

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE

Genetika, molekulární biologie a virologie



Iveta Brabcová

**Úloha mitochondriálního genomu v ischemicko-reperfúzním poškození
srdce u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) adaptovaných na
hypoxii.**

**Role of mitochondrial genome in myocardial ischemia-reperfusion injury of
spontaneously hypertensive rats (SHR) adapted to hypoxia.**

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze 6. 5. 2013

.....

Iveta Brabcová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Žurmanová, PhD. za čas a cenné rady, které mi věnovala, za velmi vstřícný přístup, trpělivost a ochotu. Dále děkuji Mgr. Ditě Kašparové, za cenné rady nejen ohledně metodiky a RNDr. Janu Neckářovi, PhD. za přínosné konzultace. Za příjemné pracovní prostředí a ochotu patří mé díky i celému kolektivu laboratoře svalové fyziologie. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi během studia pomáhali a vždy mě podporovali.

Abstrakt

Ischemicko–reperfúzní poškození srdce je jednou z významných civilizačních chorob, a proto současný výzkum věnuje mnoho pozornosti jeho prevenci a poznání možných mechanismů ochrany srdce. Adaptace na hypoxii je známa již několik desítek let jako kardioprotektivní intervence, avšak podstata ochranných mechanismů vyvolaných touto adaptací není ještě zcela objasněna. Mnoho získaných poznatků potvrzuje významnou úlohu mitochondrií, jako hlavních producentů energie a reaktivních forem kyslíku, které mohou hrát signalizační funkci v těchto mechanismech. Z toho důvodu byl vytvořen speciální konplastický kmen SHR/OlaIpcv-mt^{BN/Cri}, který nese jaderný genom Spontánně hypertenzního potkana (SHR) a mitochondriální genom normotenzního vysoce odolného kmene Brown Norway (BN). Cílem této práce bylo porovnat expresi vybraných transkriptů genů v oblasti energetického metabolismu, genů souvisejících s mitochondriální biogenezí a signalizací a antioxidačním systémem. Srovnání exprese bylo analyzováno mezi kmeny a po adaptaci na chronickou hypoxii, která u obou těchto kmenů vyvolává kardioprotektivní fenotyp. Naše výsledky ukázaly rozdílnou expresi HIF-1a a některých transkriptů energetického metabolismu jak mezi kmeny, tak po adaptaci na hypoxii. Neprokázali jsme změny v transkriptech souvisejících s biogenezí mitochondrií mezi kmeny, ale detekovali jsme změny v odpovědi na hypoxii. Jednotlivé geny antioxidačních enzymů neprokázaly jednotnou tendenci v transkripční odpovědi na hypoxii, jako je obvyklé u normotenzního kmene Wistar a měly odlišnou transkripční aktivitu.

Klíčová slova: ischemicko-reperfúzní poškození, spontánně hypertenzní potkan, Brown Norway, hypoxie, srdce, mitochondrie, genová exprese

Abstract

Ischemia-reperfusion heart injury is one of the most significant diseases affecting mankind and therefore current research pays more attention to its prevention and knowledge of the possible mechanisms which protect the heart. Adaptation to hypoxia has been known for several decades as a cardioprotective intervention but the main issues of protective mechanisms which are induced by the adaptation are still not completely understood. An important role of mitochondria as the main producers of energy and reactive oxygen species which can play a signaling role in these mechanisms is confirmed in many studies. For this reason a special conplastic strain SHR/OlaIpcv-mtBN/Crl was created. This strain carries the nuclear genome of spontaneously hypertensive rat (SHR) and the mitochondrial genome of normotensive, highly resistant strain Brown Norway (BN). The aim of this study was to compare the expression of selected gene transcripts in the area of energy metabolism, of genes which are related to mitochondrial biogenesis and signaling and antioxidant systems. Comparing the expression was analyzed between strains and after chronic hypoxia adaptation, which cause cardioprotective phenotype in both of these strains. Our results showed a different expression HIF-1 α and some gene transcripts in the area of energy metabolism between strains and after hypoxia adaptation. We did not observed any differences in the level of mRNA transcripts associated with mitochondrial biogenesis between the strains however we detected changes in response to hypoxia. Individual genes of antioxidant enzymes did not respond to hypoxia in uniform manner, as it is usual with normotensive strain Wistar.

