest podwyższona w komórkach różnicujących względem komórek kontrolnych w dniu pierwszym i drugim, a wraca do poziomu porównywalnego z komórkami nieróżnicującymi w dniu trzecim i czwartym (169).

Aby odpowiedzieć na pytanie o molekularny mechanizm aktywacji transkrypcji *Mcpip1* wzięto pod uwagę dwa czynniki transkrypcyjne - NF- κ B i Elk-1/SRF. NF- κ B aktywuje promotor genu *MCPIP1* w komórkach linii HepG2 (135). Jednak uzyskane wyniki oraz dane literaturowe wskazują, że aktywacja ekspresji *Mcpip1* w adipogenezie poprzez ten czynnik transkrypcyjny jest mało prawdopodobna. Badając fosforylację podjednostki p65 w czasie różnicowania 3T3-L1 wykazano brak aktywacji NF- κ B. Pokazano, że poziom niefosforylowanej jak i ufosforylowanej, aktywnej formy p65 nie zmienia się w początkowych (tj. do dnia trzeciego) etapach różnicowania [Ryc.4]. Również Yarmo i wsp. wykazali, że NF- κ B nie bierze udziału w adipogenezie. Co więcej, aktywacja NF- κ B

hamuje różnicowanie ludzkich preadipocytów (165). Natomiast wyciszenie szlaku NF- κ B (poprzez dodanie adiponektyny) promuje adipogenezę komórek 3T3-L1 (112).

Drugim czynnikiem transkrypcyjnym zdolnym do aktywacji ekspresji *Mcpip1* jest Elk-1/SRF aktywowany kinazą ERK (63). Prusty i wsp. udowodnili, że w proliferacyjnej fazie różnicowania komórek 3T3-L1 (faza ekspansji klonalnej) dochodzi do przejściowej aktywacji kinazy Erk1/2 (117). Potwierdzono aktywację Erk1/2 w pierwszych godzinach różnicowania [Ryc.9]. Co więcej, wykazano, że ekspresja *Mcpip1* indukowana jest tylko przez pełną, tj. zawierającą wszystkie trzy składniki (insulina, deksametazon, IBMX) pożywkę różnicującą. Żaden z czynników adipogennych podany samodzielnie nie aktywował transkrypcji genu *Mcpip1* [Ryc.2]. Prusty i wsp. we wspomnianej wyżej pracy pokazali, że żaden ze składników adipogennych podany pojedynczo nie aktywuje kinazy Erk1. Tak więc można przypuszczać, że obserwowany w szóstej godzinie różnicowania 3T3-L1 wzrost ilości mRNA kodującego *Mcpip1* wynika z aktywacji transkrypcji genu *Mcpip1* przez czynnik Elk-1. Aby potwierdzić to przypuszczenie należałoby zastosować inhibitory farmakologiczne kinazy Erk1/2 i wówczas zbadać poziom transkryptu *Mcpip1*.

Zważywszy na przebieg krzywej wyznaczającej poziom transkryptu *Mcpip1* w czasie różnicowania komórek 3T3-L1, zaskakująco przedstawia się krzywa ekspresji samego białka. Przyrost ilości *Mcpip1* widoczny jest bardzo wcześnie, bo już w szóstej godzinie od indukcji adipogenezy, a ilość białka zwiększa się w dojrzewających komórkach. Znamienne jest jednak, że w pierwszej dobie od indukcji różnicowania ma miejsce przejściowy spadek ilości *Mcpip1*, a wykryte białko cechuje szybsze tempo migracji w żelu poliakrylamidowym [Ryc.3]. Obserwowany spadek poziomu *Mcpip1* może wynikać ze zmniejszonej translacji np. wskutek degradacji przez *Mcpip1* własnego transkryptu. Zdolność degradacji własnego transkryptu przez MCPIP1 została udowodniona przez Mizgalską i wsp. (100). Zmniejszenie ilości *Mcpip1* w pierwszym dniu adipogenezy może ponadto wynikać z degradacji proteasomalnej. Iwasaki i wsp. pokazali, że po stymulacji komórek linii HeLa przez IL-1 β , lub po stymulacji embrionalnych fibroblastów przez LPS, a także po stymulacji makrofagów przez wszystkie ligandy TLR z wyjątkiem poly (I:C), dochodzi w ciągu kilkunastu minut do proteasomalnej degradacji MCPIP1, po której następuje resynteza białka (54). Rola proteasomu w degradacji MCPIP1 została udowodniona również w innych eksperymentach (133, 134). Praca Iwasaki i wsp. pokazuje, że proteasomalna degradacja MCPIP1 jest poprzedzona fosforylacją MCPIP1 przez kinazy IKK α i IKK β (54). Modyfikacja w postaci fosforylacji mogłaby wyjaśnić obserwowaną

różnicę w tempie migracji białka w żelu poliakryloamidowym. Ponieważ kinazy IKK są nieaktywne w czasie adipogenezy (o czym świadczy brak aktywacji podjednoski p65), fosforylację mogłaby prowadzić inna kinaza, na przykład kinaza szlaku MEK-Erk1/2, aktywowana już w pierwszych minutach procesu [Ryc.9].

Dynamiczna kontrola ilości Mcpip1 w pierwszym dniu adipogenezy sugeruje, że białko to może działać jako „włącznik” różnicowania, którego przejściowa indukcja uruchamia proces. Powyższa hipoteza poparta jest obserwacją dokonaną przez Younce i wsp. Pokazali oni, że przebieg adipogenezy 3T3-L1 uzależniony jest od następujących po sobie wydarzeń - występującego w ciągu pierwszych godzin adipogenezy stresu oksydacyjnego, następującego po nim stresu retikulum endoplazmatycznego i ostatecznie autofagii (168). Co ważne, pokazali, że pierwszy z nich - stres oksydacyjny - jest w komórkach 3T3-L1 indukowany przez Mcpip1. Wywołując przejściową ekspresję białka MCPIP1-GFP w konfluentnych preadipocytach 3T3-L1 można uruchomić proces adipogenezy nawet przy braku hormonalnych czynników inicjujących (169).

Rozpoczynający się w szóstej godzinie różnicowania przyrost ilości Mcpip1 wynika najprawdopodobniej z aktywnej translacji nowo syntezowanego transkryptu. Zastanawia jednakże przyrost ilości Mcpip1 w różnicujących komórkach po dniu pierwszym. Występuje on pomimo tego, że ilość transkryptu Mcpip1 w tych komórkach porównywalna jest z komórkami nieróżnicującymi, a przejawiającymi niską ekspresję białka. Wyjaśnieniem może być efekt stabilizacji białka, dzięki któremu nawet bazalny poziom transkryptu umożliwiłby gromadzenie się Mcpip1. Do takiej stabilizacji Mcpip1 podczas adipogenezy komórek 3T3-L1 mogłoby dochodzić wskutek inhibicji proteasomu. Wiadomo, że w czasie adipogenezy ścieżka proteasomalnej degradacji białek musi zostać wyłączona aby mogło dojść do kumulacji Ppar γ (68) i że w różnicujących komórkach linii 3T3-L1 inhibicja proteasomu następuje wskutek aktywacji autofagii już po 24 godzinach od indukcji różnicowania (174). Przypuszczalnie, to wyhamowanie proteasomu w pierwszym dniu adipogenezy umożliwia obserwowaną od drugiego dnia akumulację Mcpip1. Wskutek tej akumulacji, poziom białka Mcpip1 różni się między preadipocytami, a adipocytami około pięciokrotnie [Ryc.3, Ryc.15B].

Nasuwa się pytanie o możliwą rolę Mcpip1 w adipocytach. W komórkach odpornościowych (monocytach, limfocytach) oraz w komórkach wątrobiaka (HepG2) Mcpip1 funkcjonuje jako hamulec stanu zapalnego. Jednym z elementów supresji jakie Mcpip1 wywiera na szlaki zapalne jest inhibicja konstytutywnej i indukowanej aktywności

NF- κ B (83, 85, 105, 135). Analiza poziomu aktywacji NF- κ B w czasie adipogenezy pokazuje, że począwszy od trzeciego dnia różnicowania, poziom fosforylacji Ser536 w podjednostce p65 zmniejsza się o połowę, w porównaniu do adipocytów we wcześniejszej fazie różnicowania [Ryc.4]. Ponieważ fosforylacja p65 na Ser536 powiązana jest z indukowaną aktywnością kompleksu NF- κ B, można wnioskować, że począwszy od trzeciego dnia adipogenezy, aktywność NF- κ B w komórkach 3T3-L1 jest niższa. Berg i wsp. używając konstruktów reporterowych do badania aktywności NF- κ B pokazali wprawdzie, że podczas adipogenezy 3T3-L1 aktywność NF- κ B jest wyższa w adipocytach niż w preadipocytach (6), są to jednak wyniki sprzeczne z szeregiem innych doniesień, w tym z doniesieniami na temat antagonistycznego efektu PPAR γ na aktywność transkrypcyjną NF- κ B. Mechanizmy tej regulacji obejmują zahamowanie degradacji I κ B α , zmniejszenie translokacji do jądra p65 i zmniejszenie wiązania p65 do DNA (51, 67, 120). Obserwowane obniżenie poziomu fosforylacji p65 w różnicujących komórkach 3T3-L1 może więc wynikać ze wzrostu ekspresji Ppar γ , rozpoczynającego się właśnie w trzecim dniu różnicowania [Ryc.3]. Niewykluczone jednak, że w końcowych dniach różnicowania, a także w dojrzałych adipocytach, Ppar γ i Mcpip1 działają synergistycznie w kierunku zahamowania aktywności NF- κ B.

Oprócz hamowania aktywności NF- κ B, MCPIP1 może działać jako RNaza. Odkryto szereg regulowanych przez niego mRNA i miRNA i nie wydaje się, by lista ta była kompletna (125, 142). W czasie adipogenezy dochodzi do zmiany profilu syntezowanych białek, dzięki czemu preadipocyt ulega morfologicznej i metabolicznej przemianie. Pokazano, że podczas adipogenezy preadipocytów izolowanych z tkanki tłuszczowej, jak i komórek 3T3-L1, ekspresja wielu miRNA ulega obniżeniu (60, 110). Można przypuszczać, że wzrost poziomu Mcpip1 w trakcie różnicowania może służyć właśnie zahamowaniu ekspresji tych miRNA.

