

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium exprese a maturace mitochondriálního systému  
oxidativní fosforylace v průběhu prenatálního vývoje savců**

**The study of expression and maturation of mitochondrial oxidative  
phosphorylation  
system during mammalian prenatal period**

Bc. Andrea Mrhálková

Praha 2010



Vedoucí diplomové práce: Mgr. Martina Hůlková, PhD.

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch  
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN  
Ke Karlovu 2, Praha 2

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením uvedeného školitele.

V Praze, 30.8.2010

Bc. Andrea Mrháková

Děkuji své školitelce Mgr. Martině Hůlkové, PhD. za veškerý čas, cenné rady a podporu při odborném vedení diplomové práce.

Děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi, DrSc. a RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za možnost působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch a podílení se na experimentální činnosti.

V neposlední řadě děkuji celému kolektivu laboratoře.

Diplomová práce vznikla s podporou následujících grantových projektů: GAUK 25755707, IGA MZ-NR 9410.

## Abstrakt

Postnatální adaptace novorozence na extrauterinní prostředí je kromě jiného závislá na maturaci mitochondriálního systému oxidativní fosforylace (OXPHOS). Pro proces maturace je nezbytný efektivní průběh mitochondriální biogeneze během fetálního vývoje. Nedostatečnost systému OXPHOS se podílí na mortalitě a morbiditě předčasně narozených dětí. Hlubší porozumění průběhu mitochondriální biogeneze na molekulárně genetické a biochemické úrovni je tedy důležité pro zlepšení péče o předčasně narozené děti, zvláště o kriticky nemocné novorozence.

Práce vznikla v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch na Klinice dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK v Praze. Studie byla zaměřena na molekulárně genetické analýzy genů kódujících podjednotky ATP syntázy a charakterizaci změn v množství mitochondriální DNA v průběhu fetálního vývoje člověka a potkana.

Výsledky přispívají k pochopení procesu mitochondriální biogeneze respektive biogeneze ATP syntázy ve fetálních tkáních člověka a potkana.

**Klíčová slova:** mitochondrie, OXPHOS, ATP syntáza, mtDNA, biogeneze, fetální vývoj

## Abstract

Postnatal adaptation of neonate to extrauterine life is among others dependent on maturation of mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS). It depends on effective mitochondrial biogenesis during fetal development. The inadequate capacity of mitochondrial OXPHOS system plays an important role in the neonatal mortality and morbidity. Therefore the study of mitochondrial biogenesis on molecular and biochemical level is important to improve the care of very premature neonates, especially critically ill premature neonates.

This thesis has been worked out in The laboratory for study of mitochondrial disorders (Department of Pediatrics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague). The thesis is based on molecular genetic analyses, which are focused on characterisation of ATP synthase gene expression and on changes in mitochondrial DNA content during human and rat fetal development.

The results provide the better insight into mitochondrial respectively ATP synthase biogenesis during human and rat fetal development.

**Key words:** mitochondria, OXPHOS, ATP synthase, mtDNA, biogenesis, fetal development

---

## Obsah

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 9 -
2.	ÚVOD .....	- 11 -
3.	CÍLE STUDIE .....	- 12 -
4.	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	- 13 -
4.1.	Mitochondrie .....	- 13 -
4.2.	OXPHOS .....	- 14 -
4.2.1.	ATP syntáza .....	- 16 -
4.3.	Mitochondriální genom.....	- 17 -
4.3.1.	Replikace a transkripce mtDNA .....	- 18 -
4.3.2.	NRF-1 .....	- 20 -
4.3.3.	NRF-2.....	- 20 -
4.4.	Biogeneze mitochondrií.....	- 20 -
4.4.1.	Regulace mitochondriální biogeneze .....	- 21 -
4.4.1.1.	PGC-1 $\alpha$ .....	- 21 -
4.4.1.2.	PGC-1 $\beta$ .....	- 22 -
4.4.1.3.	PRC .....	- 22 -
4.4.2.	Aktivita systému OXPHOS v prenatálním období .....	- 23 -
4.4.3.	Změny množství mtDNA .....	- 24 -
4.4.4.	Adaptace na extrauterinní prostředí .....	- 25 -
4.4.5.	Adaptace na extrauterinní prostředí u předčasně narozených jedinců .....	- 26 -
4.4.6.	Vliv tyroidních hormonů na mitochondriální biogenezi .....	- 27 -
4.4.7.	Fetální játra a hematopoéza .....	- 28 -
4.4.8.	Fetální svalová tkáň .....	- 29 -
5.	MATERIÁL.....	- 31 -
5.1.	Fetální tkáň z člověka.....	- 31 -
5.1.1.	Etika.....	- 31 -
5.2.	Fetální tkáň z potkana ( <i>Rattus Norvegicus</i> ).....	- 31 -
5.2.1.	Etika.....	- 31 -
5.3.	Seznam použitých chemikálií.....	- 33 -
5.4.	Seznam použitých přístrojů a laboratorního vybavení .....	- 33 -
6.	METODY .....	- 35 -
6.1.	Izolace RNA z tkání .....	- 35 -
6.2.	Izolace DNA z tkání .....	- 35 -
6.3.	Reverzní transkripce.....	- 36 -

---

6.4.	Real-time PCR.....	- 37 -
6.5.	Analýza mtDNA.....	- 39 -
6.6.	Analýza mRNA .....	- 39 -
6.7.	Statistická analýza .....	- 40 -
7.	VÝSLEDKY .....	- 42 -
7.1.	Kvantifikace transkriptů ATP5O, ATP5G2 a ATP6 ve fetální tkáni člověka .....	- 42 -
7.2.	Kvantifikace transkriptů Atp5o, Atp5g2 a Atp6 ve fetální tkáni potkana.....	- 44 -
7.3.	Kvantifikace mtDNA v období prenatalního a postnatalního vývoje potkana .....	- 45 -
8.	DISKUZE.....	- 50 -
8.1.	Expresie genů kódujících podjednotky ATP syntázy v jaterní a svalové tkáni člověka a potkana v období prenatalního a postnatalního vývoje.....	- 50 -
8.2.	Změny množství mtDNA v jaterní tkáni potkana.....	- 53 -
8.3.	Shrnutí .....	- 54 -
9.	ZÁVĚR.....	- 55 -
10.	SEZNAM CITACÍ.....	- 56 -



## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ActB	aktin B
ATP	adenozintrifosfát
ATP5O	podjednotka 5 ATP syntézy (oligomycin senzitivní)
ATP5G2	podjednotka 5G2 ATP syntézy
ATP6	podjednotka 6 ATP syntézy
a. u.	bezrozměrná jednotka ( <i>arbitrary unit</i> )
bp	pár bazí ( <i>base pair</i> )
$\beta$ -F <sub>1</sub> mRNA	mRNA kódující $\beta$ podjednotku ATP syntézy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
COXI	podjednotka I komplexu cytochrom c oxidázy
COXII	podjednotka II komplexu cytochrom c oxidázy
COXIV	podjednotka IV komplexu cytochrom c oxidázy
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
FADH <sub>2</sub>	flavinadeninukleotid (redukováná forma)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HPRT1	hypoxantin fosforibozyltransferáza 1
HSP	promotor těžkého řetězce mtDNA ( <i>heavy strand promotor</i> )
LSP	promotor lehkého řetězce mtDNA ( <i>light strand promotor</i> )
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MT-RNR2	mitochondriálně kódovaná 16S RNA
mTERF	mitochondriální transkripční terminační faktor
mt-Nd2	podjednotka 2 komplexu NADH dehydrogenázy
mt-Nd6	podjednotka 6 komplexu NADH dehydrogenázy
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukováná forma)
nDNA	nukleární (jaderná) deoxyribonukleová kyselina
NRF-1 a 2	<i>nuclear respiratory factor 1a 2</i>
O <sub>H</sub>	počátek replikace na těžkém vlákně mtDNA ( <i>H - strand origin</i> )
O <sub>L</sub>	počátek replikace na lehkém vlákně mtDNA ( <i>O - strand origin</i> )
OSCP	protein zodpovědný za citlivost vůči oligomycinu ( <i>oligomycin sensitivity-conferring protein</i> )

---

OXPHOS	system oxidativní fosforylace ( <i>oxidative phosphorylation system</i> )
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ koaktivátor 1 $\alpha$
PGC-1 $\beta$	PPAR $\gamma$ koaktivátor 1 $\beta$
POLMRT	mitochondriální RNA polymeráza
PRC	transkripční koaktivátor příbuzný PGC-1 $\alpha$ koaktivátoru
PSMB6	podjednotka proteazomu, typ beta, 6
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RIN	hodnota stability RNA ( <i>RNA integrity numer</i> )
RT	reverzní transkripce
SDHA	podjednotka A komplexu sukcinát dehydrogenázy
T <sub>3</sub>	trijodtyronin
T <sub>4</sub>	tyroxin
TBP	TATA box vazebný protein ( <i>TATA box binding protein</i> )
Tfam	mitochondriální transkripční faktor A
TFB 1 a 2	specifické mitochondriální transkripční faktory 1 a 2
TIM	translokátor ve vnitřní mitochondriální membráně ( <i>translocase of the inner membrane</i> )
TOM	translokátor ve vnější mitochondriální membráně ( <i>translocase of the outer membrane</i> )
TRE	<i>thyroid hormone response element</i>
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

Zkratky psané kurzívou označují geny.

## 2. ÚVOD

Růst plodu je charakterizován rozsáhlou kaskádou vývojových stádií, která jsou kontrolována genetickými faktory i vlivy zevního prostředí a která jsou podmíněna postupnou aktivací a inhibicí metabolických pochodů v buňce (Cuezva *et al.*, 1992; Sperl *et al.*, 1992).

Mitochondrie se podílejí na celé řadě metabolických procesů, ale jejich základní biologickou funkcí je konverze energie v systému dýchacího řetězce a ATP syntázy (systém oxidativní fosforylace - OXPHOS) na vnitřní mitochondriální membráně. OXPHOS zajišťuje naprostou většinu energetických potřeb buňky, a proto lze říci, že životaschopnost organismu je závislá na dostatečné enzymatické aktivitě tohoto systému.

Poruchy systému OXPHOS se projevují hlavně u energeticky náročných tkání jako jsou např. mozek, kosterní svalstvo, srdce a játra. Nejvíce postiženy bývají mozek a kosterní svaly, a proto jsou tyto defekty také označovány jako mitochondriální encefalomyopatie. Poruchy systému OXPHOS jsou způsobeny zděděnými nebo získanými mutacemi jaderných i mitochondriálních genů kódujících podjednotky komplexů OXPHOS nebo genů kódujících proteiny zajišťující maturaci OXPHOSu. K maturačním procesům patří například seskupení komplexů OXPHOS na vnitřní mitochondriální membráně, nebo import proteinů a metabolitů do mitochondrií. Kromě mutací genetické informace (primární příčina) může být funkce OXPHOSu narušena vlivy zevního prostředí (sekundární příčina), které mohou způsobit například předčasné narození jedince.

Předčasný porod významně ovlivňuje proces mitochondriální biogeneze, především zasahuje do konečné fáze maturace mitochondrií v období postnatální adaptace na extrauterinní prostředí. Novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností se významně podílejí na novorozenecké morbiditě i mortalitě. Pro zlepšení péče o tyto děti je důležité vědět, jak je maturace mitochondriálních energetických systémů regulována na molekulární úrovni v průběhu prenatálního vývoje.

### 3. CÍLE STUDIE

Efektivní produkce ATP mitochondriálním systémem OXPHOS hraje klíčovou roli v období adaptace novorozence na extrauterinní prostředí. Přesný průběh maturace komplexů OXPHOS během vývoje plodu není v současné době zcela znám. A právě hlubší poznání procesu mitochondriální biogeneze v průběhu prenatálního i postnatálního vývoje může přispět ke zlepšení péče o předčasně narozené děti, zvláště o kriticky nemocné novorozence.

Tato práce byla zaměřena na molekulárně genetickou analýzu vzorků fetální jaterní a svalové tkáně člověka a fetální jaterní tkáně potkana.

Konkrétní cíle této práce byly:

- a) optimalizovat kvantifikaci mtDNA a mRNA v jaterní tkáni potkana
- b) analyzovat změny množství mtDNA v jaterní tkáni potkana během fetálního a postnatálního vývoje, od 16. dne gestace až do 5. dne postnatálního života
- c) charakterizovat změny exprese genů kódujících podjednotky ATP syntázy (jaderně kódované *ATP5O*, *ATP5G2* a mitochondriálně kódované *ATP6*) v jaterní a svalové tkáni člověka v období od 13. do 28. týdne gestace a v jaterní tkáni potkana od 16. dne gestace do 5. dne postnatálního života. A nakonec vzájemně porovnat trendy exprese studovaných genů u těchto dvou organizmů.

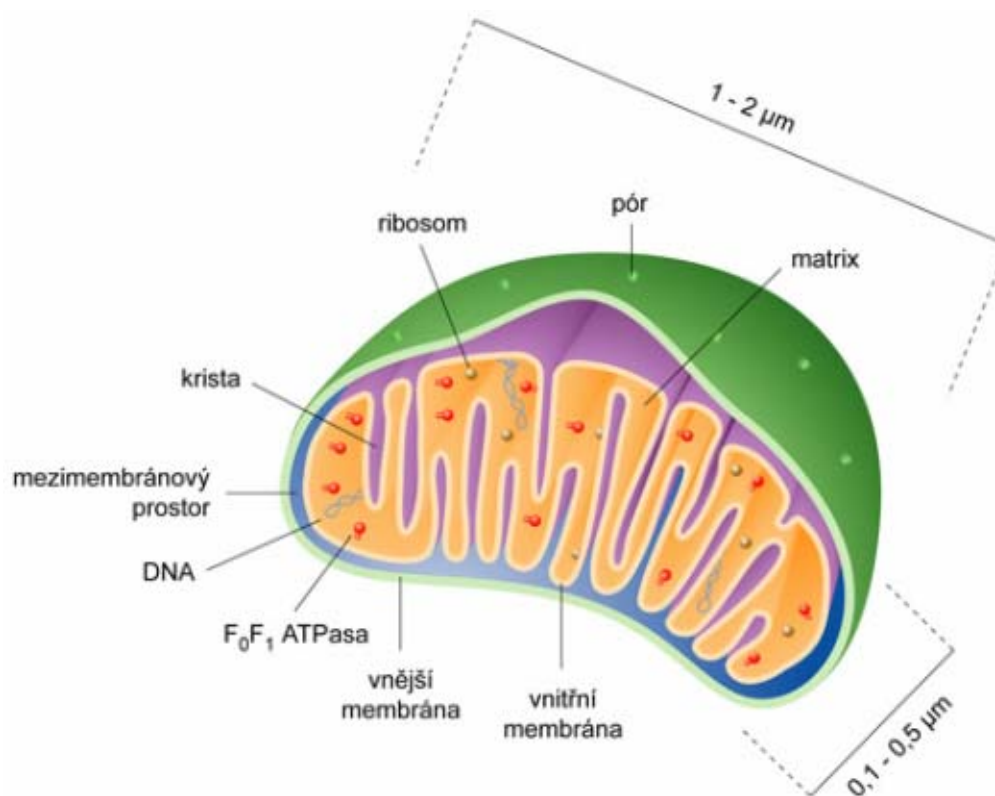
## 4. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 4.1. Mitochondrie

Mitochondrie (Obrázek 1) jsou semiautonomní organely eukaryotických buněk, které podle endosymbiotické teorie vznikly pohlcením aerobní bakteriální buňky prapůvodní eukaryotickou buňkou. Obsahují vlastní mitochondriální DNA (mtDNA) a proteosyntetický aparát (Thorsness a Hanekamp, 2001).

Základní biologickou funkcí mitochondrií je produkce buněčné energie ve formě ATP v systému oxidativní fosforylace. Za běžných fyziologických podmínek produkují přes 80% buněčného ATP (Papa, 1996). Mitochondrie se dále účastní procesů zajišťujících buněčnou proliferaci, apoptózu, udržení iontové homeostáze a podílí se na metabolismu aminokyselin, nukleotidů a lipidů.

Mitochondrie jsou tvořeny vnější a vnitřní mitochondriální membránou, mezimembránovým prostorem a mitochondriální matrix. Vnější mitochondriální membrána obsahuje póry tvořené proteiny zvanými poriny. Tyto póry nespecificky propouští molekuly do velikosti 5 kDa. Vnitřní mitochondriální membrána je volně propustná pouze pro molekuly vody, kyslíku a oxidu uhličitého. Kromě transportních proteinů pro různé metabolity obsahuje vnitřní mitochondriální membrána především komplexy systému OXPHOS. Vnitřní mitochondriální membrána je uspořádána do krist (invaginací), jejichž morfologie se mění podle metabolického stavu mitochondrií (Logan, 2006; Mannella, 2008). Bylo zjištěno, že mitochondrie nejsou v buňce nutně přítomny ve formě mnoha samostatných organel, nýbrž mohou kontinuálně fúzovat, dělit se a tvořit tak dynamické mitochondriální sítě (Soubannier a McBride, 2009). Mitochondrie jsou dynamické organely a jejich množství, struktura a funkce se v různých tkáních liší v závislosti na energetických nárocích dané tkáně (Benard *et al.*, 2006). Nejvyšší požadavek na aerobní produkci ATP má mozek, srdce, svaly, játra a endokrinní systém.



