

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Teresa Płatek

*DNA methylation profile associated with metabolic complications in obese individuals*

*Profil metylacji DNA związany z zaburzeniami metabolicznymi u pacjentów z otyłością*

*Praca doktorska*

Promotor: Dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Bogdan Solnica

Kraków, rok 2022

*Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor  
Małgorzacie Malczewskiej-Malec,*

*Pani Profesor Aldonie Dembińskiej-Kieć,*

*Pani Doktor Joannie Góralskiej,*

*Pani Doktor habilitowanej Annie Polus,*

*a także wszystkim współpracownikom z Katedry  
Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium  
Medicum za pomoc w powstaniu tej pracy.*

*Dziękuję także wszystkim Współautorom publikacji za  
życzliwość, zaangażowanie i owocną współpracę.*

*Pracę tę dedykuję moim Rodzicom, Mężowi i Synkowi.*

## SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie.....	5
2. Wykaz zastosowanych skrótów.....	6
3. Opis projektu:	
3.1. Wstęp i uzasadnienie pracy.....	8
3.2. Cele pracy.....	13
3.3. Metodologia: .....	14
3.2.1. Opis grupy badawczej: .....	14
3.2.2. Pomiary antropometryczne i badania biochemiczne: .....	15
3.2.3. Analiza metylacji DNA w leukocytach:.....	16
3.2.4. Badania poziomu ekspresji miRNA metodą Real-Time PCR na mikromacierzach TLDA:.....	17
3.2.5. Analizy statystyczne: .....	18
4. Podsumowanie wyników. ....	19
4.1. Publikacja 1.....	19
4.2. Publikacja 2.....	20
5. Wnioski.....	22
6. Streszczenie w języku polskim.....	24
7. Streszczenie w języku angielskim .....	28
8. Piśmiennictwo.....	31
9. Załączniki .....	39
9.1. Artykuł nr 1 .....	40
9.2. Artykuł nr 2 .....	53
9.3. Oświadczenia współautorów.....	70

## 1. WPROWADZENIE

Niniejsza dysertacja doktorska pt. „Profil metylacji DNA związany z zaburzeniami metabolicznymi u pacjentów z otyłością”, powstała w oparciu o cykl tematycznie powiązanych artykułów oryginalnych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych znajdujących się na listach MNiSW, indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na Liście Filadelfijskiej (Journal Citation Reports).

Na pracę doktorską składają się następujące publikacje:

1. DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia.

**Platek T**, Polus A, Góralska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. *Mol Med.* 2020 Oct 7;26(1):93 (IF= 6.354, MNiSW: 100.000).

2. Epigenetic regulation of processes related to high level of fibroblast growth factor 21 in obese subjects.

**Platek T**, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. *Genes (Basel).* 2021 Feb 21;12(2):307 (IF= 4.096, MNiSW: 100.000).

Wymienione artykuły będą cytowane w pracy jako publikacje **1, 2**.

Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (Impact Factor (IF)) według Thomson Reuters Journal Citation Reports dla wymienionych czasopism wynosi 10,45 oraz według wykazu czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynosi 200 punktów za 2020 rok.

## 2. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

ALT - aminotransferaza alaninowa, (*ang. alanine aminotransferase*),

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

BIOCLAIMS- akronim projektu pt. Biomarkery stałości równowagi metabolicznej regulowanej dietą, (*ang. BIOMarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food*),

DNTM1 - metylotransferaza DNA typu I (*ang. DNA methyltransferase 1*),

DNTM3A - metylotransferaza DNA typu III A (*ang. DNA methyltransferase 3 alpha*),

DNTM3B - metylotransferaza DNA typu III B (*ang. DNA methyltransferase 3 beta*),

FGF21 - czynnik wzrostu fibroblastów 21 (*ang. fibroblast growth factor 21*),

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

GGT - gamma – glutamylotranspetydaza (*ang. gamma-glutamyltransferase*),

GIP - glukozozależny peptyd insulintropowy (*ang. glucose-dependent insulinotropic polypeptide*),

GWAS - badanie asocjacyjne całego genomu (*ang. genome-wide association studies*),

HDL - lipoproteina o wysokiej gęstości (*ang. high-density lipoprotein*),

HOMA-IR - wskaźnik oceny modelu homeostazy oporności na insulinę (*ang. homeostasis model assessment of insulin resistance*),

IL-6 - interleukina 6 (*ang. Interleukin 6*),

LDL-CH - cholesterol LDL (*ang. low-density lipoprotein cholesterol*),

LDL - lipoproteina o niskiej gęstości (*ang. low-density lipoprotein*),

MBPs - białka wiążące grupy metylowe (*ang. methyl-CpG-binding proteins*),

MCP1 - białko chemotaktyczne monocytów (*ang. monocyte chemoattractant protein-1*),

NAFLD - niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (*ang. nonalcoholic fatty liver disease*),

NR1H2 - wątrobowy receptor X beta (*ang. liver X receptor beta*),

PPAR $\alpha$  - receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów alfa (*ang. peroxisome proliferator-activated receptor alpha*),

PUFA - wielonienasycone kwasy tłuszczowe (*ang. polyunsaturated fatty acids*),

SREBP - białko wiążące element regulatorowy sterolu (*ang. sterol regulatory element binding transcription factor 1*),

TG – triglicerydy (*ang. triglycerides*),

TLDA - mikromacierze o niskiej gęstości z sondami TaqMan (*ang. TaqMan low-density array*),

TNF $\alpha$  - czynnik martwicy nowotworów (*ang. tumor necrosis factor  $\alpha$* )

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*),

VLDL - lipoproteina o bardzo małej gęstości (*ang. very-low-density lipoprotein*),

WHR - stosunek obwodu talii do obwodu bioder (*ang. waist-hip ratio*).

### 3. OPIS PROJEKTU

#### 3.1. WSTĘP I UZASADNIENIE PRACY

Otyłość jest przewlekłą chorobą charakteryzującą się nadmiernym i/lub nieprawidłowym gromadzeniem się tkanki tłuszczowej, która dotyka ponad 650 milionów ludzi na świecie [1]. Choroba ta prowadzi do rozwoju wielu metabolicznych powikłań i w wydatny sposób zwiększa ryzyko rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Rozpowszechnienie otyłości stale narasta wśród populacji dorosłych i dzieci. Światowe dane dotyczące lat 1975- 2016 wskazują na niemal trzykrotny wzrost liczby osób dotkniętych tą chorobą [2]. Występowanie otyłości wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób towarzyszących takich jak cukrzyca typu 2, dyslipidemia, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. NAFLD), nadciśnienie tętnicze, choroby układu krążenia, zespoły otyenne, choroba zwyrodnieniowa stawów oraz nowotwory [2].

Za etiologię otyłości uznaje się złożone interakcje czynników środowiskowych z indywidualnymi predyspozycjami genetycznymi [3]. Obesogenne czynniki środowiskowe obejmują głównie niską aktywność fizyczną oraz nieprawidłowe nawyki żywieniowe, takie jak nadmierne spożycie kalorii pochodzących z rafinowanych węglowodanów i tłuszczów zwierzęcych [4]. Do rozwoju otyłości przyczyniają się również wybrane endokrynopatie, czynniki psychologiczne, genetyczne, społeczne oraz czynniki jatrogenne – głównie efekty uboczne stosowania farmakoterapii [5].

Duży wpływ na rozwój otyłości ma odziedziczony po rodzicach zestaw wariantów genetycznych. Udział czynników dziedzicznych w zmienności masy ciała ocenia się na 40 – 75 % [6]. Szacuje się, że podłoże genetyczne odpowiada za 40% do 50% zmienności wagi ciała odnosząc się do całej populacji, ale jest niższe wśród osób o normalnej wadze (około 30%) i znacznie wyższe w subpopulacji osób z otyłością i ciężką otyłością (około 60% do 80%) [6]. Wyróżnia się 3 rodzaje otyłości genetycznie uwarunkowanej: otyłość zespołową, niezespołową otyłość jednogenową i otyłość wielogenową. Zaledwie bardzo mały odsetek przypadków otyłości stanowi otyłość zespołowa [7, 8]. Obecnie znanych jest 79 zespołów syndromicznych, czyli wrodzonych zespołów chorobowych, których podłożem są mutacje w genach plejotropowych lub rearanżacje chromosomowe [7, 9]. Przykładami są m. in. Zespół Pradera-Willego (zaburzone piętnowanie genomowe regionu chromosomu 15q11-13), Zespół Bardeta i Biedla (zidentyfikowano mutacje w 21 genach: *BBS1*, *BBS2*, *ARL6*



(*BBS3*), *BBS4*, *BBS5*, *MKKS* (*BBS6*), *BBS7*, *TTC8* (*BBS8*), *BBS9*, *BBS10*, *TRIM32* (*BBS11*), *BBS12*, *MKS1* (*BBS13*), *CEP290* (*BBS14*), *WDPCP* (*BBS15*), *SDCCAG8* (*BBS16*), *LZTFL1* (*BBS17*), *BBIP1* (*BBS18*), *IFT27* (*BBS19*), *IFT72* (*BBS20*) i *C8ORF37*(*BBS21*)), Zespół Alströma (mutacje w genie *ALMS1*), Zespół łamliwego chromosomu X (transkrypcyjne wyciszenie genu *FMR1*), Zespół WAGR (ang. Wilms-Tumour-Aniridia Syndrom, delecje chromosomu 11p14), Zespół Downa (trisomia chromosomu 21) czy Zespół Turnera (monosomia chromosomu X) [7, 8, 9].

Najczęstszą przyczyną rozwoju niezespołowej otyłości jednogenowej są mutacje w genach: *MC4R*, *LEP*, *LEPR*, *PCSK1*, *ADCY3* i *POMC*, odgrywające rolę w regulacji homeostazy energetycznej mediowanej przez szlak leptyna-melanokortyna oraz mutacje genów kontrolujących apetyt (*NPY*, *FTO*, *GHSR* i *MC3R*) [7, 9, 10]. Wielogenowa forma otyłości rozwija się jako efekt obecności polimorfizmów genetycznych wielu różnych genów i ich interakcji z czynnikami środowiskowymi [10]. Najważniejszą rolę odgrywają polimorfizmy genów kontrolujących wydzielanie i działanie insuliny, regulujących apetyt i sytość, adipogenezę oraz metabolizm energetyczny i lipidowy (*BDNF*, *NEGR1*, *TCF7L2*, *IRS1*, *MAP2K5*, *SLC6A14*, *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*, *UCP1*, *UCP2* i *UCP3*) [7, 10]. Wyniki ostatnich badań naukowych ujawniają kolejne warianty genetyczne predysponujące do rozwoju otyłości [11, 12]. W dwóch metaanalizach z wykorzystaniem badania asocjacyjnego całego genomu (GWAS- genome wide association studies) przeprowadzonych na kohorcie około 700 tys. osób wykazano istnienie 536 genowych *loci* związanych ze zmiennością wartości BMI (wskaźnika masy ciała) oraz 346 związanych ze zmiennością wskaźnika WHR (stosunek obwodu talii do obwodu bioder) skorygowanego do wartości BMI [8, 11, 12]. Potencjalne nowe geny kandydujące zidentyfikowane przez GWAS to m.in. *GNPDA2*, *BDNF*, *NEGR1*, *SH2B1*, *ETV5*, *MTCH2*, *KCTD15*, *RBJ*, *GPRC5B*, *MAP2K5*, *QPCTL*, *TNNI3K*, *SLC39A8*, *FLJ35779*, *LRRN6C*, *TMEM160*, *FANCL*, *CADM2*, *PRKD1*, *LRP1B*, *PTBP2*, *MTIF3*, *ZNF608*, *RPL27A*, *NUDT3*, *HSD17B12*, *STAG3L1*, *KRTCAP2*, *THBS3*, *FAM150B*, *VRK2*, *RFTN*, *WDR6*, *NSD1*, *KCNH2*, *BNC2*, *RALGPS*, *PLCEL*, *AP0066212.1*, *ORAOV1*, *MAP4K5* i *ASB16* [11, 13 - 15].

W ostatnim dziesięcioleciu dynamicznie rozwijają się badania epigenetyczne w otyłości. Epigenetyka jest dziedziną nauki badającą dziedziczne zmiany funkcji genów, które nie są związane ze zmianami w sekwencji nukleotydów w DNA [16]. Regulacja epigenetyczna transkrypcji genów, może zachodzić poprzez chemiczną modyfikację chromatyny (metylację DNA) oraz liczne potranslacyjne modyfikacje

histonów (takie jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja i sumoilacja) oraz syntezę niekodującego mikroRNA [17, 18, 19].

W ostatnich latach, coraz częściej podkreśla się, że modyfikacje epigenetyczne tłumaczą mechanizmy oddziaływania czynników środowiskowych na ekspresję genów związanych z rozwojem otyłości i jej powikłań, zwłaszcza metabolicznych [16].

Proces metylacji DNA polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej do piątego atomu węgla pierścienia cytozyny [20]. Metylacja dinukleotydów cytozyna-guanina w obrębie promotorów genów oraz istotnych miejsc regulatorowych może blokować wiązanie czynników transkrypcyjnych i / lub białek wiążących grupy metylowe (MBPs) wyciszając transkrypcję genów [20, 21]. Fizjologicznie metylacja DNA odgrywa ważną rolę w inaktywacji chromosomu X, monoallelicznej ekspresji genów podlegających piętnowaniu rodzicielskiemu, regulacji różnicowania komórek, ekspresji genów specyficznych dla komórki, oraz utrzymaniu stabilności i struktury genomu [16, 22]. Metylacja DNA jest komórkowo i tkankowo-specyficzna, odwracalna, oraz wrażliwa na wpływ czynników środowiskowych (m. in. przyjmowanych leków, dymu papierosowego, zanieczyszczenia powietrza, aktywności fizycznej, podaży węglowodanów i kwasów tłuszczowych, a także składu mikrobiomu jelitowego) [7, 22, 23].

Metylację cytozyny katalizują enzymy nazywane DNA metylotransferazami. Znane są trzy ssacze metylotransferazy: DNTM1, DNTM3A oraz DNTM3B. Metylotransferaza DNA typu I (DNTM1) odpowiada za utrzymanie wzoru metylacji DNA w trakcie podziałów komórkowych, natomiast metylotransferazy typu III A i B (DNTM3A i DNTM3B) odpowiadają za wprowadzanie wzoru metylacji DNA *de novo*, która zachodzi na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego [22].

W badaniach ostatniej dekady wykazano, że geny kontrolujące apetyt: *POMC*, *NPY*, *FTO*, *MCHR1*, *ADIPOQ* i *LEP*, oraz geny związane z metabolizmem cholesterolu i lipidów: *LPL*, *PPARG*, *SREBF1*, *ABCA1*, *ABCG1* i *CPT1A* i metabolizmem glukozy: *IRS1*, *IGF2/H19* regulowane są również poprzez metylację DNA [7, 24 - 26].

Uważa się że czynniki środowiskowe, które są odpowiedzialne za mechanizmy epigenetyczne w otyłości należą głównie do kategorii żywieniowych i fizjologicznych. Czynniki te wpływają na metylom w określonym oknie czasowym w życiu osobniczym.

Nieprawidłowe nawyki żywieniowe modyfikują epigenom tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych, wątroby oraz komórek beta trzustki, prowadząc tym samym do dysfunkcji tych narządów [7, 22- 23].

Jak wykazano, dieta bogata w węglowodany rafinowane, nasycone kwasy tłuszczowe (zwłaszcza kwas palmitynowy), kwasy tłuszczowe typu *trans* lub dieta wzbogacona o wielonienasycone kwasy tłuszczowe (n-3 PUFA) może istotnie hamować lub aktywować transkrypcję wielu genów [16, 27 - 29]. Podobny efekt zaobserwowano przy nadmiernej podaży kalorii lub w wyniku znacznych restrykcji kalorycznych, a także po zabiegach bariatrycznych [27, 30 – 36].

Szczególnym okresem zwiększonej podatności na działanie aktywnych składników pożywienia na genom jest okres prenatalny i wczesny okres rozwojowy. Coraz liczniejsze doniesienia naukowe wskazują, że dieta matek w czasie ciąży wpływa na epigenom potomstwa. Zaobserwowano istotną korelację między wskaźnikiem masy ciała (BMI) matki przed i we wczesnym okresie ciąży i metylacją DNA w 86 loci we krwi noworodków [37]. Kolejne badania na ludziach wykazały, że na status metylacji DNA genu *POMC* u potomstwa ma wpływ sposób odżywiania matki w pierwszym trymestrze ciąży, co zostało powiązane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju otyłości u dzieci i dorosłych [38, 39].

W ostatnich latach wykazano też ściśle powiązania pomiędzy procesem starzenia się organizmu, otyłością i statusem metylacji DNA wybranych genów [40, 41, 42]. Zauważono, że metylacja DNA genów i ekspresja mRNA w tkance tłuszczowej osób otyłych jest odmienna w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała [43, 44]. Obserwowany w otyłości rozwój przewlekłego stanu zapalnego, insulinooporności, dyslipidemii i stresu oksydacyjnego, to czynniki, które nasilają związane z wiekiem zmiany w profilu metylacji DNA wybranych genów [19, 44, 45]. Dodatkowym czynnikiem, który może wpływać na procesy epigenetyczne w otyłości jest odmienny skład mikrobiomu jelitowego [46].

Tkanka tłuszczowa jest narządem aktywnym wydzielniczo, bowiem w jej obrębie produkowane są liczne substancje o działaniu endokrynnym i zapalnym, określane mianem „adipocytokin”, które regulują ogólnoustrojowe przemiany metaboliczne [8]. Ekspansja tkanki tłuszczowej prowadzi do zmian w jej anatomii i fizjologii. W otyłości obserwujemy nasilone zmiany w ekspresji adipocytokin, za co odpowiedzialne są przynajmniej częściowo modyfikacje epigenetyczne. Wykazano na przykład, że metylacja DNA odgrywa kluczową rolę w procesie represji syntezy adiponektyny i zwiększonej produkcji leptyny czy TNF $\alpha$  (czynnika martwicy nowotworów) [47, 48, 49]. Niemniej jednak, szczegółowa wiedza na temat mechanizmów epigenetycznych regulacji syntezy wielu adipocytokin jest nadal ograniczona. Dysfunkcja tkanki

tłuszczowej prowadzi do rozwoju wielu zaburzeń metabolicznych, takich jak insulinoporność i w konsekwencji zaburzenia węglowodanowe, czy upośledzony metabolizm i klirens lipoprotein [50- 52]. Dyslipidemia jest częstym zaburzeniem występującym w otyłości i charakteryzuje się głównie zwiększonym stężeniem we krwi lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) i zmniejszonym stężeniem lipoprotein o dużej gęstości (HDL). Często obserwuje się też podwyższone stężenie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) z równoczesną zmianą ich fenotypu (małe, gęste cząsteczki) [8]. Otyłość i jej metaboliczne powikłania w wydatny sposób zwiększają ryzyko rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego [53].

Ekspansja brzusznej tkanki tłuszczowej i zwiększenie zawartości tłuszczu w obrębie wątroby prowadzą do podwyższonego stężenia FGF21 w surowicy [54]. Zaobserwowano korelację między poziomami FGF21 a profilem lipidowym (TG, HDL i LDL) oraz insulinowrażliwością/opornością (HOMA-IR, insulina na czczo), poziomem adiponektyny, wysokim ciśnieniem krwi, wskaźnikiem BMI i wiekiem [54]. Podwyższone poziomy FGF21 obserwowane są w chorobach związanych ze stresem metabolicznym, np. w NAFLD, cukrzycy typu 2, nadciśnieniu tętniczym, miażdżycy, retinopatii cukrzycowej, chorobie nerek czy lipodystrofii [54].

Ocena metylomu we krwi obwodowej, tkance tłuszczowej, wątrobie lub mięśniach szkieletowych może wskazać zaburzone szlaki metaboliczne w otyłości. Umożliwia poznanie nowych genów kandydatów uczestniczących w złożonych interakcjach środowiska i genów. Dodatkowo otwiera możliwości wprowadzania przyszłych strategii prewencji i leczenia otyłości wpływając na docelowe geny poprzez zmianę diety i stylu życia.

Podsumowując, przejściowa i odwracalna natura modyfikacji epigenetycznych, umożliwia poszukiwanie nowych biomarkerów otyłości, pozwalając identyfikować osoby wysokiego ryzyka rozwoju choroby i towarzyszących powikłań. Daje możliwości poszukiwania nowych sposobów leczenia.

### **3.2. CELE PRACY:**

Ogólnym celem dysertacji doktorskiej było zbadanie czy istnieją regulacje epigenetyczne związane z powikłaniami metabolicznymi u otyłych pacjentów.

Cele szczegółowe obejmowały:

**Cel 1.** Sprawdzenie czy istnieje profil metylacji DNA związany z hipercholesterolemią w badanej grupie otyłych pacjentów.

**Cel 2.** Znalezienie genów regulowanych poprzez metylację DNA oraz profilu ekspresji miRNA związanego z wysokim poziomem czynnika wzrostu fibroblastów 21 (FGF21) w surowicy osób otyłych.

## **3.2. METODOLOGIA:**

### **3.2.1. Opis grupy badawczej:**

Badania zostały przeprowadzone w grupie osób dorosłych z nadwagą i otyłością z minimalnym wskaźnikiem BMI powyżej 27. Pacjenci zostali wybrani z projektu pt. BIOCLAIMS (Biomarkery stałości równowagi metabolicznej regulowanej dietą, ang. BIOMarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food), siódmego programu ramowego Wspólnoty Europejskiej o numerze 244995. Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego (numery zgód: KBET/82/B/2009 i KBET/45/B/2012). Kryteriami wykluczenia z udziału w projekcie były choroby układu krążenia, cukrzyca, niewydolność nerek lub wątroby, zaburzenia endokrynologiczne, przewlekłe stany zapalne, terapię hormonalną, stosowane leki hipolipemizujące lub przeciwzapalne, stosowanie suplementów, palenie lub nadmierne spożywanie alkoholu, ciąża lub laktacja. Z danych zebranych w wywiadzie wiadomo, że pacjenci prowadzili nieaktywny tryb życia.

#### **Publikacja 1:**

Badanie przeprowadzono w grupie 137 osób dorosłych z BMI powyżej 27 (min. 27 – maks. 45 kg /m<sup>2</sup>), składającej się z kobiet (n= 99) i mężczyzn (n= 38) w wieku od 25 do 65 lat.

Porównanie parametrów biochemicznych przeprowadzono w 2 grupach:

- w grupie z hipercholesterolemią (n= 68) obejmującej pacjentów z poziomem cholesterolu LDL (LDL-CH) ( $\geq 3,4$  mmol/l) w surowicy,
- w grupie kontrolnej (n = 69), która składała się z osób otyłych ze stężeniem cholesterolu LDL w surowicy  $<3,4$  mmol/l.

#### **Publikacja 2:**

Grupa badana obejmowała osoby dorosłe z nadwagą i otyłością (n = 136; 100 kobiet i 36 mężczyzn) z BMI od 27 do 45 kg/m<sup>2</sup>. Pacjentów podzielono na 2 grupy na podstawie poziomów FGF21 w surowicy na czczo (FGF21  $<213$  pg/ml i  $\geq 213$  pg/ml). Punktem odcięcia była mediana poziomu FGF21 w surowicy.

Analizowano 2 grupy badawcze:

- grupę badaną (n= 68), która składała się z osób otyłych z wysokim stężeniem FGF21 ( $\geq 213$  pg / ml) w surowicy,
- grupę kontrolną (n = 68), która składała się z osób otyłych z niskim stężeniem FGF21 w surowicy  $<213$  pg/ml.

### **3.2.2. Pomiary antropometryczne i badania biochemiczne:**

Wszyscy uczestnicy mieli wykonane pomiary masy ciała, wzrostu, obwodu talii i bioder, procentowej zawartości tkanki tłuszczowej oraz ciśnienia krwi. Od uczestników pobierano na czczo próbki krwi żyłnej, a następnie odwirowywano w celu separacji osocza lub surowicy. W surowicy oznaczono stężenie glukozy, insuliny, wolnych kwasów tłuszczowych (FFA), cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, triglicerydów (TG), adipokin (adiponektyny, leptyny, rezystyny i wisfatyny), organokin (FGF21, czynnika wzrostu fibroblastów 19 (FGF19), miostatyny i iryzyny), markerów zapalenia (interleukiny 6 (IL-6), białka C-reaktywnego o wysokiej czułości (hsCRP), białka chemotaktycznego monocytów (MCP1), naczyniowej cząsteczki adhezyjnej 1 (sVCAM-1), płytkowo-śródłonkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (sPECAM-1), śródłonkowej E-selektyny (sEselectin)) oraz czynnika wzrostu śródłonka naczyniowego (VEGF). W osoczu oznaczono stężenie glukozozależnego peptydu insulinotropowego (GIP), całkowitą zawartość kwasów tłuszczowych oraz nasyconych kwasów tłuszczowych (mirystynowy, palmitynowy, stearynowy, behenowy, lignocerynowy i arachidowy), jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (palmitoleinowy, oleinowy i nerwonowy) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (arachidonowy, linolowy,  $\alpha$ -linolenowy, eikosapentaenowy i dokozaheksaenowy).