3. Wpływ MCPIP1 na poziom C/ebp β i Ppar γ w różnicujących komórkach 3T3-L1.

3.1 Efekt ekspresji egzogennej MCPIP1 i wyciszenia ekspresji endogennej Mcpip1 w preadipocytach.

Yeh i wsp. pokazali, że ekspresja egzogennej C/ebp β wywołuje spontaniczne różnicowanie komórek 3T3-L1 przy braku hormonalnych czynników inicjujących (167). Wu i wsp. pokazali natomiast, że nawet fibroblasty NIH-3T3 różnicują pod wpływem hormonów jeśli wywoła się w nich ekspresję C/ebp β (161). C/ebp β jest więc czynnikiem

transkrypcyjnym wystarczającym do indukcji adipogenezy. Jego podstawową funkcją jest indukcja mitotycznej ekspansji klonalnej oraz aktywacja ekspresji PPAR γ oraz C/EBP α (147), dwóch czynników transkrypcyjnych regulujących końcowe różnicowanie adipocytów (122).

W niniejszej pracy pokazano, że podczas adipogenezy preadipocytów 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 ekspresja C/ebp β jest niższa niż w komórkach kontrolnych. Ilość mRNA kodującego C/ebp β w szczycie krzywej ekspresji jest średnio 2-krotnie mniejsza w tych komórkach w porównaniu z komórkami kontrolnymi [Ryc.6B], a ilość białka jest niższa średnio o połowę [Ryc.6C,D]. Obniżenie to jest wystarczające by wpłynąć na aktywność C/ebp β . Ilustruje to obniżony poziom mRNA czynnika c-fos, którego transkrypcja regulowana jest przez C/ebp β [Ryc.6E]. Jako że c-fos jest białkiem uczestniczącym w wyjściu komórek z fazy G0 do G1, można przypuszczać, że MCPIP1, w sposób pośredni, moduluje proliferacyjny potencjał komórek. Ekspresji egzogenego MCPIP1 w preadipocytach towarzyszy również obniżona około trzykrotnie ilość transkryptu PPAR γ . Ekspresja białka PPAR γ różni się przy tym dwukrotnie [Ryc.6C,D]. Przekłada się to na zmniejszoną aktywność transkrypcyjną białka, co widoczne jest na przykładzie genów kodujących transporter kwasów tłuszczowych (Fabp4) i adiponektynę. Poziom ich transkryptów jest wyraźnie niższy w komórkach z ekspresją MCPIP1 [Ryc.6E]. Niska ekspresja C/ebp β pociąga za sobą niską wydajność różnicowania [Ryc.6A,B]. Z kolei stabilnie wyciszona ekspresja Mcpip1 skutkuje średnio 7-krotnie wyższą ekspresją transkryptu C/ebp β zarówno na poziomie podstawowym, jak i indukowanym [Ryc.5A]. Podwyższona ilość transkryptu C/ebp β przekłada się na wyższy poziom białka [Ryc.5B]. Wyższa jest również ekspresja transkryptu i białka PPAR γ . Nie zaobserwowano jednak, by wyciszenie ekspresji Mcpip1 przekładało się na wyższą liczbę wytworzonych adipocytów [Ryc.5E].

Powyższe obserwacje są sprzeczne z zaprezentowanymi przez Younce i wsp. (169). Autorzy pokazali, że komórki transfekowane plazmidem kodującym fuzyjne białko MCPIP1-GFP mają wyższą ekspresję transkryptów i białek C/ebp β i Ppar γ niż komórki transfekowane plazmidem kontrolnym kodującym GFP. Co więcej, ekspresja MCPIP1-GFP uruchamiała ich różnicowanie bez konieczności stymulacji hormonalnej (169). Pokazano ponadto, że wyciszeniu Mcpip1 towarzyszy obniżenie ekspresji C/ebp β jak i pozostałych markerów adipogenezy oraz zmniejszenie liczby powstałych adipocytów (169). Powodu rozbieżności opisanych tu wyników z wynikami Younce i wsp. można upatrywać w odmiennym schemacie badawczym. Grupa pracowała wprawdzie na tym

samym modelu komórkowym (preadipocyty 3T3-L1) lecz wywoływała w nich ekspresję fuzyjnego białka MCPIP1-GFP. Co więcej, w żadnej z dwóch prac dotyczących adipogenezy Autorzy nie zaznaczyli w jakim punkcie czasowym komórki były transfekowane ani przez jak długi czas ekspresja MCPIP1-GFP się utrzymywała. Autorzy wprowadzali transgen metodą chemiczną (odczynnik FuGENE, Roche). Zakładając, że transfekcja prowadzona była zgodnie z zaleceniami producenta odczynnika do transfekcji, transfekowano komórki w gęstości 70 %. Trzeba pamiętać, że specyfika różnicowania komórek 3T3-L1 wymaga zahamowania proliferacji, a komórki przez dwa dni powinny mieć pełną gęstość. Oznacza to, że ekspresja MCPIP1-GFP mogła zaniknąć jeszcze przed fazą gotowości komórek do indukcji adipogenezy. Natomiast w przypadku wyciszenia ekspresji endogennego *Mcpip1* Younce i wsp. używali siRNA, które wprowadzali do komórek 3T3-L1 24 godziny przed indukcją adipogenezy. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykonano natomiast na komórkach 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1 uzyskaną po transdukcji retrowirusowej oraz stabilnym wyciszeniem *Mcpip1* uzyskanym po transfekcji komórek plazmidem kodującym shRNA. Zatem, w przeciwieństwie do eksperymentów prowadzonych przez Younce i wsp., efekt komórkowy MCPIP1 miał szansę ujawnić się w preadipocytach jeszcze przed fazą zahamowania wzrostu jak i w rakcie ekspansji klonalnej.

W tym kontekście warto dodać, że Holdaway i wsp. badając adipogenezę fibroblastów pobranych od myszy *Mcpip*^{-/-} nie zauważyli zaburzenia ich różnicowania. Przeciwnie, odnotowali lekkie, choć statystycznie nieistotne ($p > 0.05$) zwiększenie adipogenezy w komórkach *Mcpip*^{-/-} w porównaniu do komórek kontrolnych, pobranych od myszy heterozygotycznych (48).

Zważywszy rozbieżność uzyskanych wyników z wynikami opisanymi przez Younce i wsp. (168, 169), sprawdzono poziom transkrypty i białka *C/ebpβ* podczas przejściowej ekspresji egzogennej MCPIP1. Wykazano, że przejściowa ekspresja MCPIP1 prowadzi do podniesienia zarówno poziomu mRNA jak i białka *C/EBPβ* [Dane uzup. Ryc.1]. Tymczasowy wzrost ekspresji *C/EBPβ* obserwowany przy przejściowej transfekcji komórek 3T3-L1 (nie pokazano tutaj) i HepG2 plazmidem kodującym MCPIP1 może wynikać z próby kompensacji ilości szybko degradowanego transkrypty *C/ebpβ*. Możliwe też, że podniesienie ekspresji *C/ebpβ* związane jest z tymczasowym obniżeniem ekspresji jego negatywnego regulatora – czynnika transkrypcyjnego *Klf4* (9) przez MCPIP1. Obniżenie ekspresji *Klf4* w obecności MCPIP1 zaobserwowano w komórkach 3T3-L1 po

48 godzinach od transdukcji wektorem retrowirusowym niosącym MCPIP1 [Dane uzup. Ryc.2]. W przypadku obu hipotez kluczowa jest właściwość RNazowa MCPIP1, jako że białko jej pozbawione (MCPIP1 Δ PIN) nie powoduje przyrostu ilości C/ebp β , ani obniżenia ilości Klf4. Odmienny schemat badawczy i prawdopodobna indukcja ekspresji C/ebp β wywołana przejściową ekspresją egzogenego MCPIP1 może odpowiadać za różnice między obserwacjami opisanymi w tej pracy, a tymi dokonanyymi przez Younce i wsp. (168, 169).

3.2. Efekt ekspresji egzogenego MCPIP1 w różnicujących preadipocytach.

W przeciwieństwie do preadipocytów 3T3-L1 ze stabilną ekspresją MCPIP1, komórki z ekspresją MCPIP1 wywołaną od pierwszego dnia adipogenezy różnicowały porównywalnie do komórek kontrolnych [Ryc.7]. Oznacza to, że MCPIP1 wywiera negatywny wpływ na adipogenezę tylko w pierwszych 24 godzinach różnicowania.

Co ciekawe, nie zauważono wpływu MCPIP1 na poziom mRNA lub białka Ppary, mimo iż zastosowane podejście badawcze pozwoliło na utrzymanie się zwiększonego poziomu MCPIP1 przez cały okres adipogenezy. MCPIP1 nie zmieniał również aktywności Ppary, jako że poziom ekspresji regulowanych przez Ppary genów – adiponektyny i leptyny – był porównywalny w komórkach z ekspresją MCPIP1 i kontrolnych. Oznacza to, że obniżenie ekspresji Ppary obserwowane w preadipocytach ze stabilną ekspresją MCPIP1, nie jest efektem bezpośredniego oddziaływania MCPIP1 na transkrypt i białko Ppary. Co więcej, zaburzenie adipogenezy powodowane przez MCPIP1 nie dotyczy modulacji ekspresji genów późnego różnicowania.

Zważywszy, że transkrypcję genu *Ppary* inicjuje C/ebp β , można przypuszczać, że obniżenie ilości transkryptu/białka Ppary towarzyszące ekspresji MCPIP1 w preadipocytach [Ryc.6] jest skutkiem negatywnej regulacji C/ebp β przez MCPIP1. Co ciekawe jednak, w preadipocytach ze stabilną ekspresją mutantu MCPIP1 pozbawionego aktywności RNazy (MCPIP1 Δ PIN) poziom transkryptu C/ebp β jest niezmienny, a mimo to zaobserwowano mniejszą ilość transkryptu Ppary w czasie różnicowania [Ryc.8]. Wytłumaczeniem mniejszej ilości mRNA Ppary może być w tym przypadku zwiększona aktywność NF- κ B w komórkach z ekspresją MCPIP1 Δ PIN [Skalniak i wsp., w przygotowaniu]. Jak wspomniano, aktywacja Nf- κ B blokuje adipogenezę (165), a to skutkuje obniżeniem ekspresji Ppary. Weryfikacja tej hipotezy wymaga jednakże dalszych badań.

W preadipocytach z egzogenną ekspresją MCPIP1 wywołaną po 24-tej godzinie różnicowania ilość transkryptu i białka C/ebp β jest porównywalna z komórkami kontrolnymi [Ryc.7]. Można więc wnioskować, że MCPIP1 nie wpływa w tym przypadku na procesy transkrypcji ani translacji C/ebp β . Tym samym, zmniejszenie ilości białka C/ebp β obserwowane w komórkach ze stabilną ekspresją MCPIP1 [Ryc.6] musi być ograniczone czasowo do pierwszych 24 godzin różnicowania i wynikać albo z zaburzenia mechanizmu transkrypcji albo z degradacji mRNA kodującego C/ebp β .