**Obrázek 1.** Model mitochondrie

([http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=mitochondrie](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=mitochondrie))

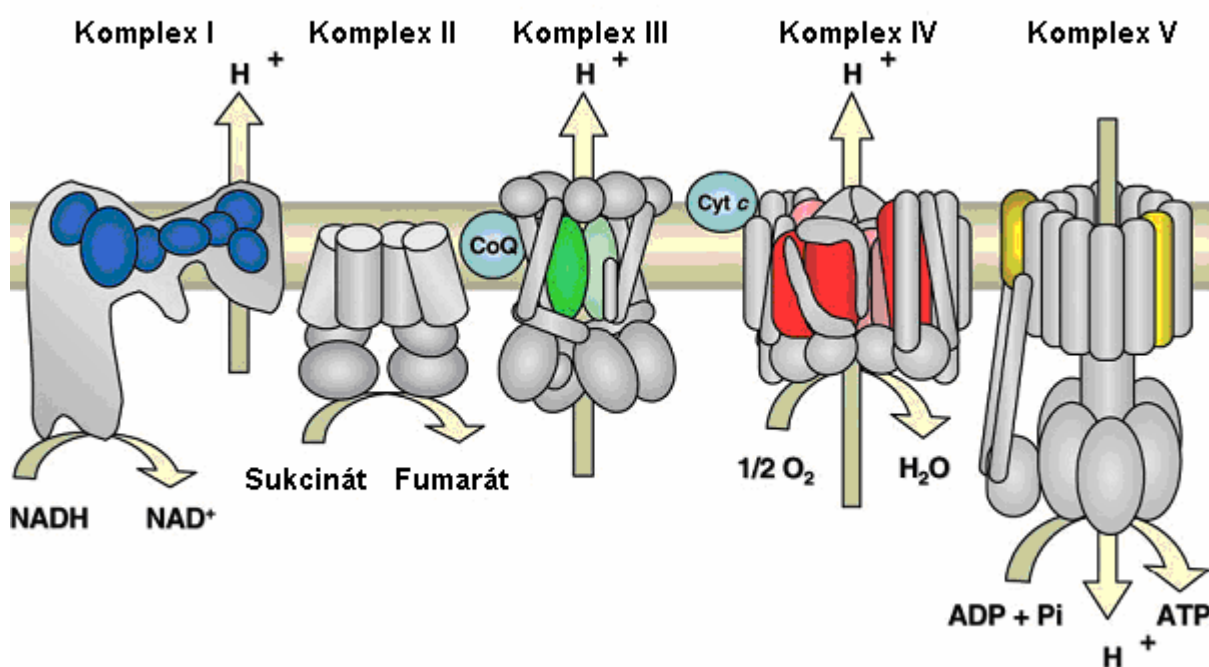
## 4.2. OXPHOS

Klíčovou rolí mitochondrií je produkce ATP. Produkty glykolýzy, Krebsova cyklu a oxidace mastných kyselin jsou dále metabolizovány systémem OXPHOS, čímž vzniká 32 molekul ATP. Aerobní proces je tedy daleko efektivnější, než anaerobní, kterým jsou produkovány pouze 2 molekuly ATP na molekulu glukózy.

Systém OXPHOS (Obrázek 2) je tvořen čtyřmi komplexy dýchacího řetězce a ATP syntázou. Komplexy dýchacího řetězce jsou NADH dehydrogenáza (komplex I), sukcinát dehydrogenáza (komplex II), cytochrom c reduktáza (komplex III) a cytochrom c oxidáza (komplex IV). Tyto multimerní proteinové komplexy leží ve vnitřní mitochondriální membráně. Komplexy I a II přenášejí elektrony z NADH resp.  $\text{FADH}_2$  na ubichinon (koenzym  $\text{Q}_{10}$ ). Redukovaný ubichinon difunduje vnitřní mitochondriální membránou ke komplexu III, který přenáší elektrony z redukovaného ubichinonu na cytochrom c, což je malý periferní protein orientovaný

do mezimembránového prostoru. Z redukovaného cytochromu c jsou elektrony přenášeny komplexem IV na molekuly kyslíku a produkují vodu. Komplexy I, III a IV fungují zároveň jako protonové pumpy. Přenášejí protony  $H^+$  přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru a generují tak elektrochemický gradient, který je následně využit ATP syntázou (komplex V) (Navarro a Boveris, 2007).

Komplexy OXPHOS se ve vnitřní mitochondriální membráně vyskytují buď samostatně, nebo jsou uspořádány do supramolekulárních struktur zvaných "superkomplexy". Uspořádání do superkomplexů má pravděpodobně vliv na efektivitu přenosu elektronů dýchacím řetězcem, stabilitu komplexů OXPHOS a strukturu vnitřní mitochondriální membrány (Schafer *et al.*, 2006; Boekema a Braun, 2007).

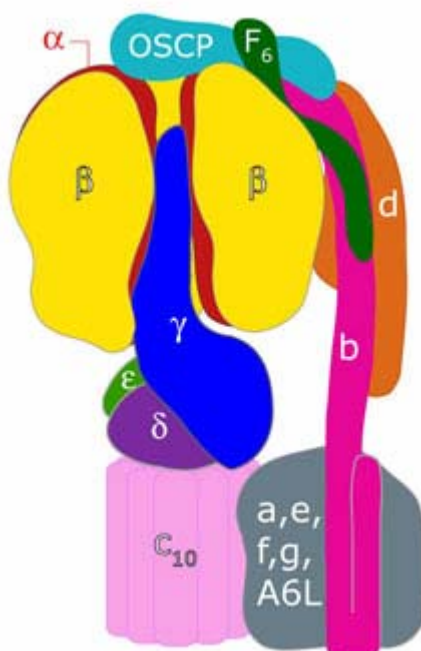


**Obrázek 2.** Dýchací řetězec a ATP syntáza (OXPHOS)  
upraveno podle (Zeviani a Di Donato, 2004)

### 4.2.1. ATP syntáza

ATP syntáza (Obrázek 3) je klíčový enzym oxidativní fosforylace. Spřahuje elektrochemický gradient generovaný proteinovými komplexy dýchacího řetězce se syntézou ATP a je tedy zodpovědná za produkci většiny ATP celého organismu.

Savčí ATP syntáza je multiproteinový komplex složený ze šestnácti podjednotek, které tvoří dva funkční sektory  $F_1$  a  $F_0$ .  $F_0$  je ve vodě nerozpustný transmembránový protein obsahující kanály pro translokaci protonů a je tvořen podjednotkami a, b, c, d, e, f, g,  $F_6$ , OSCP a A6L.  $F_1$  je ve vodě rozpustný periferní membránový protein složený z šesti podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $IF_1$ . Katalytické místo  $F_1$  části pro syntézu ATP je na  $\beta$  podjednotce tohoto  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  oligomeru. Podjednotka  $\delta$  tvoří průchod spojující  $F_0$  s  $F_1$ . Asociovaný polypeptid  $IF_1$  se váže k  $\beta$  podjednotce a inhibuje hydrolýzu ATP. Oba sektory  $F_1$  a  $F_0$  jsou spojeny stopkou, na jejímž seskupení se podílí podjednotky  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , OSCP,  $F_6$  a b. Dvě podjednotky  $F_0$  části (A6L, a) jsou kódovány mitochondriálním genomem (Pedersen a Amzel, 1993; Houšťek *et al.*, 1995).



**Obrázek 3.** ATP syntáza – schématické znázornění podjednotek  
([http://www.mrc-dunn.cam.ac.uk/research/atp\\_synthase/subunit.php](http://www.mrc-dunn.cam.ac.uk/research/atp_synthase/subunit.php))



### 4.3. Mitochondriální genom

Mitochondrie jsou zpravidla děděny po maternální linii. To znamená, že všechny mitochondrie a jejich DNA v zygotě a následně celém organismu pocházejí ze samičí pohlavní buňky - vajíčka (DiMauro a Schon, 2003).

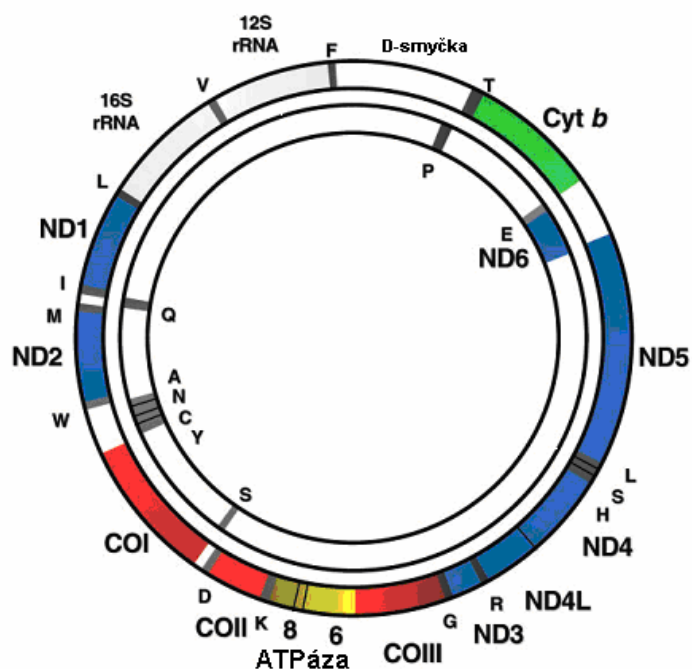
Lidská mtDNA (Obrázek 4) je cirkulární dvouvláknová molekula přibližně o délce 16,5 kb. Samostatná vlákna jsou označována jako „lehké“ (L – light) a „těžké“ (H – heavy) vlákno. Toto označení bylo přijato na základě skutečnosti, že vlákna mají různou vznášivou hustotu v gradientu cesium chloridu. Tento rozdíl je dán nerovnoměrným rozložením nukleotidů. Zatímco H vlákno je bohaté na guanin, v L vláknech je tento nukleotid zastoupen minimálně.

Každá mitochondrie má asi dva až deset genomů. V buňce jsou stovky až tisíce mitochondrií, takže buňka obsahuje  $10^3$  až  $10^4$  kopií mtDNA (Cummins, 1998). V některých kopiích mtDNA mohou být přítomny patogenní mutace. V mitochondrii se mohou nacházet jak normální, tak mutantní kopie DNA současně, tomuto stavu se říká heteroplazmie. V případě homoplazmie jsou všechny kopie DNA v mitochondrii stejné. K tomu, aby se projevila mitochondriálně kódovaná porucha, je zapotřebí určité minimální množství mutantních kopií mtDNA. Čím více je tkáň závislá na oxidativním metabolismu, tím méně mutantních kopií mtDNA stačí k tomu, aby se porucha projevila (DiMauro a Schon, 2003).

Většina původně mitochondriálních genů byla během evoluce přenesena do jádra, proto mtDNA obsahuje pouze 37 genů. Z toho 22 genů kóduje veškeré mitochondriální transferové ribonukleové kyseliny (tRNA) a 2 geny ribozomální ribonukleové kyseliny (rRNA), které se účastní intramitochondriální proteinové syntézy. Zbylých 13 genů kóduje proteinové podjednotky komplexů dýchacího řetězce I, III, IV a V. Podjednotky komplexu II jsou kódovány pouze jaderně. Mitochondriálně kódovány jsou podjednotky 1, 2, 3, 4, 4L, 5 a 6 komplexu I, cytochrom b komplexu III, podjednotky 1, 2 a 3 komplexu IV a podjednotky 6 a 8 komplexu V (Kelly a Scarpulla, 2004). Podjednotky komplexů OXPHOS jsou kódovány jaderným i mitochondriálním genomem. K zajištění správné funkce systému OXPHOS je vyžadována koordinovaná exprese obou genomů.

Mitochondriální proteosyntéza využívá jiný genetický kód než ten, který je užíván při cytozolické biosyntéze jaderně kódovaných genů (Poulton a Bindoff, 2001). Zatímco výše zmíněných 13 proteinů je transkribováno a translatováno

v mitochondriích, naprostá většina mitochondriálních proteinů je kódována jaderně a musí být do mitochondrie transportovány přes membránové přenašeče (TIM - translocase of the inner membrane, TOM - translocase of the outer membrane) za pomoci cytoplazmatických chaperonů (Poulton a Bindoff, 2001; Mokranjac a Neupert, 2005).



**Obrázek 4.** Lidská mtDNA (upraveno podle Zeviani a Di Donato, 2004)

#### 4.3.1. Replikace a transkripce mtDNA

Savčí mtDNA neobsahuje introny, některé geny se dokonce překrývají a jejich transkripty jsou polycistronní. (Clayton, 2000). Transkripce mtDNA je iniciována v oblasti D smyčky ze tří promotorů - z promotoru lehkého vlákna LSP (light strand promoter) a dvou promotorů těžkého vlákna HSP1 a HSP2 (heavy strand promoter 1 a 2). Transkript lehkého vlákna kóduje 1 mRNA a 8 tRNA. Transkript těžkého vlákna z promotoru HSP2 kóduje 12 mRNA, 14 tRNA a 2 rRNA, zatímco transkripce z promotoru HSP1 produkuje pouze rRNA. Výběrem promotoru je regulován poměr mRNA / rRNA (Scarpulla, 2008b). Kromě transkripčních promotorů obsahuje D smyčka i počátek replikace  $O_H$  na těžkém vlákně. Replikace mtDNA z  $O_H$  je

iniciována poté, co je rozštěpen RNA transkript iniciovaný z promotoru  $P_L$ , který slouží jako primer pro syntézu DNA (Bogehagen a Clayton, 2003). Procesy mitochondriální replikace a transkripce jsou tedy vzájemně spřažené a to tak, že buď probíhá transkripce, nebo je transkript rozštěpen a dochází k iniciaci replikace. Po iniciaci replikace DNA často dochází k předčasné terminaci syntézy DNA, což může hrát významnou roli v regulaci množství mtDNA (Brown a Clayton, 2002).

Důležitou roli při replikaci a transkripci mtDNA hraje transkripční faktor A - TFAM. Transkripční promotory sdílejí tzv. „upstream“ sekvenci, do které se TFAM váže, rozvolňuje DNA a aktivuje tak transkripci (Fisher *et al.*, 1992). TFAM se také významně podílí na stabilizaci mtDNA. Bylo zjištěno, že změny množství TFAM korelují se změnami množství mtDNA (Kang *et al.*, 2007). Většina buněčného TFAM se váže sekvencně nespecificky podél celé mtDNA a tvoří tak vyšší stabilnější strukturu zvanou nukleoid (Kanki *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007). Kromě TFAM transkripce vyžaduje také mitochondriální RNA polymerázu (POLMRT), specifické mitochondriální transkripční faktory 1 a 2 (TFB1 a TFB2) a mitochondriální terminační faktor mTERF. TFB1 i TFB2 spolupracují s POLMRT a TFAM při iniciaci transkripce z promotorů HSP a LSP. TFB 2 má desetkrát vyšší transkripční aktivitu, než TFB1 (Kelly a Scarpulla, 2004). Zajímavý je také fakt, že při zvýšené expresi TFAM, nebo TFB2 dochází i ke zvýšení množství mtDNA, zatímco při zvýšené expresi TFB1 ke změně množství mtDNA nedochází (Scarpulla, 2006). Lze tedy soudit, že TFAM a TFB2 hrají důležitou roli v regulaci množství mtDNA. Mitochondriální terminační faktor mTERF kromě vazby na terminační sekvenci stimuluje transkripci z HSP1, čímž zvyšuje poměr syntézy rRNA / mRNA (Scarpulla, 2008b).

Protože jsou podjednotky systému OXPHOS kódovány jaderným i mitochondriálním genomem, je nezbytná koordinovaná exprese obou genomů. Všechny mitochondriální proteiny včetně replikačního a transkripčního aparátu jsou kódovány jaderně. Výjimku tvoří pouze 13 mitochondriálně kódovaných podjednotek komplexů OXPHOS. Exprese mitochondriálního genomu je tudíž pod kontrolou genomu jaderného. Ke koordinované expresi obou genomů slouží především dva transkripční faktory jaderného původu NRF-1 a NRF-2 (nuclear respiratory factor NRF-1 a 2). Tyto faktory regulují transkripci genů ovlivňujících především mitochondriální funkce (Scarpulla, 2002a; Scarpulla, 2002b).