Pomiar stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i TG wykonano za pomocą metod enzymatyczno-kolorymetrycznych na analizatorze MaxMat. Insulinę oznaczono metodą immunoradiometryczną zestawem INS IRMA firmy Diasource, natomiast hsCRP oznaczono metodą immunoturbidymetryczną zestawem firmy APTEC Diagnostics. Oznaczenie stężenia poszczególnych kwasów tłuszczowych wykonano metodą chromatografii gazowo-cieczowej. Adipokiny, organokiny i cytokiny mierzone były metodą immunoenzymatyczną ELISA przy udziale komercyjnych zestawów następujących firm (R&D, BioVendor, Immunodiagnostik, EMD Milipore). Natomiast FFA zmierzono ilościową metodą enzymatyczno-kolorymetryczną zestawem Free Fatty Acids, Half Micro Test firmy

Roche. Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i gamma – glutamylotranspetydazy (GGT) zmierzono na automatycznym analizatorze Hitachi cobas c701/702. Stężenie cholesterolu LDL wyliczono według formuły Friedewalda, tj.  $LDL=TC-(HDL + TG/2,2)$  oraz stężenie nie-HDL według wzoru:  $nie-HDL= całkowity cholesterol - HDL cholesterol$ .

### **3.2.3. Analiza metylacji DNA w leukocytach:**

Do oznaczeń profilu metylacji DNA pobrano krew żylną do probówek EDTA-K3 (wersenian trójpotasowy). Analiza metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej została wykonana przy udziale wysokoprzepustowych macierzy metylacyjnych firmy Agilent Technologies (Human DNA Methylation Microarrays, G4495A-023795). Zastosowana macierz zawiera 237 227 oligonukleotydowych sond przytwierdzonych do szklanego szkiełka mikromacierzowego. Sondy zaprojektowane zostały do znanych wysp CpG (27 627 sond) oraz do regionów obejmujących do 85 nukleotydów w pobliżu znanej wyspy CpG, oraz sondy dla niezmetylowanych regionów (5081 sond). Z zamrożonej krwi wyizolowano genomowe DNA. Dokonano pomiaru DNA ilościowego i jakościowego za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND1000. Materiałem wyjściowym było 5 µg DNA. Przeprowadzono sonifikację przy pomocy homogenizatora ultradźwiękowego Sonopuls HD 2200. Pofragmentowane DNA zostało podzielone na 2 części: 4/5 ilości zostało wzięte do immunoprecypitacji, pozostała 1/5 część została wykorzystana jako próbka referencyjna. Immunoprecypitację fragmentów DNA bogatych w 5-metylocytozyny wykonano za pomocą przeciwciała monoklonalnego przeciwko 5-metylocytozynie (Monoclonal Antibody to 5-Methyl Cytosine / 5-MeC Purified from Acris Antibodies). Następnie przeprowadzono amplifikację i wyznakowanie barwnikami fluorescencyjnymi: zmetylowane fragmenty DNA znakowano cyjaniną- 3 (Cy-3), natomiast materiał kontrolny znakowano cyjaniną- 5 (Cy-5). Przeprowadzono konkurencyjną hybrydyzację DNA wyznakowanego Cy-3 i Cy-5 do sond oligonukleotydowych na szkiełku mikromacierzowym przez 40 godzin w temperaturze 65°C w piecu hybrydyzacyjnym. Kolejno wykonano odpłukiwanie szkiełka mikromacierzowego zgodnie z instrukcją producenta. Skanowanie mikromacierzy przeprowadzono w skanerze DNA Microarray Scanner. Ekstrakcję zeskanowanych danych na dane tekstowe przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Agilent Features Extraction software v 10.10.1.1.



### **Publikacja 1:**

Do przesiewowego badania profilu metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej spośród całej kohorty wybrano 10 reprezentatywnych próbek (po 5 na grupę dobranych pod względem płci, wieku i BMI: wysoki LDL-CH versus niski LDL-CH).

### **Publikacja 2:**

Wykonano 16 macierzy metylacyjnych w reprezentatywnych próbkach (wybranych po 8 na grupę dobranych pod względem płci i BMI: wysoki FGF21 versus niski FGF21).

### **3.2.4. Badania poziomu ekspresji miRNA metodą Real-Time PCR na mikromacierzach TLDA:**

W celu oznaczenia profilu miRNA pobrano krew żylną do próbek stabilizujących (PAX gene Blood RNA Tubes), które zamrożono w temperaturze -80°C.

Następnie miRNA zostało wyekstrahowane przy użyciu zestawu: PAXgene 96 Blood RNA Kit oraz zestawu do oczyszczania RNA/miRNA: GeneMATRIX Universal RNA/miRNA kit. Kolejno dokonano oceny ilości oraz jakości miRNA przy udziale analizatora BioAnalyzer 2100 i spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję przy użyciu zestawów: TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and MegaPlexHuman Pool A and B i primerów do odwrotnej transkrypcji (RT) oraz preamplifikację przy użyciu zestawu: Megaplex™ PreAmp Kit i dedykowanych primerów. Do analizy ekspresji miRNA wykorzystano mikromacierze o niskiej gęstości z sondami TaqMan (*ang. TaqMan Low-Density Array- TLDA*), które umożliwiają ocenę ilościową 754 ludzkich miRNA. Analizę przeprowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym (*ang. Real-Time PCR*) na aparacie 7900HT Fast Real-Time PCR system.

### **Publikacja 2:**

W celu ilościowej analizy poziomu ekspresji miRNA w leukocytach wykonano 16 macierzy TLDA w reprezentatywnych próbkach wybranych po 8 na grupę dobranych pod względem płci i BMI (grupa wysoki FGF21 versus niski FGF21).

### 3.2.5. Analizy statystyczne:

Opracowanie statystyczne danych biochemicznych i antropometrycznych zostało wykonane przy użyciu programu Statistica v 13 (StatSoft Polska). Do oceny normalności rozkładu zmiennych ciągłych zastosowano test Shapiro–Wilka. Do porównywania obu grup w przypadku parametrów o rozkładzie normalnym zastosowano test t-studenta niesparowany oraz dla danych nie spełniających warunków rozkładu normalnego test U- Manna–Whitneya. Dla zmiennych nominalnych zastosowano test chi-kwadrat. Wartość  $p < 0,05$  uznawano za istotną statystycznie.

Analizy statystyczne danych mikromacierzowych zostały wykonane przy udziale następującego oprogramowania: Feature extraction software version 10.10.1.1, BRB-ArrayTools software version 4.6, GeneSpring version 13 software oraz język programowania R. W programie Feature extraction nadano wartości intensywności dla dwóch barwników fluorescencyjnych Cy3 i Cy5, odjęto wartości tła oraz obliczono stosunek intensywności świecenia Cy3 do Cy5 (ratio of Cy3/Cy5). Normalizację danych z mikromacierzy wykonano za pomocą algorytmu Lowess (ang. locally weighted scatterplot smoothing) w programie BRB-ArrayTools. Tak przygotowane dane były analizowane w programie R. Zastosowano wartości M (logarytmiczny stosunek intensywności  $M = \log_2(\text{Cy3/Cy5})$ ) do dalszych analiz statystycznych. Model regresji liniowej do porównywania dwóch grup został dostosowany do potencjalnych czynników zakłócających, w tym proporcji krwinek z morfologii krwi i wieku pacjentów. Użyliśmy funkcje lmFit i eBayes w pakiecie „limma” do budowania modeli liniowych i obliczeń z wykorzystaniem testu moderowany test t (obliczono wartość p). Uzyskane wartości prawdopodobieństwa były korygowane poprawką na wielokrotne testowanie metodą FDR (metodą Benjamini-Hochberg) i pokazano ją jako wartość q.

Analiza danych miRNA z macierzy TLDA została obliczona za pomocą oprogramowania DataAssist v 3.01. Względne poziomy miRNA wyrażono jako krotność zmiany ((FC) = średnia geometryczna  $2^{(-\Delta\text{Ct}_{\text{grupa badana}})}$  / średnia geometryczna  $2^{(-\Delta\text{Ct}_{\text{grupa kontrolna}})}$ ), w obecności 3 genów (*RNU44*, *RNU48*, *U6sRNA*) zastosowanych jako kontrole endogenne. MiRNA z wartością względną FC większą lub równą 2,0 brano do dalszych analiz statystycznych.

Szczegółowe opisy zastosowanych analiz statystycznych zostały zamieszczone w artykułach cytowanych jako 1 i 2.

## 4. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Szczegółowe wyniki omówiono w poszczególnych artykułach.

### 4.1. Publikacja 1

#### Badania biochemiczne:

Grupa pacjentów z wysokim poziomem LDL-CH w surowicy była porównywalna z grupą kontrolną pod względem masy ciała, BMI, obwodu talii, stosunku WHR, ciśnienia tętniczego, masy tkanki tłuszczowej oraz wydzielonych adipokin (leptyny i adiponektyny). Badana grupa z hipercholesterolemią wykazała nie tylko wyższy poziom LDL-CH, ale także cholesterolu całkowitego, TG, cholesterolu nie-HDL i stosunku TG/HDL w porównaniu z grupą kontrolną. Całkowita zawartość kwasów tłuszczowych w osoczu oraz nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych była wyższa również w grupie z wysokim LDL-CH. Różnice biochemiczne między grupą badaną, a kontrolną pozostały w mniejszych podgrupach wybranych do badań metylacji DNA.

#### Badania metylacji DNA:

W analizie różnicowej metylacji DNA zidentyfikowano 7480 sond istotnych statystycznie porównując grupę z wysokim LDL-CH do grupy z niskim LDL-CH. Z tej listy sond wytypowano 190, zlokalizowanych w 143 genach jako związane ze szlakami metabolizmu lipidów. Wykazano, że geny te zaangażowane były w następujące ścieżki metaboliczne: metabolizm i klirens lipoprotein LDL i VLDL, regulacja metabolizmu lipidów przez PPAR $\alpha$  (receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów alfa), regulacja biosyntezy cholesterolu przez SREBP (białko wiążące element regulatorowy), regulacja ekspresji genów przez NR1H2 (wątrobowy receptor X beta), metabolizm i beta-oksydacja kwasów tłuszczowych i metabolizm TG. Wykazano nowe geny regulowane epigenetycznie: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* i *ZDHHC8* związane z dyslipidemią. Przedstawiono występowanie hypermetylacji DNA w promotorach kluczowych genów regulujących metabolizm cholesterolu: *PCSK9*, *LRP1*, *ABCG1*, *ANGPTL4*, *SREBF1* i *NR1H2* w leukocytach pacjentów z hipercholesterolemią. Dodatkowo wykazano różnicową metylację DNA w genach czynników transkrypcyjnych, takich jak *NFKB2*, *TCF4*, *GATA4*, *INSM1*, *CTCF*, *TCF7L2*, *SREBF1*, *KLF14*, *PPARD* i *PPARG*.

## 4.2. Publikacja 2:

### Badania biochemiczne:

Obie badane grupy były porównywalne pod względem wieku, płci, BMI, masy tkanki tłuszczowej, ciśnienia krwi, stężenia glukozy na czczo i cholesterolu. Grupa z wysokim krążącym poziomem FGF21 charakteryzowała się wyższym WHR, podwyższonym poziomem insuliny na czczo i HOMA-IR, FFA oraz TG. Stwierdzono również podwyższony poziom osoczowego hormonu GIP, a także markerów uszkodzenia wątroby (ALT i GGT). Otyli pacjenci z wysokim poziomami FGF21 mieli podwyższone poziomy VEGF, białka MCP1 i obniżone poziomy adiponektyny, podczas gdy inne adipokiny - leptyna, rezystyna i wisfatyna, miokiny – iryzyna i miostatyna i IL-6 nie różniły się między tymi grupami.

### Badania metylacji DNA:

Uzyskano 11198 sond CpG zmetylowanych w sposób różnicowy ( $p < 0,01$ ), z których 5425 było hipometylowanych, a 5774 było hipermetyleowanych w grupie z wysokim FGF21 w porównaniu z grupą o niskim FGF21. Następnie wybrano 375 sond CpG zlokalizowanych w genach zaangażowanych w metabolizm lipidów, glukozy, adipokin oraz innych szlaków, znanych lub potencjalnie powiązanych z aktywnością FGF21.

Wykazano regulowanie następujących procesów: transport glukozy (wykryte geny: *SLC2A4*, *SLC2A5*, *SLC2A8* i *KLF15*), wydzielanie i sygnalizacja insuliny (geny: *ADRA2A*, *CPT1A*, *GIPR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *INSR*, *IRS1*, *NEUROD1*, *PDK1*, *PFKM*, *PPARA*, *PRKCI*, *SLC27A1*, *SLC2A8*, *SOCS3*, *TCF7L2* i *VLDLR*), transport i metabolizm komórkowy lipidów (geny: *ABCA1*, *ABCG4*, *ACOX3*, *ACOXL*, *ACS3*, *ADIPOR1*, *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT1C*, *DECR1*, *ELOVL4*, *ELOVL6*, *ELOVL7*, *FADS2*, *LPIN1*, *PPARA*, *PRKAA1*, *PRKAB2*, *PRKAR2B*, *SCD* i *SLC27A1*), odpowiedź na poziomy składników odżywczych (geny: *ACSL3*, *BMP2*, *BMP4*, *BMPR2*, *BMP7*, *CEBPA*, *CYP24A1*, *CYP27B1*, *GIPR*, *IGF1R*, *INSR*, *LIPG*, *PPARA*, *PDGFA*, *RARA*, *RPTOR*, *SOCS3*, *SOD1*, *WNT3*, *WNT3A*, *WNT7B*, *WNT9A*, *WNT9B* i *VLDLR*), termogeneza (geny: *PRDM16*, *ESRRA*, *CPT1C* i *CREB5*), brązowienie tkanki tłuszczowej (geny: *BMP4*, *FGF9* i *FGFR3*) i mineralizacja kości (geny: *BMP2*, *BMP4*, *BMP6*, *BMP7*, *BMPR2*, *CYP27B1* i *TFAP2A*).

**Badania poziomu ekspresji miRNA:**

Wykazaliśmy statystycznie istotną różnicę w ekspresji czterech miRNA w leukocytach krwi obwodowej, które zostały powiązane z wysokimi poziomami FGF21 w surowicy. Ekspresja następujących miRNA: hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p i hsa-miR-200c-3p została obniżona, a hsa-miR-875-5p została zwiększona. Wykazano, że wykryte miRNA regulują FGFR1 i VEGFA [55- 57]. Przedstawione zmiany w poziomie ekspresji miRNA zostały powiązane z wysokim stężeniem FGF21, VEGF i niskim poziomem adiponektyny w surowicy.

Podsumowując wyniki wskazują na istotną rolę regulacji epigenetycznej genów zaangażowanych w szlaki metaboliczne związane z działaniem FGF21.

## 5. WNIOSKI.

Poniżej przedstawiono wnioski z prac oryginalnych wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej.

- a. Wykazano istnienie specyficznego profilu metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej związanego z wysokim poziomem cholesterolu LDL u otyłych pacjentów.
- b. Przedstawiony wzór metylacji DNA związany był z genami zaangażowanymi w metabolizm lipidów. Najbardziej regulowanymi ścieżkami są metabolizm i klirens lipoprotein LDL i VLDL, regulacja metabolizmu lipidów przez PPAR $\alpha$ , SREBP i NR1H2, metabolizm i beta-oksydacja kwasów tłuszczowych i metabolizm TG.
- c. Wykryto nowe geny regulowane poprzez metylację DNA: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* i *ZDHHC8*, które zostały powiązane z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy.
- d. Na podstawie uzyskanych danych nie można stwierdzić czy wykryty wzór metylacji DNA jest przyczyną rozwoju czy też efektem dyslipidemii w badanej grupie pacjentów.
- e. Wykazano występowanie profilu metabolicznego związanego z podwyższonym poziomem FGF21 w badanej grupie otyłych pacjentów.
- f. Przedstawiono profil metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej związany z wysokim poziomem FGF21 u osób otyłych. Najbardziej regulowanymi procesami są sygnalizacja i wydzielanie insuliny, utrzymanie homeostazy i transport lipidów, termogeneza i brązowienie tkanki tłuszczowej oraz regulacja kostnienia i mineralizacji kości.
- g. Wykazano zmienioną ekspresję czterech miRNA: obniżoną dla hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-200c-3p i podwyższoną dla hsa-miR-875-5p w leukocytach krwi obwodowej u osób otyłych z wysokim poziomem FGF21 w surowicy. Wykryte miRNA zostały powiązane z wysokimi stężeniami FGF21, VEGF i niskim poziomem adiponektyny w surowicy otyłych pacjentów.

Opisane wyniki mogą mieć potencjalne znaczenie kliniczne w terapii otyłości. Wykrycie nowych ścieżek regulacji metabolizmu cholesterolu poprzez zmianę profilu metylacji DNA oraz specyficznego profilu metylacji DNA i ekspresji mikroRNA związanych

z wysokim poziomem FGF21 stwarzają możliwość opracowania nowych biomarkerów oraz leczenia zaburzeń lipidowych towarzyszących otyłości.

## 6. STRESZCZENIE

Otyłość jest chorobą przewlekłą, która dotyka ponad 650 milionów ludzi na świecie. Za przyczynę rozwoju choroby uznaje się złożone interakcje czynników środowiskowych z indywidualnymi predyspozycjami genetycznymi. Czynniki środowiskowe obejmują niską aktywność fizyczną oraz nieprawidłowe nawyki żywieniowe. Tylko niewielki odsetek przypadków otyłości stanowi otyłość monogenowa. Pozostały wpływ na rozwój otyłości dopatruje się w licznych regulacjach epigenetycznych: metylacji DNA, potranslacyjnych modyfikacjach histonów i syntezie niekodującego mikroRNA, które wywołują zmiany aktywności genów. Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej do piątego atomu węgla pierścienia cytozyny. Zmiany są te zachodzą w obrębie promotorów genów oraz istotnych miejsc regulatorowych. Metylacja DNA jest specyficzna dla komórek i tkanek, wrażliwa na wpływ środowiska, może zmieniać się w odpowiedzi na zmianę aktywności fizycznej, dietę czy operacje bariatryczne. Postuluje się, że metylacja DNA może być przyczyną rozwoju otyłości i powikłań jej towarzyszących, ale również powstaje w odpowiedzi na chorobę. Przeprowadzona w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej ocena profilu metylacji DNA w leukocytach pacjentów z otyłością związana była z wysokimi poziomami cholesterolu LDL i hormonu FGF21 w surowicy.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie czy istnieją regulacje epigenetyczne związane z powikłaniami metabolicznymi u otyłych pacjentów. Sprawdzenie czy istnieje profil metylacji DNA związany z hipercholesterolemią w badanej grupie otyłych pacjentów. Znalezienie genów regulowanych poprzez metylację DNA związanych z wysokim poziomem czynnika wzrostu fibroblastów 21 (FGF21) u osób otyłych. Zbadanie czy istnieje specyficzny profil ekspresji miRNA związany z wysokim poziomem FGF21.

### METODYKA I WYNIKI BADAŃ

1. Artykuł oryginalny: Płatek T. et al.: *DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia*. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93.

Badanie przeprowadzono w grupie 137 osób (99 kobiet i 38 mężczyzn) z BMI powyżej 27 (min. 27 – maks. 45 kg /m<sup>2</sup>) w wieku od 25 do 65 lat. Porównanie parametrów biochemicznych przeprowadzono w 2 grupach: w grupie z hipercholesterolemią



z poziomem LDL-CH  $\geq 3,4$  mmol/l (n= 68) i w grupie kontrolnej z poziomem LDL-CH  $<3,4$  mmol/l (n = 69) w surowicy. Oznaczono stężenie glukozy, cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, TG, insuliny, leptyny, adiponektyny, FGF19, FGF21, GIP w surowicy oraz całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych w osoczu. Badana grupa wykazała wyższy poziom LDL-CH, cholesterolu całkowitego, TG, cholesterolu nie-HDL i stosunku TG/HDL w porównaniu z grupą kontrolną. Przesiewowa analiza metylacji DNA całego genomu została wykonana na macierzach firmy Agilent Technologies (Human DNA Methylation Microarray: G4495A, Design ID, 023795) w dziesięciu losowo wybranych próbkach DNA spośród całej grupy. W analizie różnicowej metylacji DNA zidentyfikowano 7480 sond istotnych statystycznie porównując grupę z wysokim LDL-CH do grupy z niskim LDL-CH. Z tej listy wytypowano 190 sond związanych ze szlakami metabolizmu lipidów. Wykazano, że geny zaangażowane były w następujące ścieżki metaboliczne: metabolizm i klirens lipoprotein LDL i VLDL, regulacja metabolizmu lipidów przez PPAR $\alpha$ , SREBP i NR1H2, metabolizm i beta-oksydacja kwasów tłuszczowych i metabolizm TG. Wykazano nowe geny regulowane epigenetycznie: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* i *ZDHHC8* związane z dyslipidemią.

2. Artykuł oryginalny: Płatek T. et al.: *Epigenetic regulation of processes related to high level of fibroblast growth factor 21 in obese subjects*. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307.

Grupa badana obejmowała osoby dorosłe z nadwagą i otyłością (n = 136; 100 kobiet i 36 mężczyzn) z BMI od 27 do 45 kg/m<sup>2</sup>. Pacjentów podzielono na 2 grupy na podstawie poziomów FGF21 w surowicy na czczo (FGF21  $<213$  pg / ml i  $\geq 213$  pg/ml). Zmierzono poziom glukozy, insuliny, GIP, lipidów, wybranych adipokin, miokin i cytokin i porównano w grupie z wysokim poziomem FGF21 (n = 68) z grupą z niskim poziomem FGF21 (n = 68) w surowicy. Grupa z wysokim krążącym poziomem FGF21 charakteryzowała się wyższym WHR, podwyższonym poziomem insuliny na czczo i HOMA-IR, wolnych kwasów tłuszczowych oraz triglicerydów. Stwierdzono również podwyższony poziom GIP, a także markerów uszkodzenia wątroby (ALT, GGT). Otyli pacjenci z wysokim FGF21 mieli podwyższone poziomy czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), białka chemotaktycznego monocytów (MCP1) i obniżone poziomy adiponektyny.

Przeprowadzono analizę metylacji DNA na macierzach metylacyjnych (Human DNA Methylation Microarray: G4495A, Agilent Technologies) oraz ekspresję miRNA na mikromacierzach TLDA (TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0, Thermo Scientific) w leukocytach losowo wybranych próbek (po 8 z każdej grupy).

Uzyskano 11198 sond CpG różnicowo zmetylowanych ( $p < 0,01$ ) w grupie z wysokim FGF21 w porównaniu z grupą o niskim FGF21. Zidentyfikowane geny związane były z transportem glukozy, wydzielaniem i sygnalizacją insuliny, transportem lipidów i metabolizmem komórkowym, odpowiedzią na poziomy składników odżywczych, termogenezą, brązowieniem tkanki tłuszczowej i mineralizacją kości. Wykazaliśmy statystycznie istotną różnicę w ekspresji czterech miRNA w leukocytach krwi obwodowej, które zostały powiązane z wysokimi poziomami FGF21 w surowicy. Zwiększoną ekspresję hsa-miR-875-5p i zmniejszoną ekspresję hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p i hsa-miR-200c-3p stwierdzono w grupie z wysokim FGF21 w surowicy. Wykryte regulacje związane były z wysokim stężeniem FGF21, VEGF i niskim poziomem adiponektyny w surowicy.

## WNIOSKI

1. Wykazano istnienie specyficznego profilu metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej związanego z wysokim poziomem cholesterolu LDL u otyłych pacjentów.
2. Przedstawiony wzór metylacji DNA związany był z genami zaangażowanymi w metabolizm lipidów.
3. Wykryto nowe geny regulowane poprzez metylację DNA: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* i *ZDHHC8* powiązane z wysokim poziomem cholesterolu LDL w surowicy.
4. Wykazano występowanie profilu metabolicznego związanego z podwyższonym poziomem FGF21 w badanej grupie otyłych pacjentów.
5. Przedstawiono profil metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej związany z wysokim poziomem FGF21 u osób otyłych.
6. Wykazano zmienioną ekspresję czterech miRNA: obniżoną dla hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-200c-3p i podwyższoną dla hsa-miR-875-5p w leukocytach krwi obwodowej u osób otyłych z wysokim poziomem FGF21 w surowicy.

Podsumowując opisane wyniki mogą mieć potencjalne znaczenie kliniczne, ponieważ wykazano istnienie regulacji epigenetycznych procesów związanych z wysokim poziomem cholesterolu LDL oraz hormonu FGF21 w otyłości. Odwracalny charakter metylacji DNA daje możliwość opracowywania nowych metod prewencji i leczenia zaburzeń lipidowych towarzyszących otyłości.