Analizując poziom transkryptu genu *C/ebp β* w czasie różnicowania komórek 3T3-L1, można zauważyć, że rośnie on gwałtownie po indukcji adipogenezy, osiąga maksimum w drugiej godzinie, po czym sukcesywnie spada [Ryc.1B]. Jednocześnie, ilość białka C/ebp β wzrasta od pierwszych godzin różnicowania, osiąga maksymalny poziom w pierwszym dniu, po czym obniża się i w dniu trzecim powraca do poziomu podstawowego [Ryc.3], [Ryc.5], [Ryc.6]. Porównując ekspresję białek C/ebp β i Mcpip1 w czasie różnicowania, można zauważyć, że maksimum ilości C/ebp β odpowiada minimum ilości Mcpip1. W dalszych badaniach postanowiono zgłębić mechanizm negatywnej regulacji ilości mRNA i białka C/ebp β w obecności MCPIP1.

4. Wpływ MCPIP1 na poziom transkryptu *C/ebp β* .

4.1. Mechanizm obniżenia ilości transkryptu *C/ebp β* przez MCPIP1.

Wyznaczony dla komórek HepG2 okres półtrwania mRNA C/EBP β wynosi 2 godziny [Ryc.12], a wyznaczony dla różnicujących komórek 3T3-L1 40 minut. [Ryc.11]. Pomimo krótkiego okresu półtrwania, tempo zmniejszania się poziomu transkryptu *C/ebp β* obserwowane między 2-gą a 24-tą godziną w różnicujących komórkach 3T3-L1 jest stosunkowo wolne [Ryc.1B].

Może to wynikać z:

- a. degradacji transkryptu z jednoczesną intensywną transkrypcją, lub
- b. wyłączenia mechanizmu destabilizującego transkrypt.

Jak wynika z naszych badań [Ryc.3] oraz badań Younce i wsp. (169), przyrost ilości białka Mcpip1 w czasie adipogenezy 3T3-L1 obserwowany jest dopiero od pierwszego dnia różnicowania. Dalej, ekspresji MCPIP1 wywołanej przed rozpoczęciem różnicowania towarzyszy obniżenie ilości transkryptu C/ebp β [Ryc.6], a ekspresja wywołana po pierwszym dniu różnicowania nie wpływa na poziom białka C/ebp β [Ryc.7]. Co więcej,

ekspresja nieaktywnego enzymatycznie MCPIP1 Δ PIN nie zmniejsza poziomu ekspresji genu *C/ebp β* [Ryc.8]. Zebrane dane pozwalają przypuszczać, że MCPIP1 jest białkiem odpowiedzialnym za obniżenie transkrypcji *C/ebp β* lub degradację transkryptu *C/ebp β* w pierwszej dobie różnicowania.

4.1.1. Zmniejszenie poziomu *C/ebp β* w obecności MCPIP1 nie wynika z zahamowania transkrypcji.

Czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję *C/ebp β* jest białko Creb. Belmonte i wsp. pokazali, że aby CREB mogło przyłączyć kofaktory i trans-aktywować ekspresję genów C/EBP, w tym C/EBP β , konieczna jest jego fosforylacja przez kinazę ERK1/2 (4). Yang i wsp. oraz Yao i wsp. pokazali w swoich pracach, że ekspresja MCPIP1 hamowała aktywację kinazy ERK, a obniżenie ekspresji MCPIP1 (poprzez ekspresję egzogenego miR-9) wywoływało efekt odwrotny (163), (164). Negatywny wpływ MCPIP1 na fosforylację/aktywację kinazy ERK w makrofagach stymulowanych LPS pokazał również Zhou i wsp. Ekspresja MCPIP1 zmniejszała ilość fosforylowanej formy Erk1/2, natomiast w makrofagach pochodzących od myszy z wyłączoną ekspresją genu *Mcpip1* fosforylacja kinazy Erk1/2 po stymulacji LPS była silniejsza niż w makrofagach pochodzących od myszy kontrolnych (*Mcpip1*^{+/+}) (177). Sprawdzono więc poziom fosforylacji Erk1/2 w różnicujących preadipocytach ze stabilną ekspresją MCPIP1. Okazało się, że aktywność Erk1/2 jest porównywalna między różnicującymi komórkami 3T3-L1 z ekspresją MCPIP1 i komórkami kontrolnymi w badanym przedziale czasu [Ryc.9]. Można więc wykluczyć wpływ MCPIP1 na aktywację białka Creb poprzez zmianę poziomu fosforylacji Erk1/2 w preadipocytach 3T3-L1. Brak wpływu MCPIP1 na Creb został potwierdzony w eksperymencie, w którym zmierzono aktywność Creb w komórkach 3T3-L1 stymulowanych do różnicowania używając wektora reporterowego [Ryc.10]. Zebrane na tym etapie wyniki pozwoliły wnioskować, że MCPIP1 moduluje poziom transkryptu i białka *C/ebp β* poprzez mechanizm inny niż aktywacja promotora genu *C/ebp β* . Tym mechanizmem mogło być skrócenie czasu półtrwania transkryptu *C/ebp β* .

4.1.2. MCPIP1 degraduje transkrypt *C/ebp β* .

MCPIP1 jest RNazą o szerokim spektrum substratów. Udowodniono, że substratami MCPIP1 są niektóre spośród pre-miRNA (125, 142), wirusowych RNA (87, 88) oraz matrycowych RNA białek. Wśród poznanych dotąd cząsteczek mRNA degradowanych przez MCPIP1 są transkrypty kodujące cytokiny prozapalne o krótkich czasach półtrwania, tj. IL-6 (96, 100), IL-12b (96), IL-1 β (100) czy IL-2 (82) oraz jego własne mRNA (100).

W świetle tych doniesień, postanowiono sprawdzić czy obniżenie poziomu mRNA *C/ebpβ* związane ze stabilną ekspresją MCPIP1 w komórkach 3T3-L1 oraz podwyższenie poziomu mRNA *C/ebpβ* towarzyszące stabilnemu wyciszeniu *Mcpip1* ma związek z degradacją mRNA *C/ebpβ* przez *Mcpip1*. Wskazówką sugerującą zaangażowanie nukleolitycznej aktywności *Mcpip1* w modulację poziomu mRNA kodującego *C/ebpβ* jest fakt, że preadipocyty 3T3-L1 ze stabilną ekspresją mutanta pozbawionego aktywności RNazy (MCPIP1ΔPIN), cechuje porównywalna z komórkami kontrolnymi ekspresja genu *C/ebpβ* w czasie różnicowania [Ryc.8].

W pierwszym etapie zbadano czas półtrwania transkryptu *C/EBPβ* podczas ekspresji egzogennej MCPIP1. Do testu wybrano komórki linii HepG2, ponieważ cechuje je wysoka konstytutywna ekspresja genu *C/EBPβ*. Pokazano, że ekspresja MCPIP1 w komórkach HepG2 skutkuje skróceniem czasu półtrwania transkryptu *C/EBPβ* z 2 godzin do 1,2 godziny. Ekspresja mutanta MCPIP1 pozbawionego aktywności RNazy również skraca czas półtrwania transkryptu, ale w mniejszym stopniu niż forma dzika białka ($t_{1/2}=1,5$ godziny) [Ryc.12].

Powyższe dane pozwoliły wnioskować, że MCPIP1 wpływa na degradację mRNA kodującego *C/ebpβ*. W drugim etapie sprawdzono czy degradacja jest prowadzona bezpośrednio przez MCPIP1. Użyto reporterowych konstrukcji genetycznych zawierających różnej długości odcinki 3'UTR mRNA *C/EBPβ*.

Po pierwsze odnotowano, że 3'UTR mRNA *C/EBPβ* zawiera sekwencje destabilizujące transkrypt albo negatywnie modulujące jego translację w sposób niezależny od MCPIP1. Sekwencje te znajdują się w początkowym (1-270) i końcowym (432-624) rejonie 3'UTR. Każda z nich obniżała aktywność białka reporterowego o 25-50 %, lecz ich współwystępowanie powodowało spadek aktywności aż o 65 %. Oznacza to, że efekt destabilizacji poszczególnych sekwencji jest addytywny. W literaturze opisano istnienie w 3'UTR mRNA *C/EBPβ* miejsc wiązania białek cytoplazmatycznych i jądrowych w rejonach (-61-255) oraz (180-293), ale nie zidentyfikowano rozpoznających je białek (56). Dalej, wiadomo, że 3'UTR *C/EBPβ* zawiera sekwencję bogatą w adenozyne i uracyl (motyw ARE), zlokalizowaną w rejonie 458-466 (30). Być może niska stabilność mRNA *C/EBPβ* powodowana jest w części przez białka rozpoznające sekwencje ARE, takie jak TTP lub ATF.

W eksperymencie posłużono się kontrolą pozytywną, którą był plazmid zawierający 3'UTR II-6, substratu MCPIP1 (96, 100). Wyraźne obniżenie aktywności białka reporterowego kodowanego przez ten plazmid pozwoliło upewnić się, że system

reporterowy jest skuteczny, ekspresja MCPIP1 jest wydajna, a powstające białko jest aktywne. Wynik eksperymentu [Ryc.14] pokazał zależny od MCPIP1 spadek aktywności białka reporterowego dla konstruktów zawierających fragment 15-624 oraz 432-624 3'UTR C/EBP β . Natomiast konstrukty zawierające wyłącznie fragmenty 1-431 nie były podatne na działanie MCPIP1. Oznacza to, że prowadzona przez MCPIP1 regulacja stabilności transkryptu C/EBP β oparta jest na rejonie końcowym (432-624) 3'UTR. Co więcej, zaobserwowany spadek aktywności białka reporterowego występował tylko w przypadku aktywnego nukleolitycznie MCPIP1, natomiast nie występował w przypadku ekspresji mutanta MCPIP1/D141A. Analiza bioinformatyczna rejonu 432-624 wykazała istnienie kilku rejonów tworzących drugorzędową strukturę „spinki”. „Spinka” tworzona w obrębie 480-498 występuje zarówno w 3'UTR mysiego, jak i ludzkiego C/EBP β i ma cechy zidentyfikowane przez Mino i wsp. jako pretendujące do trawienia przez MCPIP1 (99). Jest więc oddalona o więcej niż 20 nukleotydów od kodonu STOP i zawiera 3 nukleotydy w pętli. Właśnie tego typu struktury drugorzędowe przeważały w puli RNA wiązanego przez MCPIP1 (do ich identyfikacji użyto metody CLIP-RNAseq). Ponadto, jej trzon buduje 7 par nukleotydów. Mino i wsp. zidentyfikowali „spinki” typu 7-3-7, jako struktury najbardziej podatne na wiązanie przez MCPIP1 (99).

