

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Zuzana Čočková**

**Modulace funkce RNA demetylázy FTO v SH-SY5Y buňkách:  
vliv na insulinovou signalizaci a mitochondriální respiraci**

**Modulation of RNA demethylase FTO function in SH-SY5Y cells: the  
effect on insulin signaling and mitochondrial respiration**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2017

Podpis

## **Poděkování**

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za trpělivost, odborné vedení a důvěru, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce poskytoval, a také Mgr. Petru Telenskému, Ph.D. za cenné konzultace a velmi vřelý přístup. Za maximální vstřícnost a rady při práci na oxygrafu děkuji RNDr. Jitce Žurmanové Ph.D., RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. a Mgr. Elišce Flégrové. Velký dík patří také kolektivu v laboratoři za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu okamžitě poradit.

V neposlední řadě jsem vděčná své rodině a přátelům, kteří mě podporovali v průběhu psaní diplomové práce i celého studia.

Tato práce byla podpořena grantem GAUK-898616.

## Abstrakt

Cílem práce bylo pozorovat vliv inhibice funkce FTO na oxidativní metabolismus a expresní profil neuroenergeticky významných proteinů v modelové linii lidských neuronálních buněk SH-SY5Y. FTO je enzym demetylující N6-metyladenosin ve strukturách RNA. Změny v expresi enzymu jsou doprovázeny poměrně širokým spektrem efektů souvisejících s energetickou homeostázou.

Mitochondrie jsou místem tvorby energie, metabolicky významných substrátů, ale také potenciálně nebezpečných reaktivních forem kyslíku a jiných molekul. V popředí zájmu proto bylo studium mitochondriálního respiračního řetězce. Experimenty vysokorezoluční respirometrie ukázaly, že ovlivnění buněk inhibitorem FTO je doprovázeno změnami v mitochondriální respiraci. Pozorována byla zejména snížená endogenní respirace buněk a významný pokles byl zaznamenán v maximální a rezervní kapacitě elektron-transportního řetězce. Vyšší koncentrace používaného inhibitoru navíc vedla k markantnějším změnám v respiraci. Dále byla metodou Western blotu kvantifikována exprese komplexů dýchacího řetězce. Ve shodě s výše zmíněnými výsledky se ukázalo, že buňky ovlivněné inhibitorem FTO mají snížené hladiny podjednotek některých komplexů. Určitý pokles byl zaznamenán u podjednotek komplexů I a IV. Zdaleka nejvýraznější rozdíl byl však pozorován u komplexu II. Žádné změny nebyly zjištěny u podjednotek komplexu III a ATP syntázy. Mitochondriální dysfunkci může doprovázet nefyziologická míra produkce ROS. Využitím fluorescenčních sond H<sub>2</sub>DCFDA a DHE se podařilo naměřit vyšší hladiny ROS v případě pokusné skupiny buněk s inhibovaným FTO.

Druhým stěžejním tématem práce byla insulinová signalizace. Metodou Western blotu byly identifikovány změny v expresi vybraných proteinů insulinové signální dráhy. Po inhibici FTO se zvýšily hladiny insulinového receptoru, a také insulin degradujícího enzymu. Poměry p-Akt/Akt a p-p38/p38 se výrazně snížily, naopak bylo pozorováno zvýšení poměru p-ERK/ERK. Bez signifikantních změn zůstala exprese p110 podjednotky PI3K a poměr p-GSK3β/GSK3β.

Výsledky této práce naznačují, že aktivita FTO ovlivňuje metabolické a signální pochody uvnitř neuronálních buněk. Další studium tohoto enzymu může bezpochyby přispět k hlubšímu pochopení bioenergetických pochodů nervového systému.

Klíčová slova: FTO; mitochondrie; insulinová signalizace; rehin; energetický metabolismus

## **Abstract**

Aim of this thesis was to observe changes in oxidative metabolism and expression of important neuroenergetic proteins in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y due to inhibition of FTO. FTO is a RNA demethylase that uses N6-methyladenosine as substrate. Differences in enzyme expression are connected to broad area of effects involving energy homeostasis.

Mitochondria are cellular powerhouses, a key elements in production of energy and metabolic substrates, yet a source of potentially dangerous reactive oxygen species (ROS) and analogous reactive molecules. In order to better understand FTO purpose in neuronal energetic metabolism, we examined mitochondrial respiratory chain. Using high-resolution respirometry we were capable of observing impairment in mitochondrial respiration after FTO inhibition. There was considerable decline in endogenous respiration, maximal respiration rate and reserve capacity. In order to obtain more detailed view into mitochondrial respiration, expression levels of electron-transport complexes were quantified by Western blot technique. Slight reduction was identified in subunits of complex I and IV. However, the most prominent alteration was seen in complex II subunit. There were no differences in expression of complex III and ATP synthase subunits. Beside disrupted activity of electron-transport system, ROS production can reflect mitochondrial dysfunction. By using fluorescence probes, we managed to observe increased ROS production in cells treated with FTO inhibitor.

Furthermore, we studied how FTO inhibition affects insulin signaling. Expression of selected proteins involved in insulin signaling was detected by Western blot. Increased levels of insulin receptor and insulin degrading enzyme accompanied FTO inhibition. Additionally, decreased ratio of p-Akt/Akt and p-p38/p38 together with elevated ratio of p-ERK/ERK was observed. Minimal difference was sighted in PI3K p110 expression or p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio.

Taken together, these results suggest considerable link between FTO activity and neuronal signaling and metabolic actions. Further research could undoubtedly prove to be beneficial in gaining knowledge about bioenergetics processes in the nervous system.

Key words: FTO; mitochondria; insulin signaling; rhein; energetic metabolism

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>8</b>
2.1 <i>FTO</i> .....	8
2.1.1 Mechanismus fungování FTO.....	9
2.1.2 FTO a bioenergetický metabolismus .....	9
2.1.3 Inhibitor FTO: rhein.....	11
2.2 <i>BIOENERGETIKA MOZKOVÉ TKÁNĚ</i> .....	11
2.2.1 Insulinová signalizace .....	11
2.2.1.1 Signalizační kaskáda.....	12
2.2.1.1.1 PI3K/Akt.....	14
2.2.1.1.2 MAPK.....	14
2.2.2 Mitochondrie .....	14
2.2.2.1 Stavba.....	15
2.2.2.2 Mitochondrie a buněčná energetika .....	15
2.2.2.3 Buněčná respirace .....	16
2.2.2.3.1 Komplex I.....	17
2.2.2.3.2 Komplex II.....	17
2.2.2.3.3 Ubichinon .....	18
2.2.2.3.4 Komplex III .....	18
2.2.2.3.5 Cytochrom c.....	18
2.2.2.3.6 Komplex IV.....	18
2.2.2.3.7 F1-Fo ATPáza .....	19
2.2.2.4 Mitochondriální ROS produkce.....	19
2.2.3 Střet insulinové signalizace a mitochondriální aktivity.....	20
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>22</b>
<b>4 Materiál a metody</b> .....	<b>23</b>
4.1 <i>Kultivace buněk</i> .....	23
4.1.1 Ovlivnění buněk rheimem .....	23
4.2 <i>MTT test</i> .....	23
4.3 <i>SDS-PAGE elektroforéza</i> .....	24
4.3.1 Příprava vzorků:.....	24
4.3.2 Stanovení proteinů – metoda BCA.....	25

4.3.3	Elektroforetická separace proteinů .....	25
4.4	<i>Western blot</i> .....	26
4.5	<i>Vysokorezoluční respirometrie</i> .....	28
4.5.1	Úvod do metody .....	28
4.5.2	Měření respirace izolovaných mitochondrií.....	31
4.5.2.1	Sklízení buněk a izolace mitochondrií.....	31
4.5.2.2	Oxygrafické měření .....	31
4.5.3	Měření respirace na permeabilizovaných buňkách.....	32
4.5.3.1	Optimalizace koncentrace digitoninu .....	32
4.5.3.2	Sklízení a počítání buněk.....	33
4.5.3.3	Oxygrafické měření .....	33
4.6	<i>Detekce intracelulárních ROS</i> .....	34
4.7	<i>Analýza dat</i> .....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>36</b>
5.1	<i>Viabilita buněk</i> .....	36
5.2	<i>Ověření přítomnosti FTO</i> .....	37
5.3	<i>Detekce proteinů insulinové signalizace</i> .....	37
5.3.1	Insulinový receptor.....	37
5.3.2	Insulin degradující enzym.....	38
5.3.3	PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ signalizační dráha .....	39
5.3.4	MAPK signální kaskáda .....	40
5.3.4.1	ERK1/2, p-ERK1/2 .....	40
5.3.4.2	p38, p-p38 .....	41
5.4	<i>Respirace</i> .....	42
5.4.1	Izolované mitochondrie .....	42
5.4.2	Permeabilizované buňky .....	45
5.5	<i>Detekce proteinových podjednotek komplexů respiračního řetězce</i> .....	50
5.6	<i>Produkce ROS</i> .....	51
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>61</b>

## Seznam zkratek

AA	antimycin A
AAS	roztok antibiotik a antimykotik
AD	Alzheimerova demence
ADP	adeonsindifosfát
Akt	proteinkináza B (alternativně PKB)
AlkBH	dioxygenáza nukleových kyselin
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná kináza
APOE4	apolipoprotein E4
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bichoninová
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BSA	hovězí sérový albumin
CI	komplex I
CII	komplex II
CIII	komplex III
CIV	komplex IV
CV	komplex V
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin dependentní proteinkináza
CNS	centrální nervový systém
CREB	protein vázající cAMP-responzivní element
cyt c	cytochrom c
DCF	dichlorodihydrofluorescein
DHE	dihydroethidium
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DRP-1	s dynaminem asociovaný protein 1
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina etylenglykolbis(2-aminoetyler)-N,N,N',N'-tetraoctová
ERK	extracelulárním signálem řízená kináza
ETF	flavoprotein transportující elektrony
ETS	elektron-transportní systém
FAD/ FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylylhydrazon
FMN/FMNH	flavinmononukleotid
FOXO1	Forkhead box O1 protein
FTO	fat mass and obesity associated protein
GLUT1-4	glukózový transportér typ 1-4
GSK3β	glykogensyntáza kináza 3 beta
H <sub>2</sub> DCFDA	dichlorodihydrofluorescein diacetát

HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-etan sulfonová
IDE	insulin degradující enzym
INS	insulinový gen
INSR $\beta$	beta řetězec insulinového receptoru
IOK	index odprážené kontroly
IR	insulinový receptor
IRK	index respirační kontroly (IR <sub>B</sub> K - bazální; IR <sub>M</sub> K - maximální)
IRS	insulinový receptorový substrát
m <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -metyladenosin
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MIR05	mitochondriální respirační médium
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
mTORC1	savčí cíl rapamycinu komplex 1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup> /NADH	nikotinadenindinukleotid
NF $\kappa$ B1	nukleární faktor $\kappa$ B1
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
PGC1 $\alpha$	koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů
PH	pleckstrin homologní doména
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol 4,5-difosfát
PIP3	fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát
PKB	proteinkináza B (alternativně Akt)
PNS	post-nukleární supernatant
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNA	kyselina ribonukleová
RRK	respirační rezervní kapacita
SAM	S-adenosylmethionin
SDS	dodecylsírán sodný
SINKO	neuronálně specifický Sirt1 knockout
Sirt1	sirtuin 1
SNP	bodový polymorfismus
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TBHP	tert-butyl hydroperoxid
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin (alt. Krebsův cyklus)
TIM	transportér vnitřní mitochondriální membrány
TNF	tumor nekrotizující faktor
TOM	transportér vnější mitochondriální membrány
TSC	komplex tuberózní sklerózy
UCP-1	odpřahovací protein 1
VDAC	napětově závislý aniontový kanál

# 1 Úvod

FTO je demetyláza RNA, jejíž in vivo substrátem je N6-metyladenosin (Jia et al., 2011). Chemické modifikace náleží mezi klíčové regulátory biologických procesů. Odlišnosti v chemickém složení nukleových kyselin mají potenciální schopnost ovlivnit osud a funkci těchto molekul v buňce. Změny v lokalizaci, stabilitě nebo interakčních vlastnostech molekul RNA pak předznamenávají škálu odlišně regulovaných buněčných pochodů (Liu and Jia, 2014). FTO byl jedním z prvních genů identifikovaných v souvislosti s geneticky podmíněnou predispozicí k obezitě (Hinney et al., 2007). Řada následných experimentů na buněčné i organismální úrovni odhalila spojitost aktivity proteinu FTO s množstvím metabolických a energetických dějů.

V posledních letech se ukazuje, že narušení buněčného metabolismu centrálního nervového systému a s tím související metabolické poruchy zřejmě mohou mít spojitost s propuknutím neurodegenerativních pochodů a se zhoršením kognitivních funkcí u pacientů s mírnou kognitivní poruchou či Alzheimerovou demencí (AD) (Shen et al., 2014). Řada novějších hypotéz usilujících o vysvětlení etiopatogeneze AD klade důraz na poruchy energetického metabolismu, ke kterým v počátcích i pozdním průběhu onemocnění dochází. Mezi tyto hypotézy patří například hypotéza "diabetu 3. typu" (de la Monte and Wands, 2008) vysvětlující etiopatogenezi onemocnění insulinovou rezistencí mozkové tkáně, či hypotéza inverzního Warburgova efektu (Demetrius et al., 2014), která si všímá poškození funkce mitochondrií a snížené glykolytické aktivity mozku.

Defekty v mitochondriálních funkcích či insulinové signalizaci mohou vyústit v narušení bioenergetické rovnováhy, a být tak činitelem přispívajícím k rozvoji závažných patologických stavů. Z tohoto pohledu je velmi důležité identifikovat významné regulátory energetické homeostáze mozku, což může přispět k hledání efektivních terapeutických cest v léčbě či prevenci neurodegenerativních onemocnění. FTO, nacházející se v řadě metabolicky aktivních tkání včetně centrálního nervového systému, by mohl být vodítkem k lepšímu pochopení procesů odehrávajících v kontextu energetického metabolismu a možnosti jejich regulace.

## 2 Literární přehled

### 2.1 FTO

Počátky zkoumání FTO jsou asociovány s tzv. Fused toes mutací u myši. Heterozygotní mutanti byli postiženi narušeným procesem programované buněčné smrti a trpěli závažnými vývojovými malformacemi v podobě abnormálních kraniofaciálních struktur, poškozeného hypotalamu či srostlých prstů. Podstatou mutace byla delece v genomické sekvenci zahrnující 6 po sobě jdoucích genů, mezi nimi i do té doby neidentifikovaný gen FTO (van der Hoeven et al., 1994; Peters et al., 1999).

Následné pokusy zasahující cíleně do FTO odhalily poněkud odlišné fenotypické charakteristiky. Vedle zvýšené postnatální mortality vykazovaly mutantní myši alterace v tělesné váze a příjmu potravy, a také růstovou retardaci. Podobné projevy byly pozorovány také po deleci FTO specificky v nervovém systému, což naznačuje důležitou roli centrálně lokalizovaného FTO (Gao et al., 2010).

Z řady animálních studií vyplynulo, že fenotypické projevy asociované s rizikovou variantou FTO nastávají v důsledku pozměněných hladin exprese enzymu. Myši s přílišnou expresí tohoto enzymu vykazují zvýšený příjem potravy a trpí nadváhou (Church et al., 2010), kdežto snížená exprese má spíše protektivní účinky proti obezitě (Church et al., 2009). Úplné potlačení exprese se však nezdá být efektivní strategií v boji proti obezitě, neboť jak bylo výše zmíněno, je doprovázeno řadou vývojových retardací (Fischer et al., 2009). Ztráta funkce FTO se může projevit narušením časného vývoje organismů patrně v důsledku změny funkce kritických signalizačních kaskád (Osborn et al., 2014).

U lidí je delece FTO genu spjata s množstvím závažných symptomů. Objevuje se taktéž růstová retardace, a dále mikrocefálie, narušení mozkových funkcí, vzácněji i strukturální změny v mozku a poruchy srdeční činnosti (Boissel et al., 2009). Méně závažné, přesto nežádoucí důsledky má pro člověka polymorfismus FTO. V rámci celogenomové asociační studie byla identifikována souvislost bodového polymorfismu (z angl. single nucleotide polymorphism) FTO genu s predispozicí jedinců k nadměrné tělesné hmotnosti a jejich nežádoucích komorbidit, jako je diabetes 2. typu, hypertenze a kardiovaskulární problémy (Frayling et al., 2007).

Odchytky v genetickém úseku kódujícím FTO jsou dále spojovány s rizikem nástupu mnoha neuropatologických stavů jako mrtvice, epilepsie, deprese, narušení kognitivních

funkcí a Alzheimerova demence (Keller et al., 2011; Rivera et al., 2012; Rowles et al., 2012; Timpson et al., 2009).

### **2.1.1 Mechanismus fungování FTO**

Výsledky bioinformatických analýz zařadily FTO k rodině a 2-oxoglutarát a Fe<sup>II</sup>-dependentních dioxygenáz (Gerken et al., 2007), jejíž členové se účastní pochodů oprav nukleových kyselin, posttranslačních modifikací histonů a metabolismu mastných kyselin (Loenarz and Schofield, 2008). In vivo substrátem FTO je N6-metyladenosin (m6A) ve strukturách mRNA (Jia et al., 2011).

N6-metyladenosin je nejpočetnější modifikací mRNA (Wei et al., 1975). S vysokou frekvencí je tato modifikace zastoupena i ve strukturách mozku, kde její úroveň navíc roste při maturaci neuronů (Meyer et al., 2012). Za vznik metyladenosinu jsou zodpovědné metyltransferázy. Detailnější molekulární mechanismus metylace N6-adenosinu nebyl doposud zcela objasněn. Potlačení funkce metyltransferázy však vede k významným změnám genové exprese a odlišnému alternativnímu sestřihu (Dominianni et al., 2012). Antagonisticky působící FTO by se tak mohl uplatňovat jako důležitý epigenetický regulátor. Spojitost demethylace m6A v důsledku aktivity FTO a genové exprese již byla demonstrována. Myši s knockoutem FTO měli zvýšené hladiny m6A některých genů dopaminergní signalizační dráhy a exprese těchto genů byla zároveň redukována (Merkestein et al., 2014). Při nadměrné expresi FTO ve svalových buňkách bylo identifikováno nad 1000 odlišně regulovaných genů (Bravard et al., 2014). Poměrně recentní výzkum také ukázal na spojitost FTO se sestřihem mRNA. Nezbytná role FTO řízené demethylace m6A byla pozorována v procesu diferenciaci adipocytů (Merkestein et al., 2015; Zhao et al., 2014a).

Avšak kromě přímé demetylační aktivity působí FTO zřejmě ještě jinými mechanismy. Některé recentní studie naznačují schopnost tohoto enzymu ovlivňovat expresi jiných genů skrze interakce na velkou vzdálenost (Jowett et al., 2010; Ragvin et al., 2010; Smemo et al., 2014). Jinde se hovoří o FTO jako o senzoru živin. Původní hypotéza, že by FTO mohl ovlivňovat energetický metabolismus jakožto senzor 2-oxoglutarátu však byla vyvrácena v práci Ma a spol. (Ma et al., 2012). Odlišná teorie přiřazuje FTO funkci senzoru cirkulujících aminokyselin spíše než hladin 2-oxoglutarátu (Gulati et al., 2013; Cheung et al., 2013).

### **2.1.2 FTO a bioenergetický metabolismus**

Z výsledků výzkumu vyplývá silný vztah mezi aktivitou FTO a energetickým metabolismem. FTO je exprimován v mnoha vysoce metabolicky aktivních tkáních, jako je

CNS, kosterní svalstvo, srdce, játra, slinivka a tuková tkáň. Regulace FTO mRNA je dávana do souvislosti s ovlivněním exprese genů účastnících se procesů glukóзовé homeostáze - geny kódující neurotrofní faktory (TNF, NF $\kappa$ B1), AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK), insulinový (INS) gen či gen KCNJ11 kódující K<sub>ATP</sub> kanál (Pitman et al., 2012; Zhao et al., 2014b). Knockdown FTO je v buňkách doprovázen změnami hladin ATP a míry vychytávání glukózy, přičemž průběh těchto změn je závislý na typu buněk (Pitman et al., 2012). V pankreatických  $\beta$  buňkách a ve svalech je exprese FTO spojena s oxidativním stresem a ovlivňuje insulinovou senzitivitu (Bravard et al., 2011; Fan et al., 2015). Nedostatek FTO v adipocytech vede k odprášení dýchacího řetězce a ke zvýšení produkce odpráhujícího proteinu UCP-1 (Tews et al., 2013). V jaterní tkáni interaguje FTO s leptinem a signalizačními drahami signálního přenašeče a aktivátoru transkripce STAT3 - důležitého regulátoru mitochondriálního i glukóзовého metabolismu (Bravard et al., 2014).

FTO působí nejen na periférii, ale podílí se na regulaci i skrze centrální mechanismy. Centrálně lokalizovaný FTO hraje v regulaci energetické homeostáze pravděpodobně stěžejní roli, neboť knockout FTO specifický pro mozkové struktury vykazuje stejný fenotyp jako při deficienci enzymu v celém organismu (Gao et al., 2010). Vysoké hladiny FTO v mozku a zejména v hypotalamických jádrech (nc. arcuatus, nc. paraventricularis, nc. dorsomedialis, nc. ventromedialis) podporují představu o schopnosti FTO ovlivňovat apetitivní chování a příjem potravy (Fredriksson et al., 2008). Na molekulární úrovni byla odhalena interakce FTO s dopaminergní transmisí středního mozku (Hess et al., 2013). Má také vliv na signalizační kaskády zahrnující Ca<sup>2+</sup>/kaldmodulin dependentní proteinkinázu II (CaMKII) a protein vázající cAMP-responzivní element (CREB). Při nadměrné expresi FTO interaguje s CaMKII, čímž prodlužuje dobu působení transkripčního faktoru CREB, a tím kvantitativně ovlivňuje expresi jeho substrátů (mozkový neurotrofický faktor BDNF, receptor neuropeptidu Y) (Lin et al., 2014). Oba tyto proteiny byly v minulosti identifikovány ve vztahu k energetické homeostáze (Thorsell and Heilig, 2002; Yang et al., 2016). Rizikové SNP varianty genu pro FTO mohou negativně ovlivnit celkovou velikost mozku člověka (Ho et al., 2010) i vyšší kognitivní funkce (Benedict et al., 2011). Zvyšuje se také riziko rozvoje mírné kognitivní poruchy a Alzheimerovy choroby, zejména u pacientů s rizikovou alelou apolipoproteinu APOE4 (Keller et al., 2011; Shen et al., 2014). Míra exprese FTO také ovlivňuje fosforylaci proteinu tau v buněčném modelu neuronálních SH-SY5Y buněk (Jason T Fong et al., 2013).

### 2.1.3 Inhibitor FTO: rhein

Z řady testovaných sloučenin byl jako nejpotentnější inhibitor FTO identifikován rhein. V rámci in vitro studií byla odhalena jeho schopnost kompetitivně se vázat do aktivního místa na FTO. Působení rheinu bylo doprovázeno vzrůstem m<sup>6</sup>A v mRNA, přičemž tato schopnost inhibovat demetylaci m<sup>6</sup>A se ukázala být závislá na použité koncentraci rheinu (Chen et al., 2012).

Účinky rheinu jakožto bioaktivní látky obsažené v rebarboře (*Rheum palmatum*), která je součástí tradiční čínské medicíny, byly studovány nezávisle na znalostech o jeho inhibičních schopnostech. Zajímavé je, že se při tom opakovaně objevovaly výsledky o ovlivnění metabolismu živin (Liu et al., 2001; Sheng et al., 2011; Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2008) nebo funkce mitochondrií (Du et al., 2013; Liu et al., 2013; Mao et al., 2017).

Nevýhodou farmakologického zásahu může však být nízká míra selektivity použitého farmaka. Li a spol. zjistili, že rhein je schopen inhibovat nejen FTO, ale i další členy AlkBH rodiny (Li et al., 2016), náležící k superrodině 2-oxoglutarát a Fe<sup>II</sup>-dependentních dioxygenáz.