## 7. ABSTRACT

Obesity is a chronic disease that affects over 650 million people worldwide. The causes for the development of the disease are increased consumption of fat and carbohydrates, low physical activity and individual genetic predisposition. Only a small percentage of obesity is monogenic. The remaining impact on the development of obesity is considered in the epigenetic regulations as DNA methylation, post-translational modifications of histones and synthesis of non-coding microRNAs that cause changes in genes activities. DNA methylation occurs by attaching a methyl group to the fifth carbon of the cytosine in gene promoters and important regulatory sites. DNA methylation is cell and tissue specific, sensitive to environmental influence, and may alter in response to changes in physical activity, caloric restrictions and bariatric surgery. It is postulated that DNA methylation may be the cause of development of obesity and its accompanying complications, but it also arises in response to disease. The assessment of the DNA methylation profile in obese patients' leukocytes, carried out as part of this doctoral dissertation, was associated with high levels of LDL cholesterol and FGF21 in the serum.

### OBJECTIVES

The overall aim of the dissertation was to investigate whether there are epigenetic regulations related to metabolic complications in obese patients.

Specific objectives included:

Checking if there is a DNA methylation profile associated with hypercholesterolaemia in the cohort of obese patients.

Finding genes regulated by DNA methylation and associated with high levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21) in obese subjects. To test if there is a specific miRNA expression profile associated with high levels of FGF21.

### RESEARCH METHODOLOGY AND RESULTS

1. Original article: Platek T. et al.: *DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia*. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93.

The study was conducted in a group of 137 people (99 women and 38 men) with BMI over 27 (min. 27 - max. 45 kg/m<sup>2</sup>) and aged 25 to 65 years. The comparison of

biochemical parameters was carried out in 2 subgroups: in the hypercholesterolaemia group with the LDL-CH level  $\geq 3,4$  mmol / l (n = 68) and in the control group with the LDL-CH level  $<3,4$  mmol / l (n = 69) in the serum. The concentration of glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, TG, insulin, leptin, adiponectin, FGF19, FGF21, GIP in the serum and total fatty acid content in the plasma were determined. The study group showed higher levels of LDL-CH, total cholesterol, TG, non-HDL cholesterol and TG/HDL ratio compared to the control group. Whole genome DNA methylation screening was performed on Agilent Technologies arrays (Human DNA Methylation Microarray: G4495A, Design ID, 023795) in ten randomly selected DNA samples from the entire cohort. In the differential DNA methylation analysis, 7480 statistically significant probes were identified comparing the high LDL-CH group to the low LDL-CH group. The 190 probes related to lipid metabolism pathways were selected from this list. The selected genes have been involved in the following metabolic pathways: metabolism and clearance of LDL and VLDL lipoproteins, regulation of lipid metabolism by PPAR $\alpha$ , SREBP and NR1H2, metabolism and beta-oxidation of fatty acids, and metabolism of TG. New epigenetically regulated genes and associated with dyslipidemia have been demonstrated: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* and *ZDHHC8*.

2. Original article: Platek T. et al.: *Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects*. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307.

The study group included overweight and obese adults (n = 136; 100 women and 36 men) with a BMI of 27 to 45 kg/m<sup>2</sup>. Patients were divided into 2 subgroups based on fasting serum levels of FGF21 (FGF21  $<213$  pg / ml and  $\geq 213$  pg / ml). Glucose, insulin, GIP, lipids, selected adipokines, myokines and cytokines were measured and compared in the high FGF21 group (n = 68) to the low FGF21 (n = 68) group in the serum. The group with high circulating FGF21 levels had a higher WHR, increased levels of fasting insulin and HOMA-IR, free fatty acids and triglycerides. Increased levels of GIP as well as markers of liver damage (ALT, GGT) were also found. Obese patients with high FGF21 had elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemotactic protein (MCP1), and decreased levels of adiponectin. Analysis of DNA methylation was performed on methylation microarrays (Human DNA Methylation Microarray: G4495A, Agilent Technologies) and miRNA expression

on TLDA microarrays (TaqMan® Array Human MicroRNA A + B Cards Set v3.0, Thermo Scientific) in leukocytes of randomly selected samples (8 from each group). We identified 11198 differentially methylated CpG probes ( $p < 0,01$ ) in the high FGF21 group compared to the low FGF21 group. The identified genes were associated with glucose transport, insulin secretion and signaling, lipid transport and cellular metabolism, response to nutrient levels, thermogenesis, browning of adipose tissue and bone mineralization. We showed a statistically significant differences in the expression of four miRNAs in peripheral blood leukocytes that were associated with high serum levels of FGF21. Increased expression of hsa-miR-875-5p and decreased expression of hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p and hsa-miR-200c-3p were found in the group with high serum FGF21. The detected regulations were associated with high levels of FGF21, VEGF and low levels of adiponectin in the serum.

## CONCLUSIONS

1. A specific DNA methylation profile has been demonstrated in peripheral blood leukocytes associated with high levels of LDL cholesterol in obese individuals.
2. The presented DNA methylation pattern were in genes related to lipid metabolism.
3. We showed novel epigenetically regulated genes: *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* and *ZDHHC8* and associated with high serum LDL cholesterol.
4. We demonstrated the metabolic profile associated with high level of FGF21 in the studied group of obese patients.
5. The DNA methylation profile associated with high levels of FGF21 in obese subjects were presented in peripheral blood leukocytes.
6. Altered expression of four miRNAs was demonstrated: decreased for hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p and hsa-miR-200c-3p and increased for hsa-miR-875-5p in peripheral blood leukocytes in obese subjects with high serum levels of FGF21.

These findings may have a potential clinical significance as it has been shown that there is a regulation of epigenetic processes related to high levels of LDL cholesterol and the FGF21 in obesity. The reversible nature of DNA methylation makes it possible to develop new methods of preventing and treating lipid disorders accompanying obesity.

## 8. PIŚMIENNICTWO

1. WHO: World Health Organization. Dane z 1 kwietnia 2020 (<https://www.who.int/>).
2. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 May;15(5):288-298. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8. PMID: 30814686.
3. Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L, Padez C. The contribution of genetics and environment to obesity. *Br Med Bull.* 2017 Sep 1;123(1):159-173. doi: 10.1093/bmb/ldx022. PMID: 28910990.
4. Hochberg Z. An Evolutionary Perspective on the Obesity Epidemic. *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Dec;29(12):819-826. doi: 10.1016/j.tem.2018.09.002. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30243773.
5. van der Valk ES, van den Akker ELT, Savas M, Kleinendorst L, Visser JA, Van Haelst MM, Sharma AM, van Rossum EFC. A comprehensive diagnostic approach to detect underlying causes of obesity in adults. *Obes Rev.* 2019 Jun;20(6):795-804. doi: 10.1111/obr.12836. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30821060; PMCID: PMC6850662.
6. Bouchard C. Genetics of Obesity: What We Have Learned Over Decades of Research. *Obesity (Silver Spring).* 2021 May;29(5):802-820. doi: 10.1002/oby.23116. PMID: 33899337.
7. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism.* 2019 Mar;92:37-50. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.007. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30399374.
8. Magdalena Olszanecka-Glinianowicz. *OBESITOLOGIA KLINICZNA.* Wydawca: Alfa Medica Press. Rok wydania: 2021.
9. Weihbrecht K, Goar WA, Pak T, Garrison JE, DeLuca AP, Stone EM, Scheetz TE, Sheffield VC. Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye. *Med Res Arch.* 2017 Sep;5(9):10.18103/mra.v5i9.1526. doi: 10.18103/mra.v5i9.1526. Epub 2017 Sep 18. PMID: 29457131; PMCID: PMC5814251.

10. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *C R Biol.* 2017 Feb;340(2):87-108. doi: 10.1016/j.crvi.2016.11.007. Epub 2017 Jan 13. PMID: 28089486.
11. Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, Frayling TM, Hirschhorn J, Yang J, Visscher PM; GIANT Consortium. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet.* 2018 Oct 15;27(20):3641-3649. doi: 10.1093/hmg/ddy271. PMID: 30124842; PMCID: PMC6488973.
12. Pulit SL, Stoneman C, Morris AP, Wood AR, Glastonbury CA, Tyrrell J, Yengo L, Ferreira T, Marouli E, Ji Y, Yang J, Jones S, Beaumont R, Croteau-Chonka DC, Winkler TW; GIANT Consortium, Hattersley AT, Loos RJF, Hirschhorn JN, Visscher PM, Frayling TM, Yaghootkar H, Lindgren CM. Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet.* 2019 Jan 1;28(1):166-174. doi: 10.1093/hmg/ddy327. PMID: 30239722; PMCID: PMC6298238.
13. Yılmaz B, Gezmen Karadağ M. The current review of adolescent obesity: the role of genetic factors. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2020 Nov 16;34(2):151-162. doi: 10.1515/jpem-2020-0480. PMID: 33185580.
14. Rask-Andersen M, Karlsson T, Ek WE, Johansson Å. Genome-wide association study of body fat distribution identifies adiposity loci and sex-specific genetic effects. *Nat Commun.* 2019 Jan 21;10(1):339. doi: 10.1038/s41467-018-08000-4. PMID: 30664634; PMCID: PMC6341104.
15. Alonso R., Farias M., Alvarez V., Cuevas A., *The Genetics of Obesity*, in: *Translational Cardiometabolic Genomic Medicine*. Elsevier, 2016, pp. 161–177 <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13058-9>.
16. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2019 May 7;29(5):1028-1044. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30982733; PMCID: PMC6509280.
17. Pokrywka M, Kieć-Wilk B, Polus A, Wybrańska I. Metylacja DNA a otyłość prosta [DNA methylation in obesity]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2014 Nov 27;68:1383-91. Polish. doi: 10.5604/17322693.1130084. PMID: 25531701.



18. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):635-8. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006. PMID: 17320500.
19. Mansego ML, Milagro FI, Zulet MÁ, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Differential DNA Methylation in Relation to Age and Health Risks of Obesity. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 24;16(8):16816-32. doi: 10.3390/ijms160816816. PMID: 26213922; PMCID: PMC4581172.
20. Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem*. 2009 Sep 1;108(1):43-51. doi: 10.1002/jcb.22253. PMID: 19565567.
21. Blattler A, Farnham PJ. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *J Biol Chem*. 2013 Nov 29;288(48):34287-94. doi: 10.1074/jbc.R113.512517. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24151070; PMCID: PMC3843044.
22. Obri A, Serra D, Herrero L, Mera P. The role of epigenetics in the development of obesity. *Biochem Pharmacol*. 2020 Jul;177:113973. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113973. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32283053.
23. Thaker VV. GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY. *Adolesc Med State Art Rev*. 2017 Fall;28(2):379-405. PMID: 30416642; PMCID: PMC6226269.
24. Kühnen P, Handke D, Waterland RA, Hennig BJ, Silver M, Fulford AJ, Dominguez-Salas P, Moore SE, Prentice AM, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner FL, Walzer L, Grötzing C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, Krude H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Cell Metab*. 2016 Sep 13;24(3):502-509. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.001. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27568547.
25. Keller M, Hopp L, Liu X, Wohland T, Rohde K, Canello R, Klös M, Bacos K, Kern M, Eichelmann F, Dietrich A, Schön MR, Gärtner D, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Kovacs P, DiBlasio AM, Ling C, Binder H, Blüher M, Böttcher Y. Genome-wide DNA promoter methylation and transcriptome analysis in human adipose tissue unravels novel candidate genes for obesity. *Mol Metab*. 2016 Nov 16;6(1):86-100. doi: 10.1016/j.molmet.2016.11.003. PMID: 28123940; PMCID: PMC5220399.

26. Krause C, Sievert H, Geißler C, Grohs M, El Gammal AT, Wolter S, Ohlei O, Kilpert F, Krämer UM, Kasten M, Klein C, Brabant GE, Mann O, Lehnert H, Kirchner H. Critical evaluation of the DNA-methylation markers ABCG1 and SREBF1 for Type 2 diabetes stratification. *Epigenomics*. 2019 Jun;11(8):885-897. doi: 10.2217/epi-2018-0159. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31169416.
27. Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, Rosqvist F, Iggman D, Volkov P, Nilsson E, Risérus U, Ling C. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2017 Apr;105(4):991-1000. doi: 10.3945/ajcn.116.143164. Epub 2017 Mar 8. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2017 Jul;106(1):325. PMID: 28275132.
28. Deng Y, Qiu T, Zhang M, Wu J, Zhang X, Wang J, Chen K, Feng J, Ha X, Xie J, Wang C, Zhang J. High Level of Palmitic Acid Induced Over-Expressed Methyltransferase Inhibits Anti-Inflammation Factor KLF4 Expression in Obese Status. *Inflammation*. 2020 Jun;43(3):821-832. doi: 10.1007/s10753-019-01168-x. PMID: 31900830.
29. Gillberg L, Perfilyev A, Brøns C, Thomasen M, Grunnet LG, Volkov P, Rosqvist F, Iggman D, Dahlman I, Risérus U, Rönn T, Nilsson E, Vaag A, Ling C. Adipose tissue transcriptomics and epigenomics in low birthweight men and controls: role of high-fat overfeeding. *Diabetologia*. 2016 Apr;59(4):799-812. doi: 10.1007/s00125-015-3852-9. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26750116.
30. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med*. 2010 Jan;16(1):7-16. doi: 10.1016/j.molmed.2009.11.003. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20022812.
31. Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, Nilsson E, Tornberg A, Dekker Nitert M, Eriksson KF, Jones HA, Groop L, Ling C. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet*. 2013 Jun;9(6):e1003572. doi: 10.1371/journal.pgen.1003572. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23825961; PMCID: PMC3694844.
32. Ramos-Lopez O, Arpón A, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Mansego ML, Martinez JA; MENA project. DNA methylation patterns at sweet taste transducing genes are associated with BMI and carbohydrate intake in an adult population.

- Appetite. 2018 Jan 1;120:230-239. doi: 10.1016/j.appet.2017.09.004. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28888730.
33. Kim H, Worsley O, Yang E, Purbojati RW, Liang AL, Tan W, Moses DID, Hartono S, Fan V, Lim TKH, Schuster SC, Foo RS, Chow PKH, Pettersson S. Persistent changes in liver methylation and microbiome composition following reversal of diet-induced non-alcoholic-fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Nov;76(21):4341-4354. doi: 10.1007/s00018-019-03114-4. Epub 2019 May 22. PMID: 31119300.
  34. Lai CQ, Parnell LD, Smith CE, Guo T, Sayols-Baixeras S, Aslibekyan S, Tiwari HK, Irvin MR, Bender C, Fei D, Hidalgo B, Hopkins PN, Absher DM, Province MA, Elosua R, Arnett DK, Ordovas JM. Carbohydrate and fat intake associated with risk of metabolic diseases through epigenetics of CPT1A. *Am J Clin Nutr*. 2020 Nov 11;112(5):1200-1211. doi: 10.1093/ajcn/nqaa233. PMID: 32930325; PMCID: PMC7657341.
  35. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, Griffiths L, Hoffman EP, Stubbs RS, Macartney-Coxson D. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol*. 2015 Jan 22;16(1):8. doi: 10.1186/s13059-014-0569-x. PMID: 25651499; PMCID: PMC4301800.
  36. Tremblay BL, Guénard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Epigenetic changes in blood leukocytes following an omega-3 fatty acid supplementation. *Clin Epigenetics*. 2017 Apr 26;9:43. doi: 10.1186/s13148-017-0345-3. PMID: 28450971; PMCID: PMC5405524.
  37. Sharp GC, Salas LA, Monnereau C, Allard C, Yousefi P, Everson TM, Bohlin J, Xu Z, Huang RC, Reese SE, Xu CJ, Baiz N, Hoyo C, Agha G, Roy R, Holloway JW, Ghantous A, Merid SK, Bakulski KM, Küpers LK, Zhang H, Richmond RC, Page CM, Duijts L, Lie RT, Melton PE, Vonk JM, Nohr EA, Williams-DeVane C, Huen K, Rifas-Shiman SL, Ruiz-Arenas C, Gonseth S, Rezwan FI, Herceg Z, Ekström S, Croen L, Falahi F, Perron P, Karagas MR, Quraishi BM, Suderman M, Magnus MC, Jaddoe VWV, Taylor JA, Anderson D, Zhao S, Smit HA, Josey MJ, Bradman A, Baccarelli AA, Bustamante M, Håberg SE, Pershagen G, Hertz-Picciotto I, Newschaffer C, Corpeleijn E, Bouchard L, Lawlor DA, Maguire RL, Barcellos LF, Davey Smith G, Eskenazi

- B, Karmaus W, Marsit CJ, Hivert MF, Snieder H, Fallin MD, Melén E, Munthe-Kaas MC, Arshad H, Wiemels JL, Annesi-Maesano I, Vrijheid M, Oken E, Holland N, Murphy SK, Sørensen TIA, Koppelman GH, Newnham JP, Wilcox AJ, Nystad W, London SJ, Felix JF, Relton CL. Maternal BMI at the start of pregnancy and offspring epigenome-wide DNA methylation: findings from the pregnancy and childhood epigenetics (PACE) consortium. *Hum Mol Genet.* 2017 Oct 15;26(20):4067-4085. doi: 10.1093/hmg/ddx290. PMID: 29016858; PMCID: PMC5656174.
38. Candler T, Kühnen P, Prentice AM, Silver M. Epigenetic regulation of POMC; implications for nutritional programming, obesity and metabolic disease. *Front Neuroendocrinol.* 2019 Jul;54:100773. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100773. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31344387.
39. Kühnen P, Handke D, Waterland RA, Hennig BJ, Silver M, Fulford AJ, Dominguez-Salas P, Moore SE, Prentice AM, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner FL, Walzer L, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, Krude H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Cell Metab.* 2016 Sep 13;24(3):502-509. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.001. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27568547.
40. Almén MS, Nilsson EK, Jacobsson JA, Kalnina I, Klovins J, Fredriksson R, Schiöth HB. Genome-wide analysis reveals DNA methylation markers that vary with both age and obesity. *Gene.* 2014 Sep 10;548(1):61-7. doi: 10.1016/j.gene.2014.07.009. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25010727.
41. Bysani M, Perfilyev A, de Mello VD, Rönn T, Nilsson E, Pihlajamäki J, Ling C. Epigenetic alterations in blood mirror age-associated DNA methylation and gene expression changes in human liver. *Epigenomics.* 2017 Feb;9(2):105-122. doi: 10.2217/epi-2016-0087. Epub 2016 Dec 2. PMID: 27911095.
42. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, Gomez A, Hervas D, Monteiro MP, Casanueva FF, Esteller M, Martinez JA. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep.* 2017 Feb 17;7:41903. doi: 10.1038/srep41903. PMID: 28211912; PMCID: PMC5314866.

43. Keller M, Hopp L, Liu X, Wohland T, Rohde K, Cancellato R, Klös M, Bacos K, Kern M, Eichelmann F, Dietrich A, Schön MR, Gärtner D, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Kovacs P, DiBlasio AM, Ling C, Binder H, Blüher M, Böttcher Y. Genome-wide DNA promoter methylation and transcriptome analysis in human adipose tissue unravels novel candidate genes for obesity. *Mol Metab.* 2016 Nov 16;6(1):86-100. doi: 10.1016/j.molmet.2016.11.003. PMID: 28123940; PMCID: PMC5220399.
44. Salas-Pérez F, Ramos-Lopez O, Mansego ML, Milagro FI, Santos JL, Riezu-Boj JI, Martínez JA. DNA methylation in genes of longevity-regulating pathways: association with obesity and metabolic complications. *Aging (Albany NY).* 2019 Mar 29;11(6):1874-1899. doi: 10.18632/aging.101882. PMID: 30926763; PMCID: PMC6461164.
45. Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev.* 2009 Jul;10(4):383-92. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00595.x. Epub 2009 Apr 21. PMID: 19413700.
46. Ramos-Molina B, Sánchez-Alcoholado L, Cabrera-Mulero A, Lopez-Dominguez R, Carmona-Saez P, Garcia-Fuentes E, Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Gut Microbiota Composition Is Associated With the Global DNA Methylation Pattern in Obesity. *Front Genet.* 2019 Jul 3;10:613. doi: 10.3389/fgene.2019.00613. PMID: 31333715; PMCID: PMC6616130.
47. Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak SH, Bassas AF, Sallam RM, Park KS, Alfadda AA, Xu A, Kim JB. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat Commun.* 2015 Jul 3;6:7585. doi: 10.1038/ncomms8585. PMID: 26139044; PMCID: PMC4506505.
48. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, Martinez JA. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem.* 2011 Sep;67(3):463-70. doi: 10.1007/s13105-011-0084-4. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21465273.
49. Zhang J, Wang C, Ha X, Li W, Xu P, Gu Y, Wang T, Wang Y, Xie J. DNA methylation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein-1, and adiponectin genes in visceral adipose tissue is related to type 2 diabetes in

- the Xinjiang Uygur population. *J Diabetes*. 2017 Jul;9(7):699-706. doi: 10.1111/1753-0407.12478. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27573980.
50. Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;27(2):179-93. doi: 10.1016/j.beem.2013.02.004. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23731880.
51. Chia CW, Egan JM. Incretins in obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2020 Feb;1461(1):104-126. doi: 10.1111/nyas.14211. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31392745.
52. Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Nov;32(11):1655-64. doi: 10.1038/ijo.2008.164. Epub 2008 Sep 9. PMID: 18779822; PMCID: PMC2584161.
53. Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism*. 2019 Mar;92:98-107. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.011. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30399375.
54. Keuper M, Häring HU, Staiger H. Circulating FGF21 Levels in Human Health and Metabolic Disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2020 Nov;128(11):752-770. doi: 10.1055/a-0879-2968. Epub 2019 May 20. PMID: 31108554.
55. Zhou Y, Chen Z, Chen A, Ma J, Qian J, Ge J. Elevated serum miR-133a predicts patients at risk of periprocedural myocardial injury after elective percutaneous coronary intervention. *Cardiol J*. 2020 Mar 24. doi: 10.5603/CJ.a2020.0034. Epub ahead of print. PMID: 32207842.
56. Qoriansas, N.; Renovaldi, D.; Raditya, J.; Lestari, P.; Signa, N.; Gumilas, S.; Heriyanto, D.S.; Ratnasari, N.; Mubarika, S.Expression of circulating miR-200c and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) mRNA as potential biomarker in human hepatocellular carcinoma. *J. Med Sci. (Berk. Ilmu Kedokt.)* 2018, 50.
57. Wang R, Tian S, Wang HB, Chu DP, Cao JL, Xia HF, Ma X. MiR-185 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Vegfa. *FEBS Lett*. 2014 Nov 28;588(23):4438-47. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.045. PMID: 25448984.

## **9. Załączniki**

## 9.1. Artykuł nr 1

Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A.

**DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia.**

**Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93.**



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia

Teresa Płatek<sup>1\*</sup>, Anna Polus<sup>1</sup>, Joanna Góralska<sup>1</sup>, Urszula Rażny<sup>1</sup>, Anna Gruca<sup>1</sup>, Beata Kieć-Wilk<sup>2,3</sup>, Piotr Zabielski<sup>4</sup>, Maria Kapusta<sup>1</sup>, Krystyna Słowińska-Solnica<sup>1</sup>, Bogdan Solnica<sup>1</sup>, Małgorzata Malczewska-Malec<sup>1</sup> and Aldona Dembińska-Kieć<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Epigenetics can contribute to lipid disorders in obesity. The DNA methylation pattern can be the cause or consequence of high blood lipids. The aim of the study was to investigate the DNA methylation profile in peripheral leukocytes associated with elevated LDL-cholesterol level in overweight and obese individuals.

**Methods:** To identify the differentially methylated genes, genome-wide DNA methylation microarray analysis was performed in leukocytes of obese individuals with high LDL-cholesterol (LDL-CH,  $\geq 3.4$  mmol/L) versus control obese individuals with LDL-CH,  $< 3.4$  mmol/L. Biochemical tests such as serum glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, insulin, leptin, adiponectin, FGF19, FGF21, GIP and total plasma fatty acids content have been determined. Oral glucose and lipid tolerance tests were also performed. Human DNA Methylation Microarray (from Agilent Technologies) containing 27,627 probes for CpG islands was used for screening of DNA methylation status in 10 selected samples. Unpaired t-test and Mann–Whitney U-test were used for biochemical and anthropometric parameters statistics. For microarrays analysis, fold of change was calculated comparing hypercholesterolemic vs control group. The q-value threshold was calculated using moderated Student's t-test followed by Benjamini–Hochberg multiple test correction FDR.

**Results:** In this preliminary study we identified 190 lipid related CpG loci differentially methylated in hypercholesterolemic versus control individuals. Analysis of DNA methylation profiles revealed several loci engaged in plasma lipoprotein formation and metabolism, cholesterol efflux and reverse transport, triglycerides degradation and fatty acids transport and  $\beta$ -oxidation. Hypermethylation of CpG loci located in promoters of genes regulating cholesterol metabolism: *PCSK9*, *LRP1*, *ABCG1*, *ANGPTL4*, *SREBF1* and *NR1H2* in hypercholesterolemic patients has been found. Novel epigenetically regulated CpG sites include *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGF1R*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* and *ZDHHC8* genes.