### 4.3.2. NRF-1

Homodimer NRF-1 funguje jako pozitivní regulátor transkripce. Specifická vazebná místa pro NRF-1 jsou přítomna v promotorech mnoha genů ovlivňujících mitochondriální funkce. NRF-1 se účastní transkripční regulace jaderných genů kódujících proteinové podjednotky komplexů OXPHOS (Virbasius *et al.*, 1993) a genů kódujících komponenty mitochondriálního transkripčního aparátu včetně POLMRT, TFAM, TBF1 a 2 (Scarpulla, 2006). V neposlední řadě NRF-1 ovlivňuje transkripci genů kódujících asemblační faktory, komponenty pro import proteinů do mitochondrií a enzymy pro syntézu hemu (Scarpulla, 2006).

### 4.3.3. NRF-2

NRF-2 byl identifikován jako aktivátor exprese podjednotky IV komplexu cytochrom c oxidázy (Scarpulla, 2002a). Lidský NRF-2 se skládá z pěti podjednotek a to z DNA vazebné podjednotky  $\alpha$  a čtyř dalších podjednotek ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ). NRF-2 také reguluje expresi mnoha mitochondriálních proteinů včetně TFAM, TFB1, TFB2 a také tří podjednotek lidské sukcinát dehydrogenázy. V promotorové oblasti pro vazbu NRF-2 se také často vyskytují i vazebné sekvence pro NRF-1, ale není to pravidlem. Přítomnost obou faktorů pro aktivaci transkripce vyžadují např. promotory pro lidský TFAM a TFB (Scarpulla, 2006).

## 4.4. Biogeneze mitochondrií

Mitochondrie se vyvíjejí v procesu mitochondriální biogeneze. Tento proces zahrnuje mitochondriální proliferaci a mitochondriální diferenciaci (Izquierdo *et al.*, 1995). Mitochondriální proliferace je dlouhodobý proces regulovaný především na transkripční úrovni a vede ke zvýšení množství mitochondrií a mtDNA v buňce (Cuezva *et al.*, 1997). Naproti tomu mitochondriální diferenciaci je krátkodobý proces regulovaný na posttranskripční úrovni (Izquierdo a Cuezva, 1993) zahrnující regulaci stability (Ostronoff *et al.*, 1995) a translace mRNA kódujících mitochondriálních proteinů (Luis *et al.*, 1993; Ostronoff *et al.*, 1996). Výsledkem mitochondriální

diferenciace jsou změny ve struktuře, funkci a účinnosti produkce ATP v systému OXPHOS (Cuezva *et al.*, 1997).

#### 4.4.1. Regulace mitochondriální biogeneze

Významnou roli v regulaci a integraci mitochondriální biogeneze s dalšími buněčnými procesy, jako je oxidace mastných kyselin, termogeneze, glukoneogeneze a buněčný růst, hraje rodina transkripčních koaktivátorů PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) (Scarpulla, 2002a). Exprese koaktivátorů je kontrolována signály z prostředí jako je teplota, nedostatek energie, dostupnost živin a růstové faktory. Tyto koaktivátory působí prostřednictvím interakce s jadernými transkripčními faktory, hlavně NRF-1 a NRF-2. Ovlivňují tak přímo transkripci jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů a nepřímo, přes TFAM, transkripci mitochondriálně kódovaných proteinů. Do rodiny PGC-1 transkripčních koaktivátorů patří PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  a PRC. Každý z těchto koaktivátorů vykazuje specifickou tkáňovou expresi a v buňce je součástí rozdílných regulačních drah. Tyto rozdíly svědčí o odlišné funkci jednotlivých koaktivátorů v rámci mitochondriální biogeneze a dalších buněčných procesů (Scarpulla, 2006).

##### 4.4.1.1. PGC-1 $\alpha$

PGC-1 $\alpha$  je klíčovým členem rodiny transkripčních koaktivátorů. Odpovídá na cAMP dependentní signální dráhy. *PGC-1 $\alpha$*  promotor je pod kontrolou transkripčních faktorů rodiny CREB (cAMP response element binding) (Scarpulla, 2006). Exprese PGC-1 $\alpha$  je indukována po tom, co je organismus vystaven chladu, fyzické námaze a hladovění (Puigserver *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Herzig *et al.*, 2001; Baar *et al.*, 2002). PGC-1 $\alpha$  interaguje s NRF-1 a aktivuje tak expresi cílových genů tohoto transkripčního faktoru. Interakcí s NRF-1 přímo na promotoru cílového genu koaktivuje např. expresi genu *TFAM* (Wu *et al.*, 1999) a integruje tak transkripci jaderných genů s mitochondriální transkripcí. PGC-1 $\alpha$  je klíčovým faktorem v aktivaci mitochondriální biogeneze a mitochondriální respirace. Jeho expresní hladina odpovídá aktivitě mitochondriální biogeneze, což by mohlo mít zásadní využití

při léčbě mitochondriálních poruch (Cui *et al.*, 2006; Wenz, 2009). Exprese genu *PGC-1 $\alpha$*  v kultuře myoblastů a dalších buněk indukuje expresi mRNA kódujících podjednotky komplexů OXPHOS. Způsobuje tak zvýšení proteinových hladin COX IV a cytochromu c zároveň se zvýšením množství mtDNA (Wu *et al.*, 1999). Kromě regulace mitochondriální transkripce a systému OXPHOS indukuje *PGC-1 $\alpha$*  expresi genů kódujících enzymy mitochondriální oxidace mastných kyselin a dráhy syntézy hemu (Scarpulla, 2008a).

#### 4.4.1.2. PGC-1 $\beta$

*PGC-1 $\beta$*  je sekvenčně příbuzný *PGC-1 $\alpha$*  (Lin *et al.*, 2005). Expresní hladiny *PGC-1 $\beta$*  mRNA v různých tkáních jsou paralelní k hladinám *PGC-1 $\alpha$*  mRNA. Nejvyšší exprese byla zaznamenána v hnědé tukové tkáni, srdci a kosterním svalstvu. *PGC-1 $\beta$*  také váže NRF-1 a indukuje tak expresi mitochondriálních genů (Lin *et al.*, 2003). Od *PGC-1 $\alpha$*  se *PGC-1 $\beta$*  liší tím, že není indukován chladem v hnědé tukové tkáni a je jen slabým induktorem exprese enzymů účastnících se glukoneogeneze v hepatocytech (Meirhaeghe *et al.*, 2003).

#### 4.4.1.3. PRC

PRC (*PGC-1 $\alpha$ -related coactivator*) také interaguje s transkripčním faktorem NRF-1 a koaktivuje tak expresi jeho cílových genů (Andersson a Scarpulla, 2001). PRC koaktivuje TFB1 a TFB2 transkripční faktory stejně efektivně jako *PGC-1 $\alpha$* , protože NRF-1 vazebná oblast v promotorech těchto faktorů je cílem pro oba koaktivátory (Gleyzer *et al.*, 2005). Navzdory strukturálním a funkčním podobnostem PRC a *PGC-1 $\alpha$*  se významně liší jejich expresní hladiny v různých tkáních (Andersson a Scarpulla, 2001). Exprese *PRC* je na transkripční úrovni zvýšena v bílé tukové tkáni ve srovnání s hnědou tukovou tkání, takže *PRC* se zřejmě neúčastní regulace termogeneze. *PRC* hraje roli v integraci procesu mitochondriální biogeneze s buněčnou proliferací, jeho exprese je indukována růstovými faktory (Scarpulla, 2006).

#### 4.4.2. Aktivita systému OXPHOS v prenatálním období

Během prenatálního období je hlavním zdrojem produkce ATP anaerobní glykolýza (Shepard *et al.*, 1970; Papa, 1996). Kapacita fetální oxidativní fosforylace je nízká, protože buňka ještě neobsahuje dostatečné množství mitochondrií s maturovaným systémem OXPHOS. Plné aktivaci systému OXPHOS ve fetálních tkáních také zabraňuje nízký parciální tlak kyslíku, který se výrazně zvyšuje až po narození (Sutton a Pollak, 1980).

V průběhu fetálního vývoje nedochází k účinnému spřažení respirace se syntézou ATP. Možným vysvětlením je, že komplexy respiračního řetězce a ATP syntáza, která hraje v produkci ATP klíčovou roli, nejsou ve fetálních mitochondriích kompletní (Valcarce *et al.*, 1988). Naproti tomu Minai *et al.* (2008) studovali složení a aktivitu komplexů OXPHOS v lidských tkáních v období od 11. do 17. týdne gestace a zjistili, že komplexy jsou plně uspořádané a enzymaticky funkční. Jejich plné enzymatické kapacity je ale přesto dosaženo až po narození (Minai *et al.*, 2008).

K částečné aktivaci systému OXPHOS dochází již v embryonálním období. U potkanů dochází zhruba v polovině gestačního období k morfologickým a funkčním změnám mitochondrií (Mackler *et al.*, 1973). Tyto změny souvisí s částečným přechodem na oxidativní metabolismus (12. den gestace) (Akazawa *et al.*, 1994; Shepard *et al.*, 1997) v období placentace. Toto období je charakteristické tím, že dochází ke zvýšení parciálního tlaku kyslíku a tedy i zvýšení přísunu kyslíku k embryu (Jollie, 1986; Akazawa, 2005). Alcolea *et al.* (2007) zjistili, že v období placentace (11. až 13. den gestace) dochází ke zvýšení kapacity systému OXPHOS, zatímco obsah mitochondrií na buňku se snižuje. Tyto výsledky svědčí o preferenci mitochondriální diferenciaci před mitochondriální proliferací v období placentace. Dochází tak ke zvýšení mitochondriální kapacity jako odpovědi na zvýšené energetické nároky související s tímto vývojovým obdobím. Analýzou Western blot bylo zjištěno zvýšené množství jaderně kódovaných proteinů COXIV,  $\beta$  podjednotky ATP syntázy a TFAM účastnících se mitochondriální biogeneze. Naproti tomu v hladinách jejich mRNA k žádnému zvýšení nedošlo, což svědčí o posttranskripční regulaci mitochondriální diferenciaci ((Alcolea *et al.*, 2007). Již ve stadiu moruly a blastocysty bylo zaznamenáno zvýšené množství transkriptů mitochondriálně kódovaných podjednotek mt-Nd2 a mt-Nd6 komplexu I a COXI a II komplexu IV

((Piko a Taylor, 1987; Thundathil *et al.*, 2005). K transkripční aktivaci mitochondriální biogeneze tedy dochází již v preimplantačním období.

#### 4.4.3. Změny množství mtDNA

Změny množství mtDNA v kontextu s fyziologií fetálního vývoje nejsou zatím dostatečně prostudovány. Většina studií je zaměřena pouze na embryonální fázi prenatálního vývoje (Piko a Taylor, 1987; May-Panloup *et al.*, 2005; Alcolea *et al.*, 2006; Kameyama *et al.*, 2007; Facucho-Oliviera a John, 2009). Změny množství mtDNA jsou většinou doprovázeny i změnami exprese mitochondriálních genů (Papa, 1996). Zvýšení či snížení množství mtDNA může být tedy odrazem energetických nároků souvisejících s vývojem dané tkáně.

Bylo zjištěno, že množství mtDNA ve vajíčku ovlivňuje úspěšnost jeho oplození. U vajíček s nižším počtem kopií mtDNA je úspěšnost oplození podstatně nižší, než u vajíček s normálním množstvím mtDNA (Reynier *et al.*, 2001).

Savčí embryonální buňky obsahují v preimplantačním stádiu malé nematurované mitochondrie. Se začátkem buňčné diference a ztrátou pluripotence embryonálních buněk dochází k mitochondriální proliferaci a replikaci mtDNA (Facucho-Oliviera a John, 2009). U potkanů nebyly během raného embryonálního vývoje do stadia blastocysty zaznamenány žádné změny množství mtDNA, z čehož lze soudit, že v preimplantačním období nedochází k replikaci mtDNA (Kameyama *et al.*, 2007). Stejný výsledek byl pozorován i u myší (Piko a Taylor, 1987). Naproti tomu v raných embryích telete byl zaznamenán pokles hladiny mtDNA pravděpodobně v důsledku její aktivní degradace. Následně od stadia blastocysty dochází k nárůstu množství mtDNA (May Panloup *et al.*, 2005). Během období placentace, kdy dochází k aktivaci oxidativního metabolismu, byl u potkanů sledován významný pokles množství mtDNA. Toto pozorování je opět potvrzením, že v tomto období převažuje proces mitochondriální diference nad mitochondriální proliferací (Alcolea *et al.*, 2006). Heerdt a Augenlicht (1990) stanovovali množství mtDNA v lidských tkáních v období od 22. do 32. týdne gestace. V kostní dřeni, žaludku, tlustém střevě, slezině, nadledvinkách a leukocytech periferní krve bylo ve sledovaném fetálním období stanoveno přibližně stejné množství mtDNA jako u dospělého jedince. Ve fetálních ledvinách bylo



zjištěno podstatně nižší množství mtDNA, než v ledvinách dospělého jedince. Stejně tak bylo množství mtDNA nižší ve fetálních játrech a bránici, přestože v těchto orgánech došlo během sledovaného fetálního období k nárůstu množství mtDNA. Autoři Heerdt a Augenlicht (1990) soudí, že v různých tkáních se množství mtDNA liší nejen v závislosti na energetických nárocích dané tkáně, ale také na stadiu vývoje tkáně. V souladu s tímto závěrem jsou i výsledky studie zabývající se množstvím mtDNA v leukocytech lidské pupečnickové krve od 25. do 41. týdne fetálního vývoje. V tomto období se množství mtDNA v leukocytech pupečnickové krve postupně snižuje (Pejznochova *et al.*, 2008).

Klíčovým regulátorem množství mtDNA je TFAM. Množství mtDNA je přímo úměrné množství buněčného TFAM (Ekstrand *et al.*, 2004). U myši s heterozygotním knockoutem genu *TFAM* je hladina mtDNA výrazně zredukována. Myši s homozygotním knockoutem genu *TFAM* umírají v polovině gestačního období v důsledku nedostatku mtDNA a deficiencie systému OXPHOS. Z toho vyplývá, že TFAM patří mezi nezbytné faktory mitochondriální biogeneze a embryonálního vývoje (Larsson *et al.*, 1998).

#### 4.4.4. Adaptace na extrauterinní prostředí

K úplnému přechodu na oxidativní metabolismus a tudíž i nejvýraznější aktivaci mitochondriální diferenciace dochází v období adaptace na extrauterinní prostředí (Valcarce *et al.*, 1994). Adaptace na extrauterinní prostředí zahrnuje hormonální, fyziologické a metabolické změny. Funkce, které byly v prenatálním období zajišťovány placentou a orgány matky musí po narození převzít orgány novorozence (Dawkins, 1966). V tomto období hraje důležitou roli úspěšný přechod na oxidativní metabolismus a produkce ATP systémem OXPHOS. K tomu je zapotřebí dostatečné množství vyvinutých mitochondrií s maturovaným systémem OXPHOS. Diferenciace mitochondrií je po narození regulována hormony adrenalinem a glukagonem (Sutton a Pollak, 1980), které prostřednictvím cAMP spustí pozvolný nárůst koncentrace cytoplazmatického ATP (Sutton a Pollak, 1978; Nakai *et al.*, 2000). ATP způsobuje kontrakci vnitřní mitochondriální membrány, která se tak stává osmoticky aktivní, což je důležité pro úplné spřažení respirace se syntézou ATP (Pollak, 1975). Maturace komplexů OXPHOS je ale primárně závislá na proteosyntéze. Během první

hodiny po porodu dochází k rychlé syntéze proteinových komponent komplexů OXPHOS a jejich maturaci (Valcarce *et al.*, 1988). Hyperkontrakce mitochondrií a maturace komplexů OXPHOS tak společně zajišťují úspěšné spřažení respirace s oxidativní fosforylací. Proces syntézy komponent OXPHOS v procesu mitochondriální diferenciaci je regulován na translační úrovni. Během první hodiny po porodu se významně zvyšuje úroveň translace jaderně (Luis *et al.*, 1993) i mitochondriálně (Ostronoff *et al.*, 1995) kódovaných mRNA kódujících podjednotky systému OXPHOS. Tyto mRNA jsou během prenatalního vývoje nashromážděny v buňce v translačně inaktivním stavu, aby mohla být ihned po porodu zahájena efektivní proteosyntéza (Luis *et al.*, 1993). Tím je v období adaptace na extrauterinní prostředí zajištěn dostatečně rychlý a flexibilní přechod organismu na oxidativní metabolismus.

#### **4.4.5. Adaptace na extrauterinní prostředí u předčasně narozených jedinců**

Studium maturace mitochondrií a systému OXPHOS může významně přispět ke zlepšení péče o předčasně narozené novorozence. Neefektivní produkce ATP systémem OXPHOS u předčasně narozených dětí se významně podílí na novorozenecké morbiditě a mortalitě (Escobar *et al.*, 2006).