## 2.2 BIOENERGETIKA MOZKOVÉ TKÁNĚ

Ačkoliv přispívá k hmotnosti člověka pouhými 2%, procesy zajišťující normální mozkové funkce disponují vysokými energetickými požadavky a nárokují si až pětinu celkové tělesné spotřeby kyslíku (Jain et al., 2010). Energie je nezbytná pro vedení akčních potenciálů v neuronech, pro transmissi signálů a umožňuje zachování neuroplasticity. Není proto divu, že deficity v distribuci energie pak vyústí v nedostatečnou nervovou aktivitu a přispívají ke stárnutí či neurodegenerativním pochodům (Lam et al., 2009; Mattson and Magnus, 2006; Yap et al., 2009).

### 2.2.1 Insulinová signalizace

Za určitých podmínek, jako například při hladovění, dokáží pokrýt nároky mozkové tkáně ketolátky, nicméně hlavním energetickým substrátem je glukóza (Cunnane et al., 2016). V neuronálních buňkách, které postrádají schopnost tvorby zásobního glykogenu, je přítomnost glukózy v buňkách závislá na vychytávání tohoto paliva z okolního prostředí pomocí glukózových přenašečů. Existuje řada isoform glukózových transportérů, přičemž jejich exprese je buněčně specifická. Na astrocytech je dominantní isoforma GLUT1, zatímco neurony exprimují hlavně vysokoafinitní a vysokokapacitní GLUT3 (McEwen and Reagan,

2004). Několik studií však naznačuje u určitých neuronálních populací také přítomnost GLUT4, transportéru významného pro insulin senzitivní tkáň (Brant et al., 1993; Leloup et al., 1996; El Messari et al., 1998). Většina GLUT4 je v buňkách přítomna v transportních váčcích a teprve po přijetí signálu ve formě insulinu se GLUT4 rychle začleňuje do membrány a zprostředkovává absorpci glukózy (Malide et al., 1997).

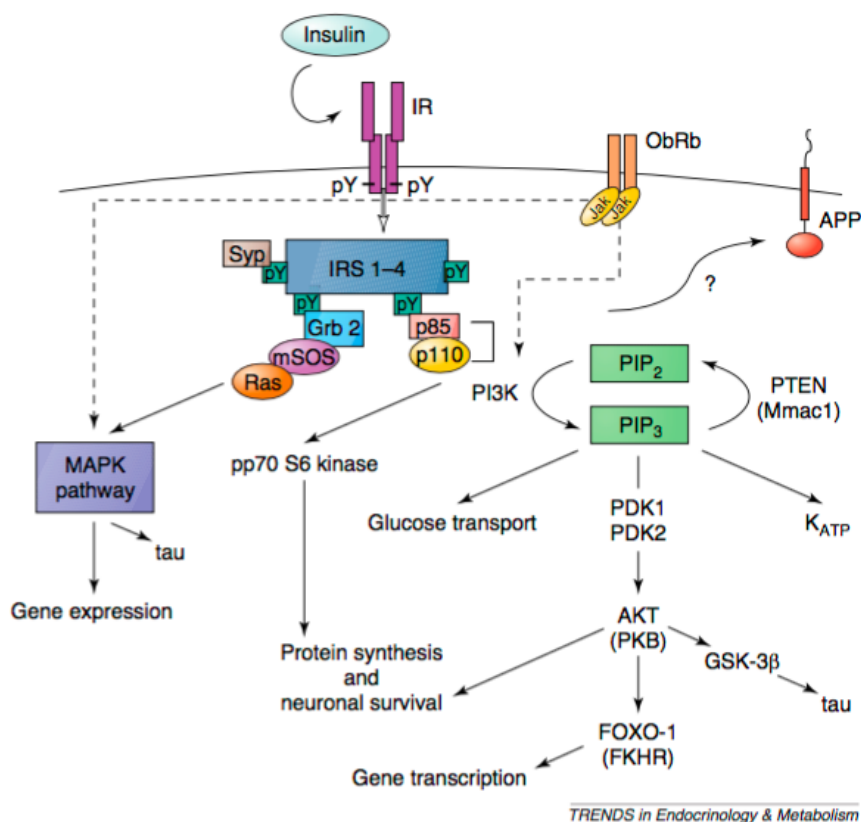
Kromě potenciálního ovlivnění vychytávání glukózy má insulinová signalizace v mozku řadu jiných významných rolí. Podílí se na regulaci energetické homeostáze a přežívání neuronů (Plum et al., 2005). Doposud byla identifikována spojitost centrální insulinové signalizace s regulací metabolismu živin, tělesné hmotnosti a ovlivněním příjmu potravy, stejně jako s procesy neuronálního vývoje a kognitivními funkcemi (Gaspar et al., 2016). Odchytky v insulinové signalizaci mohou přispívat k aberantnímu stavu organismu. Rozvíjí se různá metabolická onemocnění a přibývají důkazy o souvislosti s neuropatologickými chorobami (Frölich et al., 1998; Takahashi et al., 1996). V posledních letech je intenzivně zkoumána zejména spojitost s Alzheimerovou chorobou (AD). Mozek pacientů trpících AD vykazuje snížené hladiny insulinového receptoru a narušenou signální dráhu, která má pravděpodobně příčinnou souvislost s rozvojem markerů AD jako je hyperfosforylace tau a intracelulární tvorba  $\beta$ -amyloidních plaků (de la Monte and Wands, 2008; Mullins et al., 2017; Sajan et al., 2016).

Podobně i přítomnost insulin degradujícího enzymu (IDE) v mozku podporuje hypotézy o významu centrální insulinové signalizace. IDE byl identifikován v několika mozkových oblastech, s celulárním výskytem zejména v neuronech, ale též v gliových a endotelových buňkách (Bernstein et al., 2008). Aktivita IDE je často zmiňována ve spojitosti s AD, jelikož IDE je schopen rozkládat kromě insulinu také  $\beta$ -amyloid. Při expozici malému množství  $\beta$ -amyloidu je IDE upregulován, ale za vysokých hladin amyloidu začne být degradativní činnost IDE nedostatečná a zvýšená přítomnost insulinu pak zřejmě vede k rozvoji insulinové rezistence mozkové tkáň (Lynch et al., 2006).

### **2.2.1.1 Signalizační kaskáda**

Insulin zprostředkovává šíření signálu do buňky prostřednictvím insulinového receptoru (IR). Z prekurzorového proteinu mohou alternativním sestřihem vznikat 2 varianty receptoru, které se zřejmě odlišují v tkáňové specifitě. Delší z variant, IR-B, je přednostně lokalizován na periférii v klasických insulin senzitivních tkáních, kdežto IR-A je rozšířen v mozku (Kosaki et al., 1998; Suzuki et al., 2012). Insulinový receptor je heterotetramer o 2  $\alpha$  a 2  $\beta$  podjednotkách (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985). Náleží mezi receptory s tyrozin kinázovou aktivitou, po stimulaci ligandem dochází k autofosforylaci, a tím ke zvýšení

aktivity receptoru (Tornqvist et al., 1987). Aktivovaný receptor následně šíří přijatý signál aktivací řady efektorových molekul skrze fosforylaci jejich tyrozinových zbytků. Množství těchto intracelulárních substrátů zapojených v odpovědi na insulin vypovídá o vysoké komplexitě insulinové signalizace. Mezi nejvýznamnější skupinu patří rodina IRS, zejména pak IRS-1 a IRS-2. IRS-1 se účastní v procesech na periférii a při regulaci tělesného růstu, aktivita IRS-2 byla pozorována v souvislosti s kolísáním tělesné hmotnosti, glukózovou homeostázou i růstu mozku. Fosforylace IRS vede k aktivaci dalších složek signální kaskád, a to zejména drah PI3K/Akt a MAPK (White, 2003). Ilustrativní schéma insulinové signalizace v neuronálních buňkách je na obrázku (Obr. 1).



Obr. 1 Insulinová signalizace. Vazba insulinu na receptor iniciuje signalizační pochody regulující množství biologických efektů. Tyrozin-kinázová aktivita receptoru vyúsťuje ve fosforylaci specifických tyrozinových míst na IRS. Do těchto míst se pak váží proteiny obsahující SH-2 (src-homology-2) domény, jako například p85 podjednotka PI3K, Grb 2 nebo Syp. Vazbou zprostředkovaná aktivace příslušných proteinů vede na jedné straně k fosforylaci PIP<sub>2</sub>, a na druhé k aktivaci dráhy Ras/MAPK. Množství efektorových signálních molekul zapojených v těchto procesech zajišťuje ve výsledku spektrum rozmanitých biologických efektů, zahrnujíc regulaci genové transkripce, syntézu proteinů, apoptotické procesy či fosforylaci tau. Zkratky: FOXO-1, forkhead box protein O1A; Grb2, adaptorový protein 2 pro receptor růstového faktoru; Jak, janus kináza; MAPK, mitogenem aktivovaná proteinkináza; mSOS, son of sevenless; ObRb, leptinový receptor; PDK, protein-dependentní kináza; PI3K, fosfatidylinositol 3-kináza; PIP<sub>2</sub>, fosfatidylinositol 4,5-difosfát; PIP<sub>3</sub>, fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát; PTEN, fosfatáza a homolog tensinu; Ras, Ras malá GTPáza; Syp, proteinová tyrozinofosfatáza. Převzato z: (Plum et al., 2005).

#### 2.2.1.1.1 PI3K/Akt

PI3K/Akt je dráha mající esenciální roli při přežívání buněk, vychytávání glukózy a její utilizaci. PI3K je kináza skládající se z katalytické (p110) a regulační (p85) podjednotky, schopná fosforylovat nejen proteiny, ale i fosfolipidy. IRS interaguje s p85 podjednotkou PI3K, což vede k zacílení enzymu do buněčné membrány, kde dojde fosforylací PIP2 k tvorbě k PIP3. Zvýšení hladin PIP3 je signálem k rekrutmentu a aktivaci dalších proteinů, které obsahují PH doménu (pleckstrin homologní doména). Důležitým proteinem je Akt kináza (někdy také PKB). Akt moduluje metabolismus vícero cestami. Svou fosforylační funkcí jednak inaktivuje TSC komplex, čímž aktivuje mTORC1, a v důsledku toho je ovlivněna translace proteinů a buněčný růst. Fosforylace působí inhibičně také na GSK3 $\beta$ . Běžně pak v buňkách klesá syntéza glykogenu, ale v neuronech je signalizace GSK3 $\beta$  asociována s odlišnými procesy. Klíčovou roli hraje při vývoji neuronů a reorganizaci cytoskeletu. Činností Akt také dochází k inaktivaci transkripčního faktoru FOXO1, významného regulátoru metabolických pochodů (Gaspar et al., 2016; Lu et al., 2012).

#### 2.2.1.1.2 MAPK

MAPK jsou důležitým převodníkem extracelulárních stimulů do buněčných signálů. Jedním z těchto stimulů je pravděpodobně také insulin a s ním související efektorové látky. Aktivace IR vede k vazbě molekul vyúsťující ve spuštění Ras/ERK1/2 dráhy. Kinázy ERK jsou dále schopné fosforylovat proteiny cytoskeletální i signální, včetně jiných MAPK či aktivátoru transkripce v jádře (Blázquez et al., 2014). Jinou z kináz, která se ukázala být ovlivněna po stimulaci insulinem je p38 MAPK (Antonescu et al., 2005). Tento enzym je spojován převážně s odpovědí buňky na stres a v mozku pak s neurozánětlivými procesy, ale jeho biologická funkce bude zřejmě přesahovat tento typ odpovědi (Roux a Blenis, 2004). Jak vyplývá z některých studií, p38 se podílí pravděpodobně také na kontrole neuronálních funkcí. V kontextu AD se p38 ukazuje jako molekula ovlivňující synaptickou plasticitu a vysoká imunoreaktivita p-p38 byla pozorována v neuronech postižených amyloidními plaky a hyperfosforylovaným tau (Giraldo et al., 2014; Lauretti and Praticò, 2015; Sun, 2003).

### 2.2.2 Mitochondrie

Nezbytnou součástí energetického metabolismu buněk tvoří mitochondrie. Vznik mitochondrií se odhaduje na dobu před více než 1,45 mld. lety procesem endocytózy obligatorně nebo fakultativně anaerobní bakterie předchůdcem eukaryotických buněk (Martin et al., 2015). Jako pozůstatek této události obsahují vlastní cirkulární genom, který byl v průběhu evoluce značně zredukován přechodem genů do jaderné DNA. Z přibližných 1500

mitochondriálních proteinů je pouze 13 zakódováno v mitochondriální DNA (Taanman, 1999).

Mitochondrie jsou organely dynamicky měnící svou strukturu. Běžně podléhají změnám velikosti, počtu a tvaru díky procesům dělení, fragmentace či fúzí. Tato tzv. mitochondriální dynamika umožňuje správné fungování, bez kterého by byla narušena jak dědičnost mtDNA, tak regulace energie (Chen and Chan, 2009).

### **2.2.2.1 Stavba**

Podobně jako bakterie mají také 2 membrány, které jsou funkčně odlišné a mezi nimiž se utváří mezimembránový prostor. Vnější membrána je bohatě osázena poriny a poměrně nespecificky propouští soluty do 10 kDa. Jsou v ní zanořeny i specializované přenašeče (např. TOM), kanály (VDAC), pro-apoptotické proteiny a oxidázy. Vnitřní membrána má specifické složení zahrnující fosfolipid kardiolipin a úplnou absenci cholesterolu. Obklopuje makromolekulárně bohatý vnitřek mitochondrie zvaný matrix, kde se rozprostírá mitochondriální DNA a ribosomy, proteiny katalyzující reakce Krebsova cyklu (TCA), beta-oxidace a pyruvátdehydrogenázového aparátu, a v neposlední řadě množství rozpuštěných molekul jako  $O_2$  či  $CO_2$ . Ve vnitřní mitochondriální membráně jsou vedle transportérových proteinů TIM a SAM zakotveny enzymy elektron-transportního systému a oxidativní fosforylace (Nicholls et al., 2013a). Invaginací vnitřní membrány vznikají vchlípeniny, krysty, díky čemuž je povrch membrány mnohonásobně zvětšen. Jako důvod se uvažuje i lokální zvýšení hustoty náboje/pH ke stimulaci ATP syntázy (Cogliati et al., 2016).

### **2.2.2.2 Mitochondrie a buněčná energetika**

Bylo zmíněno, že hlavním energetickým substrátem mozku je glukóza. Aby mohla být využita, je v buňkách fosforylována hexokinázou na glukóza-6-fosfát, a dále zpracována v procesu glykolýzy za vzniku pyruvátu, ATP a NADH. Pyruvát pak může vstoupit do mitochondrie, kde je metabolizován pyruvátdehydrogenázovým systémem na acetylkoenzym A a následně zpracován TCA cyklem pro pohon oxidativní fosforylace a tvorbu univerzálního energetického platidla, ATP. Činnosti mitochondrií připadá stěžejní podíl v bioenergetickém metabolismu. Oxidací glukózy se tvoří daleko více energie ve formě ATP než při glykolýze (Magistretti and Allaman, 2015). Neurony jsou na oxidativní fosforylaci v podstatě závislé, na rozdíl od jiných buněčných typů nejsou schopné přechodu na glykolytickou produkci ATP při omezené respiraci (Knott et al., 2008).

Mitochondrie jsou multifunkční organely, které kromě respirace spřažené s oxidativní fosforylací zajišťují i řadu odlišných, avšak propojených funkcí. Přispívají k odpovědi

na buněčný stres a účastní se redoxní a vápníkové signalizace. Schopností spustit programovanou buněčnou smrt rozhodují o přežívání buněk (Nunnari et al., 2012).

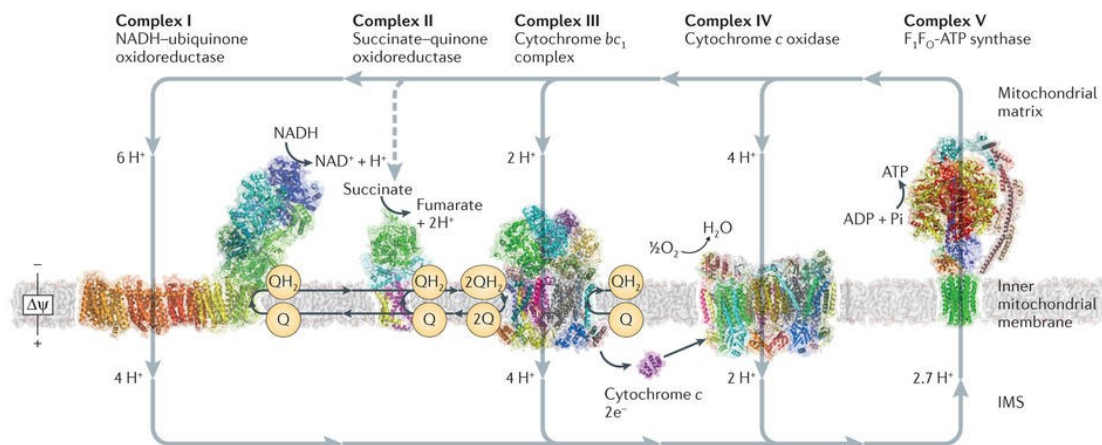
Adaptace k měnícím se bioenergetickým požadavkům buňky je nezbytnou schopností mitochondrií. Zvýšená poptávka po ATP, například při cvičení, je doprovázena přibýváním mitochondriálního obsahu a vzrůstem aktivity. Naopak na vysokou dodávku živin reaguje řada buněk utlumením mitochondriální biogeneze a stimulací procesů glykolýzy, syntézy glykogenu a tvorby tukových zásob (Liesa and Shirihai, 2013). Schopnost reagovat na měnící se metabolický status je zprostředkována buněčnými senzory. Mezi ně se řadí AMPK a NAD<sup>+</sup>-dependentní deacetyláza, Sirt1. AMPK je aktivní při zvýšení poměru AMP:ATP, typicky při zvýšení výdeje nebo snížení příjmu energie. Fosforylací řady substrátů pak vyvolává upregulaci katabolických drah a oxidativní fosforylace na úkor inhibice procesů anabolických, včetně buněčného růstu a proliferace. Sirt1 odpovídá na nárůst hladin NAD<sup>+</sup> při hladovění a skrze ovlivnění transkripčního faktoru PGC1 $\alpha$  iniciuje sekvenci dějů k optimalizaci mitochondriální produkce ATP pro žádoucí buněčný stav (Gao et al., 2014). Odpověď nutričních sensorů je také tkáňově specifickým jevem. Hypotalamická AMPK má navíc důležitou spojitost s funkcemi regulace příjmu potravy a je citlivá k metabolickým signálům z periferie (López et al., 2016).

### **2.2.2.3 Buněčná respirace**

Respirace je sledem reakcí, které mají za úkol konvertovat přijaté živiny do bioenergetických substrátů využitelných pro buněčné procesy.

Oxidací substrátů v TCA v matrix mitochondrií vznikají redukované koenzymy NADH a FADH<sub>2</sub>, dotující elektrony komplexům elektron-transportního systému (ETS) ve vnitřní mitochondriální membráně. Zde je energie elektronů zpracována sérií redoxních reakcí a využita k přenosu protonů z matrix do mezimembránového prostoru a budování elektrochemického potenciálu. Ten je dále využíván k aerobní fosforylaci ADP na ATP aktivací ATP syntázy, ale i k jiným procesům, např. importu proteinů nebo transportu iontů.

Vedle zmíněných koenzymů tvoří ETS (Obr. 2) 4 multiproteinové transmembránové komplexy: NADH-dehydrogenáza, sukcinát-dehydrogenáza, cytochrom c-reduktáza, cytochrom c-oxidáza; a 2 pohyblivé přenašeče: koenzym Q (ubichinon) a cytochrom c (Nunnari et al., 2012).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obr. 2 Přehled komplexů a mobilních elektronových přenašečů elektron-transportního systému na vnitřní mitochondriální membráně. Komplexy I, III a IV jsou spojeny s přenosem protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Komplex V (ATP syntáza) využívá gradient protonů k fosforylaci ADP. Protože je konečným akceptorem elektronů kyslík, nazývá se mitochondriální tvorba ATP oxidativní fosforylací. Zkratky: ADP, adenosindifosfát; ATP, adenosintrifosfát; IMS, mezimembránový prostor; NAD, nikotinamidadeninukleotid; Pi, fosfát; Q, ubichinon; QH<sub>2</sub>, ubichinol;  $\Delta\psi$ , membránový potenciál. Převzato ze: (Sazanov, 2015).

### 2.2.2.3.1 Komplex I

Komplex I představuje svými cca 40 podjednotkami o celkové molekulární hmotnosti čítající přibližně 1 MDa největší komplex respiračního řetězce. Pro transfer elektronů se zde nachází flavinmononukleotid (FMN) a 7-8 Fe-S redoxních center.

Respirace je zahájena oxidací NADH na FMN. Dvěma elektrony redukovaný FMNH<sub>2</sub> je dále reoxidován ve dvou krocích, vždy za uvolnění jednoho elektronu a jeho přenosu sérií Fe-S center, přičemž přechodně vzniká radikálová forma FMNH<sup>•</sup>. Oba elektrony jsou nakonec využity k redukci ubichinonu na ubichinol. Celý proces je spřažen s transferem 4 H<sup>+</sup> z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru a tvorbou elektrochemického potenciálu (Sazanov, 2015).

### 2.2.2.3.2 Komplex II

Komplex II je naopak nejmenším, zhruba 140 kDa velkým komplexem o 4 jaderně kódovaných podjednotkách. Přes kovalentně vázaný FAD, katalyzující přeměnu sukcinátu na fumarát je přímo spojen s TCA. Sukcinátem redukovaný FADH<sub>2</sub> odevzdává oba elektrony pomocí 3 Fe-S center na ubichinon, nedochází však k žádnému přenosu protonů přes mitochondriální membránu (Maklashina and Cecchini, 2010).

#### 2.2.2.3.3 Ubichinon

Ubichinon je mobilní přenašeč vyskytující se uvnitř vnitřní mitochondriální membrány. Po redukci komplexem I nebo II, ale i dalšími mitochondriálními enzymy (ETF-ubichinon oxidoreduktáza, dihydroorotát dehydrogenáza, glycerolfosfát dehydrogenáza) putuje ve formě ubichinolu ke komplexu III (Nicholls et al., 2013b).

#### 2.2.2.3.4 Komplex III

Komplex III reoxiduje ubichinol procesem označovaným jako Q cyklus. Ubichinol, který se naváže do Q<sub>o</sub> místa komplexu odevzdá jeden elektron na Rieskeho Fe-S centrum, druhý je přijat molekulou hemu bL. Elektron z Fe-S klastru putuje přes cytochrom c<sub>1</sub> přímo na další mobilní přenašeč, cytochrom c. Elektron z hemu bL se přesune nejprve na hem bH a následně je v místě Q<sub>i</sub> využit k redukci jiné molekuly ubichinonu za vzniku semichinonu. Až při reoxidaci nově přichází molekuly ubichinolu, která je zdrojem dalších 2 elektronů, je semichinon plně redukován na ubichinol, opouští Q<sub>i</sub> místo a může se zapojit do respiračního cyklu v Q<sub>o</sub> místě. Oxidací dvou molekul ubichinolu je tak přeneseno po 2 elektronech a 4 H<sup>+</sup> (Crofts, 2004).

#### 2.2.2.3.5 Cytochrom c

Cytochrom c se nachází v mezimembránovém prostoru, navázán na vnějším listu vnitřní mitochondriální membrány, kde slouží k transferu elektronů z komplexu III na finální složku respiračního řetězce, komplex IV. Na rozdíl od ubichinolu je cyt c schopen přenášet pouze jeden elektron (Lange and Hunte, 2002). Cyt c navíc zastává důležitou signalizační funkci. Pokud je uvolněn z mitochondrie do cytosolu, je rozpoznán jako pro-apoptický signál a buňka je určena k degradaci (Liu et al., 1996).