Key words: Ischemia-reperfusion injury, Spontaneously hypertensive rat, Brown Norway, hypoxia, heart, mitochondria, genes expression

OBSAH

Obsah	5
Seznam zkratek	7
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část	11
2.1. Mitochondrie	11
2.1.1. Evoluce a struktura	11
2.1.2. Mitochondriální DNA.....	13
2.1.3. Mitochondrie a jejich poškození.....	15
2.1.4. Mitopatie	17
2.2. Potkan jako modelový organismus	18
2.2.1. Kmen SHR.....	20
2.2.2. Kmen BN	21
2.2.3. Kmen SHR/OlaIpcv-mt ^{BN/Crl}	21
2.3. Hypoxie	25
2.3.1. Adaptace na Chronickou hypoxii	26
2.3.2. Hypoxií indukovaný faktor (HIF).....	27
2.4. Geny energetického metabolismu	30
2.4.1. Protein kináza B (PKB neboli AKT)	31
2.4.2. Hexokináza (HK).....	32
2.4.3. Kreatinkináza (CK).....	33
2.4.4. Cytochrom c oxidáza (COX)	35
2.5. Geny mitochondriální signalizace a biogeneze.....	36
2.5.1. Koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma (PGC1)	36
2.5.2. Protein související s dynaminem (DRP1).....	38
2.5.3. Desmin (Des)	39
2.5.4. Konexin (CX43)	39
2.5.5. Citrátsyntáza (CS).....	39
2.5.6. Aldehyddehydrogenáza (ALDH).....	40
2.6. Geny antioxidačního systému	41
2.6.1. Thioredoxinový systém.....	41
2.6.2. Peroxiredoxiny (PRX)	43
2.6.3. Superoxid dismutáza (SOD)	43
2.6.4. Monoaminoxidáza (Mao)	44

2.6.5.	Akonitáza (ACO).....	45
2.6.6.	Hemoxygenáza (HMOX).....	45
2.7.	Principy použitých metod	46
2.7.1.	Elektroforéza.....	46
2.7.2.	Real-time RT PCR (Lightcycler LC480, Roche Applied Science)	47
3.	Cíle diplomové práce	52
4.	Materiál a metody	53
4.1.	Adaptace a odběr vzorků.....	53
4.2.	Zpracování vzorků a analýza PCR.....	54
4.2.1.	Homogenizace vzorků	54
4.2.2.	Izolace RNA	55
4.2.3.	Měření koncentrace RNA	55
4.2.4.	Elektroforéza.....	56
4.2.5.	Reverzní transkripce	57
4.2.6.	Real time RT-PCR.....	57
4.3.	Testování housekeeping genů	59
5.	Výsledky	60
6.	Diskuze	64
7.	Závěr	71
8.	Přílohová část.....	73
9.	Internetové zdroje	97
10.	Použitá literatura	98