Aktivita komplexů OXPHOSu ve svalové tkáni předčasně narozených dětí je podstatně nižší, než u donošených novorozenců. Menší je i obsah proteinových podjednotek komplexů OXPHOS, z čehož lze soudit, že snížená aktivita OXPHOSu u nedonošených novorozenců je důsledkem nedostatečné maturace tohoto systému (Wenchich *et al.*, 2002; Honzik *et al.*, 2008).

V jaterní tkáni předčasně narozených potkanů ve srovnání s donošenými potkany bylo zjištěno méně mitochondrií navíc s omezenou funkcí. Nižší množství mRNA kódujících mitochondriální proteiny a opožděná akumulace ATP, které jsou důležité pro morfologickou změnu mitochondrií, je příčinou nedostatečné oxidativní fosforylace během prvních postnatálních hodin (Valcarce *et al.*, 1994). Předčasné narození narušuje proces mitochondriální biogeneze a snižuje tak schopnost adaptace organismu v extrauterinním prostředí.

#### 4.4.6. Vliv tyroidních hormonů na mitochondriální biogenezi

Tyroidní hormony  $T_3$  (trijodtyronin) a  $T_4$  (tyroxin) jsou syntetizovány ve štítné žláze. Hrají významnou roli v regulaci buněčné diferenciace, buněčného růstu a metabolismu. Ovlivňují především spotřebu kyslíku a metabolický obrát tkáně (Yen, 2001). Hypotyroidismus se projevuje snížením spotřeby kyslíku a omezením oxidace glukózy, mastných kyselin a aminokyselin. Naproti tomu zvýšená hladina tyroidních hormonů způsobuje vyšší metabolický obrát a spotřebu kyslíku spolu se zvýšením tělesné teploty a tepové frekvence. Tyroidní hormony nejvíce ovlivňují metabolismus v srdci, svalech, játrech a ve střevě, zatímco na ostatní orgány jako mozek, ledviny, slinivka břišní a nadledvinky působí méně (Tata *et al.*, 1963). Receptory tyroidních hormonů patří do rodiny ligand dependentních transkripčních faktorů a váží se na sekvenci TRE (thyroid hormon response element) (Yen, 2001).

$T_3$  je významným regulátorem mitochondriální biogeneze a aktivity. Působí přímo na expresi jaderně i mitochondriálně kódovaných genů prostřednictvím vazby jaderně resp. mitochondriálně lokalizovaných tyroidních receptorů. Kromě toho působí i nepřímo tím, že reguluje expresi transkripčních faktorů a jejich koaktivátorů (Weitzel *et al.*, 2003). Studie prováděné na hypotyroidních potkanech prokázali, že *NRF-1*, *NRF-2* a *PGC-1 $\alpha$*  jsou regulovány hormonem  $T_3$ . Zatímco expresní hladina *NRF-1* a *PGC-1 $\alpha$*  významně narůstá po šesti hodinách od distribuce  $T_3$ , expresní hladina *NRF-2* je působením  $T_3$  snížena (Weitzel *et al.*, 2001; Rodríguez-Peña *et al.*, 2002). Z uvedených faktů vyplývá, že nepřímá odpověď může být oproti přímé výrazně zpožděná (Weitzel *et al.*, 2003).

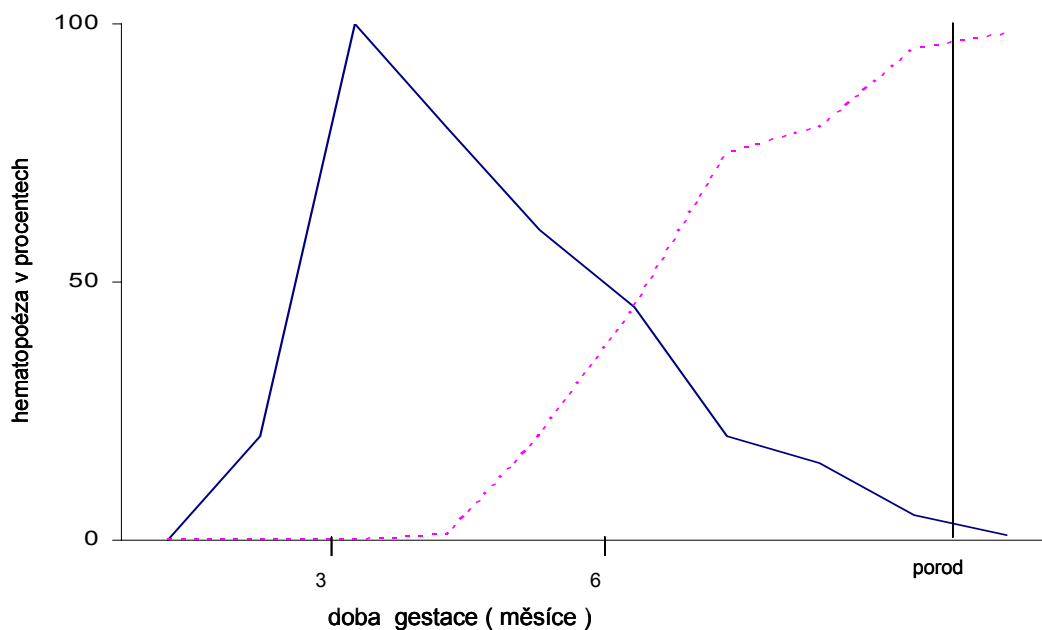
Jaterní tkáň hypotyroidních potkanů ve srovnání s normálními potkany obsahuje pouze poloviční množství mitochondrií, což svědčí o omezené mitochondriální proliferaci. Narušena je i mitochondriální diferenciace (Izquierdo *et al.*, 1990). Tato fakta dokazují, že hypotyroidismus významně narušuje proces mitochondriální biogeneze. Tyroidní hormony regulují expresi jaderně kódované katalytické podjednotky  $\beta$ - $F_1$  ATP syntázy. Hladina mRNA  $\beta$ - $F_1$  podjednotky ATP syntázy v jaterní tkáni hypotyroidních potkanů je ve srovnání s normálními eutyroidními potkany zredukována na polovinu ve všech stádiích vývoje (Izquierdo *et al.*, 1995). Hypotyroidismus tedy vede ke snížené expresi ATP syntázy, čímž je omezena kapacita oxidativní fosforylace v období adaptace na extrauterinní prostředí (Guerrieri *et al.*, 1998). Podání tyroidních hormonů novorozeným hypotyroidním

potkanům vede ke zvýšení exprese  $\beta$ -F<sub>1</sub> ATP syntázy. Postnatální indukce mitochondriální diferenciaci u hypotyroidních potkanů vyvolaná podáním tyroidních hormonů je regulována především na úrovni transkripce (Izquierdo a Cuezva, 1993).

#### 4.4.7. Fetální játra a hematopoéza

Játra se u lidského embrya zakládají ve čtvrtém týdnu gestace a vznikají ze dvou embryonálních tkání - mezodermu a endodermu (Jones a Rolph, 1985). Fetální játra mohou tvořit až 10% celkové hmotnosti plodu. V prenatalním období nejsou metabolické funkce jater plně aktivní, řada funkcí je zajišťována játry matky. Fetální játra syntetizují hlavně proteiny nezbytné pro vývoj plodu, před porodem tvoří zásobu živin, a po narození plodu je jejich činnost zaměřena na syntézu a aktivaci enzymů potřebných pro metabolické pochody v extrauterinním prostředí. Hlavním zdrojem energie bezprostředně po narození je glykogen, který se ve fetálních játrech tvoří již od 9. týdne gestace. Nejvíce glykogenu se ale tvoří krátce před porodem, kdy je jeho obsah v játrech plodu až třikrát vyšší než v játrech dospělého jedince (Masopust, 2003).

V časně fázi vývoje zajišťují játra hematopoetickou funkci. Hematopoéza začíná ve žlutkovém váčku, v 6. týdnu gestace přebírají hematopoetickou funkci játra a od 20. týdne gestace se hematopoéza postupně přesouvá do kostní dřeně (Obrázek 5). V jaterní tkáni dosahuje hematopoéza maxima ve 12. týdnu gestace. Játra jsou tedy hlavním hematopoetickým orgánem v období od 12. do 20. týdne gestace. Od 20. týdne gestace až do 1. týdne po narození jsou krevní buňky produkovány jaterní tkání a kostní dření zároveň (Brugnara a Platt, 2003). V tomto období tvoří hematopoetické buňky polovinu buněčné masy jaterní tkáně (Thomas a Yoffey, 1964) a úplně vymizí až ve 2. měsíci života kojence (Masopust, 2003). Během tohoto vývoje se postupně zvyšuje množství hepatocytů, jejich mitochondrie proliferují a narůstá množství mtDNA (Izquierdo *et al.*, 1995).



**Obrázek 5.** Přesun hematopoézy z jaterní tkáně do kostní dřeně v období prenatalního vývoje člověka (překresleno podle Brugnara a Platt, 2003). Vyznačena je intenzita hematopoézy ve fetální jaterní tkáni (plná čára) a kostní dřeni (přerušovaná čára).

#### 4.4.8. Fetální svalová tkáň

Kosterní svalstvo je mezodermálního původu (Jones a Rolph, 1985). První myogenní buňky se u člověka objevují v 6. až 8. týdnu gestace. Terminálně diferencované buňky kosterního svalstva jsou mnohjaderná svalová vlákna exprimující proteiny kontraktálního aparátu. Tato vlákna vznikají fúzí prekurzorů svalových buněk - myoblastů (Stockdale, 1997). Existují tři základní typy diferencovaných svalových vláken. Typ I jsou vlákna pomalá s vysokou oxidativní kapacitou a nízkou aktivitou glykolytických enzymů. Typ II jsou rychlá vlákna - IIA s vysokou aktivitou oxidativních i glykolytických enzymů a typ IIB s nízkou oxidativní kapacitou a vysokou aktivitou glykolytických enzymů (Jones a Rolph, 1985).

Svalová vlákna se zakládají ve třech fázích. Primární svalová vlákna se formují během embryonálního období a jsou ihned inervována motorickými neurony. Sekundární svalová vlákna se zakládají ve fetálním období od 9. týdne gestace. Začínají se formovat v oblasti inervace primárních svalových vláken a postupně je obklopují. Terciální svalová vlákna se zakládají v pozdním fetálním období a jejich formace přetrvává až do postnatálního období (Miller, 2001). Postupná diferenciac

svalových vláken je spojena se zvyšováním množství mtDNA a přechodem z glykolytického metabolismu proliferujících myoblastů na oxidativní metabolismus v diferencovaných svalových vláknech (Leary *et al.*, 1998; Franko *et al.*, 2008). Tento proces probíhá přibližně ve druhé fázi vývoje svalových vláken (Pejznochova *et al.*, 2010).

---

## 5. MATERIÁL

### 5.1. Fetální tkáň z člověka

Genová exprese byla analyzována v souboru celkem 52 vzorků fetální jaterní (n = 26) a svalové (n = 26) tkáně v období 13. až 28. týdne gestace. Fetální tkáň byla odebrána vždy po informovaném souhlasu při autopsii abortu. Rodinná anamnéza byla ve všech případech bez symptomů mitochondriálních poruch. Tkáň byla ihned po odběru uložena do tekutého dusíku a uchována do dalšího zpracování v -80°C.

Aborty byly indikovány z různých důvodů jako např. trizomie 21 (10 plodů), trizomie 18 (1 plod), sakrální teratom (2 plody), okcipitální meningocele (2 plody), oligohydramnion (2 plody), spina bifida (2 plody) a další vrozené defekty. Přehled klinických údajů je v Tabulce 1.

#### 5.1.1. Etika

Studie byla vypracována v souladu s Helsinskou deklarací Světové zdravotnické asociace a byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Fetální tkáň byla odebrána vždy po informovaném souhlasu.

### 5.2. Fetální tkáň z potkana (*Rattus Norvegicus*)

Genová exprese a množství mtDNA byly analyzovány v souboru celkem 72 vzorků jaterní tkáně v období od 16. dne gestace do 5. dne postnatálního života. Každý den sledovaného období bylo odebráno 6 vzorků jaterní tkáně. Tkáň byla ihned po odběru uložena do tekutého dusíku a uchována do dalšího zpracování v -80°C.

#### 5.2.1. Etika

Potkani byli chováni za standardních podmínek. Protokoly pokusů byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při Fyziologickém ústavu AVČR v Praze.

**Tabulka 1.** Klinické údaje k abortům

pacient	týden gestace	hmotnost plodu (g)	hlavní klinická komplikace
1	13+0	85	hygroma colli cysticum
2	13+5	70	trizomie 21
3	13+6	55	trizomie 21
4	14+2	75	trizomie 21
5	16+0	90	trizomie 21
6	16+4	85	trizomie 18
7	16+4	110	trizomie 21
8	17+4	100	spina bifida
9	18+0	350	gastroschisis
10	18+0	345	okcipitální meningocele
11	19+0	440	spontánní abort
12	19+1	300	trizomie 21
13	19+4	280	trizomie 21
14	20+0	290	trizomie 21
15	20+0	360	vrozený defekt
16	20+1	300	sakrální teratom
17	20+3	280	deformity končetin
18	20+3	355	trizomie 21
19	20+5	150	omphalocele
20	21+3	510	spina bifida a meningocele
21	22+0	350	ageneze ledvin a oligohydramnion
22	22+1	400	oligohydramnion, hypotrofie
23	23+2	600	trizomie 21
24	23+5	610	vrozený defekt
25	25+4	1200	sakrální teratom
26	28+3	900	okcipitální meningocele



### 5.3. Seznam použitých chemikálií

dNTPs	Sigma, USA
DTT	Invitrogen, USA
etanol	PENTA, ČR
FSB	Invitrogen, USA
chloroform	PENTA, ČR
izopropylalkohol	PENTA, ČR
Master Mix DyNamo™ HS SYBR® Green	Finzymes, Finsko
Oligo dT primer	Promega, USA
PCR voda	TopBio, ČR
primery	Generi Biotech, ČR
promývací roztok: 0,1 M sodium citrátu a 10% etanolu	PENTA, ČR
RNAsin	Promega, USA
Superscript III reverzní transkriptáza	Invitrogen, USA
Taq Man® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, USA
Taq Man® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, USA
TriReagent	MRC, USA

### 5.4. Seznam použitých přístrojů a laboratorního vybavení

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, USA
automatické pipety	Finnpipette®, Thermo Scientific, USA
centrifuga	Jouan, Trigon-plus®, ČR
homogenizátor	Ultra-Turrax T 10, IKA®, Německo
laboratorní plast	Eppendorf, Německo; Gilson, USA; TPP, Švýcarsko
mrazící box	SANYO, Japonsko
PCR box	Holten, Dánsko
Pipety	Eppendorf, Německo
real-time PCR cykler	Chromo4 real-time PCR System, Bio-Rad, USA

real-time PCR cycler	7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA
termocykler	DNA Engine Dyad, Bio-Rad, USA
vortex	IKA®, Německo
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA

## 6. METODY

### 6.1. Izolace RNA z tkání

Každý vzorek hluboce zmražené tkáně byl zhomogenizován přístrojem Ultra-Turrax T 10 (MERC) v roztoku TriReagent (MRC). V 1 ml roztoku bylo zhomogenizováno maximálně 100 mg tkáně. Zhomogenizovaný vzorek byl inkubován 5 min při 15 - 30°C. Dále bylo ke vzorku přidáno 0,2 ml chloroformu (na 1 ml TriReagentu) a vše bylo promícháno obracením zkumavky po dobu 15 vteřin. Poté byl vzorek inkubován 3 minuty při 15 - 30°C a pak centrifugován při 12000 g / 15 minut při 2 - 8°C. Vodná fáze byla odebrána do nové zkumavky. Bylo přidáno 0,5 ml ledového izopropylalkoholu (na 1 ml TriReagentu) a jemně promícháno otáčením zkumavky. Poté byl vzorek inkubován 10 min při 15 - 30°C a pak centrifugován při 12000 g / 10 minut při 2 - 8°C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a RNA peleta promyta 75% etanolem (1 ml 75% etanolu na 1 ml TriReagentu). Vše bylo zvortexováno a centrifugováno při 10000 g / 10 minut při 2 - 8°C. Supernatant byl odstraněn a vzorek ještě jednou zcentrifugován při 5000 g / 1 minutu. Po odstranění zbytku supernatantu byla peleta vysušena v otevřené zkumavce maximálně 5 minut. Peleta byla rozpuštěna v RNase-free vodě a koncentrace byla změřena na NanoDropu 1000 (Thermo Scientific). Všechny vzorky RNA byly zmrazeny v -70°C. Kvalita RNA byla analyzována přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### 6.2. Izolace DNA z tkání

DNA byla izolována zároveň s izolací RNA. Po homogenizaci vzorku a první centrifugaci (12000 g / 15 minut při 2 - 8°C) (viz. kapitola 4.2) byla DNA vysrážena z interfáze a organické fáze etanolem. Nejdříve bylo přidáno 0,3 ml 100% etanolu (0,3 ml 100% etanolu na 1ml TriReagentu) a vzorek byl zamíchán obracením zkumavky. Poté byl vzorek inkubován 3 min při 15 - 30°C a centrifugován při 5000 g / 5 minut při 2 - 8 °C. Fenol-etanolový supernatant byl odstraněn. Peleta byla dvakrát promyta v promývacím roztoku (1 ml promývacího roztoku na 1 ml TriReagentu) po dobu minimálně 30 minut při 15 - 30°C a za stálého míchání.