#### 2.2.2.3.6 Komplex IV

Konečným akceptorem elektronů je enzym cytochromoxidáza redukující O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O. Komplex IV tvoří 10 jaderných a 3 mitochondriálně kódované podjednotky. Esenciální v transportním mechanismu jsou podjednotky COXI a COXII. COXI obsahuje hem a a bimetalické centrum hem a<sub>3</sub>/CuB, COXII pak zahrnuje 2 atomy mědi v centru CuA. CuA odebírá elektrony z cyt c, přenáší je na hem a a centrum hem a<sub>3</sub>/CuB, kde jsou využity k redukci O<sub>2</sub>. K elektrochemickému potenciálu přispívá komplex IV přenosem protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Za 4 přijaté elektrony (ze 4 cyt c) jsou přečerpány 4 H<sup>+</sup> a současně vytvořeny 2 molekuly H<sub>2</sub>O redukcí O<sub>2</sub> (Yoshikawa et al., 2012).

#### 2.2.2.3.7 F1-Fo ATPáza

Nastrádaný protonový gradient generovaný komplexy I, III a IV je hnací silou F1-Fo ATPázy (alt. ATP syntázy). F1-Fo ATPáza, někdy též označovaná jako pátý komplex dýchacího řetězce, se skládá z 16 podjednotek uspořádaných do 2 molekulárních celků: F1 a Fo.

Hydrofilní F1 motor je situován do mitochondriální matrix a obsahuje po 3 podjednotkách  $\alpha$  a  $\beta$  a v jedné kopii podjednotky  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . F1 zajišťuje syntézu ATP nebo v případě reverzního chodu jeho hydrolyzu. Fo rotor vázaný ve vnitřní mitochondriální membráně přenáší protony po jejich elektrochemickém gradientu. U savců je Fo jednotka tvořena 8 do kruhu uspořádanými podjednotkami c a proteiny a, b, d, e, f, g, (A6L), F6. Spojení obou částí F1-Fo ATPázy je realizováno dvěma proteinovými vlákny. Podjednotky  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  komplexu F1 utváří hlavní vlákno. Periferní stonek je tvořen z podjednotek b, d a F6 komplexu Fo a proteinu citlivého k oligomycinu (Baker et al., 2012; Jonckheere et al., 2012).

Mechanismus syntézy ATP je založen na spřažení proton-motivní síly elektrochemického gradientu s konformačními změnami, které ve výsledku umožňují fosforylaci ADP. Protony přecházející z mezimembránového prostoru do matrix přes komplex Fo způsobují rotaci „c8-kruhu“ a s ním spojené podjednotky  $\gamma$  a  $\epsilon$ . Rotující asymetrická  $\gamma$  podjednotka vynucuje změnu konformace v katalytických místech  $\alpha_3\beta_3$  hexameru F1. Přenos 8 protonů umožňující otočku podjednotky o  $360^\circ$  vede k a syntéze 3 molekul ATP (von Ballmoos et al., 2009).

#### 2.2.2.4 Mitochondriální ROS produkce

Elektron-transportní řetězec je také místem produkce ROS, vysoce reaktivních molekul odvozených z kyslíku nebo vody, které jsou v případě abnormálního výskytu zdrojem nežádoucího buněčného stresu a poškození buněčných elementů. Za běžného chodu ETS se 1-2%  $O_2$  neúplně redukuje a vzniká superoxid (Sas et al., 2007). Nevyváženost produkce superoxidu pak vede k tvorbě  $H_2O_2$  (Loschen et al., 1974). Transientní produkce ROS má svůj fyziologický význam. V mozku je například zapojena do fenoménu synaptické plasticity. Bylo demonstrováno, že ROS modulují dlouhodobou potenciaci, a tudíž procesy učení a formování paměti. Nerovnováha v tvorbě ROS však může vést k poškození mitochondrií. Mitochondriální dysfunkce, ať už je jejím zdrojem neadekvátní redoxní či vápníková signalizace, abnormální mitochondriální dynamika nebo narušená oxidativní fosforylace je spojována s neuronálními defekty, které přispívají k patogenezi neurodegenerativních chorob (De Felice and Ferreira, 2014).

### 2.2.3 Střet insulinové signalizace a mitochondriální aktivity

Na jedné straně zmíněné vlivy insulinové signalizace a na druhé bioenergetický přínos mitochondriální respirace nejsou dvěma nezávislými pochody. Insulinová signalizace a mitochondrie mohou vzájemně svou činnost ovlivňovat nebo jsou současně regulovány buněčnými procesy spuštěnými v odpověď na různé příchozí výzvy.

Jednou z cest je zmíněná aktivace Sirt1-PGC1 $\alpha$  dráhy při vzrůstu poměru NAD<sup>+</sup>/NADH. Deacetylase PGC1 $\alpha$  vede jednak ke zvýšení příjmu a utilizace substrátů, jednak je stimulována biogeneze mitochondrií a vzrůstá respirace. (Gao et al., 2014). Kromě toho, že Sirt1 indukuje sekreci insulinu v pankreatických  $\beta$  buňkách, několika cestami zasahuje také do insulinové signalizační dráhy. V insulin senzitivních buňkách reguluje fosforylaci IRS-1, IRS-2 a Akt kinázy (Liang et al., 2009). Myši SINKO (s neuronálně-specifickým knockoutem Sirt1) disponovali zvýšenou citlivostí tkání k insulinu. V hypotalamické buněčné linii s inhibovaným Sirt1 byla po podání insulinu potenciována fosforylace Akt a FOXO1 (Lu et al., 2013). Důležité přitom je místo, kde k fosforylaci dochází. Fosforylace FOXO1 Akt kinázou vede k jeho ubiquitinaci a degradaci (Matsuzaki et al., 2003), ale působením proteinkináz na jiných serinových/treoninových zbytcích než při fosforylaci Akt kinázou může být iniciováno posílení transkripční aktivity FOXO1 (Tikhanovich et al., 2013) a s ním asociované snížení oxidace NADH. Pokles poměru NAD<sup>+</sup>/NADH ve výsledku vede k pozastavení transkripce enzymů účastnících se metabolismu a mitochondriálních funkcí (Cheng et al., 2009). Mezi kinázy schopné fosforylovat FOXO1 patří také ERK1/2 a p38 (Asada et al., 2007).

Aktivní Akt kináza je schopna translokovat do mitochondrií a fosforylovat zde lokalizované proteiny. Mezi identifikované substráty Akt kinázy po její akumulaci v mitochondriích patří  $\beta$  podjednotka ATP syntázy a GSK3 $\beta$  (Bijur and Jope, 2003). Pokusy s konstitutivně aktivní mitochondriální GSK3 $\beta$  ukázaly, že nadměrná aktivita je nežádoucí a vede k řadě mitochondriálních defektů (pokles aktivity komplexu I, snížená tvorba ATP, zvýšení produkce ROS) (King et al., 2008). Mitochondriální GSK3 $\beta$  je také schopna inaktivace pyruvátdehydrogenázy (Hoshi et al., 1996). Regulací GSK3 $\beta$  pomocí fosforylace na zbytku Ser9, jež vede k potlačení aktivity enzymu, by tak mohla být zachována, ne-li dokonce stimulována kapacita elektron-transportního procesu.

V mitochondriích vznikající H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> může přímo regulovat insulinovou signalizaci přes redoxně-senzitivní cysteinové zbytky ve strukturách insulinového receptoru (IR) a insulinového receptorového substrátu (IRS). Autofosforylace IR spuštěná vlivem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> má zřejmě signifikantní význam pro neurony. Persiyantseva a spol. ve své práci ukazují, že

k aktivaci neuronálních insulinových receptorů je potřeba nejen vazba insulinu, ale i dosažení určitého prahu signalizace  $H_2O_2$ . Autoři také spekulují o možnosti rozvoje centrální insulinové rezistence v důsledku narušení mitochondriální  $H_2O_2$  signalizace (Persiyantseva et al., 2013).

### **3 Cíle práce**

1. Charakterizovat změny ve funkci mitochondriálního elektron-transportního řetězce v neuronálních SH-SY5Y buňkách navozené farmakologickým blokováním FTO demetylázy rheinem.
2. Sledovat vliv inhibice FTO demetylázy rheinem na expresi vybraných proteinů insulinové signalizace v neuronální buněčné linii SH-SY5Y.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Kultivace buněk

Jako experimentální model byla použita lidská neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y (American Type Culture Collection). Buňky byly pěstovány v plastových kultivačních lahvích (75cm<sup>2</sup>) při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> v kultivačním médiu s přidavkem 1% roztoku antibiotik a antimykotik (AAS, Sigma-Aldrich). Médium bylo měněno za čerstvé každé 2-3 dny. Po dosažení cca 90% konflunce buněk v lahvi byly buňky pasážovány. Během pasážování bylo odsáto médium a k buňkám přidány 2 ml roztoku trypsin/EDTA, ředěného s PBS v poměru 1:10. Do 10 minut se buňky uvolnily ze dna nádoby a trypsin byl poté neutralizován přidáním dvojnásobného množství kultivačního média.

Sklízení buněk probíhalo mechanicky pomocí stěrky do vychlazeného PBS. Následným stočením na centrifuze Hettich Universal 320 R (10 min, 1800 rpm, 4°C) byl získán buněčný pelet, který byl využit k dalším experimentům.

Materiál:

**Kultivační médium:** 1:1 směs DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma-Aldrich); 10% FBS (fetální bovinní sérum, Gibco)

**PBS:** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno dH<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH 7,4

**Trypsin:** koncentrace 5 mg/ml (rozpuštěn v EDTA)

#### 4.1.1 Ovlivnění buněk rheinem

Rhein (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v 0,1 M NaOH na 5 mM zásobní roztok, který byl skladován v (-20°C) po dobu maximálně jednoho měsíce. Pro ovlivnění buněk byl rhein přidán do média vždy 24 h před zahájením případného pokusu.

### 4.2 MTT test

Pro analýzu buněčné viability MTT testem byly buňky pěstovány na 96 jamkových destičkách ve 100 µl média na jamku. Část jamek byla vždy vyhrazena jako blank a obsahovala pouze čisté médium bez buněk. Po požadovaném ovlivnění buněk bylo médium z jamek odsáto a nahrazeno čerstvým. Do každé jamky bylo následně přidáno 10 µl roztoku MTT a celá destička ponechána k inkubaci ve 37°C po dobu 2,5 h. Kvůli smíšenému chování

buněk SH-SY5Y, které mají schopnost přecházet mezi adherentním a suspenzním stavem, byla destička po uplynutí času stočena na centrifuze Hettich Universal 320 R. Z každé jamky bylo odsáto 85  $\mu$ l jejího obsahu a přidáno 50  $\mu$ l detergentu DMSO (dimetylsulfoxid). Následovala krátká (10 min) inkubace ve tmě při 37°C, a poté spektrofotometrické měření na přístroji Synergy HT při vlnové délce 540 nm.

Materiál:

**MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid):** koncentrace 5 mg/ml (rozpuštěn v PBS)

### 4.3 SDS-PAGE elektroforéza

#### 4.3.1 Příprava vzorků:

Pelet získaný po sklizení buněk byl resuspendován v přiměřeném množství TMES pufru s 0,02% směsí inhibitorů proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail) a 1% směsí inhibitorů fosfatáz (Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Z buněk byl dále sonikací po dobu 20 s získán celobuněčný lyzát nebo byly buňky homogenizovány injekční stříkačkou s jehlou, homogenát stočen na centrifuze Hettich Mikro 200 R (10 min, 1000 g, 4°C) a zachován pouze supernatant neobsahující jadernou frakci (post-nukleární supernatant, PNS). Nadbytek buněčného lyzátu a PNS byl zmrazen v tekutém dusíku a uložen do (-80°C) pro pozdější použití. Vzorky byly po změření proteinového obsahu metodou BCA (viz. kapitola 4.3.2) upraveny na požadovanou koncentraci proteinů a zároveň smíchány se vzorkovým Laemmliho pufrům tak, aby tvořil 1/4 výsledného objemu. Proteiny ve vzorcích bylo třeba ještě zdenaturovat zahřátím na 95°C po dobu 3 minut\*.

\*Poslední krok zahrnující povaření proteinů byl vynechán při přípravě vzorků pro detekci komplexů respiračního řetězce protilátkovým koktejlem Total OXPHOS.

Materiál:

**TMES:** 20 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA; 250 mM sacharóza; pH 7,4

**Laemmliho vzorkový pufr, 4x konc.:** 2,4 ml 1 M Tris-HCl; 1 ml glycerolu; 0,8 g SDS (dodecylsírán sodný); 0,8 g DTT (dithiothreitol); 1 mg bromfenolové modři; doplněno dH<sub>2</sub>O do 10 ml; pH 6,8

### 4.3.2 Stanovení proteinů – metoda BCA

Podle schématu v tabulce (Tab. 1) byly z výchozích roztoků hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1 µg/µl nebo 0,1 µg/µl připraveny do jamek 96 jamkové destičky jednotlivé standardy pro určení kalibrační křivky. Vzorky ke stanovení proteinů byly 100x naředěny destilovanou vodou a nanесeny vedle standardů v tripli- nebo tetraplikátech po 100 µl. Ke všem vzorkům a standardům bylo dále přidáno 100 µl reakční směsi připravené smícháním činidel A, B a C. Destička byla přelepena fólií a zahřáta v bločku při 60°C na 30 minut. Absorbance v jamkách byla změřena na spektrofotometru Synergy HT při 562 nm a výsledné množství proteinů ve vzorku bylo ustanoveno podle kalibrační křivky BSA v programu Gen 5.

Tab. 1 Příprava standardů se zvyšující se koncentrací BSA pro stanovení kalibrační křivky

Standard	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
obsah BSA [ug]	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA [0,1 µg/µl]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA [1 µg/µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H <sub>2</sub> O	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

Zkratky: BL, blank; BSA, hovězí sérový albumin

Materiál:

**Činidlo A:** 8 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O; 1,6 g vlnanu sodného; doplněno dH<sub>2</sub>O do 100 ml; pH 11,25

**Činidlo B:** 3 g BCA (bicinchoninová kyselina); doplněno dH<sub>2</sub>O do 100 ml

**Činidlo C:** 0,5 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O; doplněno dH<sub>2</sub>O do 10 ml

**Reakční směs:** činidla A : B : C v poměru 26 : 25 : 1

### 4.3.3 Elektroforetická separace proteinů

K separaci proteinů byla využita speciální aparatura pro elektroforézu. Mezi skla kazety s mezerou 1,5 mm byl nalit 10% polyakrylamidový separační gel (připravený dle tabulky v Tab. 2), převrstven butanolem a ponechán 45-60 minut polymerizaci při pokojové teplotě. Z gelu byl poté butanol opláchnut dH<sub>2</sub>O a zbylá voda vysušena filtračním papírem. Na separační gel byl přidán 4% zaostřovací gel s rozdělovacím hřebínkem, který tuhnul při pokojové teplotě cca 15 minut. Do jamek vzniklých po odstranění hřebínku byly aplikovány proteinové vzorky a 2,5 µl molekulárního standardu. Množství nanесených

proteinů v jednotlivých pokusech bylo v rozmezí 15-30 ug. Aparatura pro elektroforézu byla následně naplněna elektroforetickým pufrem a spuštěna při konstantním napětí 200V na zhruba 60 minut.

Tab. 2 Složení separačního a zaostřovacího gelu (množství potřebné na 1 gel):

<b>10% separační gel</b>	4 ml	H <sub>2</sub> O
	2,5 ml	Pufr 1
	3,35 ml	30 % akrylamid-0,8 % N,N' -metylenbisakrylamid
	100 µl	10 % SDS (dodecylsírán sodný)
	4 µl	TEMED (tetrametyletylendiamin)
	45 µl	10 % APS (peroxodisírán amonný)
<b>4% zaostřovací gel</b>	3 ml	H <sub>2</sub> O
	1,25 ml	Pufr 2
	0,65 ml	30% akrylamid - 0,8% N,N' -metylenbisakrylamid
	50 µl	10% SDS (dodecylsírán sodný)
	4 µl	TEMED (tetrametyletylendiamin)
	45 µl	10% APS (peroxodisírán amonný)

Materiál:

**Pufr 1:** 18,17 g Tris-HCl; doplněno dH<sub>2</sub>O do 100 ml; pH 8,8

**Pufr 2:** 6,05 g Tris-HCl; doplněno dH<sub>2</sub>O do 100 ml; pH 6,8

**30% akrylamid - 0,8% N,N'-metylenbisakrylamid:** 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamidu; 30 g akrylamidu; doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 000 ml

**Elektroforetický pufr, 10x konc.:** 30,3 g Tris-HCl; 141,1 g glycinu; 10 g SDS (dodecylsírán sodný); doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 000 ml

#### 4.4 Western blot

Z gelu vyjmutého po elektroforéze byl odstraněn zaostřovací gel a proteiny zachycené v separačním gelu byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blottingu. Transfer proteinů probíhal v aparatuře naplněné blotovacím pufrem 1 hodinu při napětí 100V. Nitrocelulózová membrána byla poté opláchnuta v dH<sub>2</sub>O, obarvena

v roztoku Ponceau a oskenována pro pozdější analýzu nanášky v programu Image J. Po odmytí Ponceau byla membrána vložena na 20 minut do blokovacího pufru s obsahem mléka nebo BSA, následně přenesena do ředícího pufru a 1-2 noci inkubována s primárními protilátkami (Tab. 3) ve 4°C.

Tab. 3 Primární protilátky

<b>Primární protilátka</b>	<b>Komerční kód</b>	<b>Ředění</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Blokovací činidlo</b>
<b>Akt</b>	*C67E7	3 000x	Anti-R	Mléko
<b>p-Akt</b>	*D9E	3 000x	Anti-R	BSA
<b>ERK 1/2</b>	*137F5	2 000x	Anti-R	Mléko
<b>p-ERK 1/2</b>	*197G2	2 000x	Anti-R	Mléko
<b>FTO</b>	ab92821	10 000x	Anti-M	Mléko
<b>GSK3β</b>	sc-9166	3 000x	Anti-R	Mléko
<b>p-GSK3β</b>	sc-11757	3 000x	Anti-M	Mléko
<b>IDE</b>	sc-130784	1 000x	Anti-R	BSA
<b>INSRα</b>	sc-7953	1 000x	Anti-R	Mléko/BSA
<b>INSRβ</b>	sc-711	2 000x	Anti-R	Mléko
<b>PI3K p110</b>	sc-7189	1 000x	Anti-R	Mléko
<b>p38</b>	sc-17852	4 000x	Anti-R	Mléko
<b>p-p38</b>	sc-535	1 000x	Anti-R	Mléko
<b>Total OXPPOS</b>	ab110413	4 000x; 10 000x	Anti-M	Mléko

Anti-R (anti-rabbit); Anti-M (anti-mouse); sc - Santa Cruz Technology; ab - Abcam; \* - Cell Signaling

Poté, co byla membrána vyjmuta z primárních protilátek, opláchnuta krátce v dH<sub>2</sub>O a 3x 10 minut v promývacím pufru, následovala její hodinová inkubace s příslušnou sekundární protilátkou naředěnou v ředícím pufru (Tab. 4).

Tab. 4 Sekundární protilátky

<b>Sekundární protilátka</b>	<b>ředění</b>
<b>Anti-R</b> Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked, GE Healthcare	40 000x
<b>Anti-M</b> Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked, GE Healthcare	20 000x

Po uplynutí inkubační doby byla membrána znovu opláchnuta v dH<sub>2</sub>O a 3x 10 minut v promývacím pufru a převrstvena chemiluminiscenčním substrátem pro křenovou peroxidázu (Thermo Fisher Scientific), připraveným těsně před použitím ze směsi luminolu a peroxidu vodíku v poměru 1:1. Signál z proteinů na membráně byl zachycen ve tmě na film. Výsledek získaný vyvoláním filmu byl oskenován a vyhodnocen v programu Image J.

Materiál:

**Blotovací pufr:** 15 g Tris; 72 g glycinu; 1 l metanolu; doplněno dH<sub>2</sub>O do 5l

**TBS pufr, 10x koncentrovaný:** 84,15 g NaCl; 11,63 g Tris; doplněno dH<sub>2</sub>O na 960 ml; pH 8

**Blokovací pufr:** 2,5 g sušeného mléka/BSA; 50 ml TBS pufru; 50 µl Tweenu

**Ředící pufr:** 0,5 g sušeného mléka/BSA; 50 ml TBS pufru; 50 µl Tweenu

**Promývací pufr:** 1 l TBS pufru; 3 ml Tweenu

## 4.5 Vysokorezoluční respirometrie

### 4.5.1 Úvod do metody

Měření mitochondriální respirace probíhalo na přístroji Oxygraf-2k. Na přístroji jsou 2 vzájemně oddělené komory opatřené polarografickou kyslíkovou elektrodou, která slouží jako senzor O<sub>2</sub>. Oxygraf-2k je propojen s počítačem pomocí operačního programu OROBOROS Datlab, kde lze v průběhu měření pozorovat dvě křivky odrážející stav kyslíku v komorách. První křivka vyjadřuje aktuální koncentraci O<sub>2</sub> v komůrce, druhá je její derivací v čase a znázorňuje rychlost spotřeby O<sub>2</sub> za sekundu.

Postup je založen na přidání vzorku, a postupnému přidávání substrátů či inhibitorů k ovlivnění činnosti jednotlivých komplexů respiračního řetězce (Obr. 3) (Gnaiger, 2012).

Prvním z parametrů, který je získán po uzavření komory s buňkami, je endogenní respirace. Buňky využívají vlastní substráty k produkci ATP oxidativní fosforylací. V případě měření na izolovaných mitochondriích je počáteční respirace nulová, protože v médiu nejsou žádné substráty přítomny.

Malát a glutamát jsou substráty pro rozběhnutí TCA cyklu a vzniku redukovaných koenzymů přinášejících elektrony zejména komplexu I. Respirace je nízká v důsledku nízkého toku protonů přes vnitřní membránu. Navýšení respirace se dosáhne dodáním ADP v koncentraci saturační pro činnost ATP syntázy, čímž je zajištěn odběr protonů

z mezimembránového poolu. Sukcinát jako energetický substrát stimuluje komplex II a značí vliv sukcinátdehydrogenázy na aktivitu elektron-transportního řetězce.

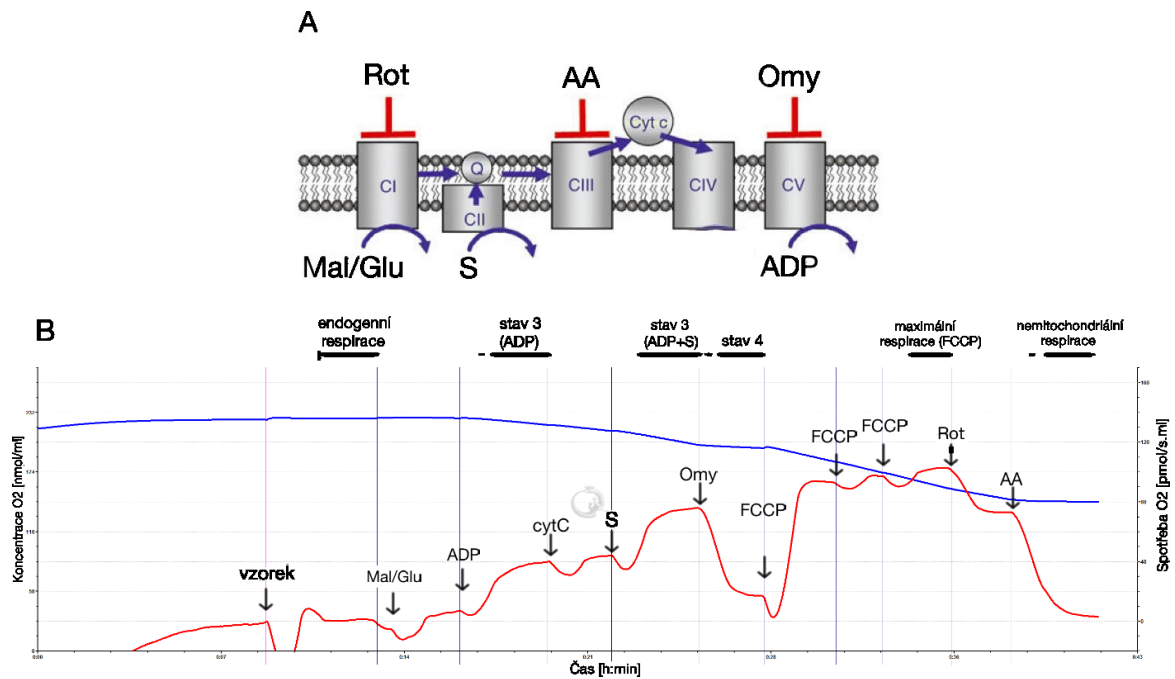
Extracelulární zdroj cytochromu c slouží jako kontrola poškození mitochondriální membrány. V případě porušené integrity vnější mitochondriální membrány se přidaný cytochrom c podílí na elektronovém transportu a zvýší se spotřeba kyslíku.