Zebrane dane eksperymentalne wspólnie z ostatnimi doniesieniami literaturowymi stanowią silną przesłankę o bezpośrednim udziale MCPIP1 w degradację transkryptu C/ebp β w komórkach 3T3-L1.

5. Mecip1 jest indukowany przez stan zapalny w tkance tłuszczowej.

Otyłość towarzysząca insulinooporności często związana jest z infiltracją tkanki tłuszczowej przez makrofagi i limfocyty (102). Uznaje się, że mediatory prozapalne wydzielane przez komórki odpornościowe zaburzają proces różnicowania preadipocytów (74), wymuszając tym samym hipertroficzny wzrost istniejących adipocytów. Przekłada się to na eskalację stanu zapalnego w tkance tłuszczowej, pogorszenie odpowiedzi na insulinę i zwiększoną lipolizę (38, 49). Jednym z czynników prozapalnych zaangażowanych w rozwój cukrzycy typu 2 i wydzielanych głównie przez makrofagi jest IL-1 β (97). Jednocześnie, IL-1 β jest silnym induktorem ekspresji *MCPIP1*, co pokazano w komórkach odpornościowych (57), w komórkach hepatocytów (100) oraz w fibroblastach (21). W ramach niniejszej pracy zbadano wpływ tej cytokiny na ekspresję genu *Mecip1* w komórkach linii 3T3-L1. Okazało się, że IL-1 β aktywuje ekspresję *Mecip1* zarówno w

preadipocytach jak i w adipocytach. Wzrost poziomu transkryptu *Mcpip1* jest w obu typach komórek bardzo gwałtowny i osiąga maksimum już w czwartej godzinie stymulacji [Ryc.15A]. W przypadku preadipocytów, poziom mRNA *Mcpip1* jest szybko obniżany, natomiast w adipocytach efekt stymulacji utrzymuje się w czasie. Co ciekawe, wzrost ekspresji mRNA pociąga za sobą podwyższenie poziomu białka *Mcpip1* tylko w preadipocytach. Zaobserwowano, że adipocyty posiadają wyższy bazalny poziom białka *Mcpip1*, natomiast stymulacja cytokiną nie wywołuje dodatkowego podniesienia ilości *Mcpip1* [Ryc.15B]. Jak pokazano wcześniej, podwyższony poziom *MCPIP1* w preadipocytach 3T3-L1 obniża ich potencjał do różnicowania [Ryc.6]. Można więc przypuszczać, że istnieje związek między obserwowaną w otyłości redukcją adipogenezy, a indukowaną przez czynniki prozapalne ekspresją *Mcpip1* w adipocytach.

Powyższą hipotezę popierają wyniki analiz podskórnej tkanki tłuszczowej myszy o genotypie *db/db*, tj. z wyłączoną ekspresją genu receptora leptyny. Myszy *db/db* charakteryzuje wzmożony apetyt (hiperfagia) i bardzo wczesny rozwój otyłości (15). Ponieważ zwiększonej masie towarzyszy hiperglikemia, dyslipidemia i insulinooporność, myszy *db/db* są modelowym organizmem w badaniach nad cukrzycą typu 2. W podskórnej tkance tłuszczowej myszy *db/db* wykazano zwiększoną liczbę makrofagów (19) i zwiększoną ekspresję genów prozapalnych (38). Przedstawione w poniższej pracy wyniki badań są zgodne z tymi doniesieniami. Analiza poziomu mRNA wybranych genów w podskórnej tkance tłuszczowej myszy *db/db* wykazała znacznie podwyższoną ekspresję genów *Mcp-1* oraz *Crp* i podwyższony poziom transkryptu genu *Tnf* [Ryc.16B]. Zbadano również poziom mRNA białka Cd14. Cd14 jest koreceptorem receptora TLR i, jako że jest ekspresjonowany głównie na komórkach mieloidalnych, uznany jest szeroko za marker monocytów/makrofagów (39). Zaobserwowano, że ilość transkryptu genu *Cd14* w tkance tłuszczowej myszy *db/db* była wyraźnie wyższa niż u myszy kontrolnych. Potwierdza to infiltrację tkanki tłuszczowej u tych myszy przez komórki odpornościowe. Co ciekawe, ilość mRNA Cd14 dodatnio korelowała z ilością mRNA *Mcpip1*. Wskazuje to na istnienie zależności pomiędzy ekspresją *Mcpip1* w rozrośniętej tkance tłuszczowej, a stopniem infiltracji przez makrofagi. Badanie nie określa które z komórek są źródłem zwiększonej ilości transkryptu *Mcpip1* w tkance tłuszczowej - mogą to być zarówno zaktywowane makrofagi (57), preadipocyty albo adipocyty [Ryc.15].

Związek między ekspresją *MCPIP1* i otyłością potwierdza przeprowadzona analiza wycinków ludzkiej podskórnej tkanki tłuszczowej. Wykazano, że w porównaniu z osobami

szczupłymi, otyli mają wyższą ekspresję *MCPIP1* w tkance tłuszczowej, a ilość mRNA kodującego MCPIP1 koreluje dodatnio ze stopniem otyłości wyrażonym przez indeks BMI [Ryc.15A]. Badania przeprowadzono na niewielkiej próbie, dlatego niezbędne jest potwierdzenie tych obserwacji w oparciu o analizę większej grupy badanych. Podwyższony w otyłości poziom mRNA *MCPIP1* w tkance tłuszczowej u ludzi potwierdzają jednakże badania przeprowadzone przez innych badaczy. Onate i wsp. zbadali transkryptom komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ang. *ADS, adipose stem cells*) osób otyłych ze zdiagnozowanym zespołem metabolicznym ($BMI > 40 \text{ kg/m}^2$) i osób szczupłych ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) (109). Komórki ASC uzyskano z podskórnej tkanki tłuszczowej pobranej od otyłych ($n=3$) w trakcie zabiegu bariatrycznego lub od osób szczupłych ($n=3$) w trakcie liposukcji i hodowano *in vitro* do uzyskania pasażu 3. Analiza wykazała wyraźnie wyższy poziom mRNA kodującego MCPIP1 u osób otyłych z zespołem metabolicznym w porównaniu do osób szczupłych i zdrowych [Dane uzup. Ryc.3]. Podobnie, analiza transkryptomu tkanki tłuszczowej wykonana przez Keller i wsp. (65) wykazała podwyższony poziom *MCPIP1* u ludzi otyłych w porównaniu z osobami szczupłymi - zarówno w grupie osób zdrowych metabolicznie, jak i cierpiących na cukrzycę typu 2 [Dane uzup. Ryc.4].

Podsumowując, dane zebrane w tej pracy, jak i opublikowane przez innych Autorów wskazują na istnienie wyraźnej korelacji dodatniej między otyłością, a ekspresją MCPIP1 w tkance tłuszczowej.

6. Perspektywy rozwoju badań nad rolą MCPIP1 w otyłości.

6.1. Inhibicja NF- κ B.

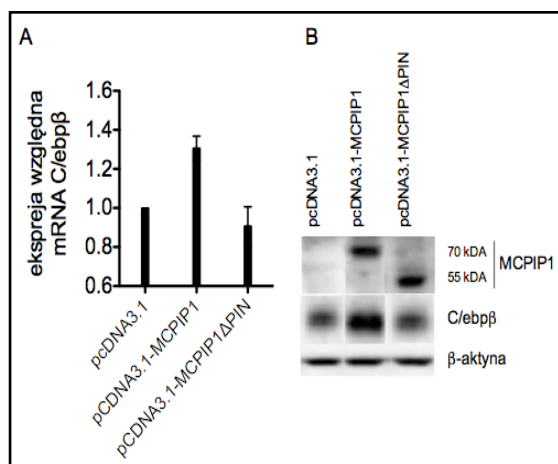
Insulinooporność i cukrzyca typu 2 są obecnie postrzegane jako choroby związane z przewlekłym stanem zapalnym. Rola NF- κ B w patologii cukrzycy typu 2 została podniesiona po raz pierwszy wskutek obserwacji, że aspiryna i inne salicylany korzystnie wpływają na tolerancję glukozy (34). Odkryto, że skuteczność tiazolidinedionów w leczeniu cukrzycy typu 2 opiera się na aktywacji PPAR γ i negatywnej regulacji NF- κ B w makrofagach (45). Pokazano, że wyhamowanie ścieżki sygnałowej NF- κ B łagodzi objawy cukrzycy typu 2, poprzez obniżenie poziomu cukru we krwi i wzrost wrażliwości komórek na insulinę (1). Blokada ekspresji czynników zapalnych wydaje się więc dobrym podejściem terapeutycznym i poszukuje się sposobu represji genów aktywowanych w makrofagach na ścieżce IKK/NF- κ B. Negatywny wpływ MCPIP1 na szlak NF- κ B został

udowodniony w hepatocytach, makrofagach i fibroblastach (104, 135). Z perspektywy tych doniesień, aktywacja MCPIP1 w makrofagach może uderzać w podstawy patogenezy chorób metabolicznych związanych z otyłością i stanowi jedno z teoretycznie efektywnych podejść terapeutycznych.

6.2. Zahamowanie adipogenezy.

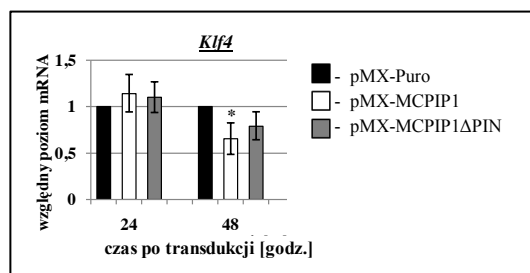
Stała nadpodaż substratów energetycznych powoduje przyrost objętości tkanki tłuszczowej. Jeśli jednak tempo powstawania adipocytów jest niewystarczające, dochodzi do wzrostu hipertroficznego adipocytów, który przyczynia się do rozwoju insulinooporności (44). Paradoksalnie, potencjał adipogeny komórek prekursorowych, jak i tempo samej adipogenezy jest obniżone właśnie w otyłości (23, 41). Skutkuje to tym, że u otyłych ludzi, mimo wysokiej liczby mezenchymalnych komórek macierzystych w podskórnej tkance tłuszczowej, preadipocytów jest mniej niż u osób szczupłych (53). Przyczyn upatruje się w obecności mediatorów stanu zapalnego, które powodują upośledzenie różnicowania komórek macierzystych i transwersję preadipocytów do komórek podobnych do makrofagów (14, 53). W niniejszej pracy wykazano negatywny wpływ MCPIP1 na adipogenezę [Ryc.6]. Pokazano również, że w podskórnej tkance tłuszczowej u osób otyłych, poziom mRNA kodującego MCPIP1 jest podwyższony. Udowodniono także, że ekspresja MCPIP1 może być aktywowana w preadipocytach przez IL-1 β , jeden z czynników prozapalnych wydzielanych przez makrofagi [Ryc.16, Ryc.15]. Dodatkowo, wyniki pracy Onate i wsp. (109) pokazują, że poziom MCPIP1 jest podwyższony w mezenchymalnych komórkach macierzystych, pochodzących z tkanki tłuszczowej otyłych osób. Razem te obserwacje sugerują, że wzrost ekspresji MCPIP1 może stanowić podłoże inhibicji adipogenezy obserwowanej u osób otyłych. Z tej perspektywy, korzystne wydaje się zahamowanie szlaku indukcji MCPIP1 w komórkach prekursorowych adipocytów poprzez wyciszenie stanu zapalnego w obrębie tkanki tłuszczowej. Ponieważ stan zapalny tkanki tłuszczowej inicjowany jest przez naciekające, zaktywowane makrofagi, środkiem do zahamowania indukcji MCPIP1 w tkance tłuszczowej wydaje się wyciszenie szlaków zapalnych w makrofagach. Jeśli tak, warto sprawdzić czy tiazolidinediony, leki stosowane z powodzeniem w terapii cukrzycy typu 2 i insulinooporności, a powodujące m.in. inhibicję NF- κ B, przyczyniają się do zmniejszenia ekspresji MCPIP1 w tkance tłuszczowej i zwiększonej ekspresji MCPIP1 w limfocytach i monocytach/makrofagach.