**Conclusions:** Our results indicate that obese individuals with hypercholesterolemia present specific DNA methylation profile in genes related to lipids transport and metabolism. Detailed knowledge of epigenetic regulation of genes, important for lipid disorders in obesity, underlies the possibility to influence target genes by changing diet and

\*Correspondence: teresa.staszal@cm-uj.krakow.pl

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 15a, 31-501 Kraków, Poland

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

lifestyle, as DNA methylation is reversible and depends on environmental factors. These findings give rise for further studies on factors that targets methylation of revealed genes.

**Keywords:** DNA methylation, Obesity, Hypercholesterolemia, Plasma lipids

## Background

The worldwide prevalence of obesity nearly tripled between 1975 and 2016 and is still growing, contributing to an increased incidence of comorbidities such as type 2 diabetes, dyslipidemia, liver steatosis, hypertension, cardiovascular disease (CVD) and cancer (Blüher 2019). Metabolic complications of obesity include insulin resistance, impaired secretion and action of incretin hormones, disturbed plasma lipoprotein clearance and metabolism and low grade inflammation (Pedersen 2013; Chia and Egan 2020; Magkos et al. 2008; Ellulu et al. 2016). A number of factors can play a role in weight gain. Among them, the most powerful factors seem to be an unhealthy lifestyle and genetics (Albuquerque et al. 2017). Research over the last decade indicates that various environmental factors at different stages of life can change to chromatin structure and function and thus change cellular phenotype and metabolism (Rosen et al. 2018; Piening et al. 2018; Jacobsen et al. 2012; Stuart et al. 2018; Roh et al. 2018). Epigenetic modifications such as DNA methylation and multiple histone post-translational modifications regulate gene transcription and thus adapt metabolism to environmental factors (Handel et al. 2010; Keating and El-Osta 2015). It is estimated that 70% of promoters in human genomes are rich in CpG sites indicating that DNA methylation serves as a crucial epigenetic modification (Blattler and Farnham 2013). DNA methylation of CpG sites in the genes' promoters as well as distal regulatory sites may modify gene expression by altering the interaction of histones, thereby affecting the binding of transcription factors or recruitment of methyl-CpG binding proteins (MBPs) (Rottach et al. 2009; Handel et al. 2010). Methylation of CpG dinucleotides may be reversible, modified in response to environmental factors consequently repressing or activating transcription (Blattler and Farnham 2013; Handel et al. 2010; Abdul et al. 2017). Current scientific reports show that methylation of CpG islands influences the expression of genes related to obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes (Kim et al. 2015; Ali et al. 2016; Shen and Zhu 2018; Guo et al. 2020). We hypothesize that several processes regulating lipid levels are controlled by DNA methylation. Therefore, this study aimed to investigate the differences in DNA methylation status in leukocytes of obese subjects with hypercholesterolemia compared to controls. Here we present the results of an analysis of a genome-wide methylation profile, with focus on genes

involved in lipids metabolism to find the pathways mostly affected by hypercholesterolemia and find new candidates genes. The results of this work may contribute to a better understanding of the epigenetic mechanisms related to dyslipidemia.

## Methods

### Aim of the study

The study aims to elucidate the link between epigenetic changes and hypercholesterolemia in obese patients.

### Patients

Our cohort involved 137 individuals with BMI (body mass index) above normal range (min.27–max.45 kg/m<sup>2</sup>), women (n=99) and men (n=38), aged 25 to 65 years. Exclusion criteria included cardiovascular diseases, diabetes mellitus, kidney or liver failure, endocrine disorders, chronic inflammation, hormone therapy, use of lipid-lowering or anti-inflammatory drugs, use of diet supplements, smoking or excessive use of alcohol, pregnancy or lactation.

The hypercholesterolemia group, (n=68) consisted of patients with obesity with borderline high, or high serum LDL cholesterol (LDL-CH) levels ( $\geq 3.4$  mmol/L) and the control group (n=69) consisted of obese subjects with serum LDL-CH levels  $< 3.4$  mmol /L (Stone et al. 2013). At this cut-off point the control group included patients with optimal for low CV risk [ $\leq 3.0$  mmol/L according to recent ESC/EAS 2019 guidelines (Mach et al. 2019)] as well as near-optimal LDL-CH concentration (3.0–3.4 mmol/L). The main criteria of enrolment into study groups were: overweight or obesity without comorbidities requiring treatment (except hypertension treated with AT1 receptor antagonists or calcium channel blockers) and fasting LDL-CH  $\geq 3.4$  mmol/L (group with newly diagnosed hypercholesterolemia) or LDL-CH  $< 3.4$  mmol/L (control group).

From the cohort 10 samples representative for both groups were selected for the study of DNA methylation on microarrays.

### Anthropometric parameters and blood pressure

Anthropometric parameters: body weight, height, waist and hip circumferences were measured and BMI, waist to hip ratio (WHR) were calculated. Body fat percentage was estimated by bioelectrical impedance method using the Segmental Body Composition Analyzer TANITA BC

418 MA. Blood pressure was measured after 10 min of rest.

#### Sample collection

Fasting venous blood samples were collected and centrifuged ( $1000\times g$  for 10 min at 4 °C within 30 min from collection) for serum and plasma separation. Serum and plasma samples were immediately frozen and stored at  $-80$  °C for further analyses of glucose, insulin, adipokines (leptin and adiponectin), glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), fibroblast growth factor 19 (FGF19), fibroblast growth factor 21 (FGF21), total cholesterol, HDL (high density lipoprotein)-cholesterol, triglycerides (TGs), total plasma fatty acids content and composition. For analysis of DNA methylation fasting peripheral blood was collected into  $K_3$ -EDTA-containing tubes and stored at  $-80$  °C until analysed.

Oral glucose tolerance test (OGTT) and oral lipid tolerance test (OLTT) were performed on separate days. Venous blood samples: fasting, 30, 60, 90 and 120 min of OGTT as well as fasting (before meal), 2, 4, 6, and 8 h of OLTT were collected in order to measure postprandial glucose, insulin, GIP and TG serum concentrations. OLTT- an 8-h high fat mixed meal tolerance test that contained 73% fat, 16% protein, and 11% carbohydrates, with a caloric value of 1018 kcal was performed. The detailed composition of meal was described previously (Razny et al. 2018).

#### Biochemical tests

Serum glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, and TGs were measured using enzymatic colorimetric methods on the MaxMat analyzer (MaxMat S.A., Montpelier, France). LDL cholesterol concentration was calculated using the Friedewald formula. Serum insulin was determined by immunoradiometric method (Diasource, ImmunoAssays, Belgium). Serum leptin, adiponectin, FGF19 and FGF21 were measured using ELISA (Human Leptin Quantikine ELISA kit; Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA kit; Human FGF-19 Quantikine ELISA Kit; Human FGF-21 Quantikine ELISA Kit, respectively, R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA). GIP was measured by ELISA [Human GIP (Total) ELISA kit (EMD Millipore, St Charles, MO, USA)]. Total plasma fatty acids content and composition was measured by gas-liquid chromatography and flame-ionization detector after direct in situ transesterification, according to Glaser et al. (2010). Plasma fatty acids profile included quantitative determination of saturated (myristic, palmitic, stearic, behenic, lignoceric, and arachidic), monounsaturated (palmitoleic, oleic and nervonic) and polyunsaturated (arachidonic, linoleic,  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic) fatty acids.

#### DNA methylation screening analysis

To perform DNA methylation screening, taking into account that both groups of hypercholesterolemia and control were equal-sized, five samples for microarrays analyses were randomly selected from each of them. To reduce the difference between structure of participants in two original groups and their random subsamples, randomization was carried out in sex strata in proportions of women to men 3:2 to map numerical superiority of men in our study (99 women versus 38 men). We didn't consider any other sampling strata given the limited sample size of a participants on which we could measure genome wide methylation. Drawn individuals in hypercholesterolemic and control groups were balanced by age and BMI.

#### Methylation screening analysis with immunoprecipitation of methylated DNA and hybridization to Human DNA Methylation Microarray

Genomic DNA from venous blood was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany). The measurement of DNA quantity and quality was performed by spectrophotometry using the NanoDrop ND1000. An amount of 5  $\mu$ g of DNA was taken for sonication. Sonication efficiency was assessed by electrophoresis on a 2.0% agarose gel. The sonicated DNA sample was then divided into two aliquots: four parts of DNA were taken for immunoprecipitation, the fifth part was stored as a reference input fraction. Analysis of methylated DNA was done by immunoprecipitation of DNA containing 5-methylcytosines (5-mC) using monoclonal antibodies against 5-methylcytidine (Monoclonal Antibody to 5-Methyl Cytosine/5-MeC Purified from Acris Antibodies, Inc, USA). Immunoprecipitated and reference samples were labelled with fluorescent dyes Cyanine-3 and Cyanine-5, respectively. The exact steps were performed based on the methodology of Agilent Technologies. Competitive hybridization of input material and methylated enriched DNA was performed to oligonucleotide microarrays—Human DNA Methylation Microarray (G4495A, Design ID, 023795) from Agilent Technologies. High-definition 244 K arrays contained 27,627 probes for annotated human CpG islands and 5081 for Undermethylated Regions (UMRs). Microarrays were hybridized for 40 h at 65 °C. Slides washing and scanning procedures and image extraction using Agilent Features Extraction software v 10.10.1.1 were performed according to the manufacturer instructions.

### Statistical analyses

For biochemical and anthropometric parameters, Shapiro–Wilk test was used to assess normality of distribution of continuous variables, then unpaired t-test for normally distributed data and Mann–Whitney U-test for non-normally distributed data were used for comparison of the two groups. The Chi-squared test was used for nominal variables. Normally distributed data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD), otherwise as median (Q2) and interquartile range in parentheses (Q1; Q3). All analyses were performed with the Statistica 13 software (StatSoft). The p-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

Microarray data analysis was performed using the Feature extraction software v 10.10.1.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), the BRB-ArrayTools Version 4.6 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), R programming language (R Foundation for Statistical Computing, University of Auckland, New Zealand) and the Gene Spring version 13 software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Feature extraction software was used to assess background subtracted intensity values for the two fluorescence dyes on each individual array feature and calculated as the ratio (Cy3/Cy5). We used Lowess normalization method for dual channel raw hybridization signals and background correction to median of all samples. A quality analysis was performed for each sample array taken for analysis (QC reports evaluation). Regarding methylation sites we removed bad quality probes, probes not located in CpG islands, probes containing SNPs in the CpG site and removed probes located on X and Y chromosomes. To account for potential differences in the proportions of blood cells, we estimated the proportion of Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils and Neutrophils to adjust raw data as previously described by Houseman et al. in R (Houseman et al. 2014). Fold of change was calculated for the hypercholesterolemic group in relation to the control group and shown as methylation level. The p-value threshold was calculated using statistical filtering (moderated Student's t-test followed by Benjamini–Hochberg multiple test correction FDR-q-value). Loci corresponding to a q-value of  $< 0.05$  and fold change of either  $> 1.3$  or  $< -1.3$  were classified as differentially methylated. Highly methylated regions had ratios significantly above zero while less methylated regions had log ratios significantly below zero.

Pathways analysis was performed in Reactome Pathway to obtain the list of differentially methylated genes related to lipids pathways (Sidiropoulos et al. 2017). Subsequently we used the BiNGO plugin in Cytoscape software (version 3.7.2) to assess the involvement of selected genes in biological processes and molecular

function (Maere et al. 2005). We used parameters as: overrepresentation after correction (using statistical test as hypergeometric test with multiple testing correction as Benjamini and Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction). Results with corrected p-value  $< 0.05$  are presented in manuscript.

### Results

#### Biochemical and anthropometric characteristics of groups

The studied group of patients with high serum LDL-CH was comparable to the control group in terms of weight, BMI, WHR, blood pressure and adipose tissue mass. The hypercholesterolemic group showed not only higher LDL-CH but also total cholesterol, triglycerides, non-HDL-CH compared to the control group (Table 1). Total plasma fatty acids content and saturated fatty acids content were higher in the high LDL-CH group as well. Particularly, higher content of palmitoleic acid (mean  $1.33 (\mu\text{g/mL}) \pm 0.18$  vs mean  $0.84 (\mu\text{g/mL}) \pm 0.34$ ,  $p = 0.0352$ ) was observed in hypercholesterolemic group. Additionally, higher percentage of myristic acid (mean  $0.87 (\%) \pm 0.79$  vs mean  $0.35 (\%) \pm 0.15$ ,  $p = 0.188$ ) in this group was noted.

Fasting serum TG levels were higher in the hypercholesterolemic patients. Obese subjects had fasting glucose below the upper reference limit, though slightly higher values of serum glucose were observed in the dyslipidemic patients compared to control. Subjects with high plasma LDL-CH were also characterized by higher FGF21 and lower adiponectin (presenting trend toward significance) serum levels (Table 1).

As the group studied in terms of methylation was a representative part of the larger cohort, below we present the characteristics of the entire cohort in Table 2. The trends and directions of differences between microarray subgroups have been preserved for those parameters that differed significantly in large groups, especially the proportions of fatty acid groups and the concentrations of GIP, FGF19 and FGF21 proteins.

#### The results of differential methylation analysis

In this preliminary study, we identified 7480 differentially methylated CpG sites, including 4905 CpG hypermethylated and 2575 hypomethylated sites. Data analysis in the Reactome Pathway Browser revealed engagement of 188 CpG probes, located in 143 genes in pathways related to lipid metabolism. The most interesting finding is the different methylation pattern of genes involved in: (1) lipoprotein assembly, remodeling and clearance (Fig. 1); (2) regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ); (3) regulation of cholesterol biosynthesis by sterol regulatory element binding protein (SREBP); (4)

**Table 1** Characteristics of subjects selected for DNA methylation analysis

	Hypercholesterolemia group (n = 5)	Control group (n = 5)	p-value
Age (years)	43.0 ± 12.6	44.6 ± 10.6	0.83
Sex, female (%) <sup>b</sup>	60	60	ns
Weight (kg) <sup>a</sup>	88 (80–107.7)	89.2 (80.2–103.2)	1
Adipose tissue mass (%) <sup>a</sup>	38.3 (30.55–43.25)	37.4 (30.9–45.3)	0.47
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.0 (29.47–36.9)	31.7 (28.4–38.9)	0.676
WHR <sup>a</sup>	0.9 (0.81–0.95)	0.81 (0.79–0.82)	0.11
Systolic blood pressure (mmHg) <sup>a</sup>	130 (127.5–140)	124 (119–130)	0.095
Diastolic blood pressure (mmHg) <sup>a</sup>	80 (80–90)	80 (77–86)	0.53
Total cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	6.31 (5.58–6.64)	5.0 (4.5–5.25)	0.06
<i>LDL cholesterol (mmol/L)<sup>a</sup></i>	<i>4.27 (3.9–4.8)</i>	<i>2.74 (2.5–2.95)</i>	<i>&lt; 0.001</i>
HDL cholesterol (mmol/l) <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.25
<i>Non-HDL (mmol/L)<sup>a</sup></i>	<i>5.19 (4.53–5.37)</i>	<i>3.49 (2.99–4.11)</i>	<i>0.02</i>
Fasting triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.7	1.1 ± 0.8	0.26
Total fatty acids (µg/mL)	4118 ± 1226	3341 ± 925	0.31
Saturated fatty acids (%)	34.04 ± 1.96	32.09 ± 0.85	0.08
Monounsaturated fatty acids (%)	28.52 ± 4.35	26.42 ± 4.42	0.49
Polyunsaturated fatty acids (%)	37.43 ± 6.02	41.49 ± 4.37	0.28
Fasting glucose (mmol/L) <sup>a</sup>	5.8 (5.1–6.3)	4.9 (4.7–5.8)	0.4
<i>Glucose AUC OLTT (mmol/L min)<sup>a</sup></i>	<i>10.44 (10.0–10.72)</i>	<i>9.05 (8.78–9.77)</i>	<i>0.022</i>
Glucose AUC OGTT (mmol/L min) <sup>a</sup>	4.4 (3.2–5.0)	3.26 (2.6–3.45)	0.06
Fasting insulin (µIU/mL)	22.8 ± 16.8	11.3 ± 4.2	0.173
HOMA-IR	4.0 ± 1.6	2.6 ± 1.1	0.14
Adiponectin (µg/mL) <sup>a</sup>	4.2 (3.55–8.07)	7.4 (5.58–10.0)	0.21
Leptin (ng/mL) <sup>a</sup>	29.89 (15.18–46.04)	21.8 (14.16–101.85)	0.83
Fasting GIP (pg/mL) <sup>a</sup>	32.54 (12.3–48.8)	24.1 (18.1–37.43)	0.4
FGF19 (pg/mL)	160.8 ± 61.7	151.4 ± 108.7	0.62
FGF21 (pg/mL)	280.4 ± 144.3	138.8 ± 92.5	0.102

Comparison between the high LDL-CH group and controls (unpaired t-test for normally or Mann–Whitney U-test for non-normally distributed <sup>a</sup> variables). Data shown as mean ± SD; otherwise (<sup>b</sup>) as median and interquartile range in parentheses except nominal variable (<sup>c</sup>) shown as % of subjects. <sup>b</sup> The chi-squared test was used for nominal variable. The statistically significant results are marked in italics

fatty acid metabolism and (5) triglyceride metabolism. In leukocytes of patients with elevated serum LDL-CH, we found hypomethylated promoters of the following genes involved in lipoprotein metabolism: *LPL*, *LIPA*, *ZDHHC8*, *PRKACA*, *AMN* and *FGF19*; hypermethylated promoters of *PCSK9*, *ABCG1*, *CLTC*, *AP2M1*, *AP2S1*, *LMF1*, *LSR*, *PRKACG*, *ANGPTL4*, *NRIH2*, and *PCSK5*, and hypermethylated inside the following genes: *LDLR*, *HDLBP*, *AP2A2* and *PCSK6* (Fig. 1 and Additional file 1: Table S1).

Enrichment analysis using BiNGO application showed possible involvement of genes in biological processes and identified probable molecular function. Results are presented in Table 3. Interestingly, the affected pathways in the group of obese with hypercholesterolemia included (1) lipoprotein remodeling in plasma (with hypomethylated promoter of *LPL* and hypermethylated *ABCG1* and *ABCA5*); (2) regulation of cholesterol storage (with hypomethylated promoters

of *LPL* and *PPARG*, and hypermethylated *ABCG1* and *NRIH2*); and (3) cholesterol transport (with hypomethylated promoter of *LIPA* and hypermethylated *ABCA5*, *ABCG1* and *ABCG4*—responsible for cholesterol efflux) (Table 3a). Other genes differentially methylated were associated with (1) fatty acids biosynthesis (hypermethylated: *ELOVL3*, *ELOVL5*, and *ELOVL6*, and hypomethylated: *FASN*, *LPL*, *MLYCD* and *MCAT*); (2) fatty acid transport (hypermethylated: *ACSL6* and hypomethylated: *PPARD*, *PPARG*, *SLC25A20* and *SLC27A1*); and (3) fatty acid β-oxidation (hypermethylated: *ACADM* and *CPT1A* and hypomethylated: *AMN*, *CRAT* and *PPARD*). Some genes related to glucose homeostasis were also found to be hypermethylated: *FOXO3*, *NCOR2*, *TCF4* and *TCF7L2*, contrary to *PPARG* which was hypomethylated (Table 3a). The BiNGO plugin revealed probable molecular function of a set of genes as lipid binding, receptor binding, transporter activity and transcription factor binding (Table 3b).

**Table 2 Characteristics of subjects with obesity included into the study, comparison of groups according to fasting serum LDL cholesterol**

	Hypercholesterolemic group (n = 68)	Control group (n = 69)	p-value
Age (years)	50.1 ± 9.8	44.6 ± 12.2	< 0.004
Sex, female (%) <sup>b</sup>	75	70	ns
Weight (kg) <sup>a</sup>	92.2 (79.87–104.5)	92.5 (84–104.2)	0.425
Adipose tissue mass (%) <sup>a</sup>	39.8 (34.4–42.8)	38.3 (33.2–42.2)	0.24
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	33.0 (30.6–35.6)	32.1 (30.1–35.7)	0.45
WHR <sup>a</sup>	0.9 (0.83–0.98)	0.85 (0.8–0.975)	0.23
Systolic blood pressure (mmHg) <sup>a</sup>	130 (120–140)	126 (120–135)	0.16
Diastolic blood pressure (mmHg) <sup>a</sup>	85 (80–90)	81 (80–89.5)	0.14
Total cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	6.14 (5.57–6.75)	4.88 (4.42–5.1)	< 0.001
LDL cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	4.14 (3.82–4.57)	2.91 (2.5–3.2)	< 0.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.69
Non-HDL cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	4.86 (4.45–5.45)	3.51 (3.14–3.78)	< 0.001
Fasting triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.9	1.4 ± 0.7	0.007
Total fatty acids (μg/mL)	3868.8 ± 851.6	3122.6 ± 600.4	< 0.001
Saturated fatty acids (%)	33.51 ± 2.56	32.95 ± 1.88	0.16
Monounsaturated fatty acids (%)	26.56 ± 3.34	25.37 ± 2.46	0.025
Polysaturated fatty acids (%)	39.93 ± 4.61	41.65 ± 3.32	0.017
Fasting glucose (mmol/L) <sup>a</sup>	5.4 (4.8–5.8)	5.0 (4.8–5.5)	0.025
Glucose AUC OLTT (mmol/L min) <sup>a</sup>	9.72 (9.1–10.44)	9.43 (8.88–9.91)	0.046
Glucose AUC OGTT (mmol/L min) <sup>a</sup>	3.68 (3.31–4.38)	3.31 (2.8–3.99)	0.018
Fasting insulin (μU/mL)	16.0 ± 8.6	15.8 ± 8.2	0.95
HOMA-IR	3.7 ± 2.0	3.7 ± 2.2	0.78
Adiponectin (μg/mL) <sup>a</sup>	5.99 (4.38–8.72)	6.25 (3.84–9.55)	0.79
Leptin (ng/mL) <sup>a</sup>	34.74 (22.67–51.95)	29.16 (19.4–51.84)	0.29
Fasting GIP (pg/mL) <sup>a</sup>	29.7 (19.3–44.7)	24.1 (15.9–33.6)	0.036
FGF19 (pg/mL)	147.9 ± 88.2	123.9 ± 90.6	0.035
FGF21 (pg/mL)	261.7 ± 160.6	214.2 ± 149.3	0.039

Comparison between the high LDL-CH group and controls (unpaired t-test for normally or Mann–Whitney U-test for non-normally distributed <sup>a</sup> variables). Data shown as mean ± SD; otherwise (<sup>a</sup>) as median and interquartile range in parentheses except nominal variable (<sup>b</sup>) shown as % of subjects. <sup>b</sup> The chi-squared test was used for nominal variable. The statistically significant results are marked in italics

In our study, hypermethylation of promoters of key genes regulating cholesterol metabolism such as *PCSK9*, *LRP1*, *ABCG1*, *ANGPTL4*, *SREBF1* and *NRIH2*, were found in obese patients with hypercholesterolemia. Furthermore, enhanced methylation of promoters of genes coding for transcription factors, such as *NFKB2*, *TCF4*, *GATA4*, *INSM1*, *CTCE*, *TCF7L2* and *SREBF1* and reduced methylation of *KLF14*, *PPARD* and *PPARG*, were found (Table 3a, b).

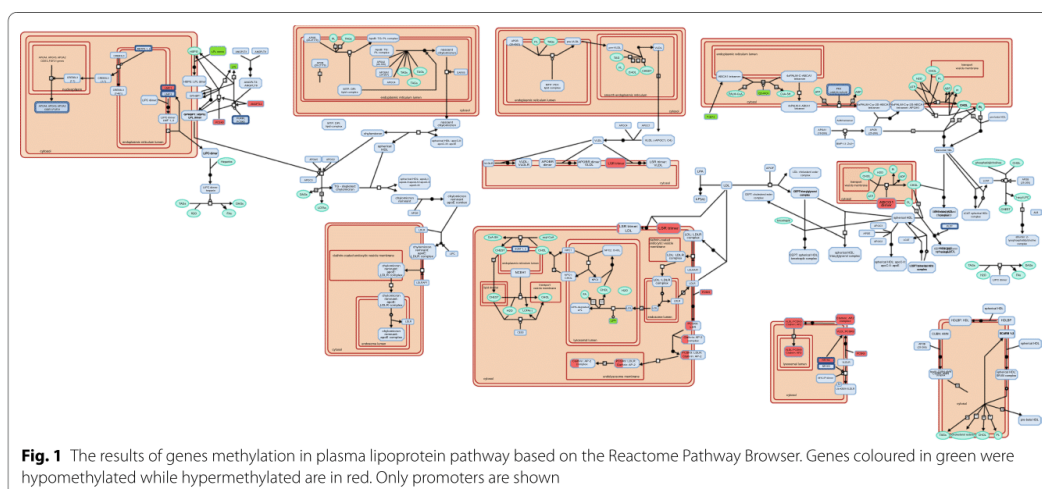
Locations of CpG sites in genes are presented in Additional file 1: Table S1.