Za dostatku substrátů pohánějících činnost ATP syntázy nastává fosforylující respirace, označovaná jako stav 3. Při vyčerpání ADP se zastaví aktivita ATP syntázy a výsledná respirace je označována jako nefosforylující nebo stav 4. Stav 4 lze docílit alternativně také přidáním oligomycinu blokujícího činnost Fo rotoru ATP syntázy. Naměřené hodnoty spotřeby  $O_2$  pak odráží hodnotu úniku (z anglického "leak") protonů přes mitochondriální membránu a nemitochondriální respiraci.

Postupnou titrací protonoforu FCCP (karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon) lze docílit maximální respirace. FCCP patří mezi tzv. odpřahovače, které odpojují elektronový transport od fosforylace ADP. Způsobují kolaps membránového potenciálu vytvořením zpětného toku protonů do matrix. Limitujícím faktorem respirace se stává kapacita respiračního řetězce, nikoliv aktivita ATP syntázy. FCCP je přidáván postupnou titrací, protože jeho působení je závislé na typu buněk, jejich metabolismu, a také na množství substrátu (NADH, sukcinátu atd.) Ve vyšších koncentracích navíc začne vykazovat vůči elektron-transportnímu systému inhibiční vliv.

Rotenon selektivně inhibuje aktivitu komplexu I. Na výsledné redukci  $O_2$  se tak podílí pouze elektrony vstupující do respiračního řetězce z komplexu II.

Antimycin A inhibující elektronový transport na komplexu III způsobí zastavení respiračního řetězce. Reziduální hodnoty spotřeby  $O_2$  měřitelné po přidání antimycinu A mají původ v nemitochondriální "respiraci". Za tu jsou zodpovědné zejména buněčné enzymy spotřebovávající kyslík nebo autooxidační reakce.



Obr. 3 (A) Ilustrativní obrázek znázorňující místa působení substrátů/inhibitorů na komplexy respiračního řetězce (CI-V). Převzato a upraveno z (Kuznetsov et al., 2008). (B) Schéma průběhu měření na oxygrafu s vyznačením respiračních stavů. Šipkami jsou znázorněny přidávky jednotlivých činidel. Modrá křivka představuje hodnotu koncentrace kyslíku v komoře oxygrafu, červená křivka odráží změnu kyslíku v čase. Zkratky: Mal/Glu, malát/glutamát; ADP, adenosindifosfát; cytC, cytochrom c; S, sukcinát; Omy, oligomycin; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; Rot, rotenon; AA, antimycin A; Q, ubiquinon.

Z naměřených hodnot stavu 3, stavu 4 a maximální respirace po přidání FCCP lze dále vypočítat několik kontrolních parametrů charakterizujících buněčnou respiraci. Pro analýzu příspěvků komplexu I a II byly rozlišeny 2 stavy fosforylující respirace. Za stavu 3<sub>(ADP)</sub> se na pohonu ATP syntázy podílí respirace iniciovaná přes komplex I, zatímco stav 3<sub>(ADP+S)</sub> v sobě obsahuje i příspěvek elektronů vstupujících v místě komplexu II. Výpočet parametrů zahrnuje korekci stavů 3, 4 a FCCP na reziduální nemitochondriální respiraci.

- **Index bazální respirační kontroly (IR<sub>BK</sub>):** Podíl hodnot stavů 3 a 4 udává hodnotu indexu bazální respirační kontroly. Tento parametr je indikátorem mitochondriální integrity, vypovídá o míře spřažení respirace a oxidativní fosforylace.
- **Index maximální respirační kontroly (IR<sub>MK</sub>):** Informace o celkové kapacitě elektron-transportního řetězce s ohledem na protonový leak přes membránu udává podíl rozpřažené maximální respirace (FCCP) a stavu 4.
- **Respirační rezervní kapacita (RRK):** Rozdíl mezi respirací maximální (FCCP) a poháněnou oxidativní fosforylací (stav 3) udává rezervní kapacitu dýchacího řetězce.

- **Index odpřažené kontroly (IOK):** IOK úzce souvisí s maximální rezervní kapacitou. Udává, do jaké míry se spotřeba O<sub>2</sub> využítá k fosforylaci ADP v přítomnosti substrátů blížící k maximální dosažitelné spotřebě O<sub>2</sub> elektron-transportním řetězcem. IOK je podílem hodnot maximální respirace (FCCP) a stavu 3. Hodnoty blížící se 1 značí systém využívající k pohonu ATP syntázy veškerou kapacitu svého elektron-transportního systému.

#### 4.5.2 Měření respirace izolovaných mitochondrií

##### 4.5.2.1 Sklizení buněk a izolace mitochondrií

Buňky z minimálně pěti kultivačních lahví porostlých ze 70-90% byly sklizeny stěrkou do vychlazeného PBS, stočeny na centrifuze Hettich Universal 320 R (10 min, 650 g, 4°C) a následně ještě jednou promyty v PBS. Pelet byl resuspendován v přiměřeném množství izolačního pufru a homogenizován na sklo/teflonovém homogenizátoru (45 krát při 2000 rpm). Homogenát byl centrifugován (Hettich Mikro 200 R) 10 minut při 650 g a 4°C. Získaný supernatant byl znovu stočen (10 min, 7000 g, 4°C) a výsledný pelet resuspendován v ~ 100 µl izolačního média. Část vzorku byla později analyzována metodou BCA (viz kap. 4.3.2) ke zjištění koncentrace proteinů.

Materiál:

**PBS:** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno dH<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH 7,4

**Izolační pufr:** 10 mM Tris-MOPS; 1 mM EGTA; 0.2 M sacharóza; pH 7,4

##### 4.5.2.2 Oxygrafické měření

Do komory oxygrafu bylo přidáno 2,1 ml MIR05 média a po ustálení křivky aplikováno mezi 50 až 100 µl izolovaných mitochondrií. Po uzavření komůrky byly k mitochondriím Hamiltonkou postupně nanášeny substráty a inhibitory (Tab. 5, upraveno podle: (Lanza and Nair, 2009)) ovlivňující mitochondriální respiraci.

Výsledné hodnoty získané z programu OROBOROS DatLab byly normalizovány na množství proteinu, a dále vyhodnoceny a zpracovány v programu GraphPad Prism 7.0.

Tab. 5 Substráty a inhibitory dýchacího řetězce přidávané k vzorku do komor oxygrafu

	<b>přídavek</b>	<b>nanáška</b>	<b>výsl. koncentrace</b>
<b>1</b>	Malát + Glutamát	10 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	5 mM + 10 mM
<b>2</b>	ADP	15 $\mu$ l	3,75 mM
<b>3</b>	Cytochrom c	10 $\mu$ l	20 $\mu$ M
<b>4</b>	Sukcinát	20 $\mu$ l	10 mM
<b>5</b>	Oligomycin	1 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M
<b>6</b>	FCCP - titrace	titrace po 1 $\mu$ l	po 0,5 $\mu$ M krocích
<b>7</b>	Rotenon	0,4 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
<b>8</b>	Antimycin A	1 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M

Materiál:

Zásobní roztoky chemikálií (s uvedením rozpouštědla):

**Inhibitory:** 5 mM antimycin A (etanol); 5 mM oligomycin (etanol); 2,5 mM rotenon (etanol)

**Substráty:** 0.5 M ADP (H<sub>2</sub>O); 1 M malát (H<sub>2</sub>O); 1 M glutamát; 1 M sukcinát (H<sub>2</sub>O)

**Ostatní:** 1 mM FCCP (karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; etanol); 4 mM cytochrom c (H<sub>2</sub>O)

**MIR05 (Mitochondriální respirační médium):** 110 mM sacharóza; 0,5 mM EGTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 60 mM K–laktobionát; 20 mM Taurin; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM HEPES; 1 g/l BSA; pH upraveno na 7,1 (pomocí 1 M KOH)

#### 4.5.3 Měření respirace na permeabilizovaných buňkách

Oproti měření na izolovaných mitochondriích je v tomto případě potřeba selektivní permeabilizace cytoplazmatické membrány pro umožnění vstupu extracelulárně podaných látek do nitrobuněčného prostředí. Jako permeabilizační agens byl zvolen digitonin, který je v nízkých koncentracích schopen rozrušit pouze cytoplazmatickou membránu a ponechat ostatní membrány intaktní.

##### 4.5.3.1 Optimalizace koncentrace digitoninu

Koncentrace digitoninu potřebná ke kompletní permeabilizaci cytoplazmatické membrány je závislá na množství buněk v suspenzi a jejich typu. Optimalizace koncentrace digitoninu proběhla podle protokolu (Pesta and Gnaiger, 2012). Byl připraven roztok digitoninu v DMSO o koncentraci 5  $\mu$ g/ $\mu$ l. K suspenzi 10 mil. buněk v MIR05 médiu v komoře oxygrafu byly postupně přidány následující látky: 10 mM sukcinát; 1 mM ADP; 0,5  $\mu$ M rotenon. Následovala titrace digitoninu v krocích po 10  $\mu$ g/ml, dokud nebylo

pozorováno zastavení vlivu na křivku odrážející spotřebu kyslíku. Výsledná optimální koncentrace digitoninu pro buněčnou linii SH-SY5Y byla stanovena jako 6 µg/10<sup>6</sup> buněk.

#### 4.5.3.2 Sklizení a počítání buněk

Obsah minimálně dvou kultivačních lahví s konfluencí buněk mezi 70-90% byl mechanicky sklizen seškrabáváním do vychlazeného PBS a stočen na centrifuze Hettich Universal 320 R (10 min, 1800 rpm, 4°C). Pelet byl resuspendován v přiměřeném množství MIR05 média a ponechán na ledu. Množství buněk bylo spočítáno za využití Bürkerovy komůrky pod světelným mikroskopem.

#### 4.5.3.3 Oxygrafické měření

Do komory oxygrafu bylo umístěno vždy 5 mil. buněk a doplněno médiem MIR05 do výsledného objemu 2,1 ml. Po uzavření komůrky byla k buňkám Hamiltonkou postupně přidávána řada substrátů a inhibitorů (Tab. 6, upraveno podle (Kuznetsov et al., 2008)), působících na vybrané části respiračního řetězce. Výsledné hodnoty a graf získané z programu OROBOROS DatLab byly vyhodnoceny a dále zpracovány v programu GraphPad Prism 7.0.

Tab. 6 Substráty a inhibitory dýchacího řetězce přidávané k vzorku do komor oxygrafu

přídavek	nanáška	výsl. koncentrace
1 Malát + Glutamát	10 µl + 20 µl	5 mM + 10 mM
2 Digitonin	6 µl	15 µg/ml
3 ADP	15 µl	3,75 mM
4 Sukcinát	20 µl	10 mM
5 Cytochrom c	10 µl	20 µM
6 Oligomycin	1 µl	2,5 µM
7 FCCP	titrace po 1 µl	0,5 µM /krok
8 Rotenon	0,4 µl	0,5 µM
9 Antimycin A	1 µl	2,5 µM

Materiál:

Zásobní roztoky chemikálií (s uvedením rozpouštědla):

**Inhibitory:** 5 mM antimycin A (etanol); 5 mM oligomycin (etanol); 2,5 mM rotenon (etanol)

**Substráty:** 0.5 M ADP (H<sub>2</sub>O); 1 M malát (H<sub>2</sub>O); 1 M glutamát; 1 M sukcinát (H<sub>2</sub>O)

**Ostatní:** 1 mM FCCP (karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; etanol); 4 mM cytochrom c (H<sub>2</sub>O); digitonin 5 µg/µl (DMSO)

**MIR05 (Mitochondriální respirační médium):** 110 mM sacharóza; 0,5 mM EGTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 60 mM K-laktobionát; 20 mM taurin; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM HEPES; 1 g/l BSA; pH upraveno na 7,1 (pomocí 1 M KOH)

**PBS:** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno dH<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH 7,4

#### 4.6 Detekce intracelulárních ROS

Před zahájením pokusu byl čerstvě vytvořen 1 mM pracovní roztok fluorescenčních sond DHE a H<sub>2</sub>DCFDA naředěním zásobních roztoků v PBS. Buňky byly kultivovány na 24 jamkových destičkách. K buňkám, které měly posloužit jako pozitivní kontrola, byl do média přidán 20 μM antimycin A na 45 minut v případě následného použití DHE nebo 200 μM TBHP na 30 minut, zjišťovala-li se produkce ROS pomocí H<sub>2</sub>DCFDA. Celá destička byla následně inkubována 30 minut ve tmě a 37°C s příslušnou fluorescenční sondou o výsledné koncentraci v jamce 20 μM H<sub>2</sub>DCFDA nebo 10 μM DHE. Po uplynutí doby bylo médium obsahující sondu odsáto a buňky opláchnuty v zahřátém PBS. Protože se promývání ukázalo jako faktor spouštějící uvolňování buněk z povrchu, byl obsah jamek přenesen do zkumavek a centrifugován (Hettich Mikro 200 R; 3 min, 1800 rpm, 25°C). Získaný pelet byl jemně resuspendován pomocí pipety v 30-50 μl PBS, z toho 20 μl nanášeno na podložní sklíčko, překryto krycím sklem a pozorováno pod inverzním fluorescenčním mikroskopem (Arsenal AIF 5114i-T). Pořízené fotografie jednotlivých pokusných skupin buněk byly získány vždy za stejného nastavení mikroskopu a LCD kamery a vyhodnoceny v programu Fuji ImageJ.

Materiál:

**DHE (dihydroethidium):** 10 mM zásobní roztok (rozpuštědlo: DMSO)

**H<sub>2</sub>DCFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetát) :** 10 mM zásobní roztok (rozpuštědlo: DMSO)

**Antimycin A:** 5 mM zásobní roztok (rozpuštědlo: etanol)

**TBHP (tert-butyl hydroperoxid):** 5,5 mM zásobní roztok (rozpuštědlo: H<sub>2</sub>O)

**PBS:** 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno dH<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH 7,4

#### 4.7 Analýza dat

Každé měření bylo provedeno minimálně třikrát, kromě pokusů vysokorozoluční respirometrie na izolovaných mitochondriích. Důvodem byl přechod k časově i finančně úspornější metodě měření respirace na permeabilizovaných buňkách.

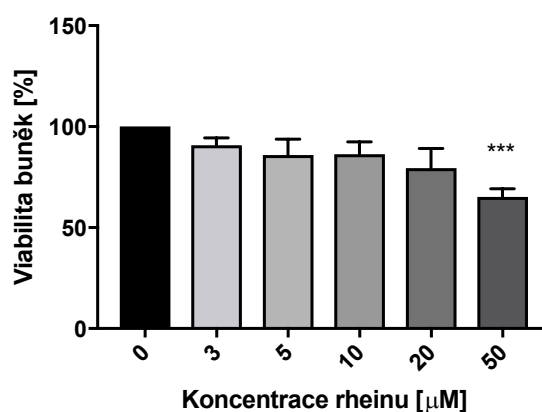
Závěrečné vyhodnocení dat a tvorba grafů proběhla v programu GraphPad Prism 7.0. K určení statistické významnosti byla použita analýza pomocí nepárového Studentova t-testu. Statistická významnost byla určena na hladině  $P \leq 0,05$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Viabilita buněk

Metoda MTT je kolorimetrickým testem stanovení životnosti buněk. Je založena na redukci žlutého solubilního 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustné modré krystalky formazanu. Reakce probíhá jak na mitochondriální membráně, tak v důsledku aktivity nemitochondriálních enzymů živých buněk (Bernas and Dobrucki, 2002). Formazan se následně rozpustí přidáním silného detergentu a intenzita výsledného zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Vyšší hodnoty absorbance roztoku pak odráží větší množství živých buněk.

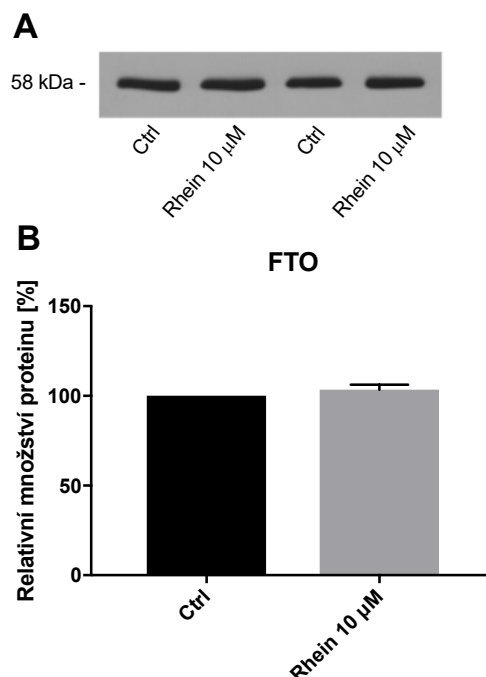
Buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin s vybranými koncentracemi rheinu (Obr. 4). Nízké koncentrace nezpůsobily výrazné změny v životaschopnosti buněk SH-SY5Y. Teprve u maximální zvolené koncentrace rheinu (50  $\mu\text{M}$ ) byl pozorován signifikantní pokles viability (v průměru o 35%) oproti kontrole neovlivněné inhibitorem.



Obr. 4 Efekt inhibitoru FTO rheinu na viabilitu buněk SH-SY5Y. Buňky byly po dobu 24h inkubovány s rheinem v různých koncentracích (3, 5, 10, 20 a 50  $\mu\text{M}$ ) a analyzovány pomocí MTT testu. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako relativní změna viability vůči neovlivněným buňkám (0  $\mu\text{M}$  rhein). Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \*\*\* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.001$ .

## 5.2 Ověření přítomnosti FTO

Pomocí metod elektroforézy a Western blottingu byl detekován výskyt proteinu FTO u buněčné linie SH-SY5Y (Obr. 5). Výsledky potvrdily přítomnost FTO v buňkách kontrolních i ovlivněných 10  $\mu$ M koncentrací rheinu, přičemž rhein neměl vliv na míru exprese FTO.



Obr. 5 Exprese proteinu FTO v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 10  $\mu$ M koncentraci rheinu. (A) Reprezentativní snímek imunoblotu. (B) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinu vyjádřené jako množství proteinu vztahované ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru.

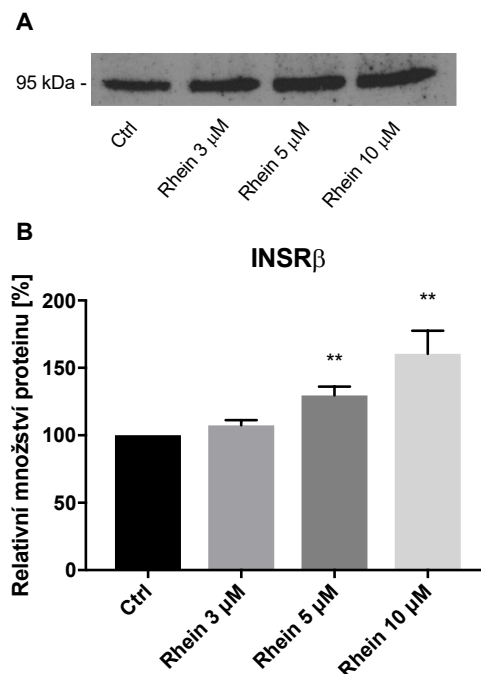
## 5.3 Detekce proteinů insulinové signalizace

Metody SDS-PAGE elektroforézy a Western blotu byly využity k detekci vybraných proteinů insulinové signalizace. Analyzovány byly celkem 4 pokusné skupiny buněk, které byly po dobu 24h inkubovány s různými koncentracemi inhibitoru rheinu (0, 3, 5 a 10  $\mu$ M). Intenzita signálu z detekovaného proteinu byla normalizována k celkovému proteinovému obsahu získanému barvením v roztoku Ponceau a vyjádřena jako relativní změna vůči kontrole.

### 5.3.1 Insulinový receptor

Insulinový receptor je heterodimer, sestávající z extracelulární  $\alpha$  podjednotky a intracelulárního  $\beta$  řetězce s transmembránovou doménou. Pomocí protilátek se ve vzorcích

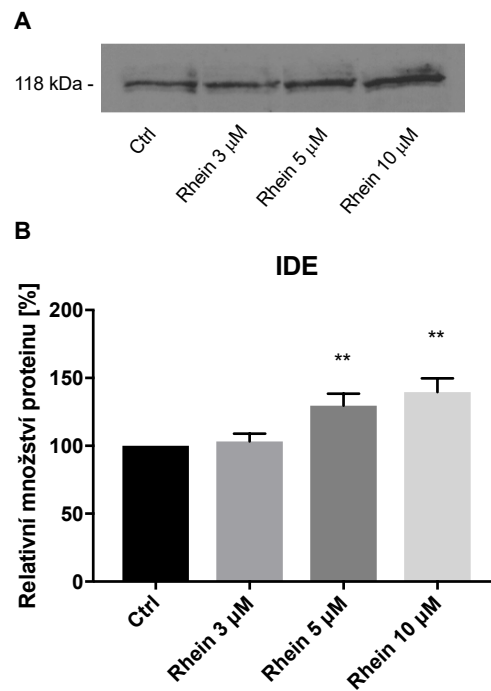
podařilo detekovat proteinovou podjednotku  $\beta$  (Obr. 6). Množství proteinu bylo zvýšeno v průměru přibližně o 30% po působení inhibitoru v 5  $\mu\text{M}$  koncentraci a téměř o 60% při ovlivnění 10  $\mu\text{M}$  koncentrací. Receptorovou podjednotku  $\alpha$  se nepodařilo s jistotou detekovat.



Obr. 6 Expres  $\beta$  řetězce insulinového receptoru (INSR $\beta$ ) v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 3, 5, a 10  $\mu\text{M}$  koncentracím rheinu. (A) Reprezentativní snímek imunoblotu. (B) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinu vyjádřené jako množství proteinu vztažené ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \*\* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.01$ .

### 5.3.2 Insulin degradující enzym

Detekce insulin degradujícího enzymu (IDE) je zobrazena na obrázku níže (Obr. 7). Po 24 hodinové inkubaci s 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  rheinem byl pozorován nárůst hladin IDE přibližně o 30 a 40% oproti kontrolním buňkám. Po působení 3  $\mu\text{M}$  rheinem nebyla pozorována změna.