Poté byly vzorky centrifugovány při 5000 g / 5 minut při 15 - 30 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta DNA promývána v 75% etanolu (1,5 ml 75% etanolu na 1 ml TriReagentu) a nechána v lednici přes noc (4°C). Poté byl vzorek centrifugován při 5000 g / 5 min při 2 - 8 °C. Etanol byl odstraněn a peleta usušena v otevřené zkumavce a následně rozpuštěna v PCR vodě (TopBio). Koncentrace DNA byla změřena na NanoDropu 1000 (ThermoScientific).

### 6.3. Reverzní transkripce

Na reverzní transkripci bylo vždy použito 1000 ng celkové RNA. Nejdříve byl připraven Mix 1 (Tabulka 2.), obsahující Oligo dT primer (Promega) a RNA templát. Mix 1 byl inkubován 2 min při 72°C v přístroji DNA Engine DYAD™ (Bio-Rad). Poté byl připraven Mix 2 (Tabulka 2.) obsahující FSB (Invitrogen), DTT (Invitrogen), dNTPs (Sigma), RNAsin (Promega) a Superscript III reverzní transkriptázu (Invitrogen). Nakonec byl Mix 2 přidán k Mixu 1 (celkem 20 µl) a směs byla inkubována 50 min při 42°C a následně 15 min při 70°C v přístroji DNA Engine DYAD™ (Bio-Rad) (Tabulka 3.). Pro analýzu byla připravena i RT negativní kontrola (reakce bez reverzní transkriptázy). Získaná cDNA byla uložena v -20°C a zpracována během dvou týdnů.

**Tabulka 2.** Reverzní transkripce - reagencie

<b>MIX 1 (10 µl)</b>	<b>koncentrace v jedné reakci (20 µl)</b>
RNA templát	50 ng / µl
Oligo dT primer	25 ng / µl
<b>MIX 2 (10 µl)</b>	<b>koncentrace v jedné reakci (20 µl)</b>
FSB	1x
DTT	10 mM
dNTP	0,5 mM
RNAsin	1 U / µl
SuperScript III	5 U / µl

**Tabulka 3.** Reverzní transkripce - program

	<b>fáze</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>
Mix 1	1. počáteční denaturace	72°C	2'
Mix 1 + Mix 2	2. reverzní transkripce	42°C	50'
	3. inaktivace enzymu	70°C	15'

#### 6.4. Real-time PCR

Kvantifikace mRNA a mtDNA ve fetálních tkáních člověka a kvantifikace mtDNA ve fetálních tkáních potkana byla provedena metodou real-time PCR na přístroji Chromo4 real-time PCR System (Bio-Rad). Reakce probíhala ve 20  $\mu$ l obsahujících 9,5  $\mu$ l 2X Master Mix DyNamo<sup>TM</sup> HS SYBR® Green (Finnzymes), koncentrace primerů v reakci byla 200 nM a bylo přidáno vždy 1  $\mu$ l DNA nebo cDNA templátu. Koncentrace analyzovaných vzorků DNA byla 50 ng /  $\mu$ l a cDNA vzorky byly naředěny tak, aby 1  $\mu$ l cDNA odpovídal 25 ng celkové RNA použité pro reverzní transkripci. Program začínal počáteční denurací vzorků při 95°C / 15 minut a pokračoval 40 cykly : denaturace 95°C / 15 s, specifická teplota a čas pro nasedání primerů na templát (Tabulka 4.) a elongace 72°C / 30 s. Po 40 cyklech následovala teplota 72°C / 5 min, měření křivky tání od 72°C do 92°C (měření fluorescence každý 1°C / 10 s) a 72°C / 10 min.

Kvantifikace mRNA ve fetálních tkáních potkana byla analyzována na přístroji 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reakce probíhala v 25  $\mu$ l obsahujících 12,5  $\mu$ l Taq Man® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) (Tabulka 5.), 1  $\mu$ l 20X sondy Taq Man Gene Expression Assays (Applied Biosystems) a 1  $\mu$ l cDNA templátu. Program začínal počáteční denurací při 95°C / 10 min a dále pokračoval 40 cykly : denaturace 95°C / 15 s a nasedání primerů s elongací 60°C / 1 min.

Pro každou analýzu byla provedena alespoň jedna RT negativní kontrola a kontrola bez templátu (blank). Každý vzorek byl analyzován dvakrát v tripletu pro každý gen. Specifita reakce byla ověřena analýzou křivky tání (při analýzách využívajících fluorescenční barvu SybrGreen) nebo elektroforézou.

Pro DNA z fetální tkáně člověka byla pro každou analýzu použita kalibrační křivka - desítkové ředění genomové DNA (od 100 ng do 10 ng), nebo dvojkové ředění cDNA (od 50 ng do 3 ng celkové RNA použité pro reverzní transkripci). Pokud

byl korelační koeficient < 0,99, kalibrační křivka nebyla použita. Hodnota směrnice kalibrační křivky odpovídala účinnosti reakce.

V rámci této diplomové práce byla provedena optimalizace metody kvantifikace mtDNA z fetální tkáně potkana. Parametry potřebné pro analýzu vzorků (např. korelační koeficient a účinnost reakce) byly vyhodnoceny na sérii kalibračních křivek (desítkové ředění) pomocí programu GenEx 4.4.2.308 (MultiD Analyses AB). Proto nebylo nutné pro každou analýzu připravovat kalibrační křivku.

**Tabulka 4.** Sekvence primerů a jejich charakteristiky

název primeru	oligonukleotidová sekvence (5' - 3') přímý / zpětný	teplota hybridizace / čas	délka produktu	číslo v GenBank
<b>člověk</b>				
GAPDH	TTCAACAGCGACACCCACT/ CCAGCCACATACCAGGAAAT	60°C/15s	95 bp	NG_007073
MT-RNR2	CCAAACCCACTCCACCTTAC/ TCATCTTTCCCTTGCGGTA	58°C/15s	118 bp	NC_001807
MT-ATP6	CCACCCTAGCAATATCAACC/ GTGAAAACGTAGGCTTGGAT	60°C/20s	115 bp	NC_012920.1
ATP50	TGAGAGTAGCACAATCCTGA/ TGGTAGTGAGGGGAGAGAAC	57°C/30s	132 bp	NM_001697.2
ATP5G2	GCCTGCTCCAAGTTTGTCTC/ GTATCTCCGGTCGTTTCAGC	59°C/20s	100 bp	NM_001002031.2
HPRT1	GCACTGGCAAACAATGC/ AACACTTCGTGGGGTCCTTT	60°C/20s	105 bp	NM_000194
PSMB6	TTTCCACAGCATTGAACTGA/ TACACCTGCCCTCCTTCTT	60°C/20s	144 bp	AK312558
TBP	TGCTCACCCACCAACAAT/ TCCAGAAACAAAATAAGGAGAA	60°C/20s	104 bp	NM_003194
<b>potkan</b>				
Gapdh	TAGGGCTGGAAAATCACTGG/ AAAGGGCAAGGCTAAAGGTC	57°C/15s	109 bp	NC_005103.2
mt-Rnr2	CAATCCAGGTCGGTTTCTATC/ GGTTGGGAGCACTTATGGTAA	57°C/15s	90 bp	NC_001665.2

Primery byly navrženy programem Primer3 (Rozen a Skaletsky, 2000) a nasyntetizovány firmou Geneti Biotech.

**Tabulka 5.** Názvy Taq Man sond analyzovaných genů (potkan)

gen	název sondy
<i>Atp6</i>	Rn03296710_s1
<i>Atp5o</i>	Rn00756345_m1
<i>Atp5g2</i>	Rn00821711_g1
<i>Gapdh</i>	Rn99999916_s1
<i>Psm6</i>	Rn00821581_g1
<i>Tbp</i>	Rn01455646_m1

### 6.5. Analýza mtDNA

Pro kvantifikaci mtDNA ve tkáních člověka a potkana byly zvoleny dva geny - *MT-RNR2* resp. *mt-Rnr2* kódovaný mtDNA a *GAPDH* resp. *Gapdh* kódovaný jadernou DNA. Optimalizace primerů pro kvantifikaci mtDNA v jaterní tkáni potkana byla provedena v rámci této diplomové práce.

Gen kódovaný jadernou DNA byl využit ke kvantifikaci jaderné DNA a k následné normalizaci množství mtDNA na buňku. K vyjádření množství mtDNA na buňku byla použita rovnice (1).

$$(1) \quad L = E_{mt}^{(-Ct_{mt})} / E_n^{(-Ct_n)}$$

L - množství mtDNA v buňce

$E_{mt}$  - účinnost PCR pro mitochondriální gen

$E_n$  - účinnost PCR reakce pro jaderný gen

$Ct_{mt}$  – prahový cyklus (threshold cycle) mitochondriálního genu (první bod, kde se intenzita fluorescence dostane nad pozadí (background))

$Ct_n$  - prahový cyklus (threshold cycle) jaderného genu

### 6.6. Analýza mRNA

Pro kvantifikaci expresních hladin mRNA analyzovaných genů ve fetálních tkáních člověka byli nejdříve vybrány dva referenční geny z pěti kandidátních genů (*ATP6* (podjednotka 6 ATP syntázy), *SDHA* (podjednotka A komplexu sukcinát

dehydrogenázy), *HPRT1* (hypoxantin fosforibozyltransferáza 1), *TBP* (TATA box binding protein), *PSMB6* (podjednotka proteazomu, typ beta, 6)). Pro fetální jaterní tkáň byly vybrány geny *TBP* a *PSMB6* a pro fetální svalovou tkáň byly vybrány geny *HPRT* a *PSMB6* (Pejznochová et al., 2010).

V rámci této diplomové práce byl proveden výběr vhodných referenčních genů pro kvantifikaci expresních hladin mRNA analyzovaných genů v jaterní tkáni potkana. Z pěti kandidátních genů (*Psm6*, *Tbp*, *Hprt*, *ActB* (aktin B) a *Gapdh* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)) byli vybrány geny *Psm6* (M = 0,401) a *Tbp* (M = 0,378) jako nejvhodnější.

Referenční geny byly vybrány aplikací GeNorm (program Microsoft Excel) dostupnou na <http://medgen.ugent.be/wjvdesomp/genorm/>. Vyhodnocení proběhlo na základě expresních hladin, pomocí nichž byla stanovena expresní stabilita kandidátních genů (M). Čím nižší je hodnota M analyzovaného genu, tím je gen stabilnější. Pomocí aplikace GeNorm byl dále stanoven normalizační faktor využívající geometrický průměr ke sledování změn relativní genové exprese a odlehlých hodnot (Vandesompele et al., 2002). Pro určení normalizovaných hodnot expresních hladin mRNA analyzovaných genů byla použita rovnice (2).

$$(2) \quad L_e = E_{\text{goi}}^{(-Ct_{\text{goi}})} / NF$$

$L_e$  - normalizovaná expresní hladina mRNA

$E_{\text{goi}}$  - účinnost PCR reakce analyzovaného genu

NF - normalizační faktor (individuální pro každý vzorek)

$Ct_{\text{goi}}$  - prahový cyklus (threshold cycle) pro analyzovaný gen

## 6.7. Statistická analýza

Ct body byly stanoveny pomocí Opticon 3 Software (Chromo4 real-time PCR System, Bio-Rad) nebo 7300 System Software (Applied Biosystems). Pro stanovení základních parametrů kalibračních křivek jednotlivých genů (účinnost a korelační koeficient) byl kromě programů Opticon 3 a 7300 System, použit i program GenEx 4.4.2.308 (MultiD Analyses AB). Pro vyhodnocení vztahu mezi gestačním věkem a množstvím mtDNA a expresními hladinami genů *ATP6* (*Atp6*), *ATP50* (*Atp50*), *ATP5G2* (*Atp5g2*) byly použity analýzy Dixonův test, Pearsonova korelace, lineární



regrese a Cookova vzdálenost. Všechny analýzy, s výjimkou Dixonova testu, byly provedeny v programu STATISTICA 6.0 (StatSoft, Praha, CZ). Výsledky byly statisticky významné, pokud  $P < 0,05$ .

---

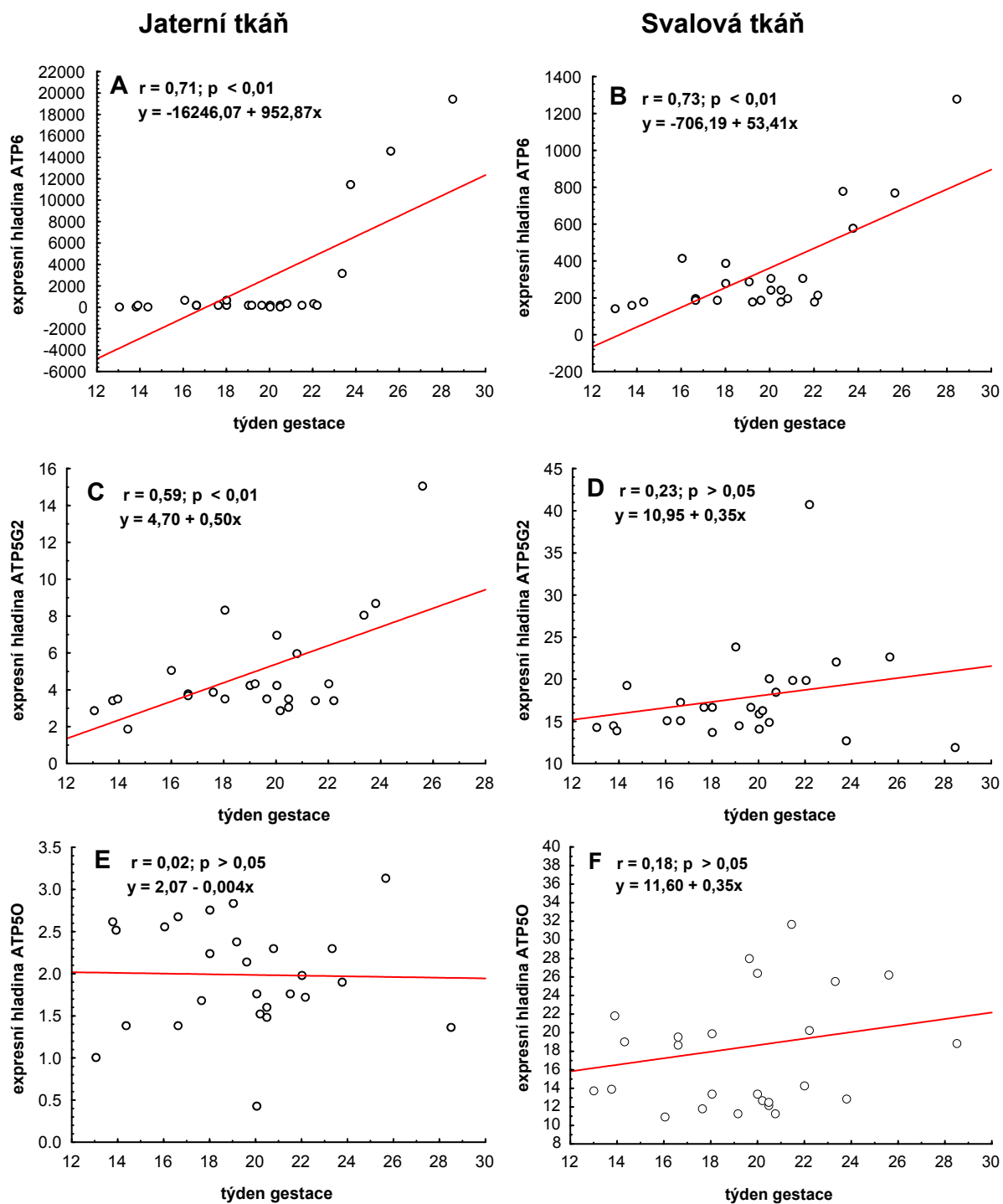
## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Kvantifikace transkriptů *ATP5O*, *ATP5G2* a *ATP6* ve fetální tkáni člověka

Průměrná kvalita celkové RNA byla  $7 \pm 1,4$  RIN (RNA integrity number) a průměrná čistota RNA byla  $1,9 \pm 0,1$  (A260/A280).