SEZNAM ZKRATEK

ACO1,2	Akonitáza 1,2
<i>Aco1, 2</i>	Gen kódující akonitázu 1,2
ADP	Adenosindifosfát
AKT 1,2 /PKB	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene 1,2</i> , proteinkináza B
<i>Akt1,2</i>	Gen kódující AKT1,2
ALDH2	Aldehyddehydrogenáza 2
<i>Aldh2</i>	Gen kódující aldehyddehydrogenázu 2
ANP	<i>Axial natriuretic factor</i> , atriální natriuretický peptid
ANT	<i>Adenin nucleotid translocase</i> , translokáza adeninových nukleotidů
AP-1	<i>Activator protein 1</i> , aktivační protein 1
AR	<i>Area of risk</i> , ohrožená oblast
ARE/ EpRE	<i>Antioxidant/electrophile response element</i>
ARNT (2)(3)	<i>Aryl hydrocarbon nuclear translocator (2)(3)</i> , aryl hydrokarbonový jaderný translokátor (2)(3)
ASK1	<i>Apoptotic signal-redgulated kinase</i> , apoptotický signál regulující kináza
ATP	Adenosintrifosfát
B2M	Beta-2 microglobulin
BN	Brown Norway
BW	<i>Body weight</i> , váha zvířete
CK-B	<i>Creatine kinase brain</i> , mozková kreatinkináza
CK-M	<i>Creatine kinase muscle</i> , svalová kreatinkináza
CK-m1tB	<i>Creatine kinase, mitochondrial 1B</i> , mitochondriální kreatinkináza 1B
<i>Ckmt2</i>	Gen kódující sarkomerickou kreatinkinázu
CK-mt2, CKS	<i>Creatine kinase, mitochondrial 2, sarcomeric</i> , sarkomerická mitochondriální kreatinkináza
COX4.1, 2	Cytochrom c oxidázu, podjednotka IV, izoforma I, II
<i>Cox4i1, 2</i>	Gen kódující cytochrom c oxidázu, podjednotku 4, izoformu 1, 2
Cp	Crossing point
<i>Cs</i>	Gen kódující citrátsyntázu
CS	Citrátsyntáza
CX43	Konexin 43
Des	Desmin
<i>Des</i>	Gen kódující desmin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
<i>Dnm1l</i>	Gen kódující protein související s dynaminem
DRP1	<i>Dynamine-related protein 1</i> , protein související s dynaminem
ERRs	<i>Estrogen receptor related receptor</i> , receptor související s estrogenovým receptorem
FADH2	Flavinadeninukleotid 2

FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-fosfátdehydrogenáza
<i>Gjal</i>	Gen kódující konexin 43
GTG	<i>Genetic Technology Grade</i>
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> , lidský choriový gonadotropin
<i>Hif1, 2</i>	Gen kódující Hif1, 2
HIF1 α , (β)	Hypoxií indukovaný faktor 1, podjednotka α , (β)
HIF2 (3) α ,	Hypoxií indukovaný faktor 2 (3), podjednotka α
HK1,2	Hexokináza 1,2
<i>Hk1,2</i>	Gen kódující hexokinázu 1,2
HMOX2	Hemoxygenáza 2
<i>Hmox2</i>	Gen kódující hemoxygenázu 2
HPRT	<i>Hypoxanthine fosforibozyl transferáza</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i> , element odpovídající na hypoxii
SHR	SHR potkan adaptovaný na hypoxii
SHR-mtBN	SHR potkan s mtDNA kmene BN adaptovaný na hypoxii
iNOS	Inducible nitric oxid synthese, inducibilní syntáza oxidu dusného
IPAS	Inhibitory PAS
LE	<i>Low Electroendosmosis</i>
LV	<i>Left ventricle</i> , levá komora
MaoA	Monoaminoxidáza A
<i>Maoa</i>	Gen kódující monoaminoxidázu
Mfn1,2	Mitofusin 1,2
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i> , přechodně otevřený mitochondriální pór
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyseliny
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NRFs	<i>Nuclear respiratory faktor</i> , jaderný respirační faktor
ODDD	<i>Oxygen dependent degradation domain</i> , na kyslíku dependentní degradační doména
OPA1	<i>Optic atrophic type 1 protein</i> , protein optické atrofie 1
p300/CBP	<i>cAMP response element-binding protein binding protein/p300</i>
PAS	Motiv PER-ARNT-SIM
PCr	Fosfokreatin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> β , růstový faktor β odvozený od trombocytů
PDK1,2	Protein dependentní kináza 1,2
PGC1 (α)(β)	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i> (α)(β), koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma 1 (α)(β)
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinázová dráha