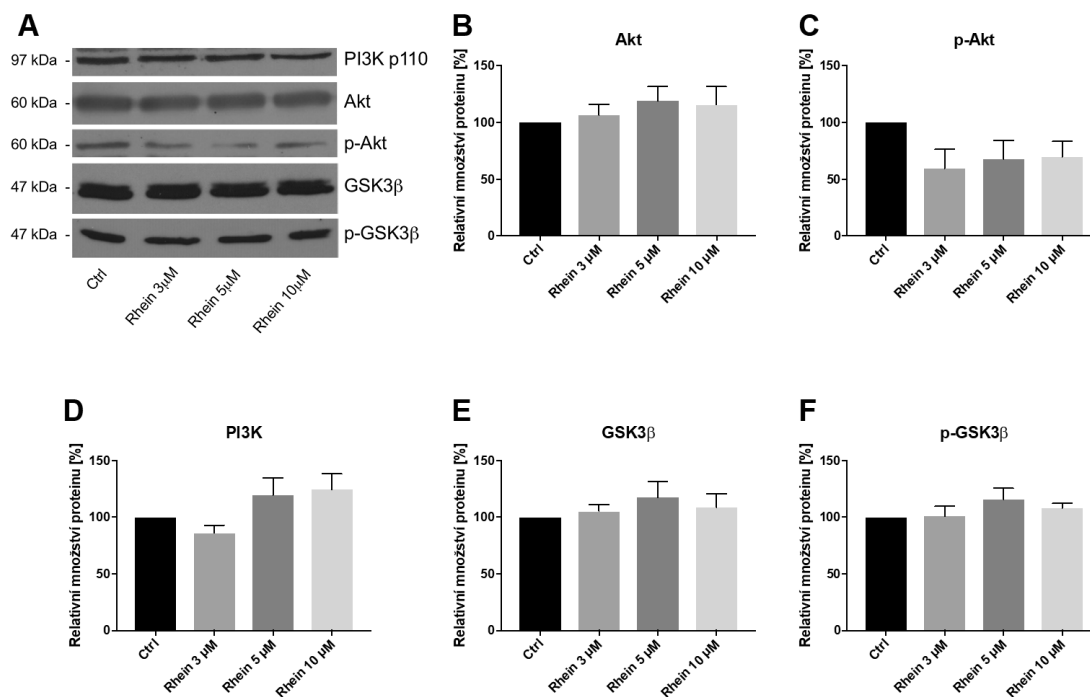


Obr. 7 Expresa insulin degradujícího enzymu (IDE) v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 3, 5, a 10  $\mu$ M koncentracím rheinu. (A) Repräsentativní snímek imunoblotu. (B) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinu vyjádřené jako množství proteinu vztažené ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \*\* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.01$ .

### 5.3.3 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ signalizační dráha

Na Obr. 8 je zobrazena exprese proteinů PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  insulinové signalizační dráhy. Míra exprese proteinu PI3K se nezměnila u žádné z experimentálních skupin. Bez signifikantních změn zůstala také hladina Akt kinázy. Pokles hladin proteinu oproti kontrolní skupině byl pozorován u fosforylované Akt kinázy, nicméně nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Signifikantní změna se ukázala po vyhodnocení poměru p-Akt/Akt (Tab. 7). Oproti kontrole tento poměr výrazně klesl (cca o 35-50%) u buněk ovlivněných rheinem ve všech zvolených koncentracích.

Analýza enzymu GSK3 $\beta$  a jeho fosforylované formy, jakožto významného substrátu Akt kinázy, neodhalila mezi pokusnými skupinami rozdíly v expresi těchto proteinů ani v poměru p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  (Tab. 7).



Obr. 8 Expres proteinů PI3K/Akt/GSK3β insulinové signalizační dráhy v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 3, 5, a 10 μM koncentracím rheinu. (A) Reprezentativní snímky imunoblotů. (B-F) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinů Akt, p-Akt, PI3K, GSK3β, p-GSK3β vyjádřené jako množství proteinu vztažené ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru.

Tab. 7 Poměr exprese proteinů p-Akt/Akt a p-GSK3β/GSK3β

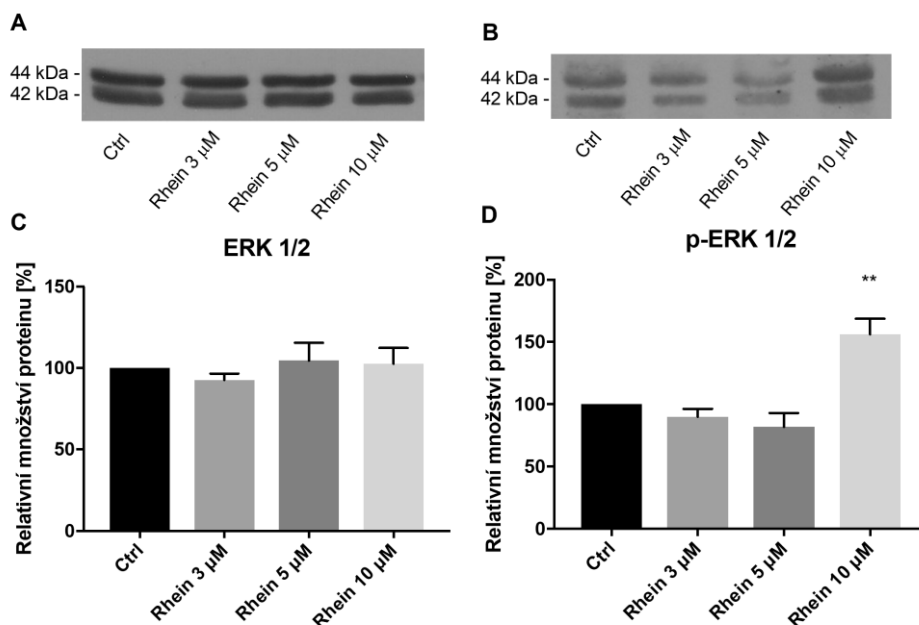
	Ctrl	Rhein 3 μM	Rhein 5 μM	Rhein 10 μM
<b>p-Akt/Akt</b>	1	0,57 ± 0,15*	0,47 ± 0,12*	0,64 ± 0,10*
<b>p-GSK3β/GSK3β</b>	1	0,97 ± 0,09	0,91 ± 0,047	1,12 ± 0,16

Poměr byl vytvořen z hodnot intenzit signálů detekovaných proteinů normalizovaných k celkové nanášece a následně vyjádřen jako relativní změna vůči kontrole (Tzn. Ctrl/Ctrl = 1; Rhein 3 μM/Ctrl = x; Rhein 5 μM/Ctrl = y ...). Hodnoty v tabulce reprezentují průměr výsledných dat +/- střední chyba průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . Ctrl, kontrola.

### 5.3.4 MAPK signální kaskáda

#### 5.3.4.1 ERK1/2, p-ERK1/2

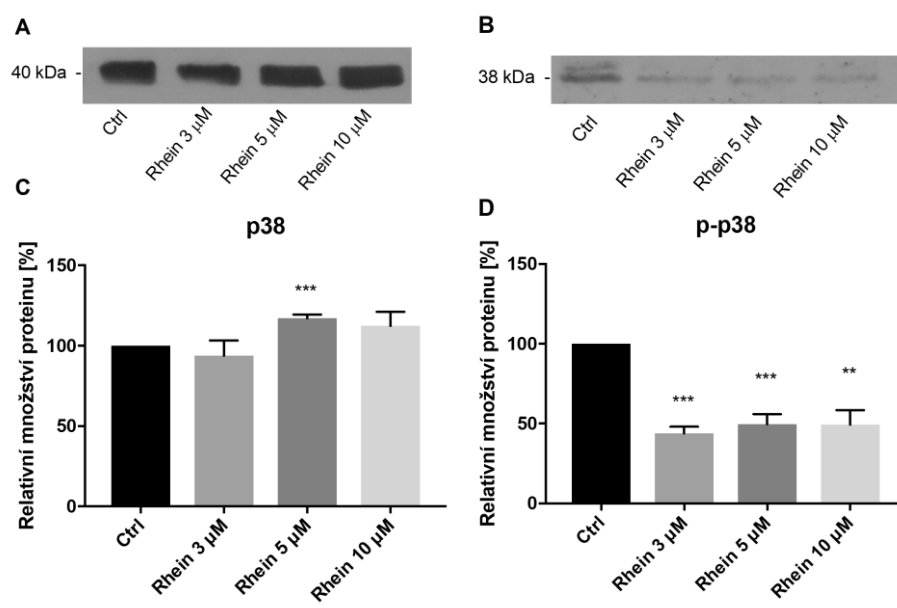
Detekované hladiny kináz ERK1/2 (Obr. 9A,C) se nelišily mezi vzorky z kontrolních a inhibitory ovlivněných buněk. Míra exprese fosforylované kinázy ERK1/2 (Obr. 9B,D) byla zvýšena u skupiny ovlivněné 10 μM rheinem přibližně na 1,5 násobek hodnot kontroly, ostatní použité koncentrace neměly na expresi p-ERK1/2 signifikantní vliv.



Obr. 9 Expresa proteinů ERK1/2 (A, C) a p-ERK1/2 (B, D) v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 3, 5, a 10 μM koncentracím rheimu. (A, B) Reprezentativní snímky imunoblotů. (C, D) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinů vyjádřené jako množství proteinu vztažené ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \*\* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.01$ .

#### 5.3.4.2 p38, p-p38

Expresa mitogenem aktivované proteinkinázy p38 (Obr. 10A,C) byla signifikantně zvýšena překvapivě pouze u experimentální skupiny exponované 5 μM koncentraci rheimu (přibližně o 15%). Podobně mírné zvýšení bylo pozorováno i po působení 10 μM rheimu, ale nebylo vyhodnoceno jako statisticky významné. Hladiny p-p38 (Obr. 10B,D) byly v porovnání s kontrolní skupinou sníženy zhruba o polovinu u vzorků ovlivněných 3, 5 i 10 μM koncentrací inhibitoru.



Obr. 10 Expres proteinů p38 (A, C) a p-p38 (B,D) v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 3, 5, a 10  $\mu\text{M}$  koncentracím rheimu. (A, B) Repräsentativní snímky imunoblotů. (C, D) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinů vyjádřené jako množství proteinu vztažené ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \*\* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.01$ , \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

Vyhodnocení podílu fosforylovaných a nefosforylovaných forem kináz (Tab. 8) ukázalo, že podání rheimu v koncentracích 3, 5 a 10  $\mu\text{M}$  je doprovázeno snížením poměru p-p38/p38 o více než 50% oproti kontrolní skupině. Poměr p-ERK/ERK se u ovlivněných buněk naopak zvýšil přibližně o 70%, ale pouze po působení 10  $\mu\text{M}$  koncentrace inhibitoru.

Tab. 8 Poměr exprese proteinů p-p38/p38 a p-ERK/ERK

	Ctrl	Rhein 3 $\mu\text{M}$	Rhein 5 $\mu\text{M}$	Rhein 10 $\mu\text{M}$
<b>p-p38/p38</b>	1	0,48 $\pm$ 0,07***	0,42 $\pm$ 0,05***	0,44 $\pm$ 0,07***
<b>p-ERK/ERK</b>	1	0,97 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,11	1,72 $\pm$ 0,22*

Poměr byl vytvořen z hodnot intenzit signálů detekovaných proteinů normalizovaných k celkové nanášece a následně vyjádřen jako relativní změna vůči kontrole (Tzn. Ctrl/Ctrl = 1; Rhein 3  $\mu\text{M}$ /Ctrl = x; Rhein 5  $\mu\text{M}$ /Ctrl = y ...). Hodnoty v tabulce reprezentují průměr výsledných dat  $\pm$  střední chyba průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . \*\*\*,  $P \leq 0.001$ ; Ctrl, kontrola.

## 5.4 Respirace

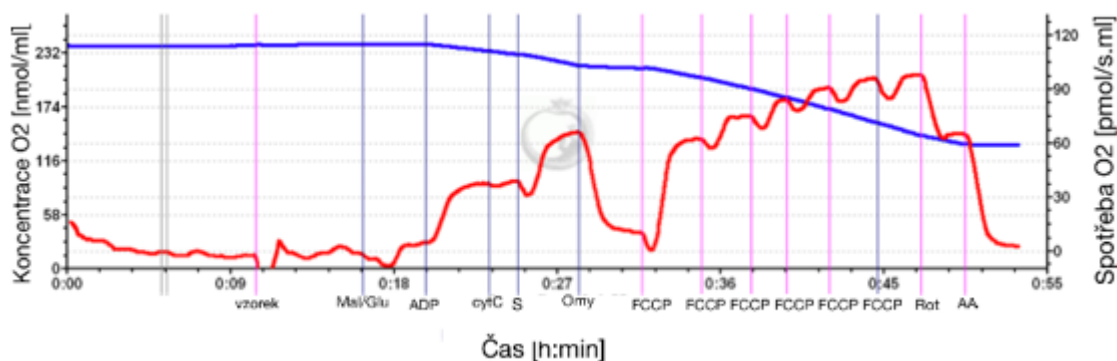
### 5.4.1 Izolované mitochondrie

Měřena byla respirace mitochondrií izolovaných z kontrolních buněk a buněk inkubovaných 24 h s 10  $\mu\text{M}$  rheimem. Zobrazené výsledky pocházejí pouze ze dvou měření, proto u nich prováděn žádný statistický test. Výsledné hodnoty jsou přesto ukázány, protože

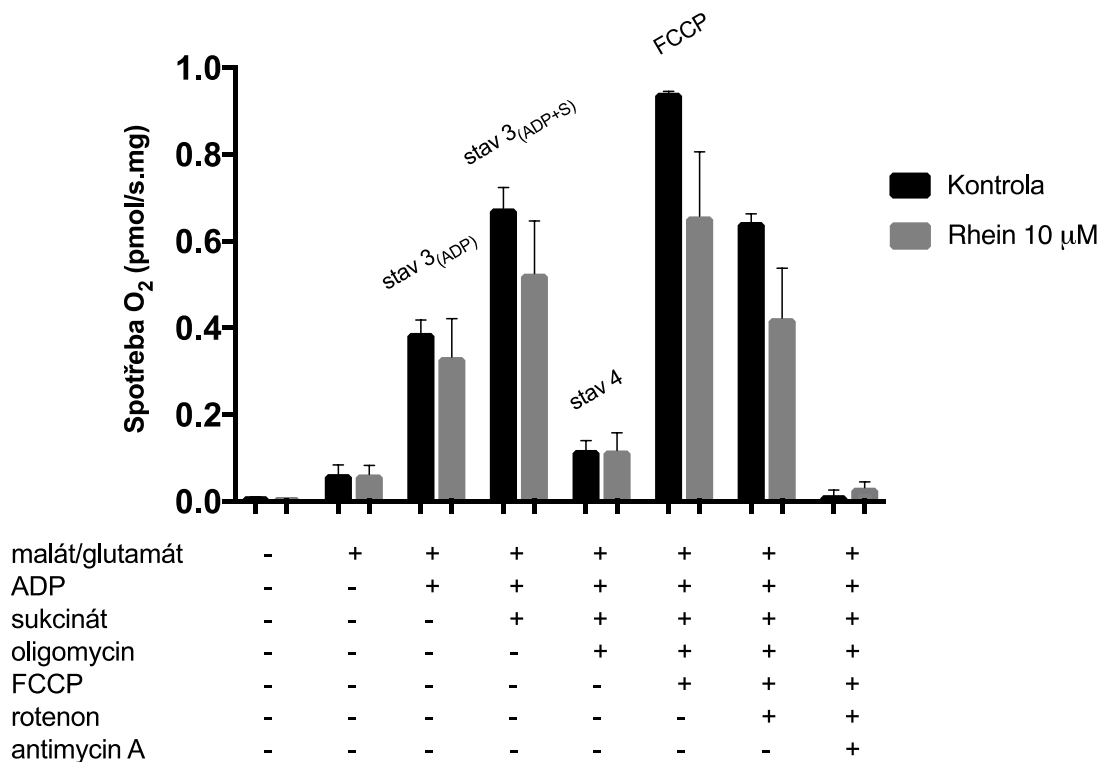
vykazují velmi podobný trend jako data získaná z respirometrických pokusů na buněčných preparátech.

Schéma průběhu měření respirace na izolovaných mitochondriích je znázorněno níže (Obr. 11). V průběhu experimentu byl k izolovaným mitochondriím přidán cytochrom c jako indikátor narušení integrity vnější mitochondriální membrány. Působení cytochromu c způsobilo v průměru nárůst spotřeby kyslíku o 4,5% u kontrolních buněk a 2,5% u buněk ovlivněných rheinem v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Z těchto výsledků lze usuzovat, že 24 h působení 10  $\mu\text{M}$  rheinu nepoškozuje integritu vnější mitochondriální membrány.

Data na obrázku (Obr. 12) ukazují rozdíly ve spotřebě kyslíku mezi kontrolními a ovlivněnými buňkami. Změny jsou viditelné zejména ve stavu  $3_{(\text{ADP+S})}$  a FCCP (viz kap. 4.5.1), v obou případech je pozorován pokles spotřeby kyslíku u buněk ovlivněných 10  $\mu\text{M}$  rheinem. Respirace zůstala snižena i po zablokování komplexu I rotenonem. Výsledky naznačují nižší mitochondriální fosforylující respiraci v přítomnosti substrátů komplexů I a II, a také nižší maximální respiraci.

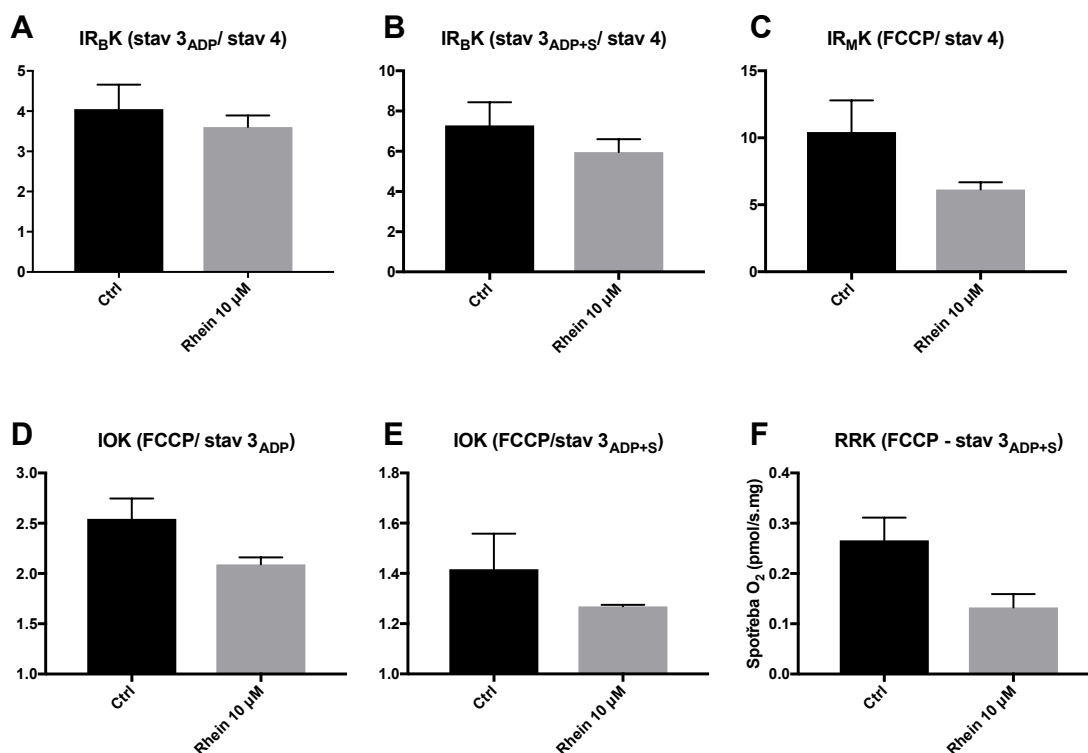


Obr. 11 Reprezentativní diagram o průběhu měření respirace mitochondriemi izolovanými z buněk SH-SY5Y. Měření spotřeby  $\text{O}_2$  zahrnovalo působení různých agens: malát/glutamát (Mal/Glu), ADP, cytochrom c (cytC), sukcinát (S), oligomycin (Omy), FCCP, rotenon (Rot), antimycin A (AA). Modrá křivka představuje hodnotu koncentrace kyslíku v komoře oxygrafu, červená křivka odráží změnu kyslíku v čase.



Obr. 12 Grafické zobrazení spotřeby  $O_2$  mitochondriemi izolovanými z buněk SH-SY5Y v přítomnosti různých substrátů a inhibitorů, porovnání kontroly a skupiny vystavené 24h působení  $10 \mu M$  rheinu. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

Z naměřených hodnot byly vypočteny a graficky znázorněny (Obr. 13) některé parametry, kterými lze lépe charakterizovat fungování respiračního řetězce (viz kap. 4.5.1). Indexy respirační kontroly ( $IR_{BK}$  a  $IR_{MK}$ ) vyjadřují míru spřažení elektron-transportního řetězce. Nižší hodnoty indexů znamenají nižší míru spřažení a tudíž kapacitu elektron-transportního systému využitou k fosforylaci ADP. Byl pozorován také nižší index odpřažené kontroly (IOK) u mitochondrií izolovaných z ovlivněných buněk. Čím více se hodnoty IOK blíží jedné, tím více se respirace poháněná ATP syntázou blíží maximální dosažitelné respiraci. Výrazná změna se týkala rezervní kapacity mitochondriálního řetězce (RRK). Pokles v tomto parametru po působení rheinu znamená menší prostor k navýšení aktivity elektron-transportního systému v případě zvýšených energetických nároků.

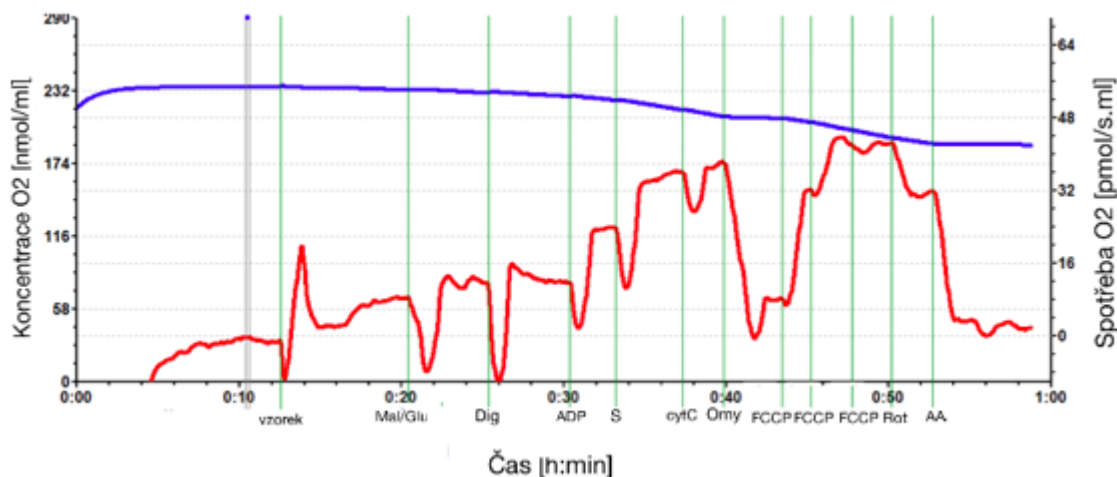


Obr. 13 Grafické zobrazení vyhodnocených kontrolních parametrů mitochondriální respirace u buněk neovlivněných (Ctrl) a vystavených 24h působení 10 μM rheinu. Index bazální respirační kontroly (IR<sub>B</sub>K) odvozený z podílu stavů 3 a 4 za aktivity komplexu I (A) a při činnosti komplexů I i II (B). (C) Index maximální respirační kontroly (IR<sub>M</sub>K) jako podíl FCCP a stavu 4. Index odpřažené kontroly (IOK) získaný z podílu FCCP a stavu 3 za aktivity komplexu I (D) a při činnosti komplexů I i II (E). (F) Respirační rezervní kapacita (RRK) daná rozdílem FCCP a stavu 3 za účasti komplexů I i II. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesení střední chyby průměru. Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

#### 5.4.2 Permeabilizované buňky

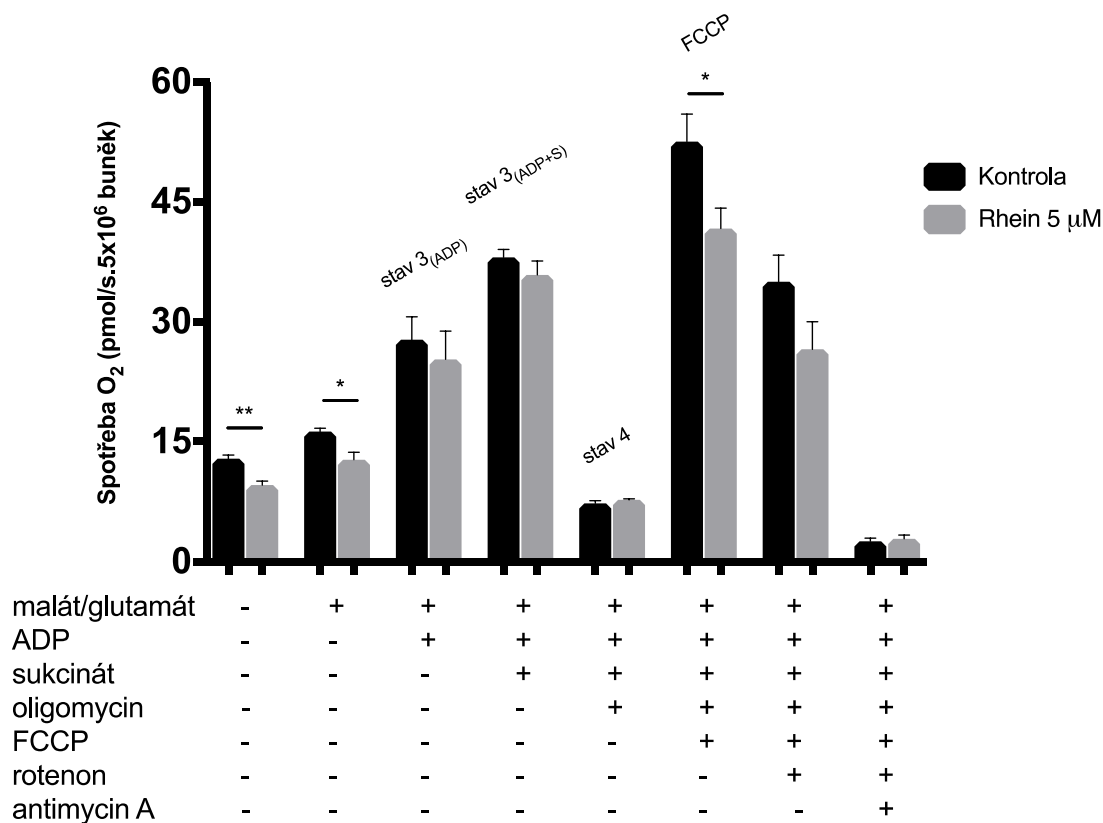
Při měření respirace na permeabilizovaných buňkách (Obr. 14) byly současně pozorovány 2 experimentální skupiny: buňky kontrolní + ovlivněné 5 μM rheinem nebo buňky kontrolní + ovlivněné 10 μM rheinem.