Expresní hladiny genů v jaterní a svalové tkáni člověka byly studovány v období od 13. do 28. týdne gestace. Expresní hladina mitochondriálně kódovaného genu *ATP6* statisticky významně narůstá v jaterní i svalové tkáni v průběhu sledovaného období, nejvýrazněji po 22. týdnu gestace (jaterní tkáň:  $r = 0,71$ ,  $p < 0,01$ ; svalová tkáň:  $r = 0,73$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 6A a 6B). Expresní hladina genu *ATP6* je na konci sledovaného období v jaterní tkáni o jeden řád vyšší než ve svalové tkáni. Expresní hladina jaderně kódovaného genu *ATP5G2* statisticky významně stoupá v průběhu sledovaného období pouze v jaterní tkáni ( $r = 0,59$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 6C) a nejvýrazněji opět po 22. týdnu gestace. Ve svalové tkáni zůstává expresní hladina genu *ATP5G2* beze změn ( $r = 0,23$ ,  $p > 0,05$ , Obrázek 6D). Expresní hladina genu *ATP5O* se během sledovaného období v jaterní, ani svalové tkáni nemění (jaterní tkáň:  $r = 0,02$ ,  $p > 0,05$ ; svalová tkáň:  $r = 0,18$ ,  $p > 0,05$ , Obrázek 6E a 6F). Expresní hladiny mitochondriálně kódovaného genu *ATP6* jsou v porovnání s expresními hladinami jaderně kódovaných genů *ATP5G2* a *ATP5O* až o čtyři řády vyšší.

**Obrázek 6.** Expresní hladiny genů *ATP6*, *ATP5G2*, *ATP5O* ve fetální jaterní (A, C, E) a svalové (B, D, F) tkáni člověka



## 7.2. Kvantifikace transkriptů *Atp5o*, *Atp5g2* a *Atp6* ve fetální tkáni potkana

Optimalizace kvantifikace mRNA v jaterní tkáni potkana byla provedena programem GenEx 4.4.2.308 (MultiD Analyses AB). Účinnost reakce pro každý gen byla stanovena pomocí tří kalibračních křivek. Pro výpočet expresních hladin genů byly použity střední hodnoty účinnosti (*Atp5o*: 1,95; *Atp5g2*: 1,96; *Atp6*: 1,97).

Průměrná kvalita celkové RNA byla  $3,4 \pm 1,5$  RIN (RNA integrity number) a průměrná čistota RNA byla  $2 \pm 0,1$  (A260/A280).

Expresní hladiny genů v jaterní tkáni potkana byly sledovány v období od 16. dne prenatalního vývoje do 5. dne postnatalního života. Během tohoto období statisticky významně narůstá hladina transkriptů mitochondriálně kódovaného genu *Atp6* ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 7A) a jaderně kódovaného genu *Atp5g2* ( $r = 0,24$ ,  $p < 0,05$ , Obrázek 7B). Expresní hladina jaderně kódovaného genu *Atp5o* se nemění v průběhu studovaného období ( $r = 0,15$ ,  $p > 0,05$ , Obrázek 7C). Hladina mRNA mitochondriálně kódovaného genu *Atp6* je koncem sledovaného období o jeden řád vyšší, než jsou hladiny mRNA obou jaderně kódovaných genů *Atp5g2* a *Atp5o*.

Expresní hladiny genů v jaterní tkáni potkana během samotného prenatalního období (16. - 22. den gestace) statisticky významně narůstají u všech genů (*Atp6*:  $r = 0,66$ ,  $p < 0,01$ ; *Atp5g2*:  $r = 0,20$ ,  $p < 0,01$ ; *Atp5o*:  $r = 0,45$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 8A, 8B a 8C). Hladina mRNA mitochondriálně kódovaného genu *Atp6* je koncem prenatalního období opět desetkrát vyšší, než jsou hladiny mRNA obou jaderně kódovaných genů *Atp5g2* a *Atp5o*. Během postnatalního období expresní hladiny genů *Atp5g2* a *Atp5o* v jaterní tkáni potkana statisticky významně klesají ( $r = -0,39$ ,  $p < 0,05$  resp.  $r = -0,72$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 9B a 9C). Expresní hladina *Atp6* se nemění ( $r = -0,09$ ,  $p > 0,05$ , Obrázek 9D).

Rozdíly mezi průměrnými expresními hladinami v prenatalním a postnatalním období u genů *Atp6* a *Atp5g2* ( $13,28 \pm 6,07$  resp.  $32,85 \pm 9,93$ ;  $p < 0,01$ , Obrázek 10A;  $1,6 \pm 0,63$  resp.  $2,18 \pm 1,37$ ;  $p < 0,05$ , Obrázek 10B) jsou statisticky významné. Rozdíl mezi průměrnou expresní hladinou v prenatalním a postnatalním období u genu *Atp5o* ( $1,44 \pm 0,47$  resp.  $1,71 \pm 0,77$ ;  $p > 0,05$ , Obrázek 10C) statisticky významný není.

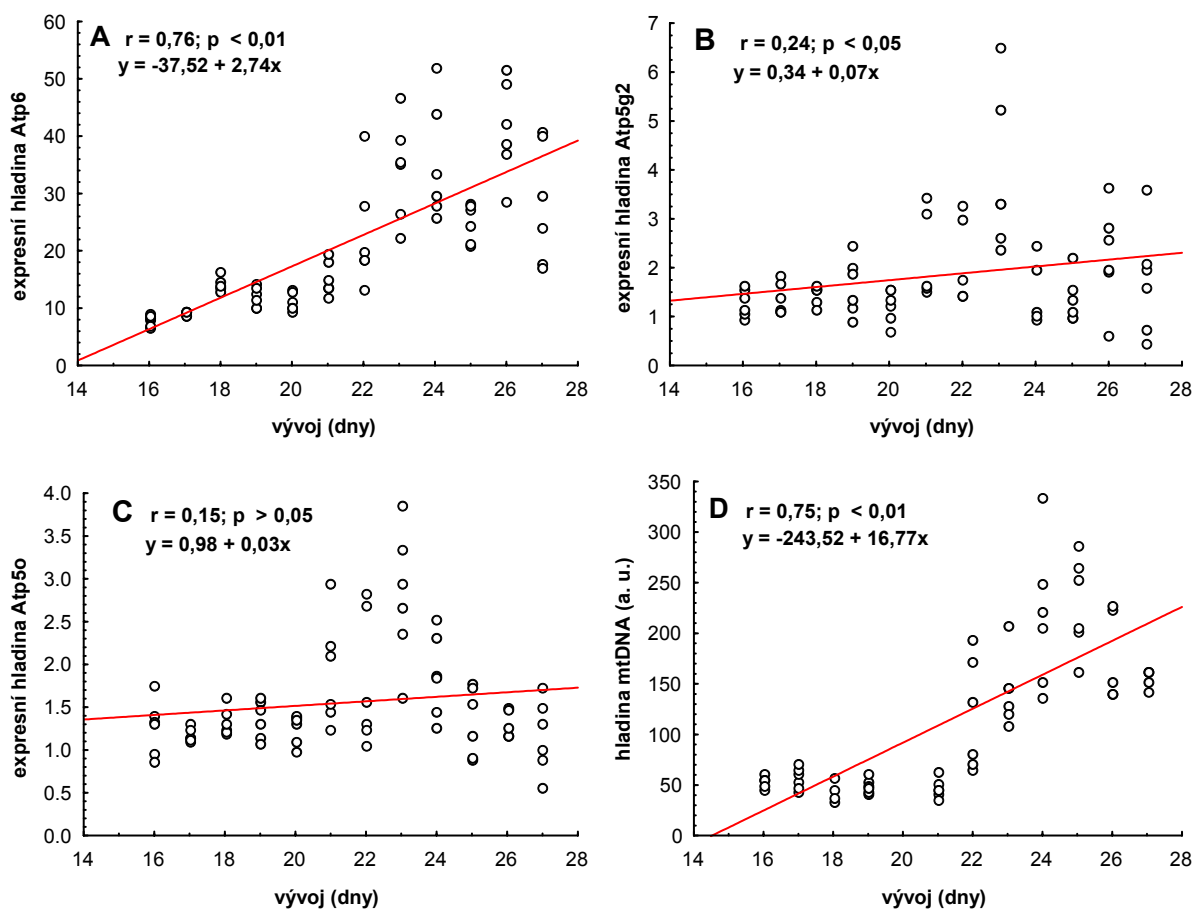
### 7.3. Kvantifikace mtDNA v období prenatalního a postnatálního vývoje potkana

Optimalizace kvantifikace mtDNA v jaterní tkáni potkana byla provedena programem GenEx 4.4.2.308 (MultiD Analyses AB). Účinnost reakce pro kvantifikaci nDNA a mtDNA byla stanovena pomocí šesti resp. čtyř kalibračních křivek. Pro určení hladiny mtDNA byly použity střední hodnoty účinnosti (nDNA: 2,08; mtDNA: 2,06).

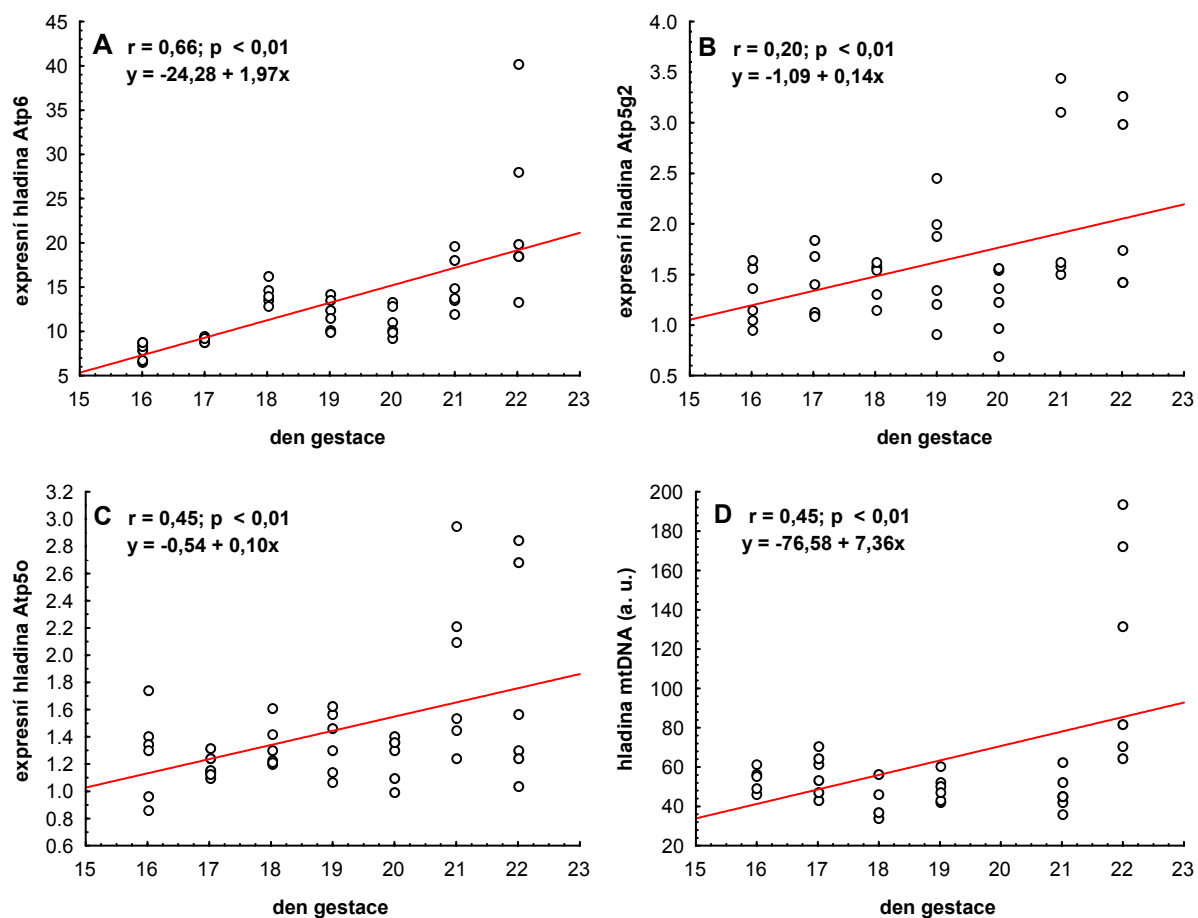
Statisticky významné zvýšení množství mtDNA bylo nalezeno ve fetální jaterní tkáni v období od 16. dne prenatalního vývoje do 5. dne postnatálního života. ( $r = 0,75$ ,  $p < 0,01$ , Obrázek 7D). Statisticky významné zvýšení množství mtDNA bylo zaznamenáno i během samotného prenatalního období vývoje (16. - 22. den gestace) ( $r = 0,45$ ,  $p < 0,01$ , 8D). Během postnatálního období se hladina mtDNA nemění ( $r = -0,02$ ,  $p > 0,05$ , Obrázek 9D).

Srovnání průměrných hladin mtDNA v prenatalním a postnatálním období vývoje ( $63,13 \pm 35,56$  resp.  $186,65 \pm 56,62$ ;  $p < 0,01$ , Obrázek 10D) ukázalo na statisticky významný rozdíl.

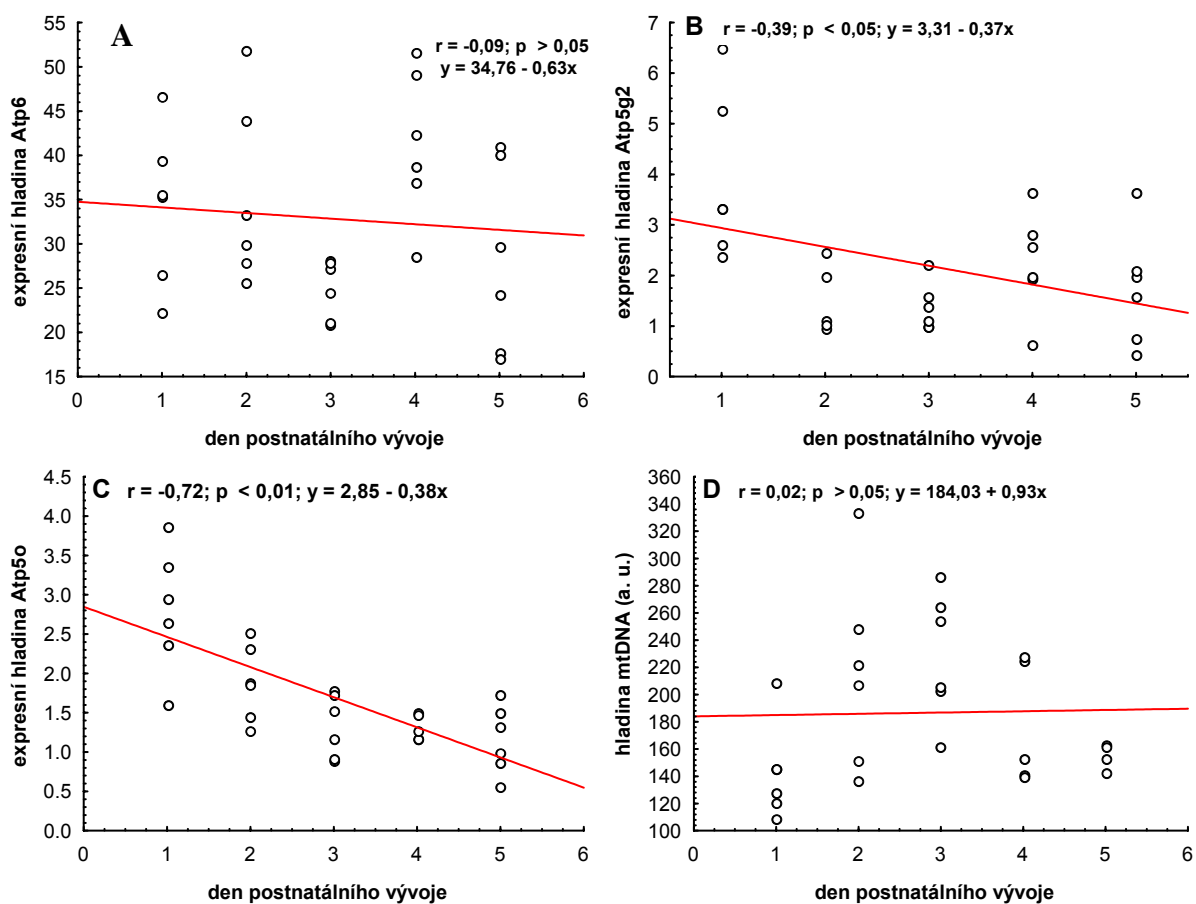
**Obrázek 7.** Expresní hladiny genů *Atp6*, *Atp5g2*, *Atp5o* (A, B, C) a množství mtDNA (D) v jaterní tkáni potkana (16.-22. den: prenatalní období; 23.-27. den: postnatální období)