PKC	Proteinkináza C
PKC ϵ	Proteinkináza ϵ
<i>Ppargc1</i>	Gen kódující PGC1
PPARs	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> , peroxisomální proliferaci aktivovaný receptory
<i>Prdx3,5</i>	Gen kódující peroxiredoxin 3,5
PRX	Peroxiredoxin
PSMG	<i>Pregnant mare's serum gonadotropin</i> , gonadotropinu produkovaný chorionem březí klisny
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , fosfatázový a tensinový homolog
QTL	<i>Quantitative trait loci</i> , mapování lokusů podmiňujících kvantitativní znaky
RARE motiv	<i>Alu-associated retinoic acid-response element</i>
REF-1	Redox factor1
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> , detekce polymorfismu délky restričních fragmentů
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ribonukleová kyselina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkripce
RV	<i>Right ventricle</i> , pravá komora
S	Septum
S18	Ribozomální podjednotka S18
SD	<i>Standard deviation</i> , standardní odchylka
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i> , spontánně hypertenzní potkan
SHR-mtBN	SHR potkan s mtDNA kmene BN
SOD	Superoxiddismutáza
<i>Sod1,2</i>	Gen kódující SOD1, 2
TAE	Pufr z Tris base, acetic acid, EDTA
TFAM	Mitochondriální transkripční faktor A
TFB1M, B2M	Mitochondriální transkripční faktor 1B,2B
TGF α , β ,	<i>Transforming growth factor, α and β</i> , transformující růstový faktor α a β
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i> , tumor nekrotický faktor α
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
TRX 1,2,3	Thioredoxin 1, 2, 3
<i>Txn2</i>	Gen kódující thioredoxin
TXNRD 1,2,3	Thioredoxinreduktáza 1, 2, 3
<i>Txnrd2</i>	Gen kódující thioredoxinreduktázu
VDAC	Napětově ovládaný iontový kanál
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> , cévní endoteliální růstový faktor A

1. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu jsou závažná onemocnění, která patří k nejčastějším příčinám úmrtí v České republice, a proto studium mechanismů těchto chorob je v centru pozornosti vědeckých laboratoří. Poškození buněk srdce v zasažené oblasti ischemií probíhá ve dvou fázích. V první fázi poškození je v ischemické oblasti nedostatek kyslíku a živin a hromadí se zplodiny metabolismu, což vytváří toxické prostředí. Stupeň poškození pak závisí na rozsahu a délce trvání ischemie. Druhá fáze poškození probíhá v reperfúzi, kdy obnovení průtoku okysličené krve koronární arterií ještě zvyšuje míru poškození srdce, převážně vysokou koncentrací volných radikálů.

Z toho důvodu se hledají mechanismy, které zvyšují odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu (I/R) poškození, stejně jako vhodné modelové systémy pro toto studium. Již více než před třiceti lety bylo zjištěno, že adaptace na hypoxii snižuje velikost I/R poškození, stejně jako později objevený *preconditioning*, což je série ischemických inzultů před ischemií a *postconditioning*, což je pomalé a přerušované obnovení průtoku krve v ischemické oblasti. Dále je známo, že k reperfúznímu poškození vysokou mírou přispívají vysoké koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS), jejichž hlavními producenty v kardiomyocytech jsou komplexy I a III respiračního řetězce mitochondrií. Proto je jeden z hlavních směrů studia kardioprotektivních mechanismů zaměřen na úlohu mitochondrií v těchto procesech.

Za účelem studia úlohy mitochondrií v různých patofyziologických procesech byly vyvinuty ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky speciální konplastické kmeny potkanů, které nesou mitochondriální genom „zdravé“ populace na pozadí jaderného genomu spontánně hypertenzních zvířat. Spontánně hypertenzní potkani (SHR) jsou experimentálním modelem esenciální hypertenze s vysokou citlivostí srdce k akutnímu I/R poškození.