V průběhu experimentu byl k buňkám přidán cytochrom c jako indikátor poškození integrity vnější mitochondriální membrány. Působení cytochromu c způsobilo nárůst spotřeby kyslíku v průměru o 2,65% u kontrolních buněk, 3,13% u buněk ovlivněných rheinem v koncentraci 5 μM a 2,55% u buněk ovlivněných rheinem v koncentraci 10 μM. Nízký vliv cytochromu c na respiraci naznačil, že vnější mitochondriální membrána nebyla výrazně poškozena u žádné z pokusných skupin.



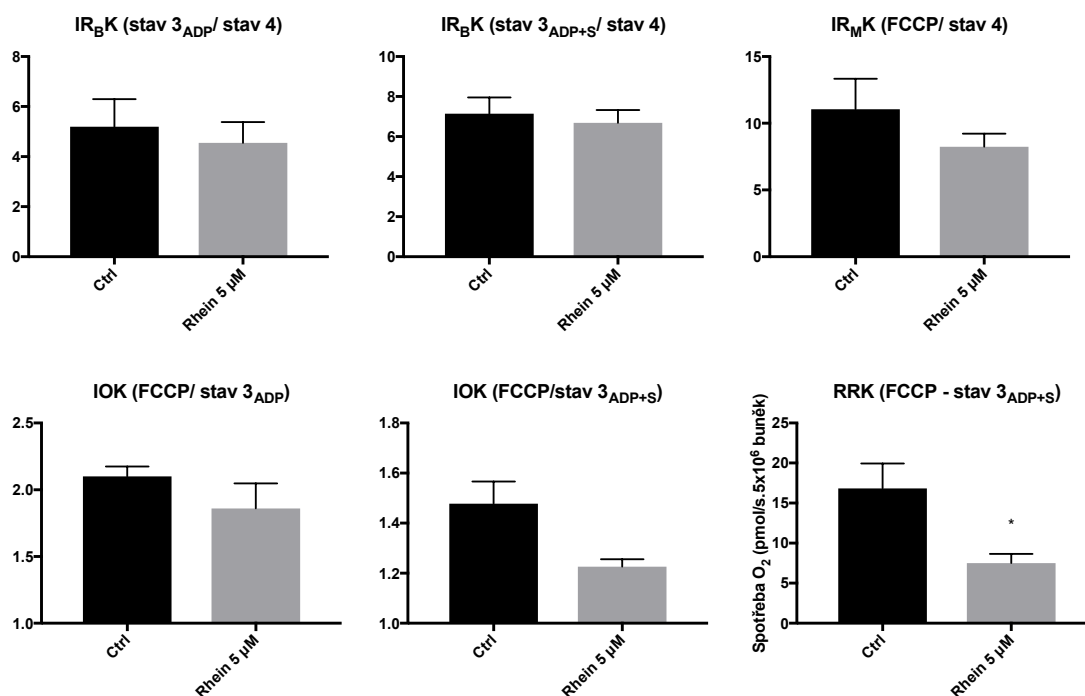
Obr. 14 Reprezentativní diagram o průběhu měření respirace permeabilizovaných buněk SH-SY5Y. Měření spotřeby O<sub>2</sub> zahrnovalo působení různých agens: malát/glutamát (Mal/Glu), digitonin (Dig), ADP, cytochrom c (cytC), sukcinát (S), oligomycin (Omy), FCCP, rotenon (Rot), antimycin A (AA). Modrá křivka představuje hodnotu koncentrace kyslíku v komoře oxygrafu, červená křivka odráží změnu kyslíku v čase.

Rozdíly ve spotřebě kyslíku mezi buňkami kontrolními a ovlivněnými 5  $\mu$ M rheinem jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 15). V nepřítomnosti žádných externě přidávaných činitelů se na spotřebě kyslíku podílí buňky pouze svou endogenní respirací. Ta byla signifikantně snížena (přibližně o 25%) u skupiny vystavené 5  $\mu$ M rheinu. Respirace zůstala signifikantně snížena i po permeabilizaci buněk a přidání malátu a glutamátu (o 20%), ale příliš se nelišila ve stavech 3 a 4. Další rozdíl ve spotřebě O<sub>2</sub> byl pozorován ve stavu maximální respirace indukované odpráhuující látkou (FCCP). Ovlivněné buňky měly oproti kontrole významně nižší maximální spotřebu kyslíku (cca o 20%). Průměrné hodnoty respirace získané zablokováním komplexu I rotenonem byly také sniženy u ovlivněných buněk, ale výsledek nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Nemitochondriální spotřeba kyslíku po přidání antimycinu A dosahovala obdobných hodnot u obou experimentálních skupin.



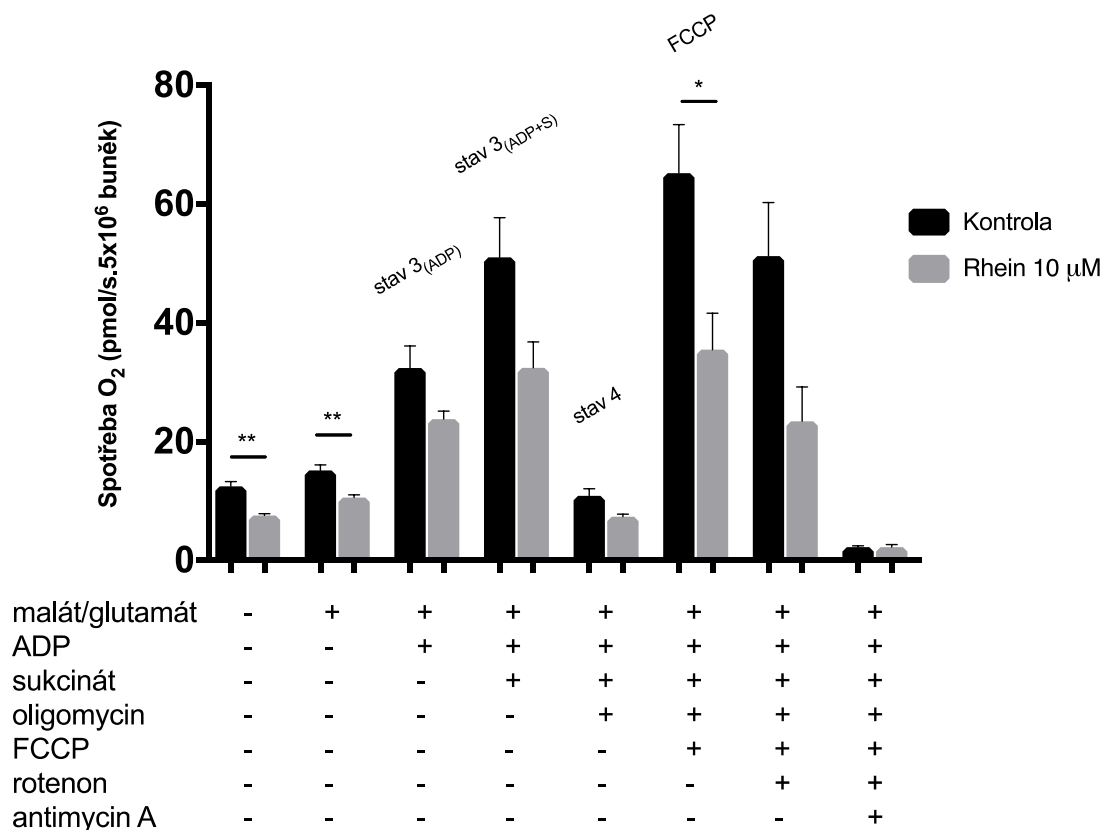
Obr. 15 Grafické zobrazení spotřeby  $O_2$  mitochondriemi izolovanými z buněk SH-SY5Y v přítomnosti různých substrátů a inhibitorů, porovnání kontroly a skupiny vystavené 24h působení 5  $\mu$ M rheinu. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ , \*\*,  $P \leq 0.01$ . Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

Porovnáním kontrolních parametrů charakterizujících fungování respiračního řetězce (viz kap. 4.5.1) byly mezi experimentálními skupinami pozorovány následující rozdíly (Obr. 16). Indexy respirační kontroly ( $IR_{BK}$  a  $IR_{MK}$ ) vyjadřující míru spřažení elektron-transportního řetězce se signifikantně nelišily mezi kontrolní a ovlivněnou skupinou buněk. Pokles v indexu odpražené kontroly (IOK) odvozeného z podílu FCCP a stavu 3 naznačuje, že ETS u rheinem ovlivněných buněk využívá k pohonu ATP syntázy větší procento své maximální kapacity, ale ani tyto změny nebyly statisticky významné. Oproti kontrole se však po ovlivnění rheinem signifikantně snížil parametr respirační rezervní kapacity (RRK), který ve srovnání s kontrolou klesl v průměru o 55%.



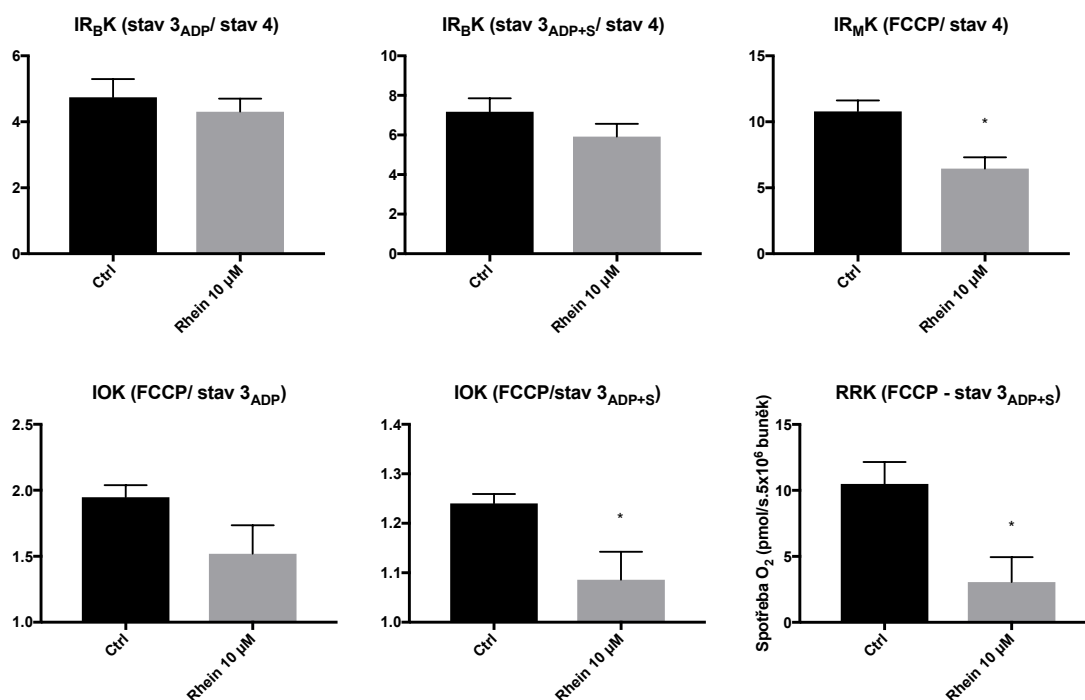
Obr. 16 Grafické zobrazení vyhodnocených kontrolních parametrů mitochondriální respirace u buněk neovlivněných (Ctrl) a vystavených 24h působení 10 μM rheinu. Index bazální respirační kontroly (IR<sub>B</sub>K) odvozený z podílu stavů 3 a 4 za aktivity komplexu I (A) a při činnosti komplexů I i II (B). (C) Index maximální respirační kontroly (IR<sub>M</sub>K) jako podíl FCCP a stavu 4. Index odpřažené kontroly (IOK) získaný z podílu FCCP a stavu 3 za aktivity komplexu I (D) a při činnosti komplexů I i II (E). (F) Respirační rezervní kapacita (RRK) daná rozdílem FCCP a stavu 3 za účasti komplexů I i II. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

Porovnání spotřeby kyslíku mezi buňkami neovlivněnými a inkubovanými s 10 μM rheinem je prezentováno na obrázku (Obr. 17). Výsledky ukazují velmi podobný trend jako případě ovlivnění 5 μM rheinem. Ve srovnání s kontrolními buňkami signifikantně klesla endogenní respirace ovlivněných buněk (v průměru o 40%). Pokles byl pozorován také po přidání malátu a glutamátu k permeabilizovaným buňkám (o 30%) a výrazněji se snížily také hodnoty maximální respirace (téměř o 45%). Oproti pokusům zkoumajícím vliv 5 μM rheinu byl pozorován značný pokles ve stavu 3 při činnosti pouze komplexu I i po přidání sukcinátu. Statistické testy však neidentifikovaly pozorované změny jako signifikantní. Signifikantní význam byl zamítnut také u rozdílu v respiraci poháněné komplexem II po přidání rotenonu. Nemitochondriální respirace zůstala opět neovlivněna.



Obr. 17 Grafické zobrazení spotřeby O<sub>2</sub> mitochondriemi izolovanými z buněk SH-SY5Y v přítomnosti různých substrátů a inhibitorů, porovnání kontroly a skupiny vystavené 24h působení 10 μM rheimu. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesení střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu, P≤0.05, \*\*, P≤0.01. Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

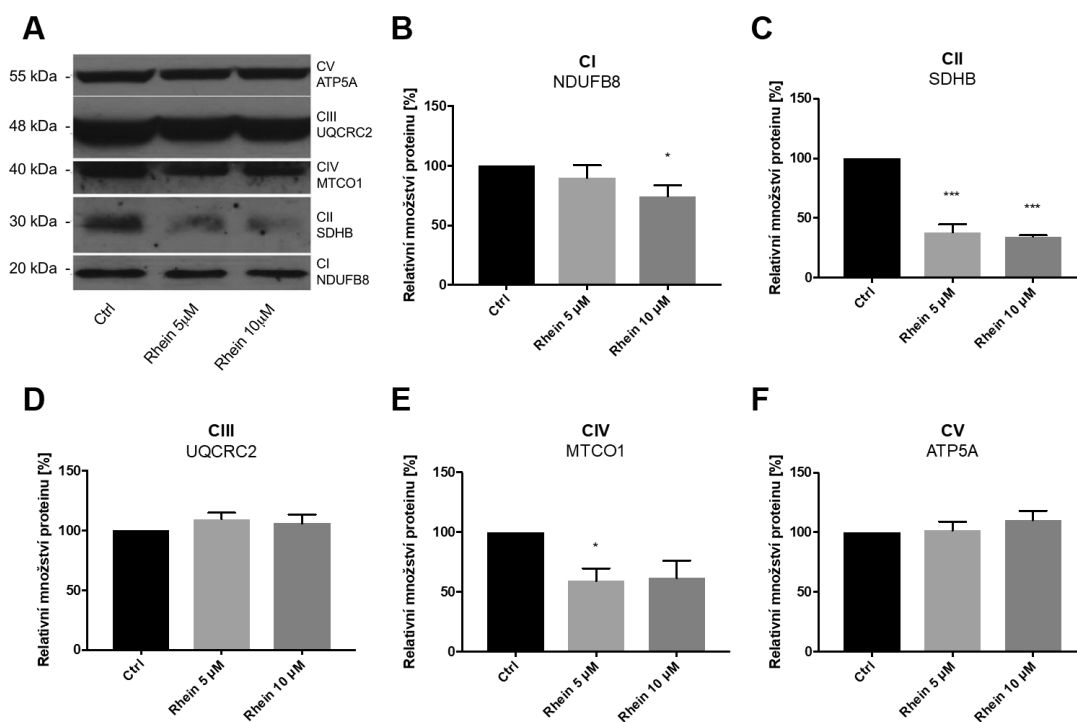
Ovlivnění buněk 10 μM koncentrací rheimu se projevilo podobně jako při použití 5 μM koncentrace i v případě některých kontrolních parametrů (viz kap. 4.5.1, Obr. 18). Podobné výsledky se týkaly hodnot IOK a RRK, přičemž pozorovaný pokles byl mnohem markantnější. U buněk se po ovlivnění 10 μM rheimem téměř vytratila rezervní kapacita respiračního řetězce, ve srovnání s kontrolními buňkami byla přibližně třetinová. Hodnoty IOK získané podílem FCCP a stavu 3<sub>(ADP+S)</sub> se výrazně přibližují jedné, dýchací řetězec tedy jede skoro na doraz své maximální dosažitelné aktivity. U ovlivněných buněk byl signifikantně snížen také parametr IR<sub>MK</sub> (cca o 40%) a nově byl zpozorován pokles (nesignifikantní) i v indexu IR<sub>BK</sub> za příspěvku komplexů I i II. Tyto výsledky značí nižší kapacitu a míru spřažení mitochondriálního ETS u buněk vystavených 10 μM rheimu ve srovnání s kontrolními buňkami.



Obr. 18 Grafické zobrazení vyhodnocených kontrolních parametrů mitochondriální respirace u buněk neovlivněných (Ctrl) a vystavených 24h působení 10 μM rheinu. Index bazální respirační kontroly (IR<sub>BK</sub>) odvozený z podílu stavů 3 a 4 za aktivity komplexu I (A) a při činnosti komplexů I i II (B). (C) Index maximální respirační kontroly (IR<sub>MK</sub>) jako podíl FCCP a stavu 4. Index odprážené kontroly (IOK) získaný z podílu FCCP a stavu 3 za aktivity komplexu I (D) a při činnosti komplexů I i II (E). (F) Respirační rezervní kapacita (RRK) daná rozdílem FCCP a stavu 3 za účasti komplexů I i II. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vnesením střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . Zkratky: ADP, adenosindifosfát; FCCP, karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon; S, sukcinát.

## 5.5 Detekce proteinových podjednotek komplexů respiračního řetězce

Vzhledem k rozdílům v respiračních křivkách mezi buňkami kontrolními a ovlivněnými rheinem byla pomocí metody Western blot stanovena míra exprese podjednotek mitochondriálních respiračních komplexů (Obr. 19). Získané výsledky dokumentující expresi některých podjednotek komplexů oxidativní fosforylace ukazují, že detekované podjednotky komplexu III (UQCRC2) a ATP syntázy (ATP5A) zůstaly bez výrazné změny míry exprese, zatímco u podjednotky SDHB komplexu II byl pozorován pokles o více než 60% oproti kontrolním buňkám. Snížení exprese bylo zaznamenáno také u podjednotek komplexů I (NDUFB8), ale pouze po působení 10 μM rheinu (cca o 50%), a komplexu IV (MTCO1), kde byl jako signifikantní vyhodnocen pokles pouze u skupiny inkubované s 5 μM rheinem (zhruba o 40%). Rozdíl hladin MTCO1 mezi skupinou kontrolní a ovlivněnou 10 μM inhibitorem byl na hranici statistické významnosti ( $P=0,0578$ ).



Obr. 19 Expresa proteinových podjednotek komplexů respiračního řetězce v buňkách kontrolních (Ctrl) a vystavených 5 μM a 10 μM koncentraci rheinu. (A) Repräsentativní snímky imunoblotů. (B-F) Grafické zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinových podjednotek komplexů I-V vyjádřené jako množství proteinu vztahované ke kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ , \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

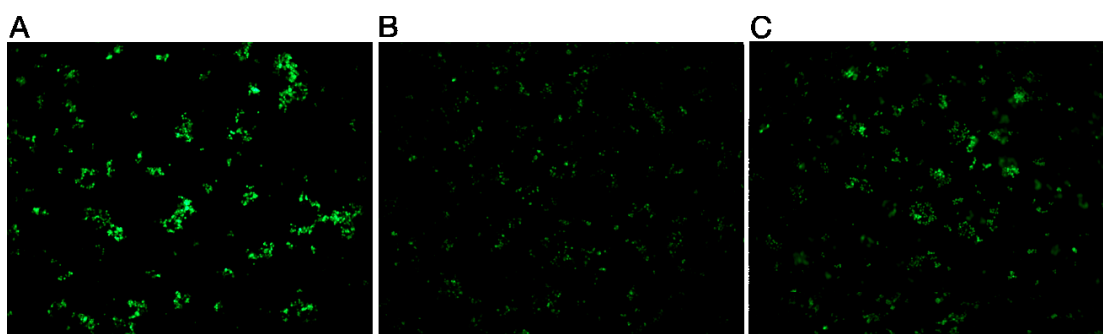
## 5.6 Produkce ROS

Ve čtyřech pokusných vzorcích ovlivněných 0, 3, 5 nebo 10 μM rheinem byla detekována tvorba intracelulárních ROS využitím fluorescenčních sond  $H_2DCFDA$  a DHE.

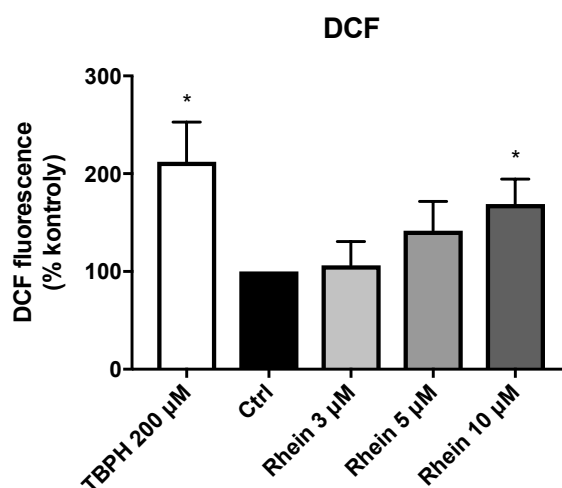
$H_2DCFDA$  volně prochází membránou do buněk, kde je deacetylován buněčnými esterázami, čímž ztrácí schopnost procházet membránami zpět. Vzniklý 2,7-dichlorodihydrofluorescein je velmi citlivý k ROS a při kontaktu s nimi se okamžitě oxiduje na 2,7-dichlorofluorescein (DCF), který je fluorescenční v zeleném spektru. DCF je citlivý především k  $H_2O_2$ , ale v menší míře i některým dalším reaktivním sloučeninám (peroxynitrit,  $HClO$ ). Míra fluorescence je proporcíální hladině těchto reaktivních molekul. Řada studií však ukázala, že oxidaci DCF ovlivňuje i výskyt antioxidantních systémů. Uvažuje se tedy, že DCF fluorescence odráží spíše celkový oxidativní stres než změny v produkci ROS.