### Discussion

This preliminary study showed different DNA methylation profiles in the leukocytes of obese, hypercholesterolemic patients (LDL-CH ≥ 3.4 mmol/L, n = 5) compared to the leukocytes methylome of obese subjects presenting serum LDL-CH levels < 3.4 mmol/L

(n = 5). Main finding of this study is the identification of differentially methylated genes associated with lipid metabolism pathways. Among the lipid-related genes mostly significant were the following pathways: regulation of lipid metabolism by PPAR alpha; plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance; metabolism of lipids; regulation of gene expression by SREBP, PPARG and NR1H2; LDL clearance and VLDLR internalisation and degradation (all located in the top ten of mostly significant pathways).

We have presented new loci of differential DNA methylation in genes that were previously found to be associated with dyslipidemia (*ABCG1*, *CPT1A*, *FASN*, *KLF14*, *LDLR*, *LPL*, *LRP1*, *PCSK9*, *PPARG* and *SREBF1*) (Mittelstraß and Waldenberger 2018; Pfeiffer et al. 2015; Rohde et al. 2019; Campanella et al. 2018) but also in new candidate genes, potentially related to



hypercholesterolemia. Novel epigenetically regulated genes include *ABCG4*, *ANGPTL4*, *AP2A2*, *AP2M1*, *AP2S1*, *CLTC*, *FGF19*, *FGFR1*, *HDLBP*, *LIPA*, *LMF1*, *LRP5*, *LSR*, *NR1H2* and *ZDHHC8*. The unique set of differentially methylated genes were enriched in gene ontology to cholesterol and fatty acid metabolism, especially plasma lipoprotein formation and metabolism, reverse cholesterol transport, triglycerides degradation, fatty acids transport and  $\beta$ -oxidation.

Regarding lipoprotein assembly, remodeling and clearance, the reduced methylation in promoters of genes coding for *LPL* (Lipoprotein lipase), *LIPA* (Lipase A) and *ZDHHC8* (Zinc Finger DHHC-Type Containing 8) were found. Palmitoyl transferase *ZDHHC8* mediates palmitoylation of *ABCA1* and thus localization of this cholesterol transporter at the plasma membrane (Singaraja et al. 2009). Methylation of promoter of *LPL* gene in leukocytes and visceral adipose tissue was previously published in severe obese men (Guay et al. 2013). In this paper the association between *LPL* DNA methylation and *LPL* mRNA level in visceral adipose tissue and HDL cholesterol (HDL-CH) level was presented (Guay et al. 2013).

We detected hypomethylation in *FGF19* and *FGFR1* genes in leukocytes DNA of obese patients with hypercholesterolemia. The effect of *FGF19* on TG and cholesterol levels may vary depending on the type of *FGFR1* or *FGFR4* receptor with which it interacts (Wu et al. 2013). Zhou et al. (2019) demonstrated that *FGF19* promotes HDL biogenesis and cholesterol efflux from the liver, with increasing serum HDL and LDL cholesterol as a consequence.

The next set of genes found to be hypermethylated in our hypercholesterolemic patients: *PCSK9*, *CLTC*, *AP2A2*, *AP2M1* and *AP2S1*, are involved in the endocytosis of the ligand-bound LDL and VLDL receptors (Peterson et al. 2008; Mulkearns and Cooper 2012; Go and Mani 2012; Pearse et al. 2000). Although *PCSK9* is principally expressed in the liver, *PCSK9* gene promoter methylation is conserved across tissues and positively correlated with its expression (Lohoff et al. 2018). Recently it was found that *FGF21* serves as a potential negative regulator of *PCSK9* (Guo et al. 2016), which is in line with our observation that hypermethylation of *PCSK9* corresponds with higher circulating *FGF21* levels in patients with hypercholesterolemia compared to control subjects.

Our study found differential methylation of the following genes encoding receptors involved in lipoprotein trafficking: hypermethylated *LDLR* (Low Density Lipoprotein Receptor), *LRP1* (LDL Receptor Related Protein 1), *LRP5* (LDL Receptor Related Protein 5), *LSR* (Lipolysis Stimulated Lipoprotein Receptor) and *NR1H2* (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 2) and hypomethylated *LRP8* (LDL Receptor Related Protein 8). *LRP1* together with *LDLR* play an essential role in binding and internalization of apoE- and apoB-containing lipoproteins regulating their cellular uptake (Dato and Chiabrando 2018). It has been found that DNA methylation of the *LRP1* gene (locus in 5'UTR) was previously detected in placental DNA and was correlated with maternal total cholesterol changes during pregnancy (Guay et al. 2020). In subsequent studies, a positive association between DNA methylation in *LRP1* gene

**Table 3 Results of statistically overrepresented biological processes and molecular function in set of differentially methylated genes**

Description	p-value	Corr p-value	N	Hypermethylated	Hypomethylated
a. Gene Ontology_Biological Processes					
Lipid metabolic process	6.0610E-33	1.0849E-29	47	ABCG1 ACADM ACP6 ACSL6 AHRR CAV1 CPT1A ELOVL3 ELOVL5 ELOVL6 FDFT1 FDP5 GPX1 GPX4 HDLBP NR1H2 LDLR LRP1 LRP5 PCSK9 PMVK RXRA SREBF1 SQLE	ABCB4 ACOT1 ACOT7 ACSF2 AGPAT2 AMN CRAT CYP1B1 CYP27B1 CYP51A1 DHCR7 FASN IL6ST INSIG1 LIPA LPL LRP8 MLYCD MCAT PPARD PPARG SLC27A1 STARD3
Regulation of lipid biosynthetic process	1.8237E-6	3.4005E-5	6	ABCG1 ACSL6 NR1H2	DHCR7 FGF19 SLC27A1
Negative regulation of lipid biosynthetic process	6.2381E-3	2.5581E-2	2		FGF19 SLC27A1
Fatty acid metabolic process	9.26E-17	2.37E-14	19	ACADM ACSL6 CPT1A ELOVL3 ELOVL5 ELOVL6 PPARA	ACOT1 ACOT7 ACSF2 AMN CRAT FASN LIPA LPL MCAT MLYCD PPARD SLC27A1
Cholesterol metabolic process	6.73E-19	6.02E-16	16	ABCG1 FDFT1 FDP5 HDLBP LDLR PCSK9 PMVK RXRA SREBF1 SQLE	CYP51A1 DHCR7 LIPA PPARD SREBF2 STARD3
Triglyceride metabolic process	1.02E-08	4.81E-07	7	ACSL6 CAV1 CPT1A PCSK9	IL6ST LIPA LPL
Cholesterol biosynthetic process	5.57E-07	1.49E-05	5	FDFT1 FDP5 PMVK	CYP51A1 DHCR7
Regulation of cholesterol storage	8.89E-09	4.42E-07	5	ABCG1 NR1H2 PPARA	LPL PPARG
Cholesterol transport	2.01E-07	6.09E-06	6	ABCA5 ABCG1 ABCG4 CAV1 LDLR	LIPA
Cholesterol efflux	1.00E-05	1.50E-04	4	ABCA5 ABCG1 ABCG4 CAV1	
Reverse cholesterol transport	5.57E-03	2.37E-02	2	ABCA5 ABCG1	
Regulation of cholesterol transport	4.57E-04	3.38E-03	3	NR1H2 LRP1	PPARG
Negative regulation of cholesterol storage	2.72E-08	1.08E-06	4	ABCG1 NR1H2 PPARA	PPARG
Fatty acid biosynthetic process	1.60E-06	3.12E-05	7	ELOVL3 ELOVL5 ELOVL6	FASN LPL MLYCD MCAT
Fatty acid transport	2.46E-08	1.05E-06	6	ACSL6 PPARA	PPARD PPARG SLC25A20 SLC27A1
Fatty acid beta-oxidation	1.22E-06	2.63E-05	5	ACADM CPT1A	AMN CRAT PPARD
Regulation of fatty acid oxidation	2.39E-06	4.32E-05	5	CPT1A PPARA	MLYCD PPARG SLC25A20
Long-chain fatty acid metabolic process	1.90E-03	1.04E-02	2	ACSL6	ACOT1
Regulation of macrophage derived foam cell differentiation	1.52E-08	6.63E-07	6	ABCA5 ABCG1 NR1H2 PPARA	LPL PPARG
Low-density lipoprotein receptor metabolic process	4.37E-05	5.00E-04	2	PCSK9	PPARG
Plasma lipoprotein particle remodeling	3.99E-04	3.11E-03	3	ABCA5 ABCG1	LPL
High-density lipoprotein particle remodeling	3.77E-03	1.75E-02	2	ABCA5 ABCG1	
Regulation of steroid metabolic process	3.09E-03	1.52E-02	3	ABCG1	FGF19 DHCR7
Glucose homeostasis	1.17E-06	2.58E-05	5	FOXO3 NCOR2 TCF4 TCF7L2	PPARG
Response to glucose stimulus	6.04E-05	6.47E-04	4	EP300 TCF7L2 TCF4	PPARD
Regulation of insulin secretion	4.82E-04	3.50E-03	3	CPT1A TCF4 TCF7L2	
Carbohydrate homeostasis	1.17E-06	2.58E-05	5	FOXO3 NCOR2 TCF4 TCF7L2	PPARG
Regulation of response to stress	5.02E-05	5.65E-04	10	AP2A2 AP2S1 AP2M1 CAV1 GPX4	FGF19 IL6ST IRAK1 PPARG PRKACA
Negative regulation of apoptosis	3.59E-03	1.70E-02	8	ANGPTL4 NKX2-6 SIN3A PCSK6 TCF4 TCF7L2	FGFR1 IRAK1
b. Gene Ontology_Molecular Function					
Lipid binding	2.19E-08	3.54E-06	15	ABCG1 AP2A2 AP2M1 CAV1 HDLBP PPARA RXRA S1PR4	ACOT7 ITPR1 LIPA LPL PPARD PPARG STARD3
Receptor binding	1.99E-06	1.16E-04	19	ANGPTL4 CAV1 EP300 LRP1 IL6ST IL13 NCOA2 NCOR2 NR1H2 PCSK9 RXRA TCF4 TCF7L2 TGFBI1	CD8A FGF19 IRAK1 LPL PPARG



**Table 3 (continued)**

Description	p-value	Corr p-value	N	Hypermethylated	Hypomethylated
Transporter activity	1.44E−03	1.01E−02	16	ABCC1 ABCC9 ABCG1 AMN AP2A2 AP2S1 AP2M1 APC2 KCNJ6 LRP1 SLC27A1	ABCB4 FASN ITPR1 SLC25A20 STARD3
Transcription factor binding	1.26E−08	3.54E−06	17	CTCF GATA4 EP300 LRP1 MED21 NCOA2 NCOR2 NR1H2 RXRA SIN3A TCF4 TCF7L2 TGFβ11	NFYC MED7 PPARG PPARG
Transcription cofactor activity	1.14E−05	4.22E−04	11	CTCF EP300 LRP1 MED21 NCOR2 NCOA2 RXRA SIN3A TGFβ11	NFYC MED7
Lipoprotein binding	1.21E−03	9.26E−03	3	LDLR LRP1	LRP8

Analyses performed using BINGO plugin in Cytoscape software. (a) Shows involvement of genes in biological processes and (b) in molecular function

and HDL-CH level was demonstrated in patients with metabolic syndrome (Castellano-Castillo et al. 2019). However, the exact location of the CpG sites has not been shown in these articles. We demonstrated hypermethylation of CpG sites located inside the fourth exon of the LDL receptor (*LDLR*) gene, however the consequences of methylation of that region have not yet been reported. Guay et al. (2020) presented correlation with DNA methylation in *LDLR* gene (CpG-A locus located between the fourth and fifth exon) with maternal total cholesterol level changes during pregnancy. Higher methylation degree of *LDLR* gene promoter in peripheral blood in atherosclerotic patients compared to healthy subjects was found (Zhi et al. 2007).

In presented study patients with elevated LDL-CH were characterized by hypermethylated CpG sites also within the promoters of the *ABCG1*, *ABCA5*, *ABCG4* and *CAVI* genes that are responsible for reverse cholesterol transport (Mauldin et al. 2008; Vaughan and Oram 2006). Pfeiffer et al. showed the association of CpG methylation in *ABCG1* (cg06500161, 21:43656587) with HDL cholesterol and triglycerides level in 1776 subjects in the KORA F4 cohort (Pfeiffer et al. 2015). Further studies demonstrated an association of methylation of (cg06500161) locus in *ABCG1* gene with its lower transcriptional activity, higher triglycerides level and higher triglycerides to HDL cholesterol ratio in 1941 obese individuals from four population-based European cohorts (Campanella et al. 2018). In our study we presented DNA hypermethylation in *ABCG1* gene in new CpG locus (21:42219751–42219800) in leukocytes of patients with high LDL-CH.

We also found altered DNA methylation in patients with hypercholesterolemia, in key genes associated with fatty acid transport and metabolism (hypomethylated: *PPARD*, *PPARG*, *SLC27A1*, *SLC27A3* and *SLC25A20*, and hypermethylated: *ANGPTL4*, *ACLS6*, *ACADM* and *CPT1A*). These results indicate inhibited  $\beta$ -oxidation as the gene *CPT1A*, coding for the key enzyme in the

carnitine-dependent transport and *ACADM* encoding acyl-CoA dehydrogenase medium chain catalysing the initial step of fatty acid  $\beta$ -oxidation, are hypermethylated (GeneCards—the human gene database [www.genecards.org](http://www.genecards.org)) (Stelzer et al. 2016). Frazier-Wood et al. showed association of methylation at 2 CpGs (cg00574958, 11:68607622; cg17058475, 11:68607737) in *CPT1A* gene with LDL and VLDL lipoprotein subfraction profile in CD4<sup>+</sup> T cells (Frazier-Wood et al. 2014). They presented hypermethylation of 2 CpGs (cg00574958, cg17058475) in 5'UTR to be associated with decreased number of VLDL particles whereas one (cg00574958) was associated with a decrease in small, dense subfraction of LDL (Frazier-Wood et al. 2014). We presented DNA hypermethylation in new locus (11:68843060–68843119) located in the promoter of *CPT1A* gene in leukocytes of patients with high LDL-CH.

Interestingly, we identified differential methylation of genes coding for transcription factors important for lipid and glucose metabolism. The hypermethylated *SREBF1*, that regulates fatty acid and cholesterol metabolism and hypermethylated *TCF7L2*, important for glucose homeostasis, characterized hypercholesterolemic patients. Additionally the reduced methylation in transcription factors: *KLF14* gene, previously associated with metabolism of HDL-CH, adipocyte function, and *PPARD* and *PPARG*- receptors for fatty acids was found (Florath et al. 2016; Dekkers et al. 2016; Vitali et al. 2017; Argmann et al. 2017; Varga et al. 2011).

Despite the observed epigenetic changes in hypercholesterolaemia, we cannot state in our studies if the differential methylation is a consequence rather than a cause of high blood lipids. Based on the regulated pathways in our study as well as relevant literature (Pfeiffer et al. 2015; Dekkers et al. 2016; Rangel-Salazar et al. 2011) we suggest that differential methylation observed in epigenome wide association studies is likely a mixed picture of sites that are the cause and consequence of abnormal lipids

levels. This is in line with previous studies where it was showed that blood lipids level influence DNA methylation (Dekkers et al. 2016). Studies on VLR (very low density—VLDL and LDL—rich lipoproteins mix) in human THP-1 macrophages showed that they induces global de novo methylation (Rangel-Salazar et al. 2011). Extension of these studies revealed that human native VLDL and LDL-rich lipoprotein mix, induces decrease in pro-inflammatory and cholesterol transport gene expression in consequence of DNA methylation. For instance *ABCG1* gene participating in cholesterol transport was down-regulated by VLR (Rangel-Salazar et al. 2011). Dekkers et al. analyzed genome wide DNA methylation in whole blood cells of 3296 individuals after Mendelian randomisation and demonstrated that higher LDL-CH induced higher methylation of a CpG (cg27168858) in *DHCR24* gene. Moreover higher TG levels induced lower methylation of 2 CpGs (cg00574958, cg17058475), which were associated with higher expression of *CPT1A*. High TG levels were also accompanied by hypermethylation of CpG (cg11024682), which was associated with lower expression of *SREBF1* gene. Additionally either lower TG or higher HDL-CH induced lower methylation of 2 CpGs (cg27243685, cg06500161), which was associated with higher expression of *ABCG1* gene (Dekkers et al. 2016). On the contrary, in article by Pfeiffer et al. (Pfeiffer et al. 2015) DNA methylation in *ABCG1*, *SREBF1* and *CPT1A* genes were presented rather as the cause not the consequence, of development of complex lipid-related diseases.

### Limitations

The main limitation of our study was the limited number of samples for genome-wide DNA methylation analysis. Thus results from the high-throughput method give rise for further studies on targeted genes methylation in all samples from the large cohort. We assessed DNA methylation in peripheral blood because it is easily accessible and its collection is acceptable by patients. Although epigenetic studies on different tissue samples are more informative, blood samples are generally used in most studies with non-surgical subjects. Nevertheless, previous studies demonstrated that hypermethylated CpG islands: *LEP*, *ADIPOQ* in adipose tissue or *PCSK9* in the liver overlap methylation status in the blood (Lohoff et al. 2018; Houde et al. 2015). Additionally Crujeiras et al. (2016) demonstrated that DNA methylation map in circulating leukocytes reflects subcutaneous adipose tissue methylation pattern. This suggests that DNA methylation analysis in leukocytes may reflect a methylation profile in other tissues (liver, adipose tissue or intestine) relevant for the pathogenesis of lipid and lipoprotein disorders. Furthermore various types of leukocytes (monocytes, neutrophils, mast

cells and B and T lymphocytes) are associated with atherosclerosis suggesting that may actively response to hypercholesterolemia (Oguro 2019).

### Conclusions

In conclusion, our preliminary data implies epigenetic regulation of lipids profile, demonstrated as differential DNA methylation in leukocytes of obese individuals with elevated LDL cholesterol levels. Analysis of DNA methylation microarrays indicated that the most regulated processes are lipoprotein plasma clearance and metabolism, reverse cholesterol transport and cholesterol efflux and fatty acid uptake and  $\beta$ -oxidation. Analysis of DNA methylation status in peripheral blood could be a tool for identifying the pathognomonic processes related to the hypercholesterolemia and other obesity related complications. As DNA methylation is reversible and dependent on environmental factors, that gives the potential to influence the methylation status of lipids genes by the nutrition and healthy lifestyle to prevent the obesity-related complications.

### Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00220-z>.

**Additional file 1: Table S1.** Detail results of identified differentially methylated CpG sites.

### Abbreviations

AUC: Area under curves; BMI: Body mass index; CVD: Cardiovascular disease; FDR: False discovery rate; FGF19: Fibroblast growth factor 19; FGF21: Fibroblast growth factor 21; GIP: Glucose-dependent insulinotropic peptide; HDL: High density lipoprotein; HDL-CH: HDL cholesterol; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment; Insulin Resistance; LDL: Low Density Lipoprotein; LDL-CH: LDL cholesterol; MBPs: Methyl-CpG binding proteins; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; OGTT: Oral glucose tolerance test; OLTT: Oral lipid tolerance test; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; Q2: Median; (Q1; Q3): Interquartile range; SD: Standard deviation; TGs: Triglycerides; WHR: Waist-to-hip ratio.

### Acknowledgements

The authors thank the patients for their cooperation. This research was supported in part by PL-Grid Infrastructure.

### Authors' contributions

TP performed DNA methylation study, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript. AP participated in conception and design of the study, analyzed the DNA methylation data and revised article critically for important intellectual content. JG interpreted the data and revised article critically for important intellectual content. UR performed the biochemical analyses. AG performed the biochemical analyses. BKW participated in conception and design of the study and recruited patients. PZ performed the biochemical analyses. MK performed the biochemical analyses. KSS performed the biochemical analyses. BS revised article critically for important intellectual content. MMM participated in conception and design of the study, recruited patients and revised article critically for important intellectual content. ADK participated in conception and design of the study and revised article critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding**

Study supported by EU FP7 BIOCLAIMS 244995, NCN Grant DEC-2011/02/A/NZ2/00022, Polish Ministry of Science and Higher Education Grants: K/ZDS/0071157 and K/ZDS/007158.

**Availability of data and materials**

All data analysed during this study are included in this published article [and its additional information files].

**Ethics approval and consent to participate**

The study, sample collection and all procedures were approved by the Ethical Committee of the Jagiellonian University, Krakow, Poland (Opinion number KBET/45/B/2012). All participants gave written informed consents to participate in the study.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors have no conflicts of interest to disclose.

**Author details**

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 15a, 31-501 Kraków, Poland. <sup>2</sup> Department of Metabolic Diseases, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 15a, 31-501 Kraków, Poland. <sup>3</sup> Department of Metabolic Diseases, University Hospital in Krakow, Jakubowskiego 2, 30-688 Kraków, Poland. <sup>4</sup> Department of Physiology, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2C, 15-222 Białystok, Poland.

Received: 10 June 2020 Accepted: 29 September 2020

Published online: 07 October 2020

**References**

- Abdul QA, Yu BP, Chung HY, Jung HA, Choi JS. Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Arch Pharmacol Res.* 2017;40(11):1219–37.
- Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L, Padez C. The contribution of genetics and environment to obesity. *Br Med Bull.* 2017;123(1):159–73.
- Ali O, Cerjak D, Kent JW, James R, Blangero J, Carless MA, et al. Methylation of SOCS3 is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. *Epigenetics.* 2016;11(9):699–707.
- Argmann CA, Violante S, Dodatko T, Amaro MP, Hagen J, Gillespie VL, et al. Germline deletion of Krüppel-like factor 14 does not increase risk of diet induced metabolic syndrome in male C57BL/6 mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(12):3277–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.021>.
- Blattler A, Farnham PJ. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *J Biol Chem.* 2013;288(48):34287–94.
- Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(5):288–98. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
- Campanella G, Gunter MJ, Polidoro S, Krogh V, Palli D, Panico S, et al. Epigenome-wide association study of adiposity and future risk of obesity-related diseases. *Int J Obes.* 2018;42(12):2022–35. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0064-7>.
- Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Sanchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Alcaide-Torres J, Morcillo S, et al. Altered adipose tissue DNA methylation status in metabolic syndrome: relationships between global DNA methylation and specific methylation at adipogenic, lipid metabolism and inflammatory candidate genes and metabolic variables. *J Clin Med.* 2019;8(1):87.
- Chia CW, Egan JM. Incretins in obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2020;1461(1):104–26.
- Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep.* 2016;2017(7):1–13.
- Dato VA, Chiabrando GA. The role of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in lipid metabolism, glucose homeostasis and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1–13.
- Dekkers KF, van Iterson M, Slieker RC, Moed MH, Bonder MJ, van Galen M, et al. Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. *Genome Biol.* 2016;17(1):1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1000-6>.
- Ellulu MS, Patimah I, Khaza H, Rahmat A, Abed Y, Sci AM. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci.* 2016;13:851–63.
- Florath I, Butterbach K, Heiss J, Bewerunge-Hudler M, Zhang Y, Schöttker B, et al. Type 2 diabetes and leucocyte DNA methylation: an epigenome-wide association study in over 1,500 older adults. *Diabetologia.* 2016;59(1):130–8.
- Frazier-Wood AC, Aslibekyan S, Absher DM, Hopkins PN, Sha J, Tsai MY, et al. Methylation at CPT1A locus is associated with lipoprotein subfraction profiles. *J Lipid Res.* 2014;55(7):1324–30.
- Glaser C, Demmelmaier H, Koletzko B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS ONE.* 2010;5(8):e12045.
- Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med.* 2012;85(1):19–28.
- Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl MC, Gaudet D, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis.* 2013;228(2):413–20. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.033>.
- Guay SP, Houde AA, Breton E, Baillargeon JP, Perron P, Gaudet D, et al. DNA methylation at LRP1 gene locus mediates the association between maternal total cholesterol changes in pregnancy and cord blood leptin levels. *J Dev Orig Health Dis.* 2020;11(4):369–78.
- Guo Y, Liu Q, Xu D. Shedding light on FGF21: a potential negative regulator of PCSK9. *Int J Cardiol.* 2016;214:75–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.03.165>.
- Guo K, Eid SA, Elzinga SE, Pacut C, Feldman EL, Hur J. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression identifies candidate genes for human diabetic neuropathy. *Clin Epigenet.* 2020;12(1):123.
- Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med.* 2010;16(1):7–16.
- Houde AA, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, et al. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet.* 2015;16(1):29.
- Houseman EA, Molitor J, Marsit CJ. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics.* 2014;30(10):1431–9.
- Jacobsen SC, Brøns C, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Yang B, Lara E, et al. Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia.* 2012;55(12):3341–9.
- Keating ST, El-Osta A. Epigenetics and metabolism. *Circ Res.* 2015;116(4):715–36.
- Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak S-H, Bassas AF, et al. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat Commun.* 2015;6(May):7585. <https://doi.org/10.1038/ncomms8585>.
- Lohoff FW, Sorcher JL, Rosen AD, Mauro KL, Fanelli RR, Momenan R, et al. Methylation profiling and replication implicates deregulation of PCSK9 in alcohol use disorder. *Mol Psychiatry.* 2018;23(9):1900–10.
- Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2019;2019:1–18.
- Mære S, Heymans K, Kuiper M. BINGO: a cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3448–9.
- Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int J Obes.* 2008;32(11):1655–64.
- Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skafien MD, Ayers CR, et al. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2008;117(21):2785–92.
- Mittelstraß K, Waldenberger M. DNA methylation in human lipid metabolism and related diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2018;29(2):116–24.