VII. Dane uzupełniające.



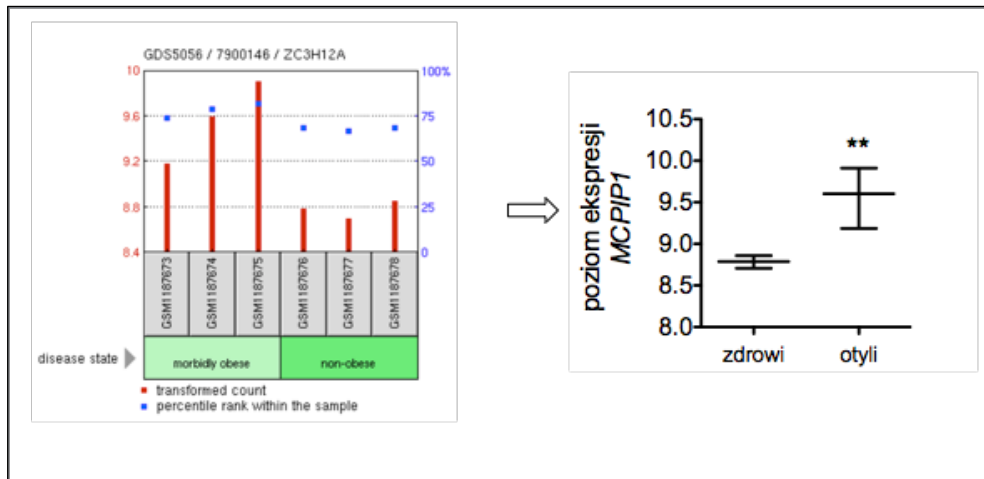
Dane uzup. Ryc.1. Poziom ekspresji genu *C/ebpβ* podczas przejściowej transfekcji MCPIP1.

Komórki 3T3-L1 transfekowano wektorem kontrolnym (pcDNA3.1), wektorem kodującym ludzkie białko MCPIP1 (pcDNA3.1-MCPIP1) lub wektorem kodującym białko MCPIP1 bez aktywności RNazy (pcDNA3.1-MCPIP1ΔPIN). **A.** Poziom mRNA *C/ebpβ* w komórkach 24 godziny po transfekcji Lipofektaminą 2000 (Life Technologies) zmierzony poprzez przeprowadzenie PCR w czasie rzeczywistym na matrycy całkowitego mRNA. Użyto identycznych molowo ilości DNA z zachowaniem takiego samego stosunku DNA/Lipofektamina. **B.** Wynik analizy western blot przeprowadzonej na lizatach komórkowych zebranych 24 godziny po transfekcji. Użyto przeciwciał α -MCPIP1 (produkcja własna), α -*C/ebpβ* (Cell Signaling) i α - β -aktyna (Sigma Aldrich). Rycina przedstawia wynik reprezentatywny dla dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.



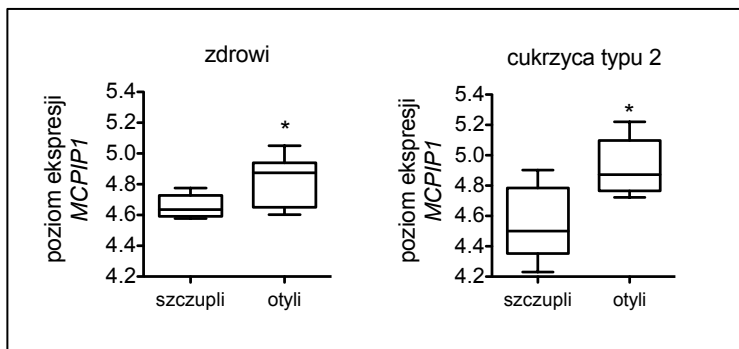
Dane uzup. Ryc.2. Poziom ekspresji genu *Klf4* podczas ekspresji egzogenego MCPIP1.

Komórki 3T3-L1 transdukowano wektorem kontrolnym (pMX-puro), wektorem kodującym ludzkie białko MCPIP1 (pMX-MCPIP1) lub wektorem kodującym białko MCPIP1 bez aktywności RNazy (pMX.1-MCPIP1ΔPIN). 24 i 48 godzin po transdukcji retrowirusowej zmierzono w komórkach poziom mRNA czynnika transkrypcyjnego *Klf4* poprzez przeprowadzenie PCR w czasie rzeczywistym na matrycy całkowitego mRNA. Wynik uzyskany przez Ewę Gogolę w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod opieką prof. dr hab. Jolanty Jury.



Dane uzup. Ryc.3. Poziom ekspresji genu *MCPIP1* w mezenchymalnych komórkach macierzystych podskórnej tkanki tłuszczowej.

Komórki od osób szczupłych (BMI<25 kg/m²) i otyłych (BMI>40 kg/m²) pobrano z brzusznej podskórnej tkanki tłuszczowej. Wykres sporządzono na podstawie danych z mikromacierzy opublikowanych przez Onate i wsp. (109) w bazie GEO Profiles (NCBI) nr dostępu GDS5056. Pozioma linia przedstawia medianę ekspresji genu *MCPIP1*, a słupki wskazują maksymalną i minimalną wartość zarejestrowaną w grupie. Symbol ** oznacza istotność statystyczną na poziomie p≤0,02 obliczoną testem t-studenta.



Dane uzup. Ryc.4. Poziom ekspresji genu *MCPIP1* w podskórnej tkance tłuszczowej.

Tkankę tłuszczową pobrano poprzez liposukcję z brzucha od osób szczupłych (BMI<25 kg/m²) i otyłych (BMI>30 kg/m²) z uwzględnieniem ich statusu metabolicznego (cukrzyca typu 2/zdrowi). Wykresy sporządzono na podstawie danych z mikromacierzy opublikowanych przez Keller i wsp. (65) w bazie GEO Profiles (NCBI) pod nr GDS3961. Pozioma linia przedstawia medianę ekspresji genu *MCPIP1*, a słupki wskazują maksymalną i minimalną wartość zarejestrowaną w grupie. Symbol * oznacza istotność statystyczną na poziomie p<0,05 obliczoną testem t-studenta po odrzuceniu testem Q Dixona górnej skrajnej wartości z grupy szczupłych, chorujących na cukrzycę.

VIII. Wnioski.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

1. Poziom transkryptu kodującego *Mcpip1* wzrasta w komórkach 3T3-L1 w ciągu kilku godzin po indukcji adipogenezy, a następnie wraca do poziomu podstawowego. Wzrost transkryptu kodującego *Mcpip1* wywołany jest przez działanie wszystkich trzech czynników stymulujących – insuliny, IBMX, deksametazonu.
2. Poziom białka *Mcpip1* rośnie w komórkach 3T3-L1 podczas adipogenezy i w dojrzałych adipocytach jest on 5-krotnie wyższy niż w preadipocytach.
3. W pierwszym dniu od rozpoczęcia adipogenezy obserwuje się tymczasowy spadek poziomu białka *Mcpip1*. W tym samym czasie poziom białka *C/ebpβ* jest najwyższy.
4. Wyciszeniu ekspresji genu *Mcpip1* w preadipocytach 3T3-L1 towarzyszy wzrost poziomu transkryptu i białka *C/ebpβ* oraz *Pparγ*.
5. Ekspresji egzogenego *MCPIP1* w preadipocytach 3T3-L1 towarzyszy obniżenie poziomu transkryptu i białka *C/ebpβ* oraz *Pparγ*.
6. Na poziom transkryptu *C/ebpβ* nie wpływa ekspresja *Mcpip1* z delecją domeny rybonukleazowej (PIN), ani ekspresja pełnego *Mcpip1* jeśli jest ona wywołana po pierwszym dniu różnicowania.
7. *MCPIP1* nie wpływa na aktywację promotora genu *C/ebpβ*.
8. *MCPIP1* obniża poziom transkryptu *C/EBPβ*, przy udziale domeny rybonukleazowej PIN.
9. Rejon transkryptu *C/EBPβ*, który jest rozpoznawany przez *MCPIP1* znajduje się w obszarze 432-624 3'UTR.
10. *IL-1β* zwiększa poziom mRNA i białka *Mcpip1* w preadipocytach.
11. W rozrośniętej tkance tłuszczowej u ludzi i myszy poziom transkryptu kodującego *MCPIP1* (*Mcpip1*) jest podwyższony.

IX. Streszczenie.

Dobrze poznana rola MCPIP1 jest negatywna regulacja procesów zapalnych w komórce. Jako endorybonukleaza, MCPIP1 degraduje niektóre krótko żyjące transkrypty, w tym transkrypty kodujące IL-6, IL-2, IL-12b, c-Rel, Icos, swój własny mRNA, a także liczne pre-miRNA. Do aktywności rybonukleolitycznej MCPIP1 niezbędna jest domena PIN. Jednakże oprócz degradacji RNA, domena PIN pozwala również na wiązanie deubikwitynazy USP10. Z kolei poprzez inną domenę (UBA) MCPIP1 wiąże białka należące do szlaku aktywacji NF- κ B. Pośredniczy w ten sposób w ich deubikwitynacji i obniża aktywność tego ważnego czynnika transkrypcyjnego.