Do buněk volně vstupující DHE je široce používaná fluorescenční sonda k detekci  $O_2^-$ . DHE reaguje s aniontem superoxidu za vzniku červeně fluorescenčního produktu, který se vmezeří do jaderné DNA.

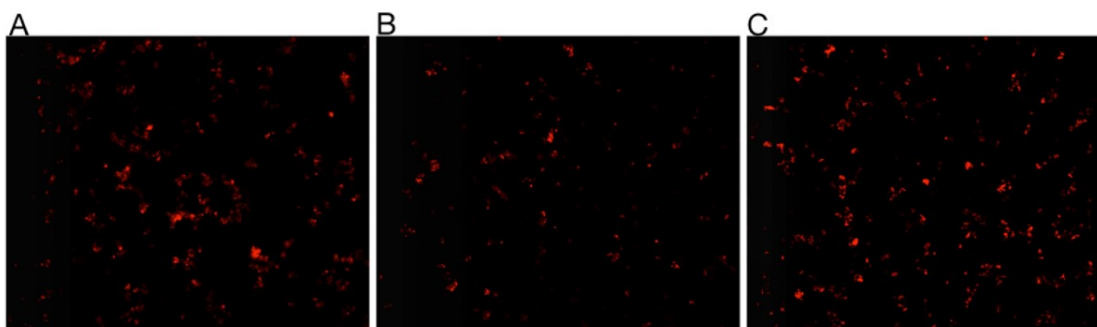
Byl pozorován trend rostoucí intenzity fluorescence se zvyšující se použitou koncentrací rheinu, a to u obou použitých sond (Obr. 20 - Obr. 23). Signifikantní rozdíl byl zaznamenán mezi kontrolní skupinou bez přítomnosti inhibitoru a buňkami ovlivněnými 10  $\mu\text{M}$  koncentrací rheinu, u sond DHE i  $H_2\text{DCFDA}$ . Intezita fluorescence DHE u ovlivněných buněk dosahovala přibližně 1,5 násobku hodnot kontroly, v případě sondy  $H_2\text{DCFDA}$  se zvýšila v průměru na 1,7 násobek. Je třeba zmínit, že úpravy zavedené do protokolu kvůli chování buněk, například nutnost centrifugace, mohou samy o sobě působit jako stresující faktor a snižovat věrohodnost získaných výsledků.



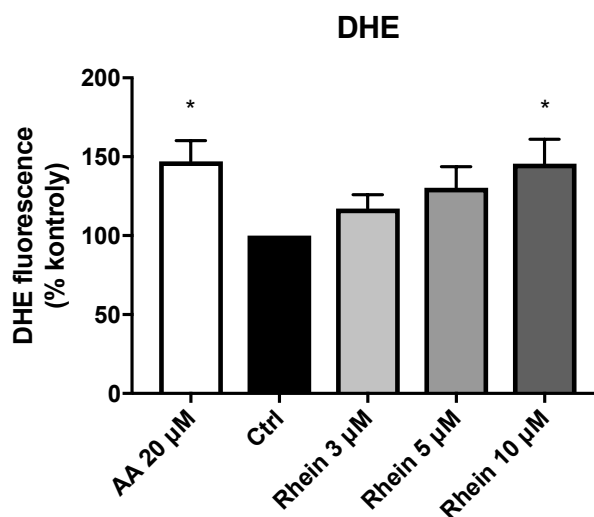
Obr. 20 Exemplární snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycující fluorescenci DCF v buňkách SH-SY5Y. Ukázána je pozitivní kontrola indukovaná působením 200  $\mu\text{M}$  TBHP (A), kontrolní neovlivněné buňky (B) a buňky inkubované s 10  $\mu\text{M}$  rheinem (C).



Obr. 21 Fluorescence DCF v buňkách kontrolních (Ctrl), inkubovaných s 200  $\mu\text{M}$  TBHP (pozitivní kontrola) a vystavených 3, 5 a 10  $\mu\text{M}$  koncentracím rheinu. Síla fluorescenčního signálu je vyjádřena jako relativní změna oproti kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . Zkratky: DCF, dichlorodihydrofluorescein; TBHP, tert-butyl hydroperoxid.



Obr. 22 Exemplární snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycující fluorescenci DHE v buňkách SH-SY5Y. Ukázána je pozitivní kontrola indukovaná působením 20  $\mu\text{M}$  antimycinu A (A), kontrolní neovlivněné buňky (B) a buňky inkubované s 10  $\mu\text{M}$  rheinem (C).



Obr. 23 Fluorescence DHE v buňkách kontrolních (Ctrl), inkubovaných s 20  $\mu\text{M}$  AA (pozitivní kontrola) a vystavených 3, 5 a 10  $\mu\text{M}$  koncentracím rheinu. Síla fluorescenčního signálu je vyjádřena jako relativní změna oproti kontrole. Data grafu reprezentují průměrné hodnoty s vnesením střední chyby průměru. \* – statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou dle t-testu,  $P \leq 0.05$ . Zkratky: AA, antimycin A; DHE, dihydroethidium.

## 6 Diskuze

RNA demetyláza FTO byla opakovaně spojována s ovlivněním metabolických a energeticky významných pochodů. Ve světle řady novodobějších teorií, které si všímají koincidence neurodegenerativních onemocnění a narušené energetické homeostáze, se zdá být FTO vhodným kandidátem pro studium této problematiky. Cílem této práce bylo pozorovat vliv inhibice funkce FTO na oxidativní metabolismus a expresi proteinů insulinové signalizace využitím modelu lidské neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y. Jelikož je farmakologický přístup ke studiu činnosti enzymu FTO v literatuře značně opomíjen, k ovlivnění aktivity proteinu jsme se rozhodli využít inhibitor FTO rhein.

Cytotoxicita rheimu byla testována na různých buněčných liniích. Výsledky ukazují, že vliv rheimu na viabilitu buněk je závislý na použité koncentraci inhibitoru a délce trvání inkubace. Nízké koncentrace se přitom zdají být buňkami dobře tolerovány (Bounda et al., 2015; Chen et al., 2012; Li et al., 2016). Pomocí MTT testu jsme proto ověřovali působení rheimu na životaschopnost námi zvolené modelové linie SH-SY5Y. Ukázalo se, že vystavení buněk rheimu v koncentracích 3, 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$  po dobu 24 h buněčnou viabilitu neovlivňuje, zatímco rhein v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  působil výrazně cytotoxicky. Protože buňky v průběhu experimentu rostou, je otázkou, zda nižší výstupní hodnotu MTT testu interpretovat jako zvýšenou úmrtnost buněk nebo omezenou proliferaci schopnost. Inhibiční vliv rheimu na proliferaci byl v minulosti identifikován (Legendre et al., 2009). Podobně i *Fto*<sup>-/-</sup> myši embryonální fibroblasty vykazovaly nižší proliferaci (Gulati et al., 2013). Na druhou stranu knockdown FTO nebyl doprovázen změnou proliferace v buňkách SH-SY5Y (Pitman et al., 2012). Pro další experimenty byly zvoleny koncentrace inhibitoru nepřesahující 10  $\mu\text{M}$  koncentraci.

Nezanedbatelnou roli v bioenergetice mozkové tkáně hraje insulinová signalizace, která je propagována hlavně pomocí dvou signalizačních kaskád: PI3K/Akt a MAPK. Zkoumali jsme proto vliv inhibice FTO rheimem na expresi insulinového receptoru (IR), insulin degradujícího enzymu (IDE), fosfatidylinosityl 3-kinázy (PI3K) a kináz Akt, GSK3 $\beta$ , ERK1/2, p38 a jejich fosforylovaných forem. Po inhibici FTO se zvýšily hladiny insulinového receptoru, a také insulin degradujícího enzymu. Bez signifikantních změn zůstala exprese p110 podjednotky PI3K. Poměr p-Akt/Akt se značně snížil, ale exprese GSK3 $\beta$  a p-GSK3 $\beta$  se nezměnila. Výrazný pokles byl pozorován u poměru p-p38/p38, zatímco u experimentální skupiny ovlivněné 10  $\mu\text{M}$  rheimem byl zaznamenán nárůst poměru p-ERK/ERK. Tradiční pojetí aktivace insulinové signalizace představuje aktivaci (fosforylaci) kináz ERK a Akt a inhibici (fosforylaci) GSK3 $\beta$  (Steen et al., 2005). Přesto

v literatuře existují neshody (Chami et al., 2016). Nicméně, spuštění insulinové signální dráhy vyžaduje aktivaci receptoru vazbou insulinu. Příčinou neobvyklých změn v expresi komponent signalizační kaskády (nárůst IR, ale pokles p-Akt/Akt a nezměněný poměr p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ) pozorovaných v této práci by mohl být fakt, že zde nebyl zahrnut vliv insulinu. Spíše než působení rheinu na proces insulinové signalizace byla zkoumána adaptace celulárního prostředí na odlišnou aktivitu bioenergetického regulátoru FTO. Vlivem rheinu na expresi proteinů insulinové signalizace se zabýval Fernand a spol. Na modelu nádorových HUVEC buněk pozoroval potlačení VEGF-dependentní aktivity PI3K, p-Akt a p-ERK (Fernand et al., 2011). Pokles ve fosforylované Akt kináze u buněčné linie SH-SY5Y byl detekován po knockdownu FTO, naopak u adipocytů se hladiny p-Akt zvýšily. Bylo tak ukázáno, že působení FTO se odvíjí od konkrétního buněčného typu (Pitman et al., 2012). Naopak overexprese FTO ve svalových buňkách a v linii HEK293 měla za následek zvýšení p-Akt/Akt (Bravard et al., 2011). PI3K/Akt dráha ovlivňuje vychytávání glukózy. Vazbou PI3K na IRS a následnou aktivací Akt je stimulován transport glukózy (Steen et al., 2005). Vedle snížených hladin p-Akt byl v práci Pitmana a spol. pozorován i pokles v míře vychytávání glukózy (Pitman et al., 2012). Odchytky v příjmu tohoto energetického substrátu jsou často v doprovodu pozměněné mitochondriální funkce (del Campo et al., 2014; Gupte et al., 2013; Hughey et al., 2014), která byla v této diplomové práci také pozorována.

Insulinová signalizace se zdá být poškozena v řadě neurodegenerativních onemocnění i v procesu stárnutí. Pacienti postižení Alzheimerovou chorobou (AD) mají v mozku snížené hladiny IR a narušenou signální dráhu, která má pravděpodobně souvislost s rozvojem markerů AD jako je hyperfosforylace tau a tvorba  $\beta$ -amyloidních plaků (Mullins et al., 2017; Sajan et al., 2016). Pozorovaná zvýšená exprese IR po aplikaci rheinu by mohla působit protektivně vůči propagaci Alzheimerovi choroby. Stejně tak nárůst hladin IDE, který je schopen rozkládat kromě insulinu také  $\beta$ -amyloid. Nedostatečnost funkce IDE byla asociována s insulinovou rezistencí mozkové tkáně (Lynch et al., 2006). Potenciální protektivní schopnost inhibice FTO v rozvoji neurodegenerativních onemocnění byla nastíněna při zjištění poklesu fosforylovaného tau v buňkách SH-SY5Y s utlumenou expresí FTO (Pitman and Fong, 2013). Aktivita GSK3 $\beta$  se uvažuje jako jednou z majoritních příčin způsobujících hyperfosforylaci tau. Fosforylace GSK3 $\beta$  vede k potlačení této aktivity. Pokud se v neuronech snižují hladiny fosfo-tau po inhibici FTO, mohlo by být pozorováno zvýšení poměru p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ . Na druhou stranu množství fosforylované Akt kinázy zodpovědné za inhibici GSK3 $\beta$  bylo sníženo u ovlivněných buněk (Pitman et al., 2012). Zkoumání proteinu GSK3 $\beta$  a jeho fosforylované formy v této diplomové práci ovšem neodhalilo téměř žádné změny v expresi. Fosforylovat GSK3 $\beta$  je schopno vedle Akt i několik dalších kináz

(Jope & Johnson 2004). Je tedy možné, že několik drah současně reguluje aktivitu GSK3 $\beta$ , přičemž tato regulace může být protichůdná. GSK3 $\beta$  je také molekulou s kompartmentalizovaným výskytem. Je-li kináza modifikována odlišně v jednotlivých kompartmentech, výsledný poměr může zůstat nezměněn (Perez-Costas et al., 2010). Alternativně by i aktivace AMPK mohla přispívat k fosforylaci tau. Snížené hladiny fosforylované (neaktivované) AMPK byly naměřeny v buňkách SH-SY5Y po knockdownu FTO (Pitman et al., 2012). V této práci jsme se však expresí proteinu AMPK nezabývali. Nicméně molekula p38 se také ukazuje mít souvislost s modifikací tau. Oproti GSK3 $\beta$  je MAPK p38 fosforylací aktivována. Následně je schopna fosforylace řady efektorových molekul, zejména kináz a transkripčních faktorů. Vyšší hladiny p-p38 byly pozorovány v mozku v souvislosti s AD a velmi pravděpodobně také přispívají k hyperfosforylaci tau (Giraldo et al., 2014). Aktivovaná kináza p38 kolokalizuje s fosfo-tau zejména v časných stádiích choroby (Sun, 2003). Naměřený pokles v poměru p-p38/p38 u buněk inkubovaných s inhibítorem FTO by tak mohl vysvětlovat sníženou fosforylaci proteinu tau. O existenci vztahu mezi aktivitou p38 a FTO svědčí i další práce ((Engelman et al., 1998; Zhao et al., 2014a).

Narušení insulinové signalizace bylo asociováno se zvýšeným oxidativním stresem a redukcí mitochondriální funkce v neuronech (de la Monte & Wands 2002). Neurony jsou buňky bohaté na mitochondrie, oxidativní fosforylace zde představuje hlavní roli v bioenergetickém metabolismu. Podobně jako postižení insulinové signalizace, také modifikace v mitochondriálních funkcích mohou přispívat k patofyziologii mozkové tkáně. Vedle insulinové signalizace byl v této práci zájem o studium dýchacího řetězce. Při overexpresi FTO byly ve svalových vláknech a buňkách C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> odlišně exprimovány komplexy elektron-transportního systému (Bravard et al., 2011). V buňkách SH-SY5Y byl knockdown FTO doprovázen zvýšením hladin ATP (Pitman et al., 2012). Co se týče rheinu, Du a spol. vypožorovali negativní působení této látky na mitochondriální funkce v Hep-G2 buněčné linii. Vedle snížených hladin ATP zaznamenali pokles v mitochondriálním membránovém potenciálu a únik cytochromu c do cytosolu. Avšak koncentrace rheinu použité v tomto případě byly poměrně vysoké (50-100  $\mu$ M na 48 h) (Du et al., 2013).

Měřením spotřeby kyslíku buňkami na přístroji oxygrafu se podařilo odhalit pozměněný charakter respirace u rheinem ovlivněných buněk. Pozorovány byly zejména snížené hodnoty endogenní a maximální respirace buněk. Vyšší koncentrace inhibítora vedla k markantnějším změnám. Endogenní respirace obvykle odráží obrát energie v buňkách (Brand and Nicholls, 2011; Pesta and Gnaiger, 2012). Změny v endogenní respiraci nastávají nejpravděpodobněji

z důvodu odlišných nároků na tvorbu ATP a nemusí indikovat mitochondriální dysfunkci. Nižší spotřeba kyslíku mitochondriemi by v tomto případě vysvětlovala zvýšení hladin ATP a pokles p-AMPK v buňkách SH-SY5Y se sníženou expresí FTO (Pitman et al., 2012). Pokles v maximální respiraci indukované rozpráhovačem může na druhou stranu implikovat mitochondriální poruchu. V tomto stavu je respirace kontrolována oxidací substrátů a změny mohou indikovat dysfunkci komponent respiračního řetězce, substrátových transportérů nebo dehydrogenáz (Brand and Nicholls, 2011). Integrita vnější mitochondriální membrány s velkou pravděpodobností nebude narušena, protože externě přidaný cytochrom c nezpůsobil výrazný nárůst ve spotřebě kyslíku.

Vedle absolutních hodnot spotřeby kyslíku bylo z naměřených dat vypočteno několik kontrolních parametrů k lepší charakterizaci buněčné respirace. Zdravé mitochondrie vykazují vysoké hodnoty v indexu respirační kontroly (IRK). Tento parametr vypočtený z podílu hodnot stavu 3 a stavu 4 nebo FCCP a stavu 4 je dobrým ukazatelem mitochondriální dysfunkce. Vyšší IRK obvykle znázorňuje mitochondrie s velkou kapacitou pro oxidaci substrátů a fosforylaci ADP za současně nízkého úniku protonů (Brand and Nicholls, 2011). Pozorovaný pokles v IRK u buněk ovlivněných rheinem tak napovídá o opačných vlastnostech mitochondriálního řetězce. Protože stav 4 se vlivem působení rheinu výrazně nezměnil, k nižší hodnotě IRK přispívají hlavně stavy 3 a FCCP. Pokud by byl zaznamenán pokles pouze ve stavu 3, ale maximální respirace by zůstala nezměněna, byla by pravděpodobně zkompromitována aktivita ATP syntázy. V tomto případě, kdy klesly hodnoty obou stavů bude příčina zřejmě odlišná. Protože výraznější rozdíly v kontrolních indexech byly zpozorovány při započtení vlivu komplexu II ke komplexu I, nedostatečná činnost bude zřejmě na straně komplexu II.

Významným diagnostickým parametrem, zejména pro buňky s proměnlivými energetickými nároky jako jsou neurony, je respirační rezervní kapacita (Brand and Nicholls, 2011). Rheinem ovlivněné buňky disponovaly nižší rezervní kapacitou. Jejich schopnost přizpůsobit se podmínkám vyšší potřeby ATP je proto značně omezena. Podobně i snížený index odpřažené kontroly u rheinem ovlivněných buněk ukazuje, že k oxidativní fosforylaci je využívána většina kapacity elektron-transportního systému a respirace se blíží svým bioenergetickým limitům.

Změna hustoty mitochondrií v intracelulárním prostředí může silně ovlivnit buněčnou respiraci. V této práci jsou také ukázány výsledky (i když nekompletní) z měření na izolovaných mitochondriích, které měly podobný profil změn jako pokusy na permeabilizovaných buňkách. Protože je normalizace v případě izolovaných mitochondrií

prováděna na množství proteinu a nikoliv na počet buněk, mohlo by se z toho usuzovat, že pozorované změny nebudou zapříčiněny odlišnostmi v mitochondriálním obsahu. Lepší by ovšem bylo kvantifikovat množství mitochondrií v buňkách a ideálně identifikovat i případné odlišnosti v jejich struktuře. Ve spojitosti s tímto fenoménem lze zmínit práci Liu a spol. Rhein zde měl stabilizační vliv na mitochondriální ultrastrukturu v pankreatických  $\beta$  buňkách, kde potlačil hyperglykemií navozené zvýšení hladin proteinu DRP1 - mediátoru rozpadu mitochondrií (Liu et al., 2013).

Pozorované změny v respiraci každopádně naznačily odlišnosti v dýchacím řetězci. Pokusili jsme se proto hledat zdroj těchto abnormalit v expresi proteinových podjednotek jednotlivých komplexů. U buněk ovlivněných inhibitorem FTO byl pozorován pokles hladin podjednotek komplexů I a IV a výrazná redukce v expresi podjednotky komplexu II. Žádné změny nebyly zjištěny u podjednotek komplexu III a ATP syntázy.

Ukazatelem mitochondriální dysfunkce může být i nadměrný oxidativní stres. Mitochondrie jsou významným zdrojem produkce ROS, které mají bezpochyby svůj účel ve fyziologických procesech. V případě vychýlení z rovnováhy se však stávají příčinou či následkem mnoha patofyziologických stavů. Jedním z faktorů zvýšené produkce ROS je i inhibice respiračního řetězce (Wang et al., 2015). Abychom zjistili, zda inkubace buněk SH-SY5Y s inhibitorem FTO rheimem působí změny oxidativního stavu, zkoumali jsme produkci ROS v nitrobuněčném prostředí pomocí dvou fluorescenčních sond, DHE a H<sub>2</sub>DCFDA. H<sub>2</sub>DCFDA v buňkách vstupuje do reakce s esterázami, mění se v 2,7-dichlorodihydrofluorescein a při kontaktu s ROS se poté oxiduje na fluorescenční látku 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Fluorescence DCF by měla být ukazatelem především produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ale DCF je citlivý i jiným reaktivním sloučeninám (peroxynitrit, HClO) a na jeho fluorescenci má vliv aktivita antioxidantních systémů. DCF fluorescenci je proto možná lepší interpretovat jako celkový oxidativní stres spíše než změny v produkci ROS. DHE je sonda detekující superoxidový radikál. Po reakci DHE s aniontem superoxidu vzniká červeně fluorescenční produkt, který se interkaluje do jaderné DNA. V diplomové práci se podařilo detekovat nárůst fluorescence v rheimem ovlivněných buňkách u obou použitých sond. Tyto výsledky ve shodě s daty získanými na oxygrafu i s pozorovaným poklesem exprese komplexů ETS naznačují pozměněnou mitochondriální aktivitu. Bounda a spol. pozorovali zvýšení produkce ROS v lidských HL-770 po aplikaci rheimu (Bounda et al., 2015). Na druhou stranu řada studií příkládá rheimu antioxidantní chování (Deng et al., 2012; Liu et al., 2013; Zhao et al., 2011). V těchto pracích se ukázalo, že rheim působí protektivně

proti oxidativnímu stresu vyvolanému různými činiteli, nebyl však studován vliv rheimu samostatně.

Závěrem lze říci, že rheim ovlivňuje bioenergetické pochody v neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y. Změny byly pozorovány jak v činnosti mitochondriálního respiračního řetězce, tak v insulinové signalizaci. Kromě produkce ROS působil rheim převážně inhibičně na fungování mitochondrií. Je otázkou, zda pozorované odchylky přisuzovat mitochondriální dysfunkci nebo adaptaci buněk na pozměněné energetické nároky. Povaha změn v komponentách insulinové signalizace byla komplexnější a nejednoznačně interpretovatelná.

## 7 Závěr

V této práci jsme studovali změny v mitochondriálním respiračním řetězci a insulinové signalizaci neuronálních buněk SH-SY5Y navozené inkubací s inhibitorem FTO rheinem po dobu 24h. FTO je enzym nabývající na významu zejména ve spojitosti s bioenergetickým metabolismem, jeho role v buněčné energetice je doposud velmi málo prozkoumána.

Vystavení buněk nízkým koncentracím rheinu (do 10  $\mu\text{M}$ ), které na rozdíl od vyšších koncentrací nemají na viabilitu buněk výrazný vliv, bylo doprovázeno odlišnostmi v expresi proteinů souvisejících s insulinovou signalizací. Po inhibici FTO došlo ke zvýšení hladin insulinového receptoru a insulin degradujícího enzymu. V rámci PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  dráhy byl snížen poměr p-Akt/Akt, ale vliv na aktivitu GSK3 $\beta$  prokázán nebyl. Odlišné exprese se dostalo fosforylovaným kinázám ERK1/2 a p38 z MAPK kaskády. Poměr p-p38/p38 výrazně klesl, zatímco poměr p-ERK/ERK byl zvýšen.

Podářilo se odhalit také vliv rheinu na mitochondriální respiraci. Ovlivněné buňky měly utlumenou endogenní respiraci a sníženou maximální a rezervní kapacitu elektron-transportního systému. Charakter změn naznačil pokles v činnosti komplexů dýchacího řetězce. To bylo podpořeno i analýzou exprese podjednotek jednotlivých komplexů. U buněk s inhibitorem klesl proteinový obsah podjednotek reprezentujících komplexy I, II a IV. Abnormální mitochondriální činnost dále potvrdil vzrůst intenzity signálu z fluorescenčních sond odrážející vyšší míru produkce ROS.