**Obrázek 8.** Expresní hladiny genů *Atp6*, *Atp5g2*, *Atp5o* (A, B, C) a množství mtDNA (D) v jaterní tkáni potkana v prenatálním období vývoje

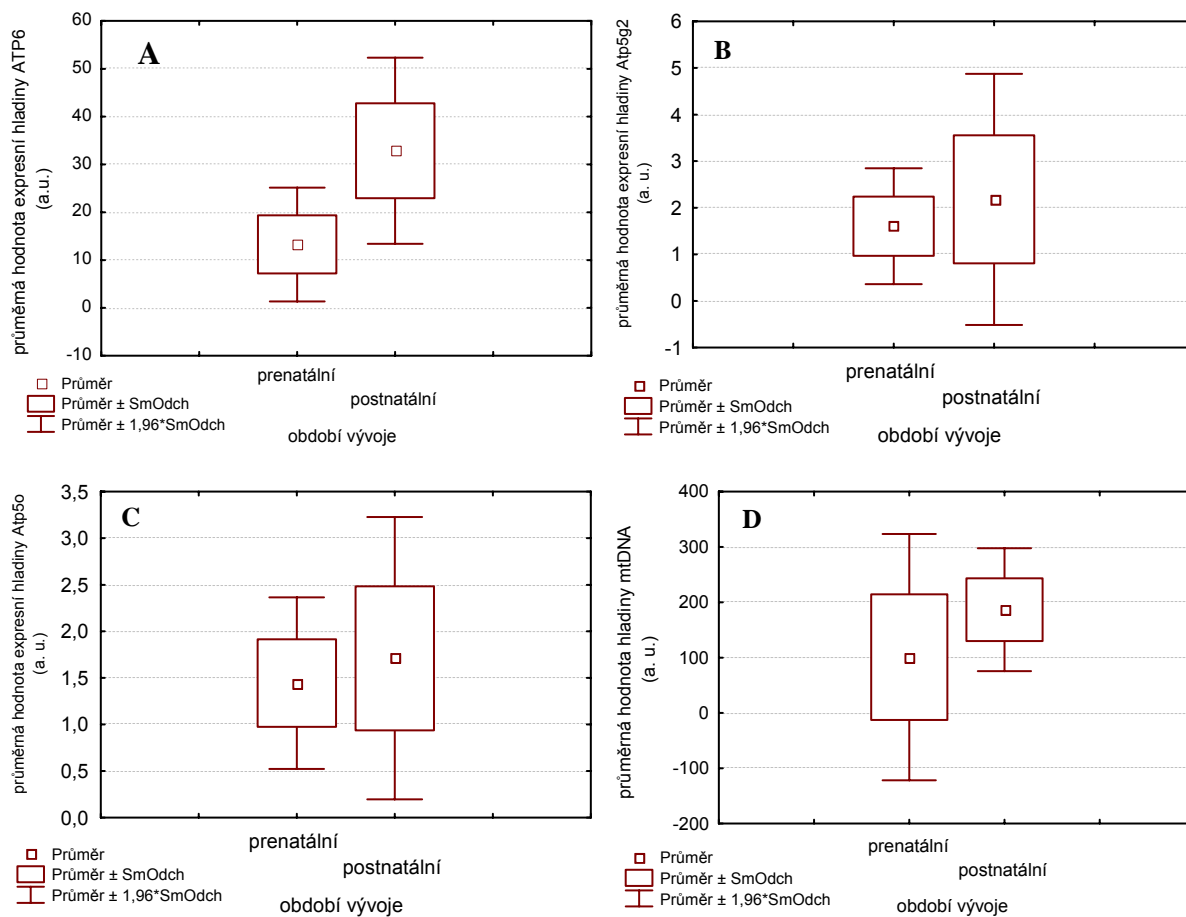


**Obrázek 9.** Expresní hladiny genů *Atp6*, *Atp5g2*, *Atp5o* (A, B, C) a množství mtDNA (D) v jaterní tkáni potkana během postnatálního období vývoje





**Obrázek 10.** Srovnání průměrných expresních hladin genů *Atp6*, *Atp5g2*, *Atp5o* (A, B, C) a průměrných hladin mtDNA (D) v prenatalním a postnatálním období vývoje v jaterní tkáni potkanů



## 8. DISKUZE

Dostatečná kapacita systému OXPHOS hraje zásadní roli v období adaptace novorozence na extrauterinní prostředí. Průběh maturace komplexů OXPHOS během vývoje plodu není zatím zcela znám. Hlubší poznání tohoto procesu může přispět ke zlepšení péče o předčasně narozené děti, zvláště o kriticky nemocné novorozence.

Tato studie se zabývá expresí podjednotek ATP syntázy, protože ATP syntáza je klíčovým enzymem v procesu oxidativní fosforylace. Ve studii byly kvantifikovány expresní hladiny genů kódujících podjednotky ATP syntázy (jaderně kódované *ATP5O*, *ATP5G2* a mitochondriálně kódovaný *ATP6*). Exprese genů byla analyzována v souboru 52 vzorků fetální jaterní a svalové tkáně člověka v průběhu druhého trimestru gestace a v souboru 72 vzorků fetální jaterní tkáně potkana v prenatalním a postnatalním období vývoje. V jaterní tkáni potkana bylo během sledovaného období navíc kvantifikováno množství mtDNA.

### 8.1. Exprese genů kódujících podjednotky ATP syntázy v jaterní a svalové tkáni člověka a potkana v období prenatalního a postnatalního vývoje

V rámci této studie byl v průběhu druhého trimestru nalezen statisticky významný nárůst expresní hladiny mitochondriálního genu *ATP6* v jaterní i svalové tkáni člověka. U jaderného genu *ATP5O* nebyla zaznamenána změna expresní hladiny ani v jedné z tkání. Naopak u dalšího jaderného genu *ATP5G2* byl pozorován vzestup expresní hladiny pouze v jaterní tkáni. Nejvýraznější nárůst expresních hladin genů *ATP6* a *ATP5G2* se objevuje po 22. gestačním týdnu. Tento týden gestace je pravděpodobně počátkem viability plodu (Persaud a Moore, 1998). Lze tedy předpokládat, že změny expresních hladin genů souvisejí s vývojovými změnami, ke kterým v tomto období dochází. Játra zastávají během časného fetálního vývoje roli hlavního hematopoetického orgánu. Po 20. týdnu gestace dochází k postupnému omezení jejich hematopoetické funkce a zvyšuje se množství hepatocytů (Brugnara a Platt, 2003). Současně s proliferací hepatocytů dochází k proliferaci mitochondrií, která je doprovázena transkripcí genů kódujících mitochondriální proteiny (Izquierdo

*et al.*, 1995). To vysvětluje i zvýšení expresních hladin genů kódujících podjednotky ATP syntázy ve fetální jaterní tkáni v naší studii.

Svalová vlákna se během prenatálního vývoje člověka zakládají ve třech fázích. První fáze začíná v embryonálním období, druhá fáze ve fetálním období a třetí fáze nastupuje až v pozdním fetálním období a pokračuje i postnatálně (Miller, 2001). Postupná diferenciací svalových vláken je spojena s přechodem z glykolytického na oxidativní metabolismus (Franko *et al.*, 2008, Leary *et al.*, 1998), nutně tedy musí docházet i k maturaci systému OXPHOS. Období sledované v této studii odpovídá druhé fázi vývoje svalových vláken. Proto je pravděpodobné, že zvyšování expresních hladin genů pro podjednotky ATP syntázy souvisí s postupnou diferenciací svalových buněk a s přechodem na oxidativní metabolismus.

Statisticky významný nárůst expresních hladin genů *Atp6* a *Atp5g2* byl stanoven i v jaterní tkáni potkana v období od 16. dne gestace do 5. dne postnatálního života. V samotném prenatálním období byl v jaterní tkáni potkana zaznamenán statisticky významný nárůst expresních hladin u všech tří analyzovaných genů *Atp6*, *Atp5g2* a *Atp5o*. Trend exprese *ATP5O* (*Atp5o*) se tedy v jaterní tkáni člověka a potkana liší. Exprese tohoto genu během prenatálního období zatím nebyla analyzována žádnou další studií. Bylo ale zjištěno, že expresní hladiny genů *Atp5o* i *Atp5g2* v různých tkáních potkanů jsou podstatně nižší, než expresní hladiny jiných podjednotek ATP syntázy (Sangawa *et al.*, 1997). I v této studii bylo stanoveno, že expresní hladiny *Atp5o* a *Atp5g2* v jaterní tkáni potkana jsou desetkrát nižší, než expresní hladina *Atp6*. Kromě toho bylo zjištěno, že v postnatálním období v jaterní tkáni potkana dochází ke statisticky významnému snížení hladiny genů *Atp5o* i *Atp5g2*. Z toho lze usoudit, že k významnému nárůstu expresních hladin *Atp5o* a *Atp5g2* v prenatálním období dochází výhradně za účelem adaptace organismu na extrauterinní prostředí. Poté expresní hladiny těchto genů s nízkou hladinou exprese opět klesají. Přesto je ale průměrná hladina exprese genu *Atp5g2* v postnatálním období statisticky významně vyšší, než jeho průměrná hladina exprese v prenatálním období. U genu *Atp6* je průměrná hladina exprese v jaterní tkáni potkana v postnatálním období také statisticky významně vyšší než v prenatálním období. Expresní hladina tohoto genu v postnatálním období se podle výsledků této studie nesnižuje.

Nárůst expresních hladin podjednotek ATP syntázy ve fetální jaterní a svalové tkáni člověka a fetální jaterní tkáni potkana odpovídá hypotéze,

že během prenatálního vývoje dochází v buňce k hromadění mRNA kódujících podjednotky komplexů OXPHOS (Luis *et al.*, 1993). Transkripty jsou během prenatálního vývoje nashromážděny v buňce v translačně inaktivním stavu, aby mohly být translatovány během první hodiny po porodu (Luis *et al.*, 1993). Tím je v období adaptace na extrauterinní prostředí zajištěn dostatečně rychlý přechod organismu na oxidativní metabolismus.

Expresní hladina genu *ATP6* je u člověka koncem druhého trimestru fetálního vývoje v jaterní tkáni desetkrát vyšší, než ve svalové tkáni. Z toho vyplývá, že zde pravděpodobně dochází ke tkáňově specifické expresi. Tkáňově specifická exprese byla zaznamenána i studií zabývajících se expresí podjednotek  $\beta$ -F<sub>1</sub>, *ATP6* a *ATP8* v různých tkáních potkana (Izquierdo a Cuezva, 1993). Studie uvádí, že hladina mRNA jaderně kódované  $\beta$ -F<sub>1</sub> podjednotky ATP syntázy je nejvyšší v srdci, následují játra, mozek, ledviny, kosterní svalstvo, slezina a nejnižší množství transkriptů je v plicích a varlatech. Hladiny mRNA mitochondriálně kódovaných podjednotek *ATP6* a *ATP8* vykazují podobnou tkáňovou specifitu jako hladiny mRNA  $\beta$ -F<sub>1</sub> podjednotky. Výsledky ukazují, že stejně jako u člověka (tato studie), je i u potkana exprese genu *Atp6* v jaterní tkáni vyšší, než ve svalové tkáni. Tkáňově specifická exprese byla ve fetálních tkáních člověka zaznamenána i u genu *ATP5G2*, jehož expresní hladina v jaterní tkáni během druhého trimestru prenatálního vývoje významně stoupá. Naproti tomu jeho expresní hladina ve svalové tkáni zůstává konstantní. Tkáňová specifita je pravděpodobně dána rozdílnými metabolickými funkcemi a odlišným prenatálním vývojem jaterní a svalové tkáně (Miller, 2001).

Geny *ATP6*, *ATP5G2* a *ATP5O* kódují podjednotky a, c a OSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein) ATP syntázy. Všechny tři podjednotky jsou součástí jejího F<sub>o</sub> sektoru (Obrázek 3). Sangawa *et al.* (1997) kvantifikovali množství transkriptů devíti podjednotek ATP syntázy v různých tkáních potkanů a určili, že *ATP5O* a *ATP5G2* patří do skupiny genů, jejichž expresní hladina je nízká. Tomu odpovídají i naše výsledky. Expresní hladiny genů *ATP5O* a *ATP5G2* ve fetálních tkáních člověka jsou v porovnání s expresními hladinami genu *ATP6* o dva až čtyři řády nižší a v jaterní tkáni potkanů jsou jejich expresní hladiny desetkrát nižší. Exprese genů patřících do skupiny genů s nízkou expresí na úrovni transkripce by mohla hrát zásadní roli v regulaci biogeneze ATP syntázy (Sangawa *et al.*, 1997). Prostřednictvím regulace těchto nízkce exprimovaných genů by tedy mohl být ovlivněn celý proces mitochondriální biogeneze. Kromě toho Houštěk *et al.* (1995) zjistili,

že množství transkriptů kódujících podjednotku c (ATP5G2) odráží množství ATP syntázy a může tedy být limitujícím faktorem v procesu její biogeneze. V souvislosti se získanými výsledky to znamená, že se množství komplexů ATP syntázy ve fetální jaterní tkáni člověka pravděpodobně zvyšuje během druhého trimestru prenatalního vývoje.

## 8.2. Změny množství mtDNA v jaterní tkáni potkana

V této studii byl zaznamenán statisticky významný nárůst množství mtDNA v jaterní tkáni potkana v období od 16. dne prenatalního vývoje do 5. dne postnatálního života. Statisticky významný nárůst byl zaznamenán i v případě analýzy pouze prenatalního období. Naproti tomu během sledovaného postnatálního období zůstává hladina mtDNA konstantní. Tento výsledek potvrzuje, že prenatalní období je klíčové a má zásadní význam pro proces mitochondriální biogeneze. Průměrná hodnota hladiny mtDNA v postnatálním období je statisticky významně vyšší, než průměrná hodnota prenatalní hladiny mtDNA. Toto zjištění je podpořeno skutečností, že během prenatalního období dochází k významnému zvýšení hladiny mtDNA. K podobným výsledkům dospěli i Prieur *et al.* (1995) ve fetálních ledvinách potkanů, kde zjistili významné zvýšení hladiny mtDNA v období od 19. dne gestace do 1. dne postnatálního života. Během tohoto období došlo k nejvyššímu nárůstu množství mtDNA mezi 19. a 20. dnem gestace. Naproti tomu během první hodiny po narození, kdy dochází k mitochondriální diferenciaci, nezaznamenali v množství mtDNA v ledvinách potkanů žádnou změnu (Prieur *et al.*, 1995). Během první postnatální hodiny byla hladina mtDNA beze změn i v jaterní tkáni potkanů (Ostronoff *et al.*, 1996). V průběhu mitochondriální diferenciaci, jejíž nejintenzivnější fáze nastává bezprostředně po narození, nedochází tedy k významným změnám množství mtDNA.

U člověka byl zjištěn významný nárůst množství mtDNA během fetálního vývoje od 7. týdne gestace do 1. měsíce postnatálního života v srdeční tkáni (Marin-Garcia *et al.*, 2000) a v období od 13. do 28. týdne gestace v jaterní a svalové tkáni (Pejznochova *et al.*, 2010). I zde se dá předpokládat, že hladina mtDNA v jaterní tkáni stoupá v souvislosti s postupným omezením hematopoetické funkce jater (Brugnara a Platt, 2003). Zvyšuje se proliferace hepatocytů následovaná proliferací mitochondrií a nárůstem hladiny mtDNA (Izquierdo *et al.*, 1995). Lze předpokládat,

---

že vývoj fetální jaterní tkáně potkana má podobný průběh jako u člověka. To by vysvětlovalo nárůst množství mtDNA v jaterní tkáni potkana, který byl zjištěn v rámci této studie.

Ve svalové tkáni množství mtDNA stoupá se zvyšujícím se počtem terminálně diferencovaných svalových buněk (Miller, 2001). U těchto diferencovaných buněk může být zvýšení hladiny mtDNA indukováno potřebou exprese podjednotek systému OXPHOS, což souvisí s přechodem z glykolytického na oxidativní metabolismus (Franko *et al.*, 2008, Leary *et al.*, 1998).

V této práci byl zaznamenán významný rozdíl mezi průměrnou hladinou mtDNA v prenatálním a postnatálním období v jaterní tkáni potkana. Významně vyšší množství mtDNA bylo zjištěno v postnatálním období. Studie Pejznochová *et al.* (2010) a Minai *et al.* (2008) tento výsledek potvrzují, neboť uvádějí významně vyšší hladiny mtDNA v postnatálním období v jaterní i svalové tkáni člověka.