Zdolność do degradacji mRNA, jak i wyciszenia aktywności NF- κ B spowodowały, że MCPIP1 badano również pod kątem różnicowania komórkowego. Udowodniono, że MCPIP1 reguluje procesy neurogenezy, angiogenezy i osteogenezy. Problematiczną była rola MCPIP1 w adipogenezie, tj. w procesie powstawania komórek tłuszczowych.

W niniejszej pracy doktorskiej pokazano, że MCPIP1 jest zaangażowane w adipogenezę, a zebrane wyniki pozwalają wnioskować, że MCPIP1 jest białkiem kontrolującym wczesny etap procesu różnicowania. W szczególności wykazano, że czynniki adipogenne - insulina, IBMX i deksametazon - indukują ekspresję genu *Mcpip1* w preadipocytach linii 3T3-L1. Po indukcji adipogenezy wzrost poziomu mRNA kodującego *Mcpip1* jest tymczasowy, jednak poziom białka rośnie w trakcie różnicowania i w dojrzałych adipocytach osiąga poziom pięciokrotnie wyższy w porównaniu do preadipocytów. Aby zrozumieć rolę *Mcpip1* w przebiegu adipogenezy zbadano preadipocyty z wyciszoną ekspresją *Mcpip1*. Zaobserwowano, że zmniejszonej ekspresji *Mcpip1* towarzyszy zwiększony poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych odpowiadających za różnicowanie - C/ebp β i Ppar γ . Co ciekawe, zwiększenie poziomu MCPIP1 w preadipocytach wywołane ekspresją egzogenego białka skutkuje obniżeniem poziomu C/ebp β i Ppar γ oraz zmniejszeniem wydajności adipogenezy. Interesujące jest to, że MCPIP1 wpływa na przebieg różnicowania tylko jeśli do jego ekspresji dochodzi przed inicjacją adipogenezy.

Aby odkryć mechanizm interakcji między MCPIP1 a czynnikami transkrypcyjnymi C/ebp β i Ppar γ , zbadano adipogenezę w obecności MCPIP1 pozbawionego domeny PIN. Odkryto, że tak zmutowane białko nie moduluje ekspresji C/ebp β . Jakkolwiek, poziom Ppar γ był w dalszym ciągu obniżony, co wskazuje na odmienne mechanizmy regulacji.

Dalej zbadano mechanizm rządzący zależnością między ilością MCPIP1 i C/ebp β . W pierwszej kolejności ustalono, że MCPIP1 nie obniża wydajności transkrypcji C/ebp β , ponieważ ani nie zmniejsza aktywacji czynnika zawiadującego transkrypcją C/ebp β (Creb), ani nie wpływa na wiązanie Creb do DNA. Dalej pokazano, że w obecności MCPIP1 czas półtrwania mRNA kodującego C/EBP β ulega skróceniu w komórkach HepG2 z 2 godzin do 1,2 godziny. Posługując się zestawem reporterowych konstruktyw genetycznych wykazano, że MCPIP1 (ale nie MCPIP1 z nieczynną domeną PIN) obniża ilość białka kodowanego przez transkrypt z przyłączonym 3'UTR transkryptu C/EBP β . Zidentyfikowano również rejon 3'UTR podlegający tej regulacji. Zebrane wyniki pozwalają wnioskować, że MCPIP1 bezpośrednio i negatywnie reguluje ilość mRNA kodującego C/ebp β .

W rozprawie przedstawiono też wyniki analizy poziomu mRNA kodującego MCPIP1 w podskórnej tkance tłuszczowej myszy i człowieka. Porównując poziom ekspresji MCPIP1 między osobnikami otyłymi i o prawidłowej masie pokazano, że w rozróżnionej tkance tłuszczowej ilość mRNA kodującego MCPIP1 jest wyższa. Prawdopodobnym wytłumaczeniem powyższej obserwacji jest obecność stanu zapalnego w tkance tłuszczowej osobników otyłych. Tezę tę popierają obserwacje, że w tkance tłuszczowej otyłych myszy (model *db/db*) poziom mRNA kodującego *Mcpip1* koreluje z poziomem mRNA białka markerowego makrofagów CD14 oraz że stymulacja preadipocytów i adipocytów 3T3-L1 prozapalną cytokiną IL-1 β podnosi poziom mRNA kodującego *Mcpip1*. Co ciekawe jednak, wzrost poziomu mRNA przekłada się na wzrost poziomu białka tylko w preadipocytach.

Opisane w pracy doktorskiej wyniki pozwalają przypuszczać, że obserwowany u otyłych z syndromem metabolicznym stan zapalny tkanki tłuszczowej może skutkować podwyższeniem ekspresji MCPIP1 w komórkach prekursorowych adipocytów. W efekcie dochodzi może do zahamowania adipogenezy w tkance tłuszczowej i gromadzenia trójglicerydów w komórkach innych narządów. Sytuacja taka prowadzi do rozwoju insulinooporności, cukrzycy typu 2 i chorób serca. Dlatego interesującym podejściem terapeutycznym w chorobach związanych z otyłością wydaje się obniżenie ekspresji MCPIP1 w komórkach prekursorowych adipocytów.

X. Summary.

MCPIP1 is well known for its ability to downregulate intra-cellular inflammatory processes. As an endoribonuclease it degrades transcripts coding for IL-6, IL-2, IL-12b, c-Rel, Icos and many pre-miRNA as well as its own mRNA. These ribonucleolytic capabilities result from the presence of a PIN domain within the protein. However, PIN domain not only enables RNA degradation but also directly binds to deubiquitinase USP10. With another domain, UBA, MCPIP1 binds to proteins involved in NF- κ B activation. MCPIP1 enables their deubiquitination and thus downregulates NF- κ B activity. Endoribonucleolytic activity as well as the ability to downregulate NF- κ B prompted studies toward MCPIP1 involvement in differentiation processes. It has been shown that MCPIP1 controls neurogenesis, angiogenesis and bone formation. MCPIP1 has been also studied in the context of adipocytes formation (adipogenesis). However, specificity of its engagement raised some doubts.

This dissertation shows that MCPIP1 is one of the proteins involved in the differentiation of fat cells precursors - adipogenesis. Adipogenesis is an ordered and sequential process characterized by cascading activation of effector proteins. The results presented in the thesis encourage us to stipulate that MCPIP1 is the protein that controls early stages of adipogenesis. In particular, we have shown that only adipogenic factors such as insulin, IBMX and dexamethazone together induce expression of *Mcpip1* gene in preadipocytes of 3T3-L1 line. We observed that even though mRNA level of *Mcpip1* increases transiently after adipogenesis induction, protein level increases significantly during the process and reaches fivefold higher level than in preadipocytes.

To push our understanding of *Mcpip1* role in adipogenesis further we studied preadipocytes with silenced expression of the protein. We detected an increased level of differentiation-governing transcription factors *C/ebp β* and *Ppar γ* . On the other hand, when we forced exogenous MCPIP1 expression in preadipocytes, we noticed diminishing of *C/ebp β* and *Ppar γ* levels as well as adipogenesis efficiency. Interestingly, exogenous expression of MCPIP1 has influence on the progression of adipogenesis only if it is induced before the induction of adipogenesis.

In order to discover the mechanism of interaction between MCPIP1 and *C/ebp β* and *Ppar γ* we studied influence of MCPIP1 devoid of PIN domain on the differentiation process. We found that MCPIP1 with such modification has no influence on *C/ebp β* level.

Ppar γ level remained the same, though, which suggests a different regulatory mechanism. Our further study examined the mechanism of MCPIP1 impact on C/ebp β level. We established that MCPIP1 does not influence transcription rate of C/ebp β since it does not affect activation of C/ebp β transcription-driving factor (Creb), nor does it influence Creb/DNA binding.

However, we found that in HepG2 cells MCPIP1 shortens C/EBP β mRNA half-life to 1.2h from 2h. Using a set of genetic constructs we proved that MCPIP1 lowers the quantity of reporter protein encoded by transcript bound with 3'UTR of C/EBP β transcript. This effect disappears when MCPIP1 is devoid of PIN domain. Using the gathered data we claim that MCPIP1 directly downregulates mRNA of C/ebp β .

The other aspect of the dissertation was to establish MCPIP1 mRNA levels in subcutaneous fat tissue of mice and men. Comparing obese and non-obese subjects we showed that MCPIP1 mRNA level in fat tissue specimens of the obese ones is higher than in non-obese ones. The probable explanation of this fact is a presence of inflammation process in fat tissue of obese subjects. A supportive evidence is that Mecip1 mRNA level in fat tissue of obese mouse (*db/db* model) correlates with mRNA level of macrophage marker protein Cd14. Furthermore, Mecip1 mRNA level increases when pro-inflammatory cytokine IL-1 β is administered to 3T3-L1 peradipocytes or adipocytes. It is interesting to note, however, that the increased mRNA level translates into higher protein expression only in preadipocytes and not in mature adipocytes.

The results presented in the dissertation allow us to stipulate that inflammation observed in fat tissue of obese subjects might increase the MCPIP1 levels in adipocyte precursor cells. As a result, interruption of adipogenesis might occur in fat tissue, which leads to the accumulation of triglycerides in cells of other organs. This promotes the development of insulin resistance, type 2 diabetes as well as cardiovascular diseases. Therefore, it might be interesting to consider preadipocyte MCPIP1 level modulation as an approach to alleviate negative health effects of obesity.