Získané výsledky jsou ve shodě s tezí, že FTO funguje jako regulátor energetického metabolismu. Zda lze tyto výsledky ovšem přisuzovat pouze inhibici FTO, případně snížení hladin N6-metyladenosinu v důsledku blokování funkce vícero demetyláz z AlkBH rodiny nebo snad ještě jiným mechanismům účinku rheinu, musí být upřesněno dalšími experimenty.

## 8 Literatura

Antonescu, C.N., Huang, C., Niu, W., Liu, Z., Eysers, P.A., Heidenreich, K.A., Bilan, P.J., and Klip, A. (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology* 146, 3773–3781.

Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell. Signal.* 19, 519–527.

Baker, L.A., Watt, I.N., Runswick, M.J., Walker, J.E., and Rubinstein, J.L. (2012). Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11675–11680.

von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., and Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F1Fo ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 649–672.

Benedict, C., Jacobsson, J.A., Rönnemaa, E., Sällman–Almén, M., Brooks, S., Schultes, B., Fredriksson, R., Lannfelt, L., Kilander, L., and Schiöth, H.B. (2011). The fat mass and obesity gene is linked to reduced verbal fluency in overweight and obese elderly men. *Neurobiol. Aging* 32, 1159.e1-1159.e5.

Bernas, T., and Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47, 236–242.

Bernstein, H.-G., Lendeckel, U., Bukowska, A., Ansorge, S., Ernst, T., Stauch, R., Trübner, K., Steiner, J., Dobrowolny, H., and Bogerts, B. (2008). Regional and cellular distribution patterns of insulin-degrading enzyme in the adult human brain and pituitary. *J. Chem. Neuroanat.* 35, 216–224.

Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* 87, 1427–1435.

Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J.M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 161.

Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S.H., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhom, N., et al. (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 106–111.

Bounda, G.-A., Zhou, W., Wang, D., and Yu, F. (2015). Rhein elicits in vitro cytotoxicity in primary human liver HL-7702 cells by inducing apoptosis through mitochondria-mediated pathway. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 1–19.

Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312.

Brant, A.M., Jess, T.J., Milligan, G., Brown, C.M., and Gould, G.W. (1993). Immunological

analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *192*, 1297–1302.

Bravard, A., Lefai, E., Meugnier, E., Pesenti, S., Disse, E., Vouillarmet, J., Peretti, N., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Vidal, H., et al. (2011). FTO is increased in muscle during type 2 diabetes, and its overexpression in myotubes alters insulin signaling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction. *Diabetes* *60*, 258–268.

Bravard, A., Vial, G., Chauvin, M.-A., Rouillé, Y., Bailleul, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2014). FTO contributes to hepatic metabolism regulation through regulation of leptin action and STAT3 signalling in liver. *Cell Commun. Signal.* *12*, 4.

del Campo, A., Parra, V., Vasquez-Trincado, C., Gutierrez, T., Morales, P.E., Lopez-Crisosto, C., Bravo-Sagua, R., Navarro-Marquez, M.F., Verdejo, H.E., Contreras-Ferrat, A., et al. (2014). Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *AJP Endocrinol. Metab.* *306*, E1–E13.

Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 261–273.

Crofts, A.R. (2004). The cytochrome bc 1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* *66*, 689–733.

Cunnane, S.C., Courchesne-Loyer, A., St-Pierre, V., Vandenberghe, C., Pierotti, T., Fortier, M., Croteau, E., and Castellano, C.-A. (2016). Can ketones compensate for deteriorating brain glucose uptake during aging? Implications for the risk and treatment of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1367*, 12–20.

Demetrius, L.A., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2014). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Front. Physiol.* *5*, 522.

Deng, Z.-Y., Huang, G.-D., Luo, T., Deng, Z.-Y., and Hu, J.-N. (2012). Protective effect of rhein against oxidative stress-related endothelial cell injury. *Mol. Med. Rep.* *5*, 1261–1266.

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., et al. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* *485*, 201–206.

Du, Q., Bian, X.-L., Xu, X.-L., Zhu, B., Yu, B., and Zhai, Q. (2013). Role of mitochondrial permeability transition in human hepatocellular carcinoma Hep-G2 cell death induced by rhein. *Fitoterapia* *91*, 68–73.

Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* *40*, 747–758.

Engelman, J.A., Lisanti, M.P., and Scherer, P.E. (1998). Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *273*, 32111–32120.

Fan, H.-Q., He, W., Xu, K.-F., Wang, Z.-X., Xu, X.-Y., and Chen, H. (2015). FTO inhibits insulin secretion and promotes NF- $\kappa$ B activation through positively regulating ROS production in pancreatic  $\beta$  cells. *PLoS One* *10*, e0127705.

De Felice, F.G., and Ferreira, S.T. (2014). Inflammation, defective insulin signaling, and

mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes* 63, 2262–2272.

Fernand, V.E., Losso, J.N., Truax, R.E., Villar, E.E., Bwambok, D.K., Fakayode, S.O., Lowry, M., and Warner, I.M. (2011). Rhein inhibits angiogenesis and the viability of hormone-dependent and -independent cancer cells under normoxic or hypoxic conditions in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 192, 220–232.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J.C., and Rütther, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458, 894–898.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., et al. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889–894.

Fredriksson, R., Hägglund, M., Olszewski, P.K., Stephansson, O., Jacobsson, J.A., Olszewska, A.M., Levine, A.S., Lindblom, J., and Schiöth, H.B. (2008). The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149, 2062–2071.

Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.-G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., et al. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 105, 423.

Gao, A.W., Cantó, C., and Houtkooper, R.H. (2014). Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol. Med.* 6, 580–589.

Gao, X., Shin, Y.-H., Li, M., Wang, F., Tong, Q., and Zhang, P. (2010). The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PLoS One* 5, e14005.

Gaspar, J.M., Baptista, F.I., Macedo, M.P., and Ambrósio, A.F. (2016). Inside the diabetic brain: role of different players involved in cognitive decline. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 131–142.

Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.-C.L., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S.H., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., et al. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469–1472.

Giraldo, E., Lloret, A., Fuchsberger, T., and Viña, J. (2014). A $\beta$  and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: Protective role of vitamin E. *Redox Biol.* 2, 873–877.

Gnaiger, E. (2012). Mitochondrial pathways and respiratory control an introduction to OXPHOS analysis. *Mitochondr Physiol Netw. OROBOROS MiPNet Publ.* 1718.

Gulati, P., Cheung, M.K., Antrobus, R., Church, C.D., Harding, H.P., Tung, Y.-C.L., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P.J., et al. (2013). Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2557–2562.

Gupte, A.A., Minze, L.J., Reyes, M., Ren, Y., Wang, X., Brunner, G., Ghosn, M., Cordero-Reyes, A.M., Ding, K., Pratico, D., et al. (2013). High-fat feeding-induced hyperinsulinemia increases cardiac glucose uptake and mitochondrial function despite peripheral insulin resistance. *Endocrinology* 154, 2650–2662.

- Hess, M.E., Hess, S., Meyer, K.D., Verhagen, L.A.W., Koch, L., Brönneke, H.S., Dietrich, M.O., Jordan, S.D., Saletore, Y., Elemento, O., et al. (2013). The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat. Neurosci.* *16*, 1042–1048.
- Hinney, A., Nguyen, T.T., Scherag, A., Friedel, S., Brönner, G., Müller, T.D., Grallert, H., Illig, T., Wichmann, H.-E., Rief, W., et al. (2007). Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (*FTO*) variants. *PLoS One* *2*, e1361.
- Ho, A.J., Stein, J.L., Hua, X., Lee, S., Hibar, D.P., Leow, A.D., Dinov, I.D., Toga, A.W., Saykin, A.J., Shen, L., et al. (2010). A commonly carried allele of the obesity-related *FTO* gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 8404–8409.
- van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.G., Kyewski, B., and Rüther, U. (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (*Ft*). *Development* *120*, 2601–2607.
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2719–2723.
- Hughey, C.C., James, F.D., Ma, L., Bracy, D.P., Wang, Z., Wasserman, D.H., Rottman, J.N., and Shearer, J. (2014). Diminishing impairments in glucose uptake, mitochondrial content, and ADP-stimulated oxygen flux by mesenchymal stem cell therapy in the infarcted heart. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *306*, C19-27.
- Chami, B., Steel, A.J., De La Monte, S.M., and Sutherland, G.T. (2016). The rise and fall of insulin signaling in Alzheimer’s disease. *Metab. Brain Dis.* *31*, 497–515.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R169-76.
- Chen, B., Ye, F., Yu, L., Jia, G., Huang, X., Zhang, X., Peng, S., Chen, K., Wang, M., Gong, S., et al. (2012). Development of cell-active N6-methyladenosine RNA demethylase *FTO* inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 17963–17971.
- Cheng, Z., Guo, S., Copps, K., Dong, X., Kollipara, R., Rodgers, J.T., Depinho, R.A., Puigserver, P., and White, M.F. (2009). *Foxo1* integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nat. Med.* *15*, 1307–1311.
- Cheung, M.K., Gulati, P., O’Rahilly, S., and Yeo, G.S.H. (2013). *FTO* expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int. J. Obes.* *37*, 744–747.
- Church, C., Lee, S., Bagg, E.A.L., McTaggart, J.S., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinović, J., Quwailid, M.M., et al. (2009). A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated *FTO* gene. *PLoS Genet.* *5*, e1000599.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G.T., Teboul, L., Wells, S., Brüning, J.C., Nolan, P.M., Ashcroft, F.M., et al. (2010). Overexpression of *Fto* leads to increased food intake and results in obesity. *Nat. Genet.* *42*, 1086–1092.
- Jain, V., Langham, M.C., and Wehrli, F.W. (2010). MRI estimation of global brain oxygen

- consumption rate. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 1598–1607.
- Jason T Fong, R.T.P., Fong, J.T., Am, Stone, a L., Devito, J.T., and Puri, N. (2013). FTO knockdown decreases phosphorylation of tau in neuronal cells; A potential model implicating the association of FTO with Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. Park.* *3*, 1–4.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., et al. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 885–887.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M., and Rodenburg, R.J.T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* *35*, 211–225.
- Jowett, J.B.M., Curran, J.E., Johnson, M.P., Carless, M.A., Göring, H.H.H., Dyer, T.D., Cole, S.A., Comuzzie, A.G., MacCluer, J.W., Moses, E.K., et al. (2010). Genetic variation at the FTO locus influences RBL2 gene expression. *Diabetes* *59*, 726–732.
- Keller, L., Xu, W., Wang, H.-X., Winblad, B., Fratiglioni, L., and Graff, C. (2011). The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J. Alzheimers. Dis.* *23*, 461–469.
- King, T.D., Clodfelder-Miller, B., Barksdale, K.A., and Bijur, G.N. (2008). Unregulated mitochondrial GSK3 $\beta$  activity results in NADH:Ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Neurotox. Res.* *14*, 367–382.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzell, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 505–518.
- Kosaki, A., Nelson, J., and Webster, N.J. (1998). Identification of intron and exon sequences involved in alternative splicing of insulin receptor pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* *273*, 10331–10337.
- Kuznetsov, A. V, Veksler, V., Gellerich, F.N., Saks, V., Margreiter, R., and Kunz, W.S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* *3*, 965–976.
- de la Monte, S.M., and Wands, J.R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J. Diabetes Sci. Technol.* *2*, 1101–1113.
- Lam, P.Y., Yin, F., Hamilton, R.T., Boveris, A., and Cadenas, E. (2009). Elevated neuronal nitric oxide synthase expression during ageing and mitochondrial energy production. *Free Radic. Res.* *43*, 431–439.
- Lange, C., and Hunte, C. (2002). Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 2800–2805.
- Lanza, I.R., and Nair, K.S. (2009). Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol.* *457*, 349–372.
- Laurettil, E., and Praticò, D. (2015). Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase. *Aging Cell* *14*, 1067–1074.
- Legendre, F., Heuze, A., Boukerrouche, K., Leclercq, S., Boumediene, K., Galera, P., Domagala, F., Pujol, J. -P., and Ficheux, H. (2009). Rhein, the metabolite of diacerein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis. *Scand. J. Rheumatol.* *38*, 104–111.

- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lepetit, N., Cartier, N., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1996). Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Mol. Brain Res.* *38*, 45–53.
- Li, Q., Huang, Y., Liu, X., Gan, J., Chen, H., and Yang, C.-G. (2016). Rhein inhibits AlkB repair enzymes and sensitizes cells to methylated DNA damage. *J. Biol. Chem.* *291*, 11083–11093.
- Liang, F., Kume, S., and Koya, D. (2009). SIRT1 and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* *5*, 367–373.
- Liesa, M., and Shirihai, O.S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* *17*, 491–506.
- Lin, L., Hales, C.M., Garber, K., and Jin, P. (2014). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 3299–3306.
- Liu, J., and Jia, G. (2014). Methylation Modifications in Eukaryotic Messenger RNA. *J. Genet. Genomics* *41*, 21–33.
- Liu, J., Chen, Z., Zhang, Y., Zhang, M., Zhu, X., Fan, Y., Shi, S., Zen, K., and Liu, Z. (2013). Rhein protects pancreatic  $\beta$ -cells from dynamin-related protein-1-mediated mitochondrial fission and cell apoptosis under hyperglycemia. *Diabetes* *62*, 3927–3935.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147–157.
- Liu, Z.H., Li, Y.J., Chen, Z.H., Liu, D., and Li, L.S. (2001). Glucose transporter in human glomerular mesangial cells modulated by transforming growth factor-beta and rhein. *Acta Pharmacol. Sin.* *22*, 169–175.
- Loenarz, C., and Schofield, C.J. (2008). Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 152–156.
- López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Diéguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 421–432.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* *42*, 68–72.
- Lu, M., Wan, M., Leavens, K.F., Chu, Q., Monks, B.R., Fernandez, S., Ahima, R.S., Ueki, K., Kahn, C.R., and Birnbaum, M.J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat. Med.* *18*, 388–395.
- Lu, M., Sarruf, D.A., Li, P., Osborn, O., Sanchez-Alavez, M., Talukdar, S., Chen, A., Bandyopadhyay, G., Xu, J., Morinaga, H., et al. (2013). Neuronal Sirt1 deficiency increases insulin sensitivity in both brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* *288*, 10722–10735.
- Lynch, J.A., George, A.M., Eisenhauer, P.B., Conn, K., Gao, W., Carreras, I., Wells, J.M., McKee, A., Ullman, M.D., and Fine, R.E. (2006). Insulin degrading enzyme is localized predominantly at the cell surface of polarized and unpolarized human cerebrovascular endothelial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* *83*, 1262–1270.
- Ma, M., Harding, H.P., O’Rahilly, S., Ron, D., and Yeo, G.S.H. (2012). Kinetic analysis of FTO (fat mass and obesity-associated) reveals that it is unlikely to function as a sensor for 2-

- oxoglutarate. *Biochem. J.* *444*, 183–187.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* *86*, 883–901.
- Maklashina, E., and Cecchini, G. (2010). The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1797*, 1877–1882.
- Malide, D., Dwyer, N.K., Blanchette-Mackie, E.J., and Cushman, S.W. (1997). Immunocytochemical evidence that GLUT4 resides in a specialized translocation post-endosomal VAMP2-positive compartment in rat adipose cells in the absence of insulin. *J. Histochem. Cytochem.* *45*, 1083–1096.
- Mao, Y., Zhang, M., Yang, J., Sun, H., Wang, D., Zhang, X., Yu, F., Li, J., Chung, J.-G., Lee, Y.H., et al. (2017). The UCP2-related mitochondrial pathway participates in rhein-induced apoptosis in HK-2 cells. *Toxicol. Res.* *6*, 297–304.
- Martin, W.F., Garg, S., and Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *370*, 20140330.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11285–11290.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 278–294.
- McEwen, B.S., and Reagan, L.P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* *490*, 13–24.
- Merkestein, M., McTaggart, J.S., Lee, S., Kramer, H.B., McMurray, F., Lafond, M., Boutens, L., Cox, R., and Ashcroft, F.M. (2014). Changes in gene expression associated with FTO overexpression in mice. *PLoS One* *9*, e97162.
- Merkestein, M., Laber, S., McMurray, F., Andrew, D., Sachse, G., Sanderson, J., Li, M., Usher, S., Sellayah, D., Ashcroft, F.M., et al. (2015). FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat. Commun.* *6*, 6792.
- El Messari, S., Leloup, C., Quignon, M., Brisorgueil, M.J., Penicaud, L., and Arluison, M. (1998). Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *399*, 492–512.
- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* *149*, 1635–1646.
- Mullins, R.J., Diehl, T.C., Chia, C.W., and Kapogiannis, D. (2017). Insulin resistance as a link between amyloid-beta and tau pathologies in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* *9*, 118.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., Nicholls, D.G., and Ferguson, S.J. (2013a). 10 – The cell biology of the mitochondrion. In *Bioenergetics*, pp. 303–325.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., Nicholls, D.G., and Ferguson, S.J. (2013b). 5 – Respiratory chains. In *Bioenergetics*, pp. 91–157.

- Nunnari, J., Suomalainen, A., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* *148*, 1145–1159.
- Osborn, D.P.S., Roccasecca, R.M., McMurray, F., Hernandez-Hernandez, V., Mukherjee, S., Barroso, I., Stemple, D., Cox, R., Beales, P.L., and Christou-Savina, S. (2014). Loss of FTO antagonises Wnt signaling and leads to developmental defects associated with ciliopathies. *PLoS One* *9*, e87662.
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., and Banerjee, U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species.
- Perez-Costas, E., Gandy, J.C., Melendez-Ferro, M., Roberts, R.C., and Bijur, G.N. (2010). Light and electron microscopy study of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mouse brain. *PLoS One* *5*, e8911.
- Persiyantseva, N.A., Storozhevskiy, T.P., Senilova, Y.E., Gorbacheva, L.R., Pinelis, V.G., and Pomytkin, I.A. (2013). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *J. Mol. Signal.* *8*, 11.
- Pesta, D., and Gnaiger, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 25–58.
- Peters, T., Ausmeier, K., and Rüther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm. Genome* *10*, 983–986.
- Pitman, R.T., and Fong, J.T. (2013). FTO knockdown decreases phosphorylation of tau in neuronal cells; A potential model implicating the association of FTO with Alzheimer’s disease. *J. Alzheimer’s Dis. Park.* *3*, 1–4.
- Pitman, R.T., Fong, J.T., Billman, P., and Puri, N. (2012). Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner. *PLoS One* *7*, e38444.
- Plum, L., Schubert, M., and Brüning, J.C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* *16*, 59–65.
- Ragvin, A., Moro, E., Fredman, D., Navratilova, P., Drivenes, O., Engstrom, P.G., Alonso, M.E., Mustienes, E. d. l. C., Skarmeta, J.L.G., Tavares, M.J., et al. (2010). Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to HHEX, SOX4, and IRX3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 775–780.
- Rivera, M., Cohen-Woods, S., Kapur, K., Breen, G., Ng, M.Y., Butler, A.W., Craddock, N., Gill, M., Korszun, A., Maier, W., et al. (2012). Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. *Mol. Psychiatry* *17*, 604–611.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 320–344.
- Rowles, J., Wong, M., Powers, R., and Olsen, M. (2012). FTO, RNA epigenetics and epilepsy. *Epigenetics* *7*, 1094–1097.
- Sajan, M., Hansen, B., Ivey, R., Sajan, J., Ari, C., Song, S., Braun, U., Leitges, M., Farese-Higgs, M., and Farese, R. V. (2016). Brain insulin signaling is increased in insulin-resistant states and

decreases in FOXOs and PGC-1 $\alpha$  and increases in A $\beta$  1–40/42 and phospho-tau may abet Alzheimer development. *Diabetes* 65, 1892–1903.

Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., and Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257, 221–239.

Sazanov, L.A. (2015). A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 375–388.

Shen, L., Thompson, P.M., Potkin, S.G., Bertram, L., Farrer, L.A., Foroud, T.M., Green, R.C., Hu, X., Huentelman, M.J., Kim, S., et al. (2014). Genetic analysis of quantitative phenotypes in AD and MCI: imaging, cognition and biomarkers. *Brain Imaging Behav.* 8, 183–207.

Sheng, X., Wang, M., Lu, M., Xi, B., Sheng, H., and Zang, Y.Q. (2011). Rhein ameliorates fatty liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation, and immunomodulation in diet-induced obese mice. *AJP Endocrinol. Metab.* 300, E886–E893.

Smemo, S., Tena, J.J., Kim, K.-H., Gamazon, E.R., Sakabe, N.J., Gómez-Marín, C., Aneas, I., Credidio, F.L., Sobreira, D.R., Wasserman, N.F., et al. (2014). Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507, 371–375.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* 7, 63–80.

Sun, A. (2003). P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp. Neurol.* 183, 394–405.

Suzuki, H., Takeuchi, M., Sugiyama, A., Alam, A.K., Vu, L.T., Sekiyama, Y., Dam, H.C., Ohki, S.-Y., and Tsukahara, T. (2012). Alternative splicing produces structural and functional changes in CUGBP2. *BMC Biochem.* 13, 6.

Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1410, 103–123.

Takahashi, M., Yamada, T., Tooyama, I., Moroo, I., Kimura, H., Yamamoto, T., and Okada, H. (1996). Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 204, 201–204.

Tews, D., Fischer-Posovszky, P., Fromme, T., Klingenspor, M., Fischer, J., Rütter, U., Marienfeld, R., Barth, T.F., Möller, P., Debatin, K.M., et al. (2013). FTO deficiency induces UCP-1 expression and mitochondrial uncoupling in adipocytes. *Endocrinology* 154, 3141–3151.

Thorsell, A., and Heilig, M. (2002). Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 36, 182–193.

Tikhanovich, I., Cox, J., and Weinman, S.A. (2013). Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 Suppl 1, 125–131.

Timpson, N.J., Harbord, R., Davey Smith, G., Zacho, J., Tybjaerg-Hansen, A., and Nordestgaard, B.G. (2009). Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk?: Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype. *Hypertension* 54, 84–90.

- Tornqvist, H.E., Pierce, M.W., Frackelton, A.R., Nemenoff, R.A., and Avruch, J. (1987). Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro. *J. Biol. Chem.* *262*, 10212–10219.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., et al. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* *313*, 756–761.
- Wang, L., Duan, Q., Wang, T., Ahmed, M., Zhang, N., Li, Y., Li, L., and Yao, X. (2015). Mitochondrial respiratory chain inhibitors involved in ROS production induced by acute high concentrations of iodide and the effects of SOD as a protective factor. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2015*, 217670.
- Wei, C.M., Gershowitz, A., and Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell* *4*, 379–386.
- White, M.F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science* *302*, 1710–1711.
- Yang, H., An, J.J., Sun, C., and Xu, B. (2016). Regulation of energy balance via BDNF expressed in nonparaventricular hypothalamic neurons. *Mol. Endocrinol.* *30*, 494–503.
- Yap, L.-P., Garcia, J. V, Han, D., and Cadenas, E. (2009). The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 1283–1298.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K., and Shinzawa-Itoh, K. (2012). Reaction mechanism of mammalian mitochondrial cytochrome c oxidase. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 215–236.
- Zhang, Y., Fan, S., Hu, N., Gu, M., Chu, C., Li, Y., Lu, X., and Huang, C. (2012). Rhein reduces fat weight in db/db mouse and prevents diet-induced obesity in C57Bl/6 mouse through the inhibition of PPAR  $\gamma$  signaling. *PPAR Res.* *2012*, 1–9.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y.-J., Ping, X.-L., Chen, Y.-S., Wang, W.-J., et al. (2014a). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res.* *24*, 1403–1419.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Zhao, Y.-L., and Yang, Y.-G. (2014b). FTO and obesity: mechanisms of association. *Curr. Diab. Rep.* *14*, 486.
- Zhao, Y.-L., Zhou, G.-D., Yang, H.-B., Wang, J.-B., Shan, L.-M., Li, R., and Xiao, X.-H. (2011). Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem. Toxicol.* *49*, 1705–1710.
- Zheng, J.-M., Zhu, J.-M., Li, L.-S., and Liu, Z.-H. (2008). Rhein reverses the diabetic phenotype of mesangial cells over-expressing the glucose transporter (GLUT1) by inhibiting the hexosamine pathway. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 1456–1464.