- Mulkearns EE, Cooper JA. FCH domain only-2 organizes clathrin-coated structures and interacts with Disabled-2 for low-density lipoprotein receptor endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2012;23(7):1330–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0812>.
- Oguro H. The roles of cholesterol and its metabolites in normal and malignant hematopoiesis. *Front Endocrinol*. 2019;10(APR):1–15.
- Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ. Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10(2):220–8.
- Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):179–93. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.004>.
- Peterson AS, Fong LG, Young SG. Erratum: PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1595–9.
- Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, Reischl E, Sandling JK, Kunze S, et al. DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(2):334–42.
- Piening BD, Zhou W, Contrepois K, Röst H, Gu Urban GJ, Mishra T, et al. Integrative personal omics profiles during periods of weight gain and loss. *Cell Syst*. 2018;6(2):157–170.e8.
- Rangel-Salazar R, Wickström-Lindholm M, Aguilar-Salinas CA, Alvarado-Caudillo Y, Dössing KBV, Esteller M, et al. Human native lipoprotein-induced de novo DNA methylation is associated with repression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *BMC Genomics*. 2011;12(1):582.
- Razny U, Goralska J, Zdzienicka A, Gruca A, Zapala B, Micek A, et al. High fat mixed meal tolerance test leads to suppression of osteocalcin decrease in obese insulin resistant subjects compared to healthy adults. *Nutrients*. 2018;10(11):1611.
- Roh HC, Tsai LTY, Shao M, Tenen D, Shen Y, Kumari M, et al. Warming induces significant reprogramming of beige, but not brown, adipocyte cellular identity. *Cell Metab*. 2018;27(5):1121–1137.e5.
- Rohde K, Keller M, LaCourPoulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metab Clin Exp*. 2019;92:37–50.
- Rosen ED, Kaestner KH, Natarajan R, Patti ME, Sallari R, Sander M, et al. Epigenetics and epigenomics: implications for diabetes and obesity. *Diabetes*. 2018;67(10):1923–31.
- Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):43–51.
- Shen J, Zhu B. Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med Rep*. 2018;17(6):7636–44.
- Sidiropoulos K, Viteri G, Sevilla C, Jupe S, Webber M, Orlic-Milacic M, et al. Reactome enhanced pathway visualization. *Bioinformatics*. 2017;33(21):3461–7.
- Singaraja RR, Kang MH, Vaid K, Sanders SS, Vilas GL, Arstikaitis P, et al. Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function. *Circ Res*. 2009;105(2):138–47.
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinform*. 2016;54:1.30.1–1.30.33.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA hyperlipidemia guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(25 Pt B):2889–934.
- Stuart TJ, O'Neill K, Condon D, Sasson I, Sen P, Xia Y, et al. Diet-induced obesity alters the maternal metabolome and early placenta transcriptome and decreases placenta vascularity in the mouse. *Biol Reprod*. 2018;98(6):795–809.
- Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2011;1812(8):1007–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>.
- Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*. 2006;47(11):2433–43.
- Vitali C, Khetarpal SA, Rader DJ. hdl cholesterol metabolism and the risk of CHD: new insights from human genetics. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(12):132.
- Wu X, Ge H, Baribault H, Gupte J, Weiszmann J, Lemon B, et al. Dual actions of fibroblast growth factor 19 on lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(2):325–32.
- Zhi YF, Huang YS, Li ZH, Zhang RM, Wang SR. Hypermethylation in promoter area of LDLR gene in atherosclerosis patients. *Fen zi xi bao sheng wu xue bao = J Mol Cell Biol*. 2007;40(6):419–27.
- Zhou M, Marc Learned R, Rossi SJ, Tian H, DePaoli AM, Ling L. Therapeutic FGF19 promotes HDL biogenesis and transhepatic cholesterol efflux to prevent atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2019;60(3):550–65.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## **9.2. Artykuł nr 2**

Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A,  
Solnica B, Malczewska-Malec M.

**Epigenetic regulation of processes related to high level of fibroblast growth factor  
21 in obese subjects.**

**Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307.**

Article

# Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects

Teresa Platek <sup>1,\*</sup>, Anna Polus <sup>1</sup>, Joanna Górska <sup>1</sup>, Urszula Rażny <sup>1</sup>, Agnieszka Dziewońska <sup>1</sup>, Agnieszka Micek <sup>2</sup>, Aldona Dembińska-Kieć <sup>1</sup>, Bogdan Solnica <sup>1</sup> and Małgorzata Malczewska-Malec <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, 15a Kopernika Street, 31-501 Krakow, Poland; apolus@cm-uj.krakow.pl (A.P.); jgoralska@cm-uj.krakow.pl (J.G.); urazny@cm-uj.krakow.pl (U.R.); a.sliwa@uj.edu.pl (A.D.); mbkiec@cyf-kr.edu.pl (A.D.-K.); mbsolnic@cyf-kr.edu.pl (B.S.); mbmalec@cyf-kr.edu.pl (M.M.-M.)

<sup>2</sup> Department of Nursing Management and Epidemiology Nursing, Faculty of Health Sciences, Jagiellonian University Medical College, 25 Kopernika Street, 31-501 Krakow, Poland; agnieszka.micek@uj.edu.pl

\* Correspondence: teresa.staszal@cm-uj.krakow.pl; Tel.: +48-12-424-87-87



**Citation:** Platek, T.; Polus, A.; Górska, J.; Rażny, U.; Dziewońska, A.; Micek, A.; Dembińska-Kieć, A.; Solnica, B.; Malczewska-Malec, M. Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects. *Genes* **2021**, *12*, 307. <https://doi.org/10.3390/genes12020307>

Academic Editors: Marek Skrzypski and Paweł A. Kolodziejcki

Received: 19 January 2021

Accepted: 18 February 2021

Published: 21 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** We hypothesised that epigenetics may play an important role in mediating fibroblast growth factor 21 (FGF21) resistance in obesity. We aimed to evaluate DNA methylation changes and miRNA pattern in obese subjects associated with high serum FGF21 levels. The study included 136 participants with BMI 27–45 kg/m<sup>2</sup>. Fasting FGF21, glucose, insulin, GIP, lipids, adipokines, miokines and cytokines were measured and compared in high serum FGF21 (*n* = 68) group to low FGF21 (*n* = 68) group. Human DNA Methylation Microarrays were analysed in leukocytes from each group (*n* = 16). Expression of miRNAs was evaluated using quantitative PCR-TLDA. The study identified differentially methylated genes in pathways related to glucose transport, insulin secretion and signalling, lipid transport and cellular metabolism, response to nutrient levels, thermogenesis, browning of adipose tissue and bone mineralisation. Additionally, it detected transcription factor genes regulating FGF21 and fibroblast growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor pathways regulation. Increased expression of hsa-miR-875-5p and decreased expression of hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p and hsa-miR-200c-3p were found in the group with high serum FGF21. These changes were associated with high FGF21, VEGF and low adiponectin serum levels. Our results point to a significant role of the epigenetic regulation of genes involved in metabolic pathways related to FGF21 action.

**Keywords:** FGF21; obesity; glucose and lipid metabolism; DNA methylation; microRNA

## 1. Introduction

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) acts as an endocrine factor that regulates glucose and lipids homeostasis in humans and animals although its function is still debated due to its different sites of production and actions [1–3]. FGF21 is primarily expressed in the liver but also in the skeletal muscles, adipose tissue, gut and pancreas [4].

FGF21 is regulated by nutritional status (fasting state, high carbohydrate and high protein ingestion) as well as physical activity [3,5–7]. In humans, FGF21 expression in the liver was also found to be up-regulated by glucagon and by glucocorticoids, and repressed by insulin [3]. Circulating FGF21 concentrations exhibit a characteristic diurnal rhythm in humans [8]. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) induces FGF21 transcription in the liver in the fasting state in humans and mice via binding to its promoter [3,9]. Nevertheless, other nuclear receptors such as retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ), carbohydrate response element-binding protein (ChREBP), farnesoid X receptor (FXR) and liver X receptor (LXR) are also involved in the regulation of hepatic FGF21 expression [10–12]. Recently, the stimulatory effect of the fasting state

(through KLF15 and BTG2) on hepatic FGF21 expression have been demonstrated in mice [13]. In contrast to the liver, FGF21 expression in brown and white adipose tissues (WAT) is induced mainly by cold exposure and adrenergic signalling as well as PPAR $\gamma$ , which directly mediates the expression of FGF21 in WAT [3,9]. In muscles, FGF21 expression is controlled by ATF4 [14].

FGF21 signalling to target cells is mediated by binding to and activation of four receptors: FGFR1, FGFR2, FGFR3 and FGFR4 in the presence of co-receptor  $\beta$ -klotho [15]. FGFR receptors are ubiquitously expressed, whereas  $\beta$ -klotho, an essential co-receptor, is expressed only in the liver, adipose tissue, pancreas and brain, suggesting that FGF21 functions selectively in these tissues [4]. Although therapeutic administration of FGF21 prevents diet-induced obesity and related insulin resistance in mice and humans. Paradoxically metabolic disorders like obesity, diabetes are characterised by elevated serum FGF21. This highlights the important role of receptors. A recent study has shown the reduced expression of *FGFR1c*, *FGFR3c* and *FGFR4* receptors in skeletal muscles and increased expression of *FGFR1c* in WAT of individuals with type 2 diabetes [16]. Signal activation via FGFR1 leads to weight loss, brown fat thermogenesis, insulin sensitisation and hepatic lipids reduction [17]. FGF21 is widely known to exert multiple metabolic effects: increases insulin sensitivity, fatty acid oxidation and ketogenesis but inhibits lipogenesis in liver; increases fatty acid uptake, lipolysis, browning, thermogenesis and mitochondrial activity in white adipocytes and enhances glucose uptake and thermogenesis in brown adipocytes [3,12].

Serum level of circulating FGF21 increases with age as well as in obesity and insulin resistance state [18–20]. High serum FGF21 level is associated with MAFLD (metabolic associated fatty liver disease) and the higher risk of developing metabolic syndrome and type 2 diabetes [21,22]. Elevated FGF21 levels are observed in patients with atherosclerosis, pancreatitis and reduced bone strength [3]. Moreover, recent findings have indicated that high versus low serum FGF21 levels correlate with mortality in the elderly [12]. FGF21 is a part of a complicated inter-organ cross talk, so other factors (e.g., cytokines, metabolites) may modulate FGF21 action in target tissues and consequently elicit a beneficial (healthy) or detrimental (unhealthy) effect.

It is hypothesised that proper action of FGF21 prevents the development of diet-induced obesity [21]. According to a recent hypothesis, FGF21 is a hormonal mediator of the human “thrifty” metabolic phenotype [23]. Efficient regulation, with large changes in FGF21 secretion in response to the supply of nutrients or nutrient deprivation, is one of the main factors determining the metabolic phenotype less susceptible to the development of obesity and its complications [24]. As FGF21 also plays a role in brown adipose tissue activation, it seems, to some extent, to affect the individual propensity to weight gain. However, in obesity the state of FGF21 resistance is widely observed, which is suggested as compensatory up-regulation response to chronically elevated serum levels of FGF21 [19]. Mechanisms mediating the interaction between environmental factors and the genome, such as epigenetics, may be of particular importance in the pathogenesis of FGF21-resistance. In recent study on mice it was demonstrated that *Fgf21* gene methylation status can be modulated in a PPAR $\alpha$ -dependent manner [25]. Therefore, expanding knowledge of the epigenetic basis associated with blunted FGF21 response to diet, is important for identifying individuals at risk and preventing the metabolic complications of obesity.

The aim of this study was to find differentially methylated genes and profile of miRNAs related to high FGF21 levels in obese subjects. For this purpose, a genome wide DNA methylation and miRNA expression patterns were determined in leukocytes. We chose blood samples, as easily accessible to collect, for screening of epigenetic biomarkers associated with high FGF21 levels. As a result, a blood epigenetic profile characteristic for high serum FGF21 in obesity was established.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

The study group (from the BIOCLAIMS cohort) included adult overweight and obese individuals ( $n = 136$ ; 100 women and 36 men) with BMI ranging from 27 to 45 (overweight:  $n = 30$ , obese:  $n = 106$ ). Exclusion criteria were cardiovascular diseases, diabetes mellitus, kidney or liver failure, endocrine disorders and chronic inflammation as well as smoking or excessive use of alcohol, pregnancy or lactation. Subjects did not use any drugs or dietary supplements and led inactive lifestyle.

The study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and with the Good Clinical Practice guidelines. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University, Krakow, Poland (file number: KBET/82/B/2009 and KBET/45/B/2012).

Patients were divided into 2 groups based on the fasting serum FGF21 levels (FGF21  $< 213$  pg/mL and  $\geq 213$  pg/mL). The cut-off point was the median serum FGF21 in the cohort.

### 2.2. Anthropometry Measurements

All subjects had measurements of body weight, height, waist and hip circumferences and blood pressure. Body fat percentage was estimated by bioelectrical impedance method using the Segmental Body Composition 116 Analyzer TANITA BC 418 MA (Tanita Corporation, Tokyo, Japan).

### 2.3. Sample Collection and Biochemical Tests

Fasting venous blood samples were always between 8 to 9 am collected and then centrifuged ( $1000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ ) within 30 min of collection for serum and plasma separation. For biochemical tests (except free fatty acids (NEFAs), serum and plasma samples were immediately frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed. For analysis of DNA methylation, fasting venous blood was collected into K3-EDTA tubes. At the same time, a second sample of venous blood was collected into PAX gene Blood RNA Tubes (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) for miRNAs expression analysis. All samples were frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysed.

Serum was used for biochemical tests: glucose, insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides (TG) concentrations. Glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, and TGs were assayed using enzymatic colorimetric methods on the MaxMat analyzer (MaxMat S.A., Montpelier, France). LDL cholesterol concentration was calculated using the Friedewald formula. Insulin was measured by an immunoradiometric method (INS IRMA Diasource ImmunoAssays, Neuve Belgium). Homeostasis model of assessment (HOMA-IR) was calculated as a ratio according to Matsuda M and DeFronzo RA [26]. Plasma GIP was measured by ELISA (Human GIP (Total) 96-Well Plate Assay (EMD Millipore, St Charles, MO, USA)). Total plasma fatty acids content and composition of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids were measured by gas-liquid chromatography and flame-ionization detector after direct in situ transesterification, according to Glaser et al. [27]. NEFAs concentrations were measured immediately in fresh plasma by an enzymatic quantitative colorimetric method (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Activities of ALT and GGT were measured by the routine method using an automated analyser (Hitachi cobas c 701/702, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### 2.4. Adipokines, Miokines and Cytokines

Serum concentrations of sEselectin, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), vascular cell adhesion protein 1 (sVCAM-1) and interleukin-6 (IL-6) were measured using ELISA kits (Human sE-Selectin/CD62E Quantikine ELISA, Human CCL2/ MCP-1 Quantikine ELISA, Human sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA and Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit, R&D Systems, USA). Soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule 1



(SPECAM-1) was measured by ELISA kit (BioVendor, Brno, Czech Republic) and hsCRP was measured by immunoturbidimetric method (APTEC Diagnostics nv, Sint-Niklaas, Belgium). Adiponectin and leptin were measured using R&D Systems kits (Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA kit and Human Leptin Quantikine ELISA kit; R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA). For the quantitative determination of human visfatin the Human Visfatin (Nampt/ PBEF) ELISA kit (BioVendor—Laboratori Medicina a.s. Brno, Czech Republic) and for human resistin (Human Resistin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) were used. To measure serum FGF-21 and Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations, the ELISA kits (Human FGF-21 Quantikine ELISA Kit and Human VEGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) were used. Human myostatin was assayed using the Human Myostatin ELISA kit (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Germany).

#### 2.5. Genome-wide DNA Methylation Analysis

DNA methylation microarrays were analyzed in 16 samples selected randomly (matched to sex and BMI) from the two studied groups (8 representative for each group- High FGF21 and Low FGF21). The subgroups reflected the biochemical characteristics of the group they represented. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The assessment of DNA quantity and quality was performed by spectrophotometry using the NanoDrop ND1000 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). First, sonication of 5 µg of DNA was performed. Sonication efficiency was assessed by electrophoresis on a 2.0% agarose gel. The 4/5 of sonicated DNA was taken for immunoprecipitation, the fifth part was used as a reference input fraction. The immunoprecipitation of DNA containing 5-methylcytosines (5-mC) were performed using monoclonal antibodies against 5-methylcytidine (Monoclonal Antibody to 5-Methyl Cytosine / 5-MeC Purified from Acris Antibodies, Inc, USA). Immunoprecipitated and reference DNA aliquots were labelled with fluorescent dyes Cyanine-3 and Cyanine-5, respectively. Competitive hybridisation of input material and methylated DNA enriched fraction was performed to oligonucleotide microarrays—Human DNA Methylation Microarray: High-definition 244K arrays contained 27,627 probes for annotated human CpG islands and 5081 undermethylated regions (G4495A, Design ID: 023795) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). The selected arrays includes 3 types of probes: probes for known CpG islands, probes spanning 85 nucleotides proximal to each CpG island and probes for undermethylated regions representing 237,227 unique biological probes. Microarrays were hybridized for 40 h at 65 °C. Samples amplification and labelling, hybridisation, slides washing and scanning procedures and image extraction using Agilent Features Extraction software v 10.10.1.1 were performed according to the manufacturer's instructions.

#### 2.6. Determination of miRNAs Expression by Real-Time PCR -TLDA (TaqMan Low Density Arrays)

For relative quantification of miRNA, 16 blood samples intended for epigenetic analysis were drawn from both group (8 representative for each group- High FGF21 and Low FGF21).

MiRNA was extracted using the PAXgene 96 Blood RNA Kit and GeneMATRIX Universal RNA/miRNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). Finally, after isolation we obtained miRNAs from peripheral blood leukocytes. MiRNA quality was assessed in an Agilent Bioanalyzer 2100 using the RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and quantified by spectrophotometry using the NanoDrop ND-1000. For miRNAs expression analysis by Real-time PCR, TaqMan Low-Density Array (TLDA) (TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) was used. Selected arrays allow simultaneous and accurate quantitation of 754 human microRNAs. Reverse transcription was performed with TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and MegaPlex Human Pool A and B and RT primers. The preamplification step was enabled by Megaplex™ PreAmp Kit and Primers. The arrays were run in a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

### 2.7. Real-time PCR Analysis

Total RNA was reverse transcribed using a reverse transcription kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)) with random primers (1 µg). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed with the QuantiTect SYBR Green PCR kit. The specific TaqMan Gene Expression Assays with a pair of specific PCR primers and a TaqMan probe with a FAM (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) was used. Amplification was performed using the continuous fluorescence detection system 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). The expression ratio of target mRNA was normalised to the level of 18 s RNA and compared to control group. Data was analysed using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method. The statistically significant results were recognized, with a value of  $p < 0.05$ .

### 2.8. Statistical Analyses

For biochemical and anthropometric parameters, data distribution was analysed by Shapiro-Wilk test. Differences between groups were calculated by unpaired t-test for normally distributed data and Mann-Whitney U-test for non-normally distributed data (BMI, adipose tissue mass, WHR, glucose, HOMA-IR, VEGF, GIP, leptin, adiponectin, FGF21, myostatin, IL-6 and hs-CRP). The chi-squared test was used for nominal variables. Normally distributed data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD), otherwise as median (Q2) and interquartile range (Q1; Q3). All analyses were performed with the Statistica 13 software (StatSoft Polska, Krakow, Poland). The  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

Microarray DNA methylation data analysis was performed using the Feature extraction software version 10.10.1.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), the BRB-ArrayTools software version 4.6 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and the R software version 3.6.1 (Development Core Team, Vienna, Austria and Bioconductor). Feature extraction software was used to assess background subtracted intensity values for the two fluorescence dyes on each individual array feature and calculated as the ratio (Cy3/Cy5). Loess normalisation method for dual channel raw hybridisation signals were computed in BRB-ArrayTools. M values ( $\log$  intensity ratio  $M = \log_2$  (Cy3/Cy5)) were used for downstream statistical analyses. A linear regression model for comparing two groups with high and low FGF21 was adjusted for potential confounders including blood cell-type proportions and age. To account for potential differences in the proportions of blood cells, we estimated the proportion of lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils and neutrophils to adjust raw data as previously described by Houseman et al. in R [28]. We used the functions `lmFit` and `eBayes` in “`limma`” package to build linear models and compute moderated t-statistics ( $p$ -value was calculated). Then Benjamini-Hochberg multiple test correction FDR was performed and shown as  $q$ -value. Regarding methylation sites, probes not including CpG or not located in CpG islands, probes containing CNVs in the CpG site and probes located on X and Y chromosomes were removed from the analyses. Fold of change (FC) in relation to obese with high FGF21 versus obese with low FGF21 was used as the methylation level. Loci corresponding to  $q$ -value  $< 0.01$  and FC in the range of  $> 1.4$  or  $< -1.4$  were classified as differentially methylated. Methylated regions had log ratios significantly above zero while less methylated regions had log ratios significantly below zero. Highly methylated regions are with  $\text{FC} \geq 2.0$  and moderately methylated with FC between 1.4 to 2.0.

MiRNAs TLDA arrays data analysis was calculated using DataAssist v 3.01 tool (Thermo Scientific). Relative miRNA levels were expressed as fold of change ((FC) = geometric mean  $2(-\Delta\text{Ct high FGF21}) / \text{geometric mean } 2(-\Delta\text{Ct low FGF21})$ ), in the presence of 3 genes (RNU44, RNU48, U6sRNA) used as endogenous controls. MiRNAs with fold of change (FC)  $\geq 2.0$  were taken for further analysis.

#### Pathway analyses:

We used the BiNGO plugin in Cytoscape software (version 3.7.2) to assess the involvement of selected genes in biological processes and molecular function [29]. The parameters

as overrepresentation after correction (using statistical test as hypergeometric test with multiple testing correction as Benjamini–Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction) were selected. Results with corrected  $p$ -value  $< 0.05$  are presented in this manuscript.

The putative target predictions of miRNAs were extracted using the three online software solutions: mirPath v.3 DIANA TOOLS, miRTarBase and miRWalk databases [30–32].

### 3. Results

#### 3.1. Biochemical and Anthropometric Characteristics of the Study Groups

The two investigated groups were comparable in terms of age, sex, BMI, adipose tissue mass, blood pressure, fasting glucose and cholesterol, regardless of serum FGF21 levels. Nevertheless, the group with high circulating FGF21 was characterised by higher WHR, elevated fasting insulin and HOMA-IR, NEFAs as well as triglycerides levels (Table 1). This group included 42 (62%) individuals who met the criteria for abdominal obesity, compared to the low FGF21 group,  $n = 27$  (40%). Plasma GIP, an incretin hormone important for regulating carbohydrate as well as lipid metabolism, was also found to be elevated in the high FGF21 group. Liver damage markers (ALT, GGT) also differed between groups, indicating patients with high FGF21 are more prone to liver injury. Obese patients with high FGF21 had elevated VEGF, MCP1 and decreased adiponectin levels whereas other adipokines—leptin, resistin, visfatin, myokines—irisin, myostatin, and IL-6 levels did not differ between these groups (Table 1). Other inflammatory markers studied—CRP, sVCAM, sPECAM, sE-selectin—showed comparable levels regardless of circulating FGF21 (Table 1). The patients in the study group presented metabolic profile related to elevated FGF21. Characteristics of subjects selected for epigenetic study are presented in Table S1 (in supplementary files).

Table 1. Characteristics of subjects.