XI. Bibliografia.

1. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab.* 13(1):11–22
2. Barton M, Baretella O, Meyer MR. 2012. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *British Journal of Pharmacology.* 165(3):591–602
3. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, et al. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17(1):4–12
4. Belmonte N, Phillips BW, Massiera F, Villageois P, Wdziekonski B, et al. 2001. Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and -delta in preadipocytes. *Molecular Endocrinology.* 15(11):2037–49
5. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, et al. 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 277(34):30998–1004
6. Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE. 2004. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *AJP: Endocrinology and Metabolism.* 287(6):E1178–88
7. Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*
8. Berry R, Rodeheffer MS. 2013. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* 15(3):302–8
9. Birsoy K, Chen Z, Friedman J. 2008. Transcriptional Regulation of Adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.* 7(4):339–47
10. Blazusiak E, Florczyk D, Jura J, Potempa J, Koziel J. 2013. Differential regulation by Toll-like receptor agonists reveals that MCP1 is the potent regulator of innate immunity in bacterial and viral infections. *J Innate Immun.* 5(1):15–23
11. Blüher M, Wilson-Fritch L, Leszyk J, Laustsen PG, Corvera S, Kahn CR. 2004. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279(30):31902–9
12. Brooks SA, Blackshear PJ. 2013. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1829(6-7):666–79
13. Brun RP, Spiegelman BM. 1997. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *Journal of Endocrinology.* 155(2):217–18
14. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, et al. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J. Biol. Chem.* 278(11):9850–55
15. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, et al. 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* 84(3):491–95
16. Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 1(2):581–85
17. Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, et al. 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes & Development.* 3(9):1323–35
18. Cinti S. 2007. The Adipose Organ. In *Adipose Tissue and Adipokines in Health*

- and Disease*, pp. 3–19. Totowa, NJ: Humana Press. 17 p.
19. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, et al. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *The Journal of Lipid Research*. 46(11):2347–55
 20. Cristancho AG, Lazar MA. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(11):722–34
 21. Dhamija S, Winzen R, Doerrie A, Behrens G, Kuehne N, et al. 2013. Interleukin-17 (IL-17) and IL-1 activate translation of overlapping sets of mRNAs, including that of the negative regulator of inflammation, MCP1P1. *J. Biol. Chem*. 288(26):19250–59
 22. Divoux A, Clément K. 2011. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*. 12(5):e494–503
 23. Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, et al. 2006. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity*. 14(9):1543–52
 24. Essayan DM. 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol*. 108(5):671–80
 25. Farmer SR. 2005. Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 29:S13–S16
 26. Feng T, Szabo E, Dziak E, Opas M. 2010. Cytoskeletal disassembly and cell rounding promotes adipogenesis from ES cells. *Stem Cell Rev*. 6(1):74–85
 27. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. 2005. The relation of childhood BMI to adult adiposity: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 115(1):22–27
 28. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. 1994. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes & Development*. 8(14):1654–63
 29. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 316(2):129–39
 30. Gantt K, Cherry J, Tenney R, Karschner V, Pekala PH. 2005. An early event in adipogenesis, the nuclear selection of the CCAAT enhancer-binding protein {beta} (C/EBP{beta}) mRNA by HuR and its translocation to the cytosol. *J. Biol. Chem*. 280(26):24768–74
 31. Gao Z, He Q, Peng B, Chiao PJ, Ye J. 2006. Regulation of nuclear translocation of HDAC3 by IkappaBalpha is required for tumor necrosis factor inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function. *J. Biol. Chem*. 281(7):4540–47
 32. Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. 2007. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*. 131(2):242–56
 33. Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. 2007. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*. 131(2):242–56
 34. Goldfine AB, Conlin PR, Halperin F, Koska J, Permana P, et al. 2013. A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance. *Diabetologia*. 56(4):714–23
 35. Gonzalez GA, Montminy MR. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 59(4):675–80
 36. Goossens GH. 2008. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior*. 94(2):206–18
 37. Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*.

- 5(1):19–27
38. Gregor MF, Hotamisligil GS. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*
 39. Griffin JD, Ritz J, Nadler LM, Schlossman SF. 1981. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 68(4):932–41
 40. Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, et al. 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 15(2):230–39
 41. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. 2013. Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes.* 62(9):2997–3004
 42. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. 1987. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64(4):832–35
 43. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 3(2):177–82
 44. Henninger AMJ, Eliasson B, Jenndahl LE, Hammarstedt A. 2014. Adipocyte hypertrophy, inflammation and fibrosis characterize subcutaneous adipose tissue of healthy, non-obese subjects predisposed to type 2 diabetes. *PLoS ONE.* 9(8):e105262
 45. Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MTA, Bandyopadhyay G, et al. 2007. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 117(6):1658–69
 46. Hirsch J, Han PW. 1969. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *The Journal of Lipid Research.* 10(1):77–82
 47. Hodson L. 2014. Adipose tissue oxygenation: effects on metabolic function. *Adipocyte*
 48. Holdaway B, Naik C, Chang Y. 2014. Monocyte chemotactic protein induced protein 1 (MCP1) fails to affect adipogenesis in immortalized mouse embryonic fibroblasts (iMEF) (LB149). *FASEB J.* 28(1 Supplement):LB149
 49. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444(7121):860–67
 50. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259(5091):87–91
 51. Hou Y, Moreau F, Chadee K. 2012. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nature Communications.* 3:1300
 52. Huang J, Manning BD. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 37(Pt 1):217–22
 53. Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. 2009. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes.* 58(7):1550–57
 54. Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, et al. 2011. The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR–IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol.* 12(12):1167–75
 55. Jin Z, Liang J, Wang J, Kolattukudy PE. 2013. Delayed brain ischemia tolerance

- induced by electroacupuncture pretreatment is mediated via MCP-induced protein 1. *J Neuroinflammation*
56. Jones H, Carver M, Pekala PH. 2007. HuR binds to a single site on the C/EBP β mRNA of 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 355(1):217–20
 57. Jura J, Wegrzyn P, Korostyński M, Guzik K, Oczko-Wojciechowska M, et al. 2008. Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim. Biophys. Acta*. 1779(6-7):383–89
 58. Kadowaki T, Miyake Y, Hagura R, Akanuma Y, Kajinuma H, et al. 1984. Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 26(1):44–49
 59. Kaestner KH, Christy RJ, Lane MD. 1990. Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(1):251–55
 60. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. 2006. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*. 12(9):1626–32
 61. Kampf C, Bodin B, Källskog Ö, Carlsson C, Jansson L. 2005. Marked increase in white adipose tissue blood perfusion in the type 2 diabetic GK rat. *Diabetes*. 54(9):2620–27
 62. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. 2009. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS Journal*. 276(20):5747–54
 63. Kasza A, Wyrzykowska P, Horwacik I, Tymoszuik P, Mizgalska D, et al. 2010. Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of ZC3H12A expression. *BMC Mol Biol*. 11(1):14–11
 64. Kawai M, Rosen CJ. 2010. PPAR γ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nature Publishing Group*. 6(11):629–36
 65. Keller P, Gburcik V, Petrovic N, Gallagher IJ, Nedergaard J, et al. 2011. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocrine Disorders*. 11(1):7
 66. Kelly AS, Ryder JR, Marlatt KL, Rudser KD, Jenkins T, Inge TH. 2015. Changes in inflammation, oxidative stress, and adipokines following bariatric surgery among adolescents with severe obesity. *Int J Obes (Lond)*
 67. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 405(6785):421–24
 68. Kilroy GE, Zhang X, Floyd ZE. 2009. PPAR- γ AF-2 Domain Functions as a Component of a Ubiquitin-dependent Degradation Signal. *Obesity*. 17(4):665–73
 69. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, et al. 2003. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Experimental Hematology*. 31(11):1007–14
 70. Klemm DJ, Roesler WJ, Boras T, Colton LA, Felder K, Reusch JE. 1998. Insulin stimulates cAMP-response element binding protein activity in HepG2 and 3T3-L1 cell lines. *J. Biol. Chem*. 273(2):917–23
 71. Klyde BJ, Hirsch J. 1979. Increased cellular proliferation in adipose tissue of adult rats fed a high-fat diet. *The Journal of Lipid Research*. 20(6):705–15
 72. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler S. 2002. *E.; Hamman R, F.; Lachin, JM; Walker, EA; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle N. Engl. J. Med*
 73. Labeledz-Maslowska A, Lipert B, Berdecka D, Kedracka-Krok S, Jankowska U, et

- al. 2015. Monocyte Chemoattractant Protein-Induced Protein 1 (MCP-1) Enhances Angiogenic and Cardiomyogenic Potential of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*. 10(7):e0133746
74. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. 2007. Macrophage-Secreted Factors Impair Human Adipogenesis: Involvement of Proinflammatory State in Preadipocytes. *Endocrinology*. 148(2):868–77
75. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, Tchernof A. 2015. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*, pp. 1–13
76. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulangé A, et al. 2006. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*. 49(9):2162–73
77. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 240(4860):1759–64
78. Larsen OA, Lassen NA, Quaade F. 1966. Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol. Scand*. 66(3):337–45
79. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. 1995. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem*. 270(22):12953–56
80. Lemberger T, Braissant O. 1996. PPAR Tissue Distribution and Interactions with Other Hormone-Signaling Pathways. *Annals of the New York Acad. Sci.*
81. Lemonnier D. 1972. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J. Clin. Invest*. 51(11):2907–15
82. Li M, Cao W, Liu H, Zhang W, Liu X, et al. 2012. MCP-1 Down-Regulates IL-2 Expression through an ARE-Independent Pathway. *PLoS ONE*. 7(11):e49841
83. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, et al. 2010. MCP-induced protein 1 ubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- κ B signaling. *Journal of Experimental Medicine*. 207(13):2959–73
84. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, et al. 2010. MCP-induced protein 1 ubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- κ B signaling. *J. Exp. Med*. 207(13):2959–73
85. Liang J, Wang J, Azfer A, Song W, Tromp G, et al. 2008. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J. Biol. Chem*. 283(10):6337–46
86. Liang J, Wang J, Saad Y, Warble L, Becerra E, Kolattukudy PE. 2011. Participation of MCP-induced protein 1 in lipopolysaccharide preconditioning-induced ischemic stroke tolerance by regulating the expression of proinflammatory cytokines. *J Neuroinflammation*. 8(1):182
87. Lin R-J, Chien H-L, Lin S-Y, Chang B-L, Yu H-P, et al. 2013. MCP-1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Research*. 41(5):3314–26
88. Lin R-J, Chu J-S, Chien H-L, Tseng C-H, Ko P-C, et al. 2014. MCP-1 suppresses hepatitis C virus replication and negatively regulates virus-induced proinflammatory cytokine responses. *J. Immunol*. 193(8):4159–68
89. Liu S, Qiu C, Miao R, Zhou J, Lee A, et al. 2013. MCP-1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(47):19083–88

90. Löfgren P, Andersson I, Adolfsson B, Leijonhufvud B-M, Hertel K, et al. 2005. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(11):6207–13
91. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, et al. 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes.* 61(7):1691–99
92. Mandrup S, Loftus TM, MacDougald OA, Kuhajda FP, Lane MD. 1997. Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9):4300–4305
93. Marciniak SJ, Ron D. 2006. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86(4):1133–49
94. Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. 2015. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851(4):503–18
95. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, et al. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science.* 294(5549):2166–70
96. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, et al. 2009. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*, pp. 1–8
97. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, et al. 2011. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes.* 60(6):1688–98
98. Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, et al. 2007. Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes.* 56(1):161–67
99. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels H-H, et al. 2015. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell.* 161(5):1058–73
100. Mizgalska D, Wegrzyn P, Murzyn K, Kasza A, Koj A, et al. 2009. Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS Journal.* 276(24):7386–99
101. Mizgalska D, Wegrzyn P, Murzyn K, Kasza A, Koj A, et al. 2009. Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1beta mRNA. *FEBS J.* 276(24):7386–99
102. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, et al. 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Publishing Group*, pp. 1–8
103. Niu J, Azfer A, Zhelyabovska O, Fatma S, Kolattukudy PE. 2008. Monocyte Chemotactic Protein (MCP)-1 Promotes Angiogenesis via a Novel Transcription Factor, MCP-1-induced Protein (MCPIP). *J. Biol. Chem.* 283(21):14542–51
104. Niu J, Jin Z, Kim H, Kolattukudy PE. 2015. MCP-1-induced protein attenuates post-infarct cardiac remodeling and dysfunction through mitigating NF- κ B activation and suppressing inflammation-associated microRNA expression. *Basic Res. Cardiol.* 110(3):26–15
105. Niu J, Shi Y, Xue J, Miao R, Huang S, et al. 2013. USP10 inhibits genotoxic NF- κ B activation by MCPIP1-facilitated deubiquitination of NEMO. *The EMBO Journal.* 32(24):3206–19