### 8.3. Shrnutí

Změny množství mtDNA a exprese genů kódujících podjednotky ATP syntázy ve fetálních tkáních člověka i potkana popsané v této studii pravděpodobně souvisejí s přípravou plodu na adaptaci v extrauterinním prostředí. Podle výsledků této studie dochází během prenatálního vývoje k významnému nárůstu expresních hladin jaderně kódovaného genu *ATP5G2* (*Atp5g2*) a mitochondriálně kódovaného genu *ATP6* (*Atp6*) v jaterní tkáni člověka i potkana a jaderně kódovaného genu *Atp5o* pouze v jaterní tkáni potkana. Naproti tomu ve fetální svalové tkáni člověka se zvyšuje pouze expresní hladina mitochondriálně kódovaného genu *ATP6*. Exprese ostatních podjednotek není statisticky významná. Dále byl zjištěn významný nárůst množství mtDNA v jaterní tkáni potkana. Z těchto výsledků vyplývá, že regulace exprese jaderného a mitochondriálního genomu je ve fetální jaterní tkáni koordinována nejintenzivněji na transkripční úrovni. Naopak ve fetální svalové tkáni je pravděpodobné, že hlavní roli v regulaci exprese obou genomů hraje jiná, nejspíše posttranskripční úroveň.

---

## 9. ZÁVĚR

Hlavní výsledky, které byly dosaženy v této studii jsou:

a) Optimalizace kvantifikace mtDNA a mRNA v jaterní tkáni potkana. Zoptimalizovaná metoda umožnila následnou analýzu studovaného materiálu a navíc může být využita k další experimentální práci.

b) Analýza změn množství mtDNA v jaterní tkáni potkana během fetálního a postnatálního vývoje, od 16. dne gestace až do 5. dne postnatálního života. Analýzou bylo zjištěno, že během fetálního období dochází k nárůstu množství mtDNA. Naopak v postnatálním období nebyla zaznamenána žádná významná změna množství mtDNA.

c) Charakterizace změn exprese genů kódujících podjednotky ATP syntázy (*ATP6*, *ATP5G2*, *ATP5O* resp. *Atp6*, *Atp5g2*, *Atp5o*) v jaterní a svalové tkáni člověka od 13. do 28. týdne gestace a v jaterní tkáni potkana od 16. dne gestace do 5. dne postnatálního vývoje. Podle výsledků dochází u člověka v jaterní a svalové tkáni během studovaného období k nárůstu expresních hladin těchto genů. Dále byla zjištěna tkáňově specifické exprese, především u genů *ATP6* a *ATP5G2*. Podobný trend exprese těchto genů byl pozorován i v jaterní tkáni potkana.

Výsledky odrážejí podstatu jednotlivých vývojových stádií z hlediska mitochondriální biogeneze a ukazují na důležitou roli fetálního období v tomto procesu. Pozorované změny pravděpodobně souvisejí s přípravou plodu na adaptaci v extrauterinním prostředí, kdy dochází k přechodu z glykolytického na oxidativní metabolismus.

---

## 10. SEZNAM CITACÍ

- Akazawa S (2005). Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model. *Congenit Anom (Kyoto)* 45(3): 73-9.
- Akazawa S, Unterman T and Metzger B E (1994). Glucose metabolism in separated embryos and investing membranes during organogenesis in the rat. *Metabolism* 43(7): 830-5.
- Alcolea M P, Colom B, Llado I, Garcia-Palmer F J and Gianotti M (2007). Mitochondrial differentiation and oxidative phosphorylation system capacity in rat embryo during placentation period. *Reproduction* 134(1): 147-154.
- Alcolea M P, Colom B, Llado I, Gianotti M and Garcia-Palmer F J (2006). Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is increased in rat embryo during placentation and associated with mitochondrial differentiation. *Cell Physiol Biochem* 17(1-2): 79-88.
- Andersson U and Scarpulla R C (2001). PGC-1-Related Coactivator, a Novel, Serum-Inducible Coactivator of Nuclear Respiratory Factor 1-Dependent Transcription in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 21(11): 3738-3749.
- Baar K, Wende A R, Jones T E, Marison M, Nolte L A, Chen M, Kelly D P and Holloszy J O (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16(14): 1879-86.
- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage J P, Casteilla L, Letellier T and Rossignol R (2006). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(6): C1172-82.
- Boekema E J and Braun H P (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282(1): 1-4.
- Bogenghagen D F and Clayton D A (2003). The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem Sci* 28(7): 357-60.
- Brown T A and Clayton D A (2002). Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res* 30(9): 2004-10.
- Brugnara C and Platt O S (2003). The neonatal erythrocyte and its disorders. *Hematology of Infancy and Childhood*. D. G. Nathan, S. K. Orkin, A. T. Look and D. Ginsburg. Philadelphia, Saunders: 19-26.
- Clayton D A (2000). Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises. *Exp Cell Res* 255(1): 4-9.
- Cuezva J M, Ostronoff L K, Ricart J, de Heredia M L, Di Liegro C M and Izquierdo J M (1997). Mitochondrial Biogenesis in the Liver during Development and Oncogenesis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29(4): 365-377.
- Cuezva J M, Valcarce C, Luis A M, Izquierdo J M, Alconada A, Ostronoff L K, Flores A I, Liras A and Chamorro M (1992). Molecular mechanisms involved in the functional onset of mitochondrial activity soon after birth. *Proceedings of the International Symposium „Physiologic Basic of Perinatal Care“*. Madrid. 47-62.
- Cui L, Jeong H, Brovecki F, Parkhurst C N, Tanese N and Krainc D (2006). Transcriptional Repression of PGC-1? by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell* 127(1): 59-69.
- Cummins J (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod* 3(3): 172-82.



- Dawkins M J (1966). Biochemical aspects of developing function in newborn mammalian liver. *Br Med Bull* 22(1): 27-33.
- DiMauro S and Schon E A (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348(26): 2656-68.
- Ekstrand M I, Falkenberg M, Rantanen A, Park C B, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson C M and Larsson N-G (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 13(9): 935-944.
- Escobar G J, Clark R H and Greene J D (2006). Short-term outcomes of infants born at 35 and 36 weeks gestation: we need to ask more questions. *Semin Perinatol* 30(1): 28-33.
- Facucho-Oliviera J M and John J C (2009). The Relationship Between Pluripotency and Mitochondrial DNA Proliferation During Early Embryo Development and Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Rev and Rep* 5: 140-158.
- Fisher R P, Lisowsky T, Parisi M A and Clayton D A (1992). DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *Journal of Biological Chemistry.* 267(5): 3358-3367.
- Franko A, Mayer S, Thiel G, Mercy L, Arnould T, Hornig-Do H T, Wiesner R J and Goffart S (2008). CREB-1 $\alpha$  is recruited to and mediates upregulation of the cytochrome c promoter during enhanced mitochondrial biogenesis accompanying skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 28(7): 2446-59.
- Gleyzer N, Vercauteren K and Scarpulla R C (2005). Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 25(4): 1354-1366.
- Guerrieri F, Kalous M, Adorisio E, Turturro N, Santoro G, Drahotka Z and Cantatore P (1998). Hypothyroidism leads to a decreased expression of mitochondrial F0F1-ATP synthase in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 30(3): 269-76.
- Herzig S, Long F, Jhala U S, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B and Montminy M (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *413(6852):* 179-183.
- Honzik T, Wenchich L, Böhm M, Hansikova H, Pejznochova M, Zapadlo M, Plavka R and Zeman J (2008). Activities of respiratory chain complexes and pyruvate dehydrogenase in isolated muscle mitochondria in premature neonates. *Early Human Development* 84(4): 269-276.
- Houštěk J, Andersson U, Tvrđík P, Nedergaard J and Cannon B (1995). The Expression of Subunit C Correlates with and Thus May Limit the Biosynthesis of the Mitochondrial F0F1-ATPase in Brown Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* 270: 7689-7694.
- Izquierdo J M and Cuezva J M (1993). Evidence of post-transcriptional regulation in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 55-60.
- Izquierdo J M, Luis A M and Cuezva J M (1990). Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J Biol Chem* 265(16): 9090-7.
- Izquierdo J M, Ricart J, Ostronoff L K, Egea G and Cuezva J M (1995). Changing Patterns of Transcriptional and Post-transcriptional Control of Beta-F1-ATPase Gene Expression during Mitochondrial Biogenesis in Liver. *J. Biol. Chem.* 270(17): 10342-10350.

- Jollie W P (1986). Ultrastructural studies of protein transfer across rodent yolk sac. *Placenta* 7(3): 263-81.
- Jones C T and Rolph T P (1985). Metabolism during fetal life: a functional assessment of metabolic development. *Physiol Rev* 65(2): 357-430.
- Kameyama Y, Filion F, Yoo J G and Smith L C (2007). Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro. *Reproduction* 133(2): 423-32.
- Kang D, Kim S H and Hamasaki N (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* 7(1-2): 39-44.
- Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson C M, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N and Kang D (2004). Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A in Maintenance of Human Mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 24(22): 9823-9834.
- Kelly D P and Scarpulla R C (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development* 18(4): 357-368.
- Larsson N-G, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh G S and Clayton D A (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics* 18: 231-236.
- Leary S C, Battersby B J, Hansford R G and Moyes C D (1998). Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1365(3): 522-30.
- Lin J D, C H and Spiegelman B M (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcriptional coactivators. *Cell Metab* 1: 361-370.
- Lin J D, Tarr P T, Yang R J, J R, Puigserver P, Newgard C B and Spiegelman B M (2003). PGC-1 $\beta$  in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* 278(33): 30843-30848.
- Logan D C (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57(6): 1225-1243.
- Luis A M, Izquierdo J M, Ostronoff L K, Salinas M, Santaren J F and Cuezva J M (1993). Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* 268(3): 1868-75.
- Mackler B, Grace R, Haynes B, Bargman G J and Shepard T H (1973). Studies of mitochondrial energy systems during embryogenesis in the rat. *Arch Biochem Biophys* 158(2): 662-6.
- Mannella C A (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 171-9.
- Marin-Garcia J, Ananthkrishnan R and Goldenthal M J (2000). Heart mitochondrial DNA and enzyme changes during early human development. *Molecular and Cellular Biochemistry* 210(1): 47-52.
- Masopust J (2003). Vyšetření funkce jater v pediatrii (1. část). *Pediatric pro praxi* 2: 60-62.
- May-Panloup P, Vignon X, Chretien M-F, Heyman Y, Tamassia M, Malthiery Y and Reynier P (2005). Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3(1): 65.
- Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi J K, Yeo G, Brand M D, Cortright R N, O'Rahilly S, Montague C and Vidal-Puig A J (2003). Characterization of the human, mouse

- and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 373(1): 155-165.
- Miller J (2001). *Developmental Biology of Skeletal Muscle. Disorders of Voluntary Muscle.* G. Karpati, D. Hilton-Jones and R. Griggs, Cambridge University Press: 26-28.
- Minai L, Martinovic J, Chretien D, Dumez F, Razavi F, Munnich A and Rötig A (2008). Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development. *Molecular Genetics and Metabolism* 94(1): 120-126.
- Mokranjac D and Neupert W (2005). Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1019-23.
- Nakai A, Taniuchi Y, Asakura H, Oya A, Yokota A, Koshino T and Araki T (2000). Developmental changes in mitochondrial activity and energy metabolism in fetal and neonatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 121(1): 67-72.
- Navarro A and Boveris A (2007). The mitochondrial transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292: 670-686.
- Ostronoff L K, Izquierdo J M and Cuezva J M (1995). mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3): 1094-8.
- Ostronoff L K, Izquierdo J M, Enríquez J A, Montoya J and Cuezva J M (1996). Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem. J.* 316(1): 183-191.
- Papa S (1996). Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1276(2): 87-105.
- Pedersen P L and Amzel L M (1993). ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem* 268(14): 9937-40.
- Pejznochova M, Tesarova M, Hansikova H, Magner M, Honzik T, Vinsova K, Hajkova Z, Havlickova V and Zeman J (2010). Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. *Mitochondrion* 10(4): 321-9.
- Pejznochova M, Tesarova M, Honzik T, Hansikova H, Magner M and Zeman J (2008). The developmental changes in mitochondrial DNA content per cell in human cord blood leukocytes during gestation. *Physiol Res* 57(6): 947-55.
- Persaud T and Moore K (1998). *Introduction to the Developing Human.* The Developing Human. T. Persaud and K. Moore, Saunders: pp. 2-3, 396.
- Piko L and Taylor K D (1987). Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 123(2): 364-74.
- Pollak J K (1975). The maturation of the inner membrane of foetal rat liver mitochondria. *Biochem J* 150(3): 477-88.
- Poulton J and Bindoff L (2001). *Mitochondrial Respiratory Chain Disorders.* Encyclopedia of Life Sciences.
- Prieur B, Cordeau-Lossouarn L, Rotig A, Bismuth J, Geloso J P and Delaval E (1995). Perinatal maturation of rat kidney mitochondria. *Biochem J* 305 ( Pt 2): 675-80.

- Puigserver P, Wu Z, Park C W, Graves R, Wright M and Spiegelman B M (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92(6): 829-839.
- Reynier P, May-Panloup P, Chretien M-F, Morgan C J, Jean M, Savagner F, Barriere P and Malthiery Y (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 7(5): 425-429.
- Rodríguez-Peña A, Escrivá H, Handler A C and Vallejo C G (2002). Thyroid hormone increases transcription of GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2 [alpha]-subunit in rat liver. *FEBS Letters* 514(2-3): 309-314.
- Rozen S and Skaletsky H (2000). Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. K. S and M. S. Totowa, Humana: 365-386.
- Sangawa H, Himeda T, Shibata H and Higuti T (1997). Gene expression of subunit c(P1), subunit c(P2), and oligomycin sensitivity-conferring protein may play a key role in biogenesis of H<sup>+</sup>-ATP synthase in various rat tissues. *J Biol Chem* 272(9): 6034-7.
- Scarpulla R C (2002a). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 1-14.
- Scarpulla R C (2002b). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286(1): 81-9.
- Scarpulla R C (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 97(4): 673-683.
- Scarpulla R C (2008a). Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147(Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders): 321-334.
- Scarpulla R C (2008b). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiol. Rev.* 88(2): 611-638.
- Shepard T H, Tanimura T and Park H W (1997). Glucose absorption and utilization by rat embryos. *The International journal of developmental biology* 41: 307-314.
- Shepard T H, Tanimura T and Robkin M A (1970). Energy metabolism in early mammalian embryos. *Symp Soc Dev Biol* 29: 42-58.
- Schafer E, Seelert H, Reifschneider N H, Krause F, Dencher N A and Vonck J (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281(22): 15370-5.
- Soubannier V and McBride H M (2009). Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793(1): 154-170.
- Sperl W, Sengers R C, Trijbels J M, Ruitenbeek W, Doesburg W H, Smeitink J A, Kollée L A and Boon J M (1992). Enzyme activities of the mitochondrial energy generating system in skeletal muscle tissue of preterm and fullterm neonates. *Ann Clin Biochem* 29: 638-645.
- Stockdale F E (1997). Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct* 22(1): 37-43.
- Sutton R and Pollak J K (1978). The increasing adenine nucleotide concentration and the maturation of rat liver mitochondria during neonatal development. *Differentiation* 12(1): 15-21.
- Sutton R and Pollak J K (1980). Hormone-initiated maturation of rat liver mitochondria after birth. *Biochem. J.* 186(1): 361-367.

- Tata J, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S and Hedman R (1963). The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J.* 86: 408-428.
- Thomas D B and Yoffey J M (1964). Human Foetal Haematopoiesis II. Hepatic Haematopoiesis in the Human Foetus. *Br J Haematol* 10: 193-7.
- Thorsness P E and Hanekamp T (2001). Mitochondria: Origin. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- Thundathil J, Filion F and Smith L C (2005). Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 71(4): 405-13.
- Valcarce C, Izquierdo J M, Chamorro M and Cuezva J M (1994). Mammalian adaptation to extrauterine environment: mitochondrial functional impairment caused by prematurity. *Biochem. J.* 303(3): 855-862.
- Valcarce C, Navarrete R, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J and Cuezva J (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 263(16): 7767-7775.
- Vandesompele J, De Paepe A and Speleman F (2002). Elimination of Primer-Dimer Artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* 303(1): 95-98.
- Virbasius C A, Virbasius J V and Scarpulla R C (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes & Development* 7(12a): 2431-2445.
- Weitzel J, Iwen K and Seitz H (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Experimental Physiology* 88(1): 121-128.
- Weitzel J M, Radtke C and Seitz H J (2001). Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res* 29(24): 5148-55.
- Wenchich L, Zeman J, Hansikova H, Plavka R, Sperl W and Houstek J (2002). Mitochondrial energy metabolism in very premature neonates. *Biol Neonate* 81(4): 229-35.
- Wenz T (2009). PGC-1alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life* 61(11): 1051-1062.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla R C and Spiegelman B M (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* 98(1): 115-124.
- Yen P M (2001). Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol. Rev.* 81(3): 1097-1142.
- Zeviani M and Di Donato S (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127(Pt 10): 2153-72.