

Streszczenie

Adipogeneza jest złożonym i ściśle regulowanym procesem biologicznym, odgrywającym kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej oraz rozwoju otyłości. Powstawanie adipocytów jest szczególnie istotne dla świń, ponieważ tkanka tłuszczowa silnie wpływa na tempo wzrostu, bilans energetyczny, przeżywalność noworodków oraz cechy jakości mięsa, które są bardzo ważne z punktu widzenia produkcji zwierzęcej. Chociaż zidentyfikowano wiele kluczowych czynników transkrypcyjnych uczestniczących w adipogenezie, współdziałanie mechanizmów transkrypcyjnych i epigenetycznych regulujących ten proces pozostaje nadal niewystarczająco poznane, szczególnie u gatunków gospodarskich, takich jak świnia.

Głównym celem niniejszej pracy było poznanie molekularnych mechanizmów regulujących adipogenezę u świń, ze szczególnym uwzględnieniem roli kluczowych czynników transkrypcyjnych, ich wzajemnych interakcji oraz modyfikacji histonów związanych z różnicowaniem adipocytów. Analizy transkrypcyjne i epigenetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem świńskich mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) jako modelu *in vitro*. W celu poznania roli ważnych genów kodujących czynniki transkrypcyjne adipogenezy - *SREBF1* i *CEBPB* zastosowano edycję genomu za pomocą metody CRISPR/Cas9. Wpływ wprowadzonych delecji genów na różnicowanie adipocytów oceniano poprzez analizę ekspresji głównych markerów adipogenezy, obejmujących geny *PPARG*, *GATA2*, *CEBPA*, *CEBPD* i *FABP4*. Dodatkowo, oceniono regulację epigenetyczną poprzez analizę wybranych aktywujących i represyjnych modyfikacji histonów, tj. H4K20me3, H4K8ac oraz H3K9ac, w obrębie loci genów *PPARG*, *GATA2*, *CEBPA* oraz *CEBPB*.

W badaniach zastosowano szereg metod eksperymentalnych, obejmujących hodowlę *in vitro* MSC, indukcję różnicowania w kierunku adipocytów, edycję genomu z wykorzystaniem techniki CRISPR/Cas9, generowanie komórek z homozygotycznymi i heterozygotycznymi delecjami, PCR i sekwencjonowanie

DNA w celu potwierdzenia obecności mutacji, analizę akumulacji kropli lipidowych za pomocą immunobarwienia, izolację RNA, ilościową reakcję PCR po odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR) do analizy ekspresji genów, immunoprecypitację chromatyny połączoną z ilościowym PCR (ChIP-qPCR) do analizy modyfikacji histonów oraz analizę korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną a modyfikacjami chromatyny.

Uzyskane wyniki wykazały, że zaburzenie funkcji izoformy *SREBF1c* istotnie zmieniało ekspresję kluczowych genów adipogennych, w tym prowadziło do obniżenia ekspresji genów *PPARG*, *CEBPA*, *CEBPD* oraz *FABP4*, oraz wzrost ekspresji genu *CEBPB*, co ostatecznie skutkowało zahamowaniem adipogenezy i ograniczeniem akumulacji kropli lipidowych. Po raz pierwszy wykazano kluczową rolę izoformy *SREBF1c* w różnicowaniu adipocytów u świń oraz zidentyfikowano potencjalną współzależność regulacyjną pomiędzy *SREBF1c* i *CEBPB*.

W przypadku genu *CEBPB* edycja genomu metodą CRISPR/Cas9 doprowadziła do powstania zarówno homozygotycznych, jak i heterozygotycznych delecji w obrębie regionu promotorowego. Oba typy modyfikacji całkowicie blokowały różnicowanie adipocytów oraz wpływały na zdolność proliferacyjną świńskich mezenchymalnych komórek macierzystych, co potwierdzono zmienionymi profilami ekspresji genów związanych z proliferacją, takich jak *CCND1*, *MCM2* i *PCNA*. Wyniki te wykazały kluczową rolę *CEBPB* nie tylko w adipogenezie, lecz także w regulacji proliferacji komórkowej.

Ponadto analizy epigenetyczne ujawniły dynamiczne i zależne od etapu różnicowania zmiany aktywujących (H3K9ac i H4K8ac) oraz represyjnych (H4K20me3) modyfikacji histonów w obrębie loci adipogennych genów *PPARG*, *GATA2*, *CEBPA* i *CEBPB*. Analiza modyfikacji histonów specyficznych dla regionów promotorowych i eksonowych dostarczyła szczegółowych informacji dotyczących przebudowy chromatyny w różnych regionach genów oraz związku z regulacją transkrypcji podczas różnicowania adipocytów. Zaobserwowane profile modyfikacji histonów były specyficzne zarówno dla poszczególnych genów, jak i regionów genomowych, a ich zależność z aktywnością transkrypcyjną pokrywała się jedynie częściowo, co wskazuje na złożoną epigenetyczną kontrolę adipogenezy u świń.

Podsumowując, niniejsza praca wykazała, że adipogeneza u świń jest regulowana przez złożone interakcje pomiędzy kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi a mechanizmami epigenetycznymi kontrolującymi organizację chromatyny i ekspresję genów. Istotnym elementem badań było zastosowanie nowoczesnej technologii edycji genomu CRISPR/Cas9 w świńskich mezenchymalnych komórkach macierzystych, co stanowi skuteczne narzędzie do badań funkcji genów u gatunków gospodarskich. Uzyskane wyniki nie tylko poszerzają aktualną wiedzę na temat molekularnych mechanizmów rozwoju tkanki tłuszczowej świni, lecz także wskazują na potencjał wykorzystania w przyszłości technologii edycji genomu w hodowli zwierząt w celu uzyskania zwierząt o pożądanych cechach produkcyjnych, takich jak ulepszony skład tuszy i lepsza jakość mięsa.

Poznań, 27.05.2026