106. Niu J, Wang K, Graham S, Azfer A, Kolattukudy PE. 2011. MCP-1-induced protein attenuates endotoxin-induced myocardial dysfunction by suppressing cardiac NF- κ B activation via inhibition of I κ B kinase activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 51(2):177–86
107. Niu J, Wang K, Zhelyabovska O, Saad Y, Kolattukudy PE. 2013. MCP-1-induced protein promotes endothelial-like and angiogenic properties in human bone marrow monocytic cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 347(2):288–97
108. Olefsky JM, Glass CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72(1):219–46
109. Oñate B, Vilahur G, Camino-López S, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, et al. 2013. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics*. 14(1):625
110. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, et al. 2010. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS ONE*. 5(2):e9022
111. Ossipov V, Descombes P, Schibler U. 1993. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *PNAS*. 90(17):8219–23
112. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, et al. 2000. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 102(11):1296–1301
113. Pang C, Gao Z, Yin J, Zhang J, Jia W, Ye J. 2008. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 295(2):E313–22
114. Park EA, Roesler WJ, Liu J, Klemm DJ, Gurney AL, et al. 1990. The role of the CCAAT/enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *Mol. Cell. Biol.* 10(12):6264–72
115. Pascual G, Sullivan AL, Ogawa S, Gamliel A, Perissi V, et al. 2007. Anti-inflammatory and antidiabetic roles of PPAR γ . *Novartis Found. Symp.* 286:183–96–discussion196–203
116. Pinney DF, Emerson CP. 1989. 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ. Health Perspect.* 80:221–27
117. Prusty D. 2002. Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α Gene Expression during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 277(48):46226–32
118. Qi D, Huang S, Miao R, She ZG, Quinn T, et al. 2011. Monocyte Chemotactic Protein-induced Protein 1 (MCP-1) Suppresses Stress Granule Formation and Determines Apoptosis under Stress. *J. Biol. Chem.* 286(48):41692–700
119. Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, et al. 2010. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE*. 5(7):e11765
120. Remels AHV, Langen RCJ, Gosker HR, Russell AP, Spaapen F, et al. 2009. PPAR γ inhibits NF- κ B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(1):E174–83
121. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. 1973. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to

- postconfluence inhibition of division. *Cancer Research*. 33(12):3231–38
122. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*. 14(11):1293–1307
 123. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, et al. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 289(5481):950–53
 124. Roy A, Kolattukudy PE. 2012. Monocyte chemotactic protein-induced protein (MCPIP) promotes inflammatory angiogenesis via sequential induction of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cellular Signalling*. 24(11):2123–31
 125. Roy A, Zhang M, Saad Y, Kolattukudy PE. 2013. Antidicer RNase activity of monocyte chemotactic protein-induced protein-1 is critical for inducing angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 305(10):C1021–32
 126. Ruan H, Lodish HF. 2003. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14(5):447–55
 127. Samulin J, Lien S, Grindflek E, Berget I, Ruyter B, Sundvold H. 2008. Depot specific differences during adipogenesis of porcine stromal-vascular cells. *Cell Biol. Int*. 32(5):525–31
 128. Sanburn N, Cornetta K. 1999. Rapid titer determination using quantitative real-time PCR. *Gene Ther*. 6(7):1340–45
 129. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. 2009. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes & Development*. 23(7):788–97
 130. Sell H, Eckel J. 2010. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13(4):366–70
 131. Shibasaki M, Takahashi K, Ito T, Miyazawa S, Ito M, et al. 2002. Alterations of insulin sensitivity by the implantation of 3T3-L1 cells in nude mice. A role for TNF- α ? *Diabetologia*. 45(4):518–26
 132. Skalniak A, Boratyn E, Tyrkalska SD, Horwacik I, Durbas M, et al. 2014. Expression of the monocyte chemotactic protein-1-induced protein 1 decreases human neuroblastoma cell survival. *Oncol. Rep*. 31(5):2385–92
 133. Skalniak L, Dziendziel M, Jura J. 2014. MCPIP1 contributes to the toxicity of proteasome inhibitor MG-132 in HeLa cells by the inhibition of NF- κ B. *Mol Cell Biochem*. 395(1-2):253–63
 134. Skalniak L, Koj A, Jura J. 2013. Proteasome inhibitor MG-132 induces MCPIP1 expression. *FEBS J*. 280(11):2665–74
 135. Skalniak L, Mizgalska D, Zarebski A, Wyrzykowska P, Koj A, Jura J. 2009. Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase. *FEBS J*. 276(20):5892–5905
 136. Skalniak L, Mizgalska D, Zarebski A, Wyrzykowska P, Koj A, Jura J. 2009. Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase. *FEBS Journal*. 276(20):5892–5905
 137. Skalniak L, Mizgalska D, Zarebski A, Wyrzykowska P, Koj A, Jura J. 2009. Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase. *FEBS Journal*. 276(20):5892–5905
 138. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. 2007. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 92(3):1023–33
 139. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, et al. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 453(7196):783–87

140. Sparna T, Rétey J, Schmich K, Albrecht U, Naumann K, et al. 2010. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF-alpha/IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes. *BMC Genomics*. 11(1):226–14
141. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, et al. 2011. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(37):15324–29
142. Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, et al. 2011. MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation. *Molecular Cell*. 44(3):424–36
143. Takiguchi M. 1998. The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int J Exp Pathol*. 79(6):369–91
144. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *The EMBO Journal*. 16(24):7432–43
145. Tang Q-Q, Grønberg M, Huang H, Kim J-W, Otto TC, et al. 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *PNAS*. 102(28):9766–71
146. Tang Q-Q, Lane MD. 2012. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718>. 81(1):715–36
147. Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. 2003. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *PNAS*. 100(1):44–49
148. Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM. 1997. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 748(1-2):267–70
149. Trayhurn P. 2005. Adipose Tissue in Obesity—An Inflammatory Issue. *Endocrinology*. 146(3):1003–5
150. Trayhurn P. 2013. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol. Rev*. 93(1):1–21
151. Trayhurn P, Wang B, Wood I. 2015. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 114(4):267–76
152. Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, Matsushita K, Hernandez-Cuellar E, et al. 2013. Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. *Cell*. 153(5):1036–49
153. Vrotsos EG, Kolattukudy PE, Sugaya K. 2009. MCP-1 involvement in glial differentiation of neuroprogenitor cells through APP signaling. *Brain Research Bulletin*. 79(2):97–103
154. Wang K, Niu J, Kim H, Kolattukudy PE. 2011. Osteoclast precursor differentiation by MCPIP via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *J Mol Cell Biol*. 3(6):360–68
155. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, et al. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 269(5227):1108–12
156. Wang W, Huang X, Xin H-B, Fu M, Xue A, Wu ZH. 2015. TRAF Family Member-associated NF- κ B Activator (TANK) Inhibits Genotoxic Nuclear Factor κ B Activation by Facilitating Deubiquitinase USP10-dependent Deubiquitination of TRAF6 Ligase. *J. Biol. Chem*. 290(21):13372–85
157. Wassermann F. 1965. *The development of adipose tissue*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

158. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112(12):1796–1808
159. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115(5):1111–19
160. Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Haché RJG. 2007. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(8):2703–8
161. Wu Z, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes & Development.* 9(19):2350–63
162. Xu J, Peng W, Sun Y, Wang X, Xu Y, et al. 2012. Structural study of MCP1 N-terminal conserved domain reveals a PIN-like RNase. *Nucleic Acids Research.* 40(14):6957–65
163. Yang L, Chao J, Kook YH, Gao Y, Yao H, Buch SJ. 2013. Involvement of miR-9[*sol*]MCP1 axis in PDGF-BB-mediated neurogenesis in neuronal progenitor cells. *Cell Death & Disease.* 4(12):e960
164. Yao H, Ma R, Yang L, Hu G, Chen X, et al. 2014. MiR-9 promotes microglial activation by targeting MCP1. *Nature Communications.* 5:
165. Yarmo MN, Gagnon A, Sorisky A. 2010. The anti-adipogenic effect of macrophage-conditioned medium requires the IKK β /NF- κ B pathway. *Horm. Metab. Res.* 42(12):831–36
166. Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL. 1995. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(24):11086–90
167. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & Development.* 9(2):168–81
168. Younce C, Kolattukudy P. 2012. MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* 30(2):307–20
169. Younce CW, Azfer A, Kolattukudy PE. 2009. MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)-induced Protein, a Recently Identified Zinc Finger Protein, Induces Adipogenesis in 3T3-L1 Pre-adipocytes without Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J. Biol. Chem.* 284(40):27620–28
170. Younce CW, Azfer A, Kolattukudy PE. 2009. MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)-induced protein, a recently identified zinc finger protein, induces adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes without peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 284(40):27620–28
171. Younce CW, Kolattukudy PE. 2010. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP1P. *Biochem. J.* 426(1):43–53
172. Younce CW, Wang K, Kolattukudy PE. 2010. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP1P. *Cardiovascular Research.* 87(4):665–74
173. Yubero P, Manchado C, Cassarddoulcier AM, Mampel T, Vinas O, et al. 1994. CCAAT/Enhancer Binding-Proteins α and β Are Transcriptional Activators of the Brown Fat Uncoupling Protein Gene Promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 198(2):653–59
174. Zhang C, He Y, Okutsu M, Ong LC, Jin Y, et al. 2013. Autophagy is involved in

- adipogenic differentiation by repressing proteasome-dependent PPAR γ 2 degradation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305(4):E530–39
175. Zhang J-W, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. 2004. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 279(6):4471–78
176. Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J. 2011. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription. *J. Cell. Biochem.* 112(2):488–97
177. Zhou L. 2006. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces a Novel Transcription Factor That Causes Cardiac Myocyte Apoptosis and Ventricular Dysfunction. *Circulation Research.* 98(9):1177–85
178. Zhou L. 2006. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces a Novel Transcription Factor That Causes Cardiac Myocyte Apoptosis and Ventricular Dysfunction. *Circulation Research.* 98(9):1177–85