Race (Caucasian)	High FGF21 ( $n = 68$ )		Low FGF21 ( $n = 68$ )		$p$
Sex, F/M (%)	63		75		Ns
Age (years)	48.3	$\pm 11.5$	47.2	$\pm 11.0$	0.582
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.90	(30.4–36.2)	32.3	(30.3–34.6)	0.235
Adipose tissue mass (%)	39.7	(33.7–42.7)	38.2	(34.1–42.9)	0.969
WHR	0.92	(0.85–1.02)	0.84	(0.80–0.92)	0.001
Waist circumference (cm)	108.5	$\pm 12.1$	100	$\pm 11.1$	0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	130.6	$\pm 14.9$	127.7	$\pm 15.9$	0.246
Diastolic blood pressure (mmHg)	84.4	$\pm 8.6$	83.2	$\pm 9.3$	0.427
Fasting glucose (mmol/L)	5.4	(5.0–5.7)	5.2	(4.7–5.5)	0.193
Insulin ( $\mu$ U/mL)	18.1	$\pm 10.4$	14.5	$\pm 7.7$	0.035
HOMA-IR	3.29	(2.45–4.9)	2.71	(2.0–4.04)	0.038
VEGF (pg/mL)	361.1	(226.7–521.1)	263.2	(176.4–421)	0.038
Total cholesterol (mmol/L)	5.7	$\pm 1.0$	5.4	$\pm 1.1$	0.061
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3	$\pm 0.3$	1.3	$\pm 0.2$	0.236
LDL cholesterol (mmol/L)	3.6	$\pm 0.9$	3.4	$\pm 1.0$	0.192
TG (mmol/L)	1.8	$\pm 0.9$	1.3	$\pm 0.7$	0.0004
GIP (pg/mL)	31.6	(18.8–45.6)	25.5	(16.1–33.1)	0.019
ALT (U/L)	20.8	$\pm 12.0$	16.8	$\pm 8.3$	0.026
GGT (U/L)	34.2	$\pm 39.3$	19.8	$\pm 11.9$	0.005
Leptin (ng/mL)	36.1	(20.3–56.3)	27.5	(20.8–44.6)	0.155
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	4.9	(3.8–7.55)	7.3	(5.3–9.7)	0.013
Resistin (ng/mL)	9.5	$\pm 3.7$	10.4	$\pm 3.9$	0.120
Visfatin (ng/mL)	1.2	$\pm 0.9$	1.1	$\pm 0.9$	0.439
FGF21 (pg/mL)	299	(253.8–401.9)	127.8	(62–162.4)	<0.0001
Irisin ( $\mu$ g/mL)	5	$\pm 1.6$	4.6	$\pm 1.2$	0.112
Myostatin (ng/mL)	21.5	(18.5–24.3)	21.2	(18.7–25.05)	0.964
IL-6 (pg/mL)	1.3	(0.9–1.9)	1.2	(0.8–1.7)	0.411
hs-CRP (mg/mL)	2.2	(1.0–3.8)	1.1	(0.5–3.8)	0.191
MCP1 (pg/mL)	392.1	$\pm 127.2$	348.2	$\pm 102$	0.034
sVCAM-1 (ng/mL)	609	$\pm 160.1$	636.9	$\pm 149.1$	0.270
sPECAM-1 (ng/mL)	74.6	$\pm 19.9$	71.7	$\pm 16.9$	0.395

Table 1. Cont.

Race (Caucasian)	High FGF21 (n = 68)		Low FGF21 (n = 68)		p
sEselectin (pg/mL)	43.8	±20.7	39.4	±15.6	0.179
<b>Fasting NEFAs (mmol/L)</b>	<b>0.804</b>	<b>±0.314</b>	<b>0.674</b>	<b>±0.268</b>	<b>0.008</b>
<b>Total fatty acids (µg/mL)</b>	<b>3642.9</b>	<b>±819.8</b>	<b>3258.9</b>	<b>±737.1</b>	<b>0.005</b>
Saturated fatty acids (%)	33.4	±2.6	33	±1.9	0.351
Monounsaturated fatty acids (%)	26.3	±2.7	25.4	±3.0	0.051
Polyunsaturated fatty acids (%)	40.3	± 4.0	41.6	±3.7	0.057

Data presented as Mean ± S.E.M. for normally distributed values or median (Q1–Q3) for not-normally distributed values.

### 3.2. Epigenetics Study Results

#### 3.2.1. Results of DNA Methylation Analysis

The analysis of the data obtained from DNA methylation arrays revealed 11 198 CpG probes differentially methylated ( $p < 0.01$ , representing approximately 4.6% of probes located on the array), of which 5425 were significantly hypomethylated and 5774 were significantly hypermethylated in the high FGF21 group compared to the low FGF21 group. We selected 375 CpG probes for further analysis of biological significance in pathways related to potential FGF21 action. We focused on those genes that were engaged in metabolism of lipids, glucose and adipokines and other pathways known or potentially related to FGF21 activity. Detailed results of each probe described in the manuscript are presented in Table S2 enclosed as a supplementary file.

Analyses in Cytoscape software revealed biological processes affected by differentially methylated genes (results presented in Table 2). The most interesting finding is the involvement of these genes in the response to glucose and insulin and other nutrient levels. Subsequently, the differential methylation status of lipid transport and fatty acid metabolism, fat cell differentiation (including white and brown fat cell differentiation), generation of precursor metabolites and energy, response to hypoxia and regulation of ossification, were demonstrated (Table 2). Importantly, in the high FGF21 group, changes in methylation status of genes involved in browning program of adipose tissue: *BMP4* (hypomethylated in promoter), *FGF9* (hypermethylated in promoter) as well as *PRDM16* (hypermethylated in promoter) and *CPT1C* (hypomethylated in promoter) were detected. Genes: *MRAP* (shown as hypomethylated in the high FGF21 group) and *TBX1* (hypermethylated in the high FGF21 group) are the hallmark proteins, for fatty tissue (highly enriched in differentiated adipocytes) and beige adipocytes, respectively.

Interestingly, five genes coding for transcriptional factors: *PPARA*, *RORA*, *ATF4*, *NR3C1* and *KLF15*, known to regulate FGF21 expression, were differentially methylated (Table 3). Analysis of DNA methylation also revealed regulation of fibroblast growth factor receptor signalling (hypomethylated genes: *FGF3*, *KLB*, *FGFR1* and *FGFR3*) and vascular endothelial growth factor receptor signalling (hypomethylated genes: *VEGFA* and *FLT1*) pathways (Table 2). High FGF21 individuals were also characterised by the *LIPG* gene, as well as *ABCA1* and *VLDLR* genes (all hypermethylated) related to lipoprotein metabolism and transport. We found differential methylation in promoters in genes: *IGF1R* -receptor for IGF1 and *IGFBP1* - an FGF21-induced pro-osteoclastogenic liver hormone (all with hypermethylated status in promoters in the high FGF21 group) (Table 2). Interestingly, the promoter of *GIPR* (receptor for GIP) gene was hypermethylated in this group. We showed at the protein level that serum GIP and VEGF levels were significantly higher in obese patients with high FGF21 than in subjects with low FGF21.

**Table 2.** Results of biological processes of differentially methylated genes-generated in Cytoscape software through BinGo plugin.

Description	Corr <i>p</i> -Value	X	<i>n</i>	Regulation	Genes
lipid metabolic process	$9.47 \times 10^{-10}$	35	834	Hypermethylated	ABCA1; ACOXL; ACOX3; ATP8B1; CIDEA; CPT1A; CYP51A1; CYP26C1; CYP24A1; CYP46A1; CYP26B1; CYP27B1; DECR1; DHCR24; ELOVL6; FADS2; GATA6; LIPG; PPARA; PRKAR2B; SCD; VLDLR
				Hypomethylated	ACSL3; ACSS2; ADIPOR1; ATP8B1; CPT1A; CPT1B; CPT1C; CYP26A1; ELOVL4; ELOVL6; ELOVL7; GATA6; LPIN1; PDE3A; PRKAA1; PRKAB2; SLC27A1;
lipid localization	$9.18 \times 10^{-11}$	17	151	Hypermethylated	ABCA1; ABCG4; ATP8A2; ATP8B1; ATP10A; ATP10D; ATP11A; CIDEA; LIPG; PPARA; VLDLR; ATP8B1; ATP8B3; ATP9A; ATP9B; ATP11A; CPT1B; SLC27A1; STARD4;
				Hypomethylated	ABCA1; ABCG4; ATP8A2; ATP8B1; ATP10D; ATP10A; ATP11A; LIPG; PPARA; VLDLR; ATP8B1; ATP8B3; ATP9A; ATP9B; ATP10A; CPT1B; SLC27A1; STARD4;
lipid transport	$2.46 \times 10^{-10}$	16	139	Hypermethylated	ABCA1; ABCG4; ATP8A2; ATP8B1; ATP10D; ATP10A; ATP11A; LIPG; PPARA; VLDLR;
				Hypomethylated	ATP8B1; ATP8B3; ATP9A; ATP9B; ATP10A; CPT1B; SLC27A1; STARD4;
regulation of lipid storage	$1.48 \times 10^{-2}$	3	27	Hypermethylated	ABCA1; CIDEA; PPARA
				Hypomethylated	
fatty acid metabolic process	$1.79 \times 10^{-10}$	19	209	Hypermethylated	ACOX3; CPT1A; DECR1; ELOVL6; FADS2; ACOXL; SCD; PPARA
				Hypomethylated	ACSL3; ADIPOR1; CPT1A; CPT1B; CPT1C; ELOVL4; ELOVL6; ELOVL7; LPIN1; PRKAA1; PRKAB2; PRKAR2B; SLC27A1
regulation of fatty acid oxidation	$2.33 \times 10^{-5}$	6	33	Hypermethylated	CPT1A; PPARA
regulation of sequestering of triglyceride	$1.74 \times 10^{-2}$	2	9	Hypomethylated	CPT1B; IRS1; PRKAA1; PRKAB2;
				Hypermethylated	CIDEA; PPARA
cholesterol metabolic process	$1.66 \times 10^{-2}$	5	91	Hypermethylated	ABCA1; CYP46A1; CYP51A1; DHCR24; VLDLR
regulation of insulin secretion	$3.26 \times 10^{-5}$	7	54	Hypermethylated	ADRA2A; GIPR; NEUROD1; PFKM; TCF7L2; ADRA2A; CPT1A; IRS1;
				Hypomethylated	IGFBP1; IGF1R; PDK1; PRKCI; PPARA; SLC2A8; VLDLR
response to insulin stimulus	$2.86 \times 10^{-6}$	11	123	Hypermethylated	INSR; IRS1; SLC27A1; SOCS3;
				Hypomethylated	
insulin receptor signaling pathway	$4.44 \times 10^{-4}$	5	36	Hypermethylated	IGFBP1; IGF1R; SLC2A8
				Hypomethylated	INSR; IRS1
glucose homeostasis	$8.11 \times 10^{-9}$	10	51	Hypermethylated	BAD; FOXO3; NEUROD1; PDX1; PFKM; SLC2A4; TCF7L2;
				Hypomethylated	ADRA2A; INSR; IRS1
response to glucose stimulus	$6.03 \times 10^{-4}$	6	62	Hypermethylated	ADRA2A; GIPR; NEUROD1; TCF7L2
				Hypomethylated	ADRA2A; INSR; IRS1;
glucose metabolic process	$7.96 \times 10^{-5}$	10	146	Hypermethylated	ATF4; BAD; CPT1A; PDK1; PDX1; PFKM; SLC2A8
				Hypomethylated	PDK2; PFKL; PFKP
glucose transport	$1.60 \times 10^{-3}$	4	27	Hypermethylated	SLC2A4; SLC2A5; SLC2A8; KLF15;
				Hypomethylated	SLC2A5
regulation of glucose transport	$3.42 \times 10^{-3}$	4	34	Hypermethylated	PRKCI; PRKCZ
				Hypomethylated	INSR; IRS1; PRKCZ
glycolysis	$3.72 \times 10^{-2}$	3	42	Hypermethylated	PFKM
				Hypomethylated	PFKL; PFKP
response to nutrient levels	$8.47 \times 10^{-14}$	24	243	Hypermethylated	BMP7; BMPR2; CYP24A1; CYP27B1; GIPR; IGF1R; LIPG; PPARA; RARA; WNT3; WNT3A; VLDLR
				Hypomethylated	ACSL3; BMP2; BMP4; BMPR2; CEBPA; INSR; PDGFA; RARA; RPTOR; SOCS3; SOD1; WNT3A; WNT7B; WNT9A; WNT9B
fibroblast growth factor receptor signalling pathway	$1.35 \times 10^{-6}$	7	33	Hypermethylated	FGF3; FGF5; FGF9; FGFR1; FRS2
				Hypomethylated	FGF3; FGFR1; FGFR3; KLB
positive regulation of MAPKKK cascade by fibroblast growth factor receptor signalling pathway	$6.41 \times 10^{-3}$	2	5	Hypermethylated	FGFR1
				Hypomethylated	KLB; FGFR1

Table 2. Cont.

Description	Corr <i>p</i> -Value	X	n	Regulation	Genes
fat cell differentiation	$2.86 \times 10^{-7}$	9	56	Hypermethylated Hypomethylated	ADRB1; CTBP2; PRDM16; SLC2A4; TCF7L2; CEBPA; CEBPB; CTBP1; CTBP2; PRDM16
white fat cell differentiation	$1.44 \times 10^{-2}$	2	8	Hypermethylated Hypomethylated	CTBP2 CTBP1; CTBP2
brown fat cell differentiation	$8.44 \times 10^{-5}$	5	25	Hypermethylated Hypomethylated	ADRB1; PRDM16; SLC2A4 CEBPA; CEBPB; PRDM16
positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signalling pathway	$1.95 \times 10^{-3}$	3	12	Hypermethylated Hypomethylated	FGF9; FLT1; VEGFA
response to oxygen levels	$2.87 \times 10^{-5}$	11	158	Hypermethylated Hypomethylated	ATP1B1; PDGFRA; PPARA; SLC2A8; VLDLR ANGPTL4; ATP1B; FLT1; PDGFA; PDGFRA; PRKAA1; SOCS3; VEGFA
response to hypoxia	$9.26 \times 10^{-5}$	10	149	Hypermethylated Hypomethylated	ATP1B1; PPARA; SLC2A8; VEGFA ANGPTL4; ATP1B1; FLT1; PDGFA; PRKAA1; SOCS3; VLDLR
vascular process in circulatory system	$1.24 \times 10^{-2}$	4	51	Hypermethylated Hypomethylated	ADRB1 FGFBP3; SOD1; VEGFA
positive regulation of canonical Wnt receptor signalling pathway	$8.48 \times 10^{-4}$	3	9	Hypermethylated Hypomethylated	WNT3A; WNT7A; WNT2B;
regulation of ossification	$9.96 \times 10^{-7}$	10	86	Hypermethylated Hypomethylated	BMP6; BMP7; BMPR2; CYP27B1; ESRR; GNAS; TFAP2A BMP2; BMP4; BMPR2; GNAS; WNT7B; TFAP2A
regulation of bone mineralization	$1.35 \times 10^{-6}$	7	33	Hypermethylated Hypomethylated	BMPR2; BMP7; BMP6; CYP27B1; TFAP2A; BMP2; BMP4; BMPR2; TFAP2A;
positive regulation of osteoblast differentiation	$2.68 \times 10^{-7}$	7	26	Hypermethylated Hypomethylated	BMPR2; GNAS BMP2; BMP4; BMPR2; GNAS; WNT7B
generation of precursor metabolites and energy	$5.08 \times 10^{-15}$	28	312	Hypermethylated Hypomethylated	ATP6V1B2; ATP6V1C1; ATP6V1E1; FADS2; GIPR; GNAS; NDUFAF1; NDUFA6; NDUFA8; NDUFA9; NDUFA13; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB5; NDUFB7; NDUFS1; NDUFS2; NDUFV2; PDX1; PFKM
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	$3.52 \times 10^{-12}$	12	43	Hypermethylated Hypomethylated	ATP5D; ATP5H; CEBPA; COX7A1; GNAS; NDUFA11; NDUFV3; PFKL; PFKP NDUFA6; NDUFA8; NDUFA9; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB5; NDUFB7; NDUFAF1; NDUFS1; NDUFS2; NDUFV2 NDUFV3;
ATP synthesis coupled electron transport	$9.12 \times 10^{-11}$	12	57	Hypermethylated Hypomethylated	NDUFA6; NDUFA8; NDUFA9; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB5; NDUFB7; NDUFAF1; NDUFS1; NDUFS2; NDUFV2 NDUFV3;
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	$9.12 \times 10^{-11}$	12	57	Hypermethylated Hypomethylated	NDUFA6; NDUFA8; NDUFA9; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB5; NDUFB7; NDUFAF1; NDUFS1; NDUFS2; NDUFV2 NDUFV3;
response to retinoic acid	$2.86 \times 10^{-7}$	9	56	Hypermethylated Hypomethylated	WNT3; WNT3A; RARA; BMP2; BMP4; PDGFA; RARA; WNT3A; WNT7B; WNT9A; WNT9B;
regulation of striated muscle tissue development	$1.16 \times 10^{-2}$	4	50	Hypermethylated Hypomethylated	FGF9; TBX5; FGFR1 BMP4; FGFR1
regulation of apoptosis	$6.59 \times 10^{-5}$	26	852	Hypermethylated Hypomethylated	BAD; BMP7; CEBPB; CIDEA; CFLAR; DHCR24; FGFR1; FOXO3; GATA6; IGF1R; IL7; MYO18A; NDUFA13; NEUROD1; PRKCI; PRKCZ; TBX5; TCF7L2 ANGPTL4; BMP2; BMP4; FGFR1; GATA6; MYO18A; PDE3A; PRKCE; PRKCZ; SOCS3; SOD1; VEGFA

**Table 3.** Results on identified differentially methylated transcription factors genes known to regulate FGF21 expression.

TF (Transcription Factor)	DNA Methylation Status	Region	Selected Regulated Genes <sup>a</sup>	Reference
PPARA	Hypermethylated (2 probes)	Promoter	ACADVL, ACOT7, ACOT8, CYP26A1, FABP1, FBP2, FGF9, FGF21, GAPDH, HNF1A, HSD17B8, IGF2BP1, IL10, IL4, LPL, LRP1, MAP2K3, PDGFB, PPARGC1A, PRDM16, VEGFA	[33]
RORA	Hypermethylated (3 probes)	Promoter: CTCF binding sites	ABCA1, ACOXL, CYP26A1, FGF9, FGF21, IL7, KLF4	[11,34]
ATF4	Hypermethylated (1 probe)	Promoter	ABCA2, CPT1B, CYP26A1, ELOVL5, FGF21, GNAS, NDUFA10, S1PR2, SREBF2	[35,36]
KLF15	Hypermethylated (1 probe)	Promoter	FGF21, NR3C1, PPARA	[13]
NR3C1	Hypermethylated (1 probe) Hypomethylated (1 probe)	Promoter	BMPR2, CD36, CYP26A1, ELOVL6, ESRRA, FGF9, FGF21, IL10, PDGFRA, RORA, SCD, SLC2A2,	[37]

<sup>a</sup> - Selection of targets genes based on TRANSFAC Curated Transcription Factor Targets database [38] and relevant publications.

Further analysis of differentially methylated genes in ClueGO plugin in CytoScape software allowed to create graphic representation of biological processes and pathways (Figure S1). Figure S1 is enclosed as a supplementary file.

DNA microarray results was verified by real-time PCR in 17 samples (8 from high FGF21 group and 9 from low FGF21 group) for selected *ATF4* gene. We demonstrated a statistically significant 2.75-fold decrease in expression of the *ATF4* gene in leukocytes ( $p < 0.05$ ). This result confirms that detected DNA hypermethylation in the promoter of *ATF4* gene regulates its expression in patients with high serum FGF21 level.

### 3.2.2. Results of microRNA Expression Level in Leukocytes:

We demonstrated a statistically significant difference in expression of four miRNAs in peripheral blood leukocytes related to high FGF21 serum levels. Expression of the following miRNAs: hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p and hsa-miR-200c-3p was downregulated and hsa-miR-875-5p was up-regulated (results are presented in Table 4). In Table 4, we also selected targets for miRNAs in relation to high FGF21 (among others the *FGFR1* gene, receptor for FGF21) as well as related to high serum VEGF (*VEGFA* and its binding receptors genes) and low adiponectin (the *ADIPOQ* gene), found to accompany high FGF21 serum levels. Presented in Table 4, target genes for hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-185-5p and hsa-miR-200c-3p were validated in previous manuscripts and/ or information based on selected online datasets. For hsa-miR-875-5p, we chose some putative target genes located in 3'UTR from miRWalk and TargetScan databases.

**Table 4.** Results of the expression of miRNAs by quantitative PCR-TLDA (TaqMan low density array) arrays in leukocytes in the high FGF21 versus low FGF21 group.

miRNA Name	adj. <i>p</i>	FC	Selected Targets
hsa-miR-133a-3p	0.0477	−3.1	FGFR1 VEGFA PRDM16
hsa-miR-185-5p	0.0496	−2.6	FGFR1 VEGFA
hsa-miR-200c-3p	0.0347	−2.2	FGFR1 VEGFA FLT1 KDR TCF7L2
hsa-miR-875-5p	0.0052	13	ADIPOQ CPT1A IRS1 LEP LIPA SLC2A2 SLC2A3 SLC2A4 BMP8A BMPRI1A

#### 4. Discussion

In the current study, we have demonstrated for the first time genome-wide DNA methylation profile and miRNAs expression analysis in white blood cells associated with high serum FGF21 levels in human obese non-diabetic individuals. In our cohort, well-characterised in terms of many circulating active mediators, such as myokines, adipokines, incretins, cytokines and fatty acids, we observed increased parameters of insulin- and GIP resistance, lipids disorders, elevated VEGF, MCP1 and lower adiponectin serum levels suggesting disturbed nutrients signalling and dysregulated inter-organ cross-talk in the high FGF21 group compared to the low FGF21 group.

It is well known that the altered DNA methylation of CpG sites in the genes' promoters, as well as distal regulatory sites, changes gene expression patterns by modifying the interaction of histones, thereby affecting the binding of transcription factors or recruitment of methyl-CpG binding proteins (MBPs) [39,40]. The detected and presented, differentially methylated genes may be responsible for aberrant expression of genes related to high FGF21 level in obese people.

As FGF21 is responsible mainly for glucose and lipid homeostasis we showed altered methylation in a set of genes involved in metabolic pathways of glucose transport (*SLC2A4*, *SLC2A5*, *SLC2A8* and *KLF15*), insulin secretion and signalling (*ADRA2A*, *CPT1A*, *GIPR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *INSR*, *IRS1*, *NEUROD1*, *PDK1*, *PFKM*, *PPARA*, *PRKCI*, *SLC27A1*, *SLC2A8*, *SOCS3*, *TCF7L2* and *VLDLR*) as well as lipid transport, fatty acid metabolism and lipoprotein metabolism and transport (*ABCA1*, *ABCG4*, *ACOX3*, *ACOXL*, *ACSL3*, *ADIPOR1*, *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT1C*, *DECR1*, *ELOVL4*, *ELOVL6*, *ELOVL7*, *FADS2*, *LPIN1*, *PPARA*, *PRKAA1*, *PRKAB2*, *PRKAR2B*, *SCD* and *SLC27A1*). Interestingly, the gene encoding the receptor for insulin (*INSR*) was hypomethylated. Contrary to this, we found hypermethylation of the gene *SLC2A4* (coding for GLUT4, insulin-responsive glucose transporter type 4), which plays a role in glucose uptake from the circulation and has been determined a key regulator of whole body glucose homeostasis [41].

Regarding lipid metabolism, differentially methylated genes: *PPARA*, *LPIN1*, *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT1C*, *ANGPTL4* and *FADS2* are key regulators of liver, adipose tissue, muscle and total lipid homeostasis. *PPARA* (nuclear transcription factor) together with *LPIN1* (acting as a nuclear transcriptional coactivator for PPARGC1A and PPARA) regulate various lipid



metabolic pathways [42,43]. In the liver PPAR $\alpha$  induces the expression of genes involved in fatty acid oxidation, binding, activation, elongation and desaturation, synthesis and hydrolysis of triglycerides and lipid droplets, lipoprotein metabolism, gluconeogenesis and bile acid metabolism pathways [44]. It has been demonstrated on mice models that enhanced lipin expression increases lipogenic gene expression in adipose tissue and promoted fat storage in obesity, whereas in skeletal muscle it participated in energy expenditure and fat utilisation [45]. *CPT1C* gene plays a role in the central control of feeding behaviour and whole-body energy homeostasis [46]. Hypomethylation of leukocytic *CPT1C* gene was previously thought to be associated with increased risk of developing MAFLD [47].

Among five detected TFs known to regulate FGF21 expression, the majority (except 1 probe in *NR3C1* gene) were hypermethylated in patients with high FGF21. PPAR $\alpha$  was activated by endogenous fatty acids and other PPAR $\alpha$  agonists and, in turn, activated expression of FGF21 and genes involved in fatty acids beta-oxidation and ketogenesis pathways [33,48]. Research on mice showed that PPAR $\alpha$  modulated the methylation of liver Fgf21 and represents a form of epigenetic memory that persists from the postnatal period into adulthood that influence the risk of obesity in later life [25]. On the other hand, we did not observe any differences in methylation status of *PPARG*, regulating FGF21 expression in WAT, between the groups. It has been reported previously that glucocorticoid receptor decreases hepatic PPAR $\alpha$  expression and, in consequence, reduces liver FGF21 expression and plasma levels [10] and suppression of nuclear receptor RORA causing a decrease in FGF21 expression [11]. Observed hypermethylation of TFs (*KLF15*, *NR3C1* (glucocorticoid receptor), *RORA* (all regulating hepatic FGF21 expression) and *ATF4* (regulating muscle FGF21 expression)) suggests disturbed regulation of FGF21 in tissues. It was identified that glucose induced Fgf21 mRNA expression through ChREBP activation, as the ChoRE is located in the Fgf21 promoter. The feedback systems of ChREBP regulation are composed of two factors: PPAR $\alpha$  and Fibroblast growth factor-21. Negative feedback is achieved by FGF21, which interacts with PPAR $\alpha$  to repress their own transcription [49]. Although PPAR $\alpha$  is the most important regulator of hepatic FGF21 expression, it is possible that other TFs may be down-regulated by FGF21, which is suggested by our DNA methylation results.

In our study, besides adipomyokine FGF21, two other myokines-myostatin and irisin were measured in the serum. Since circulating myostatin and irisin did not differ between the groups, we supposed that FGF21 was mainly of hepatic origin and not skeletal muscle. Thus, we postulated that high FGF21 levels in our studied group were associated with a metabolic disorder, not induced by exercise. Receptors mediate FGF21 action in target tissues. FGFR1 and FGFR2 are ubiquitously expressed growth factor receptors that mediate most biological functions of the FGF family [4]. Regarding liver FGF21 receptors, hepatic mRNA expression is the highest for FGFR4 and FGFR2, then for FGFR3 and the lowest for FGFR1 [50–52]. We detected differential methylation in *FGFR1* and *FGFR3* receptor genes and their co-factors: *FGFRL1* and *KLB* genes. This is in line with previous studies where it was demonstrated that hepatic levels for  $\beta$ -Klotho, FGFR1 and FGFR3 transcripts were significantly increased in patients with obesity [53]. Interestingly, patients in the high FGF21 group presented simultaneously high level of serum VEGF protein. We detected differential DNA methylation in pathway: positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signalling (with affected genes: *FLT1*, *VEGFA* and *FGF9*).

As non-coding microRNAs are post-transcriptional regulators of genes translation, we analysed the microRNA profile in patients with obesity and high FGF21 levels. Analysis of miRNAs expression in leukocytes revealed a statistically significant decrease in expression of has-miR-133a-3hashsa-miR-185-5hasnd hsa-miR-200c-3p in the group with high FGF21. Previously, it was demonstrated that miR-133 directly targeted and negatively regulated *Prdm16* in mice [54]. In humans, it was shown that circulating miR-133 is high in patients with periprocedural myocardial injury and, as a consequence, decreased fibroblast growth factor (FGFR1) [55]. As FGF21 is known to be activated by stress conditions, low hsa-miR-133a-3p expression in our studied group may be a kind of response to metabolic stress. According to a recent hypothesis, FGF21 is a hormonal mediator of the human “thrifty”

metabolic phenotype; thus, it may be one of the mechanisms of metabolism towards browning of adipose tissue. In studies on human cancer cells inverse correlation of miR-185 and miR-200c to modulate VEGFA translation was found [56,57]. This profile of miRNAs is in line with elevated serum VEGF level detected in the group with high FGF21 from our cohort. The present study revealed the increased expression of hsa-miR-875-5p. There is limited information regarding hsa-miR-875-5p. Potential involvement of hsa-miR-875-5p to regulate TNF, LEP and IRS1 genes in gestational diabetes mellitus was demonstrated in a recent study [58]. Previous studies have shown decreased levels of hsa-miR-875-5p in the adipose tissue of patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [59]. Searching the miRNAs databases, we found potential targets for hsa-miR-875-5p such as: *ADIPOQ* (Adiponectin), *BMP8A* (Bone Morphogenetic Protein 8a), *BMPRI1A* (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A), *CPT1A* (Carnitine Palmitoyl transferase 1A), *IRS1* (Insulin Receptor Substrate 1), *LIPA* (Cholesteryl Esterase), *SLC2A2* (Glucose Transporter Type 2, Liver), *SLC2A3* (Glucose Transporter Type 3, Brain) and *SLC2A4* (Glucose Transporter Type 4, Insulin-Responsive) genes. Selected genes are the key genes regulating lipid and glucose metabolism and may be potential targets for FGF21 action on metabolism. Simultaneously, we demonstrated statistically significant lower adiponectin protein level in serum in individuals with high FGF21; however, to confirm that hsa-miR-875-5p regulate the *ADIPOQ* gene are required further miRNA/mRNA interaction validations.

The main limitation of our study was the analysis of genome-wide DNA methylation and miRNAs expression in limited samples representative for both groups. Thus, results from our high-throughput method gives rise for further studies on targeted DNA methylation. We assessed DNA methylation in peripheral blood cells because they are easily accessible and the collection is acceptable by patients. Although epigenetic studies on different tissue samples are more informative, blood samples are generally used in most studies with non-surgery subjects. Nevertheless, previous studies demonstrated that levels of DNA methylation in blood tend to be broadly correlated with levels in other target tissues [60,61]. This suggests that DNA methylation and miRNAs analysis in leukocytes may reflect epigenetic changes in other tissues (liver, muscles, adipose tissue and bones) relevant for the pathogenesis of glucose and lipid disturbances related to high FGF21 in obesity. Another limitation is investigations among participants with metabolically healthy obesity, excluding general obese population with associated diabetes and cardiovascular diseases or other obesity complications.

## 5. Conclusions

The major finding of this preliminary study is that individuals with high FGF21 presents specific DNA methylation and miRNAs profiles in blood leukocytes. Altered DNA methylation in promoters of transcription factor genes (*PPARA*, *KLF15*, *NR3C1*, *RORA* and *ATF4*) known to regulate FGF21 expression and its binding receptors and co-factors (*FGFR1*, *FGFR3* and *FGFRL1* and *KLB*) has been revealed in relation to the elevated levels of circulating FGF21 in obesity. The mostly regulated processes are insulin secretion and signalling, lipid transport and homeostasis maintenance, thermogenesis and browning of adipose tissue and regulation of ossification and bone mineralization. Additionally, we demonstrated differentially expressed miRNAs known to target and inversely regulate the *FGFR1* and *VEGFA* genes. As DNA methylation is reversible and depends on environmental factors, there is the potential to influence the methylation status of key genes by nutrition and a healthy lifestyle to prevent obesity-related complications [62–65]. These findings give rise for further studies on detailed dietary factors and targeted DNA methylation editing therapies that may regulate revealed genes.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/2/307/s1>, Figure S1: Graph of a biological network of identified as differentially methylated genes created by the ClueGO plugin in Cytoscape software, Table S1: Characteristics of subjects selected for epigenetics study, Table S2: Detail results of identified differentially methylated CpGs probes.

**Author Contributions:** T.P. performed the study, analysed and interpreted the data and drafted the manuscript. A.P. participated in conception and design of the study, analysed the data and revised article critically for important intellectual content. J.G. interpreted the data and revised article critically for important intellectual content. U.R. performed the study and analysed the data. A.D. performed the study and analysed the data. A.M. analysed the data. A.D.-K. participated in conception and design of the study and revised article critically for important intellectual content. B.S. revised article critically for important intellectual content. M.M.-M. participated in conception and design of the study and revised article critically for important intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Study supported by EU FP7 BIOCLAIMS 244995, NCN grant DEC-2011/02/A/NZ2/00022, Polish Ministry of Science and Higher Education grants: K/ZDS/007157 and K/ZDS/007158.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and with the Good Clinical Practice guidelines. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University, Krakow, Poland (file number: KBET/82/B/2009 and KBET/45/B/2012).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data from the BIOCLAIMS study are deposited in Nutritional Phenotype Database <http://www.dbnp.org/nutritional-instance/> (accessed on 19 January 2021)). The data of differentially methylated CpGs probes presented in this study are available in Supplementary materials.

**Acknowledgments:** The authors thank the patients for their cooperation. This research was supported in part by PL-Grid Infrastructure.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflicts of interest to disclose.

## References

- Liu, M.; Cao, H.; Hou, Y.; Sun, G.; Li, D.; Wang, W. Liver Plays a Major Role in FGF-21 Mediated Glucose Homeostasis. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 1423–1433. [\[CrossRef\]](#)
- Tanajak, P.; Pongkan, W.; Chattipakorn, S.C.; Chattipakorn, N. Increased plasma FGF21 level as an early biomarker for insulin resistance and metabolic disturbance in obese insulin-resistant rats. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2018**, *15*, 263–269. [\[CrossRef\]](#)
- Staiger, H.; Keuper, M.; Berti, L.; de Angelis, M.H.; Häring, H.U. Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men. *Endocr. Rev.* **2017**, *38*, 468–488. [\[CrossRef\]](#)
- Yan, H.; Xia, M.; Chang, X.; Xu, Q.; Bian, H.; Zeng, M.; Zeng, M.; Rao, S.; Yao, X.; Tu, Y.; et al. Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Closely Associated with Hepatic Fat Content: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24895. [\[CrossRef\]](#)
- Fontana, L.; Cummings, N.E.; Apelo, S.I.A.; Neuman, J.C.; Kasza, I.; Schmidt, B.A.; Cava, E.; Spelta, F.; Tosti, V.; Syed, F.A.; et al. Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 520–530. [\[CrossRef\]](#)
- Taniguchi, H.; Tanisawa, K.; Sun, X.; Cao, Z. Cardiorespiratory fitness and visceral fat are key determinants of serum fibroblast growth factor 21 concentration in Japanese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 1877–1884. [\[CrossRef\]](#)
- Dushay, J.R.; Toschi, E.; Mitten, E.K.; Fisher, F.M.; Herman, M.A.; Maratos-Flier, E. Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol. Metab.* **2015**, *4*, 51–57. [\[CrossRef\]](#)
- Andersen, B.; Beck-Nielsen, H.; Højlund, K. Plasma FGF21 displays a circadian rhythm during a 72-h fast in healthy female volunteers. *Clin. Endocrinol.* **2011**, *75*, 514–519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bae, K.-H.; Kim, J.-G.; Park, K.-G. Transcriptional regulation of fibroblast growth factor 21 expression. *Endocrinol. Metab.* **2014**, *29*, 105–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marino, J.S.; Stechschulte, L.A.; Stec, D.E.; Nestor-Kalinoski, A.; Coleman, S.; Hinds, T.D. Glucocorticoid receptor  $\beta$  induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25776–25788. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Y.; Solt, L.A.; Burris, T.P. Regulation of FGF21 expression and secretion by retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15668–15673. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tezze, C.; Romanello, V.; Sandri, M. FGF21 as modulator of metabolism in health and disease. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 419. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, Y.D.; Hwang, S.-L.; Jeon, H.-J.; Jeon, Y.H.; Nedumaran, B.; Kim, K.; Lee, S.E. B-cell translocation gene 2 enhances fibroblast growth factor 21 production by inducing Kruppel-like factor 15. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, K.H.; Jeong, Y.T.; Oh, H.; Kim, S.H.; Cho, J.M.; Kim, Y.-N.; Kim, S.S.; Kim, D.H.; Hur, K.Y.; Kim, H.K.; et al. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 83–92. [\[CrossRef\]](#)
- Fisher, F.M.; Chui, P.C.; Antonellis, P.J.; Bina, H.A.; Kharitonov, A.; Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* **2010**, *59*, 2781–2789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Kruse, R.; Vienberg, S.G.; Vind, B.F.; Andersen, B.; Højlund, K. Effects of insulin and exercise training on FGF21, its receptors and target genes in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* **2017**, *60*, 2042–2051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sonoda, J.; Chen, M.Z.; Baruch, A. FGF21-receptor agonists: An emerging therapeutic class for obesity-related diseases. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2017**, *30*. [[CrossRef](#)]
18. Hanks, L.J.; Gutiérrez, O.M.; Bamman, M.M.; Ashraf, A.; McCormick, K.L.; Casazza, K. Circulating levels of fibroblast growth factor-21 increase with age independently of body composition indices among healthy individuals. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* **2015**, *2*, 77–82. [[CrossRef](#)]
19. Zhang, X.; Yeung, D.C.; Karpisek, M.; Stejskal, D.; Zhou, Z.-G.; Liu, F.; Wong, R.L.C.; Chow, W.-S.; Tso, A.W.K.; Lam, K.S.L.; et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* **2008**, *57*, 1246–1253. [[CrossRef](#)]
20. Markan, K.R.; Naber, M.C.; Small, S.M.; Peltekian, L.; Kessler, R.L.; Potthoff, M.J. FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 602–610. [[CrossRef](#)]
21. Ajala, O.; Mora, S. Fibroblast growth factor-21 levels in metabolic syndrome: Another instrument in a widening tool belt? *Atherosclerosis* **2019**, *281*, 143–144. [[CrossRef](#)]
22. Chen, C.; Cheung, B.M.; Tso, A.W.; Wang, Y.; Law, L.S.; Ong, K.L.; Wat, N.M.S.; Xu, A.; Lam, K.S.L. High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of type 2 diabetes: A 5.4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 2113–2115. [[CrossRef](#)]
23. Vinales, K.L.; Begaye, B.; Bogardus, C.; Walter, M.; Krakoff, J.; Piaggi, P. FGF21 is a hormonal mediator of the human “thrifty” metabolic phenotype. *Diabetes* **2019**, *68*, 318–323. [[CrossRef](#)]
24. Hollstein, T.; Piaggi, P. Metabolic Factors Determining the Susceptibility to Weight Gain: Current Evidence. *Curr. Obes. Rep.* **2020**, *9*, 121–135. [[CrossRef](#)]
25. Yuan, X.; Tsujimoto, K.; Hashimoto, K.; Kawahori, K.; Hanzawa, N.; Hamaguchi, M.; Seki, T.; Nawa, M.; Ehara, T.; Kitamura, Y.; et al. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–16. [[CrossRef](#)]
26. Matsuda, M.; DeFronzo, R.A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **1999**, *22*, 1462–1470. [[CrossRef](#)]
27. Glaser, C.; Demmelmair, H.; Koletzko, B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Houseman, E.A.; Molitor, J.; Marsit, C.J. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1431–1439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Maere, S.; Heymans, K.; Kuiper, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinform.* **2005**, *21*, 3448–3449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Vlachos, I.S.; Kostoulas, N.; Vergoulis, T.; Georgakilas, G.; Reczko, M.; Maragkakis, M.; Paraskevopoulou, M.D.; Prionidis, K.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA miRPath v. 2.0: Investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W498–W504. [[CrossRef](#)]
31. Hsu, S.-D.; Lin, F.-M.; Wu, W.-Y.; Liang, C.; Huang, W.-C.; Chan, W.-L.; Tsai, W.-T.; Chen, G.-Z.; Lee, C.-J.; Chiu, C.-M.; et al. miRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D163–D169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dweep, H.; Sticht, C.; Pandey, P.; Gretz, N. miRWalk-database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **2011**, *44*, 839–847. [[CrossRef](#)]
33. Inagaki, T.; Dutchak, P.; Zhao, G.; Ding, X.; Gautron, L.; Parameswara, V.; Li, Y.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Esser, V.; et al. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 415–425. [[CrossRef](#)]
34. Rouillard, A.D.; Gundersen, G.W.; Fernandez, N.F.; Wang, Z.; Monteiro, C.D.; McDermott, M.G.; Ma’ayan, A. The harmonizome: A collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database J. Biol. Databases Curation.* **2016**, *2016*, baw100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Maruyama, R.; Shimizu, M.; Li, J.; Inoue, J.; Sato, R. Fibroblast growth factor 21 induction by activating transcription factor 4 is regulated through three amino acid response elements in its promoter region. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 929–934. [[CrossRef](#)]
36. Joe, Y.; Kim, S.; Kim, H.J.; Park, J.; Chen, Y.; Park, H.J.; Jekal, S.J.; Ryter, S.W.; Kim, U.H.; Chung, H.T. FGF21 induced by carbon monoxide mediates metabolic homeostasis via the PERK/ATF4 pathway. *FASEB J.* **2018**, *32*, 2630–2643. [[CrossRef](#)]
37. Patel, R.; Bookout, A.L.; Magomedova, L.; Owen, B.M.; Consiglio, G.P.; Shimizu, M.; Zhang, Y.; Mangelsdorf, D.J.; Kliewer, S.A.; Cummins, C.L. Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Matys, V.; Fricke, E.; Geffers, R.; Gössling, E.; Haubrock, M.; Hehl, R.; Hornischer, K.; Karas, D.; Kel, A.E.; Kel-Margoulis, O.V.; et al. TRANSFAC: Transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 374–378. [[CrossRef](#)]
39. Rottach, A.; Leonhardt, H.; Spada, F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *108*, 43–51. [[CrossRef](#)]
40. Handel, A.E.; Ebers, G.C.; Ramagopalan, S.V. Epigenetics: Molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 7–16. [[CrossRef](#)]

41. Huang, S.; Czech, M.P. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 237–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tyagi, S.; Gupta, P.; Saini, A.; Kaushal, C.; Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2*, 236–240. [[CrossRef](#)]
43. Rashid, T.; Nemazany, I.; Paolini, C.; Tatsuta, T.; Crespin, P.; Villeneuve, D.; Brodesser, S.; Benit, P.; Rustin, P.; Baraibar, M.A.; et al. Lipin1 deficiency causes sarcoplasmic reticulum stress and chaperone-responsive myopathy. *EMBO J.* **2019**, *38*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kersten, S.; Stienstra, R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochim.* **2017**, *136*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Phan, J.; Reue, K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 73–83. [[CrossRef](#)]
46. Stark, R.; Reichenbach, A.; Andrews, Z.B. Hypothalamic carnitine metabolism integrates nutrient and hormonal feedback to regulate energy homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *418*, 9–16. [[CrossRef](#)]
47. Tilg, H.; Effenberger, M. From NAFLD to MAFLD: When Pathophysiology Succeeds. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2020**, *17*, 387–388. [[CrossRef](#)]
48. Badman, M.K.; Pissios, P.; Kennedy, A.R.; Koukos, G.; Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 426–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Iizuka, K. Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism. *Endocr. J.* **2013**, *60*, 543–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Fisher, F.M.; Estall, J.L.; Adams, A.C.; Antonellis, P.J.; Bina, H.A.; Flier, J.S.; Kharitonov, A.; Spiegelman, B.M.; Maratos-Flier, E. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology* **2011**, *152*, 2996–3004. [[CrossRef](#)]
51. Lin, Z.; Pan, X.; Wu, F.; Ye, M.D.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Jin, L.; Lian, Q.; Huang, Y.; Ding, H.; et al. Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice. *Circulation* **2015**, *131*, 1861–1871. [[CrossRef](#)]
52. Kurosu, H.; Choi, M.; Ogawa, Y.; Dickson, A.S.; Goetz, R.; Eliseenkova, V.; Mohammadi, M.; Rosenblatt, K.P.; Kliewer, S.A.; Kuro-o, M. Tissue-specific Expression of  $\beta$ Klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21. *NIH Public Access* **2008**, *282*, 26687–26695.
53. Gallego-Escuredo, J.M.; Gomezambrosi, J.; Catalan, V.; Domingo, P.; Giralt, M.; Frühbeck, G.; Villarroya, F. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Trajkovski, M.; Ahmed, K.; Esau, C.C.; Stoffel, M. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1330–1335. [[CrossRef](#)]
55. Zhou, Y.; Chen, Z.; Chen, A.; Ma, J.; Qian, J.; Ge, J. Elevated serum miR-133a predicts patients at risk of periprocedural myocardial injury after elective percutaneous coronary intervention. *Cardiol. J.* **2020**. [[CrossRef](#)]
56. Qoriansas, N.; Renovaldi, D.; Raditya, J.; Lestari, P.; Signa, N.; Gumilas, S.; Heriyanto, D.S.; Ratnasari, N.; Mubarka, S. Expression of circulating miR-200c and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) mRNA as potential biomarker in human hepatocellular carcinoma. *J. Med. Sci. (Berk. Ilmu Kedokt.)* **2018**, *50*. [[CrossRef](#)]
57. Wang, R.; Tian, S.; Wang, H.B.; Chu, D.P.; Cao, J.L.; Xia, H.F.; Ma, X. MiR-185 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Vegfa. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4438–4447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Azodi, M.Z.; Rezaei-Tavirani, M.; Rezaei-Tavirani, M.; Robati, R.M. Gestational diabetes mellitus regulatory network identifies hsa-mir-145-5p and hsa-mir-875-5p as potential biomarkers. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2019**, *17*, 3.
59. Estep, M.; Armistead, D.; Hossain, N.; Elarainy, H.; Goodman, Z.; Baranova, A.; Chandhoke, V.; Younossi, Z. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**, *32*, 487–497. [[CrossRef](#)]
60. Houde, A.-A.; Légaré, C.; Biron, S.; Lescelleur, O.; Biertho, L.; Marceau, S.; Tchernof, A.; Vohl, M.C.; Hivert, M.F.; Bouchard, L. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet.* **2015**, *16*, 1–10. [[CrossRef](#)]
61. Walle, P.; Männistö, V.; De Mello, V.D.; Vaitinen, M.; Perfiyev, A.; Hanhineva, K.; Ling, C.; Pihlajamäki, J. Liver DNA methylation of FADS2 associates with FADS2 genotypex 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *Clin. Epigenetics* **2019**, *11*, 24–30.
62. Ali, O.; Cerjak, D.; Kent, J.W.; James, R.; Blangero, J.; Carless, M.A.; Zhang, Y. Methylation of SOCS3 is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. *Epigenetics* **2016**, *11*, 699–707. [[CrossRef](#)]
63. Shen, J.; Zhu, B. Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 7636–7644. [[CrossRef](#)]
64. Guo, K.; Eid, S.A.; Elzinga, S.E.; Pacut, C.; Feldman, E.L.; Hur, J. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression identifies candidate genes for human diabetic neuropathy. *Clin. Epigenetics* **2020**, *12*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hanzawa, N.; Hashimoto, K.; Yuan, X.; Kawahori, K.; Tsujimoto, K.; Hamaguchi, M.; Tanaka, T.; Nagaoka, Y.; Nishina, H.; Morita, S.; et al. Targeted DNA demethylation of the Fgf21 promoter by CRISPR/dCas9-mediated epigenome editing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

### **9.3. Oświadczenia współautorów**

Kraków, dnia 03.02.2022 r.

Mgr inż. Teresa Płatek

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia". Płatek T, Polus A, Górska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 50 % i polegał na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 14.02.2022

Dr hab. Anna Polus

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

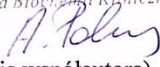
Jako współautor pracy: "DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10% i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

02903 dr hab. n. med. Anna Polus  
diagnosta laboratoryjny  
...Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej  
Katedra Biochemii Klinicznej UJCM  
  
(podpis współautora)



Kraków, dnia 10.02.2022r.

Dr Joanna Góralska

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- krytycznej ocenie manuskryptu oraz edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

Zakład Biochemii Klinicznej,  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM

dr n. med. Joanna Góralska  
.....

(podpis współautora)

Kraków, dnia...11.02.2021

Dr Urszula Rażny

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

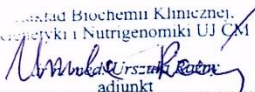
Jako współautor pracy: "DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na:

- wykonaniu oznaczeń biochemicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

Katedra Biochemii Klinicznej,  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM  
  
..... adiunkt .....

(podpis współautora)

Kraków, dnia.....11.02.2022

Dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ  
Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

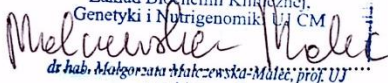
Jako współautor pracy: "DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia". Płatek T, Polus A, Górska J, Raźny U, Gruca A, Kieć-Wilk B, Zabielski P, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Solnica B, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A. Mol Med. 2020 Oct 7;26(1):93 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- interpretacji wyników pracy,
- krytycznej ocenie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

Zakład Biochemii Klinicznej,  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM  
  
dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ  
p.o. kierownik  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 03.02.2022 r.

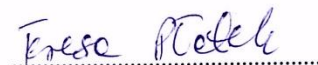
Mgr inż. Teresa Płatek

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 50 % i polegał na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 14.02.2022

Dr hab. Anna Polus

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

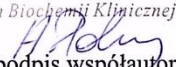
Jako współautor pracy: „Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects”. Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

02903 dr hab. n. med. Anna Polus  
diagnosta laboratoryjny  
Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej  
Katedra Biochemii Klinicznej UJCM  
  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 10.02.2022

Dr Joanna Góralska

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy: "Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- pozyskaniu finansowania oznaczeń poziomu FGF21 w surowicy pacjentów,
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- krytycznej ocenie manuskryptu oraz edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

  
Zakład Biochemii Klinicznej,  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM  
dr n. med. Joanna Góralska  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 11.02.2022

Dr Urszula Rażny

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects". Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5 % i polegał na:

- wykonaniu oznaczeń biochemicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

Zakład Biochemii Klinicznej,  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM  
*Urszula Rażny*  
.....  
M. Sc. med. Urszula Rażny  
adiunkt

(podpis współautora)

Kraków, dnia 11.02.2022

Dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof. UJ  
Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński- Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE

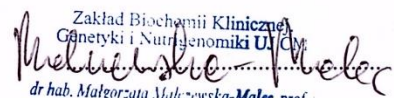
Jako współautor pracy: „Epigenetic Regulation of Processes Related to High Level of Fibroblast Growth Factor 21 in Obese Subjects”. Płatek T, Polus A, Góralska J, Rażny U, Dziewońska A, Micek A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Malczewska-Malec M. Genes (Basel). 2021 Feb 21;12(2):307. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań,
- interpretacji wyników pracy,
- krytycznej ocenie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Teresę Płatek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr inż. Teresy Płatek polegający na:

- opracowywaniu koncepcji badań,
- wykonywaniu części eksperymentalnej (wykonaniu oznaczeń metylacji DNA),
- analizie, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rycin,
- przygotowaniu manuskryptu pracy w zakresie opisu rezultatów oraz dyskusji i finalnych wniosków, a także edycji tekstu.

Zakład Biochemii Klinicznej  
Genetyki i Nutrigenomiki UJ CM  
  
dr hab. Małgorzata Malczewska-Malec, prof.,  
p.o. kierownik

(podpis współautora)