Cílem této diplomové práce je charakterizovat hladiny mRNA transkriptů u vybraných genů, které souvisejí nebo mohou souviset s buněčným oxidativním stresem a funkcí mitochondrií u SHR kmene a konplastického kmene SHR/OLAIPCV-MT^{BN/CRL} za normoxických podmínek a po adaptaci na hypoxii, která indukuje kardioprotektivní fenotyp u obou kmenů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. MITOCHONDRIE

2.1.1. EVOLUCE A STRUKTURA

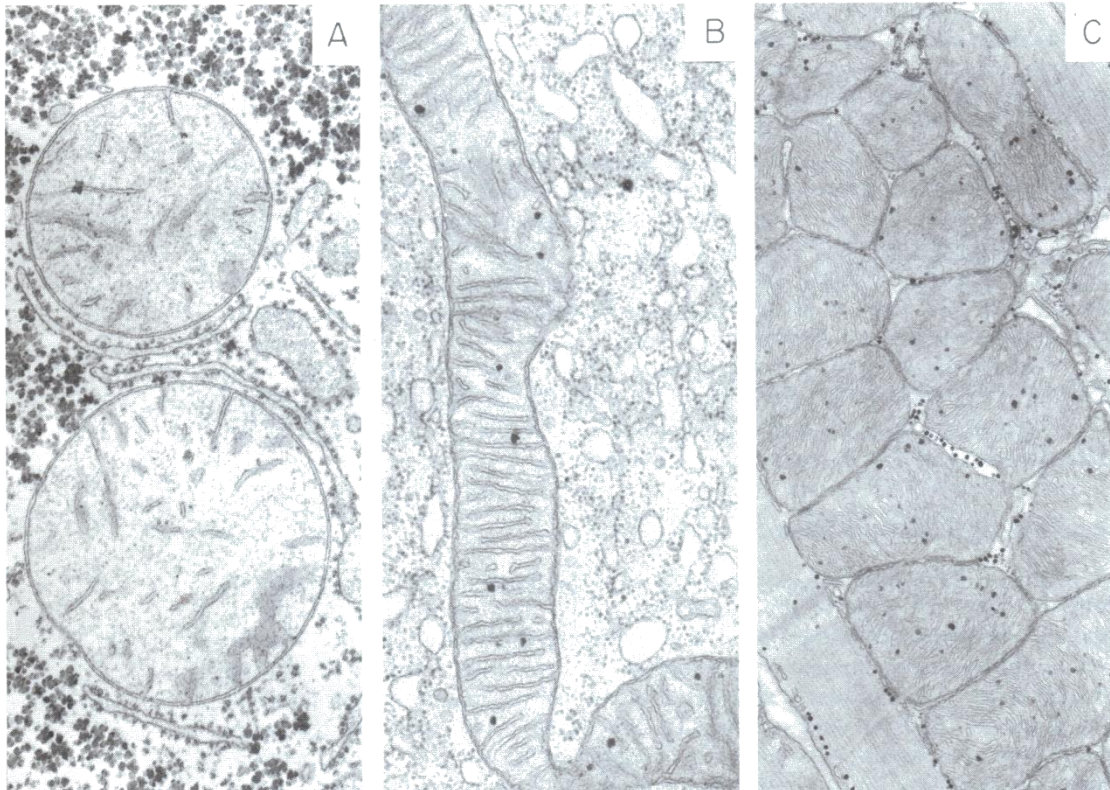
První známky o mitochondriích pocházejí kolem roku 1850. V té době byla pomocí světelného mikroskopu objevena malá granula v buňkách. Altman v roce 1890 popsal skutečnost, že tato subcelulární granula mají velmi podobný tvar a velikost bakteriím a vyslovil myšlenku, že jsou schopny nezávislé existence. Termín mitochondrie znamená nitkovitá granula a byl vymyšlen v období vynálezu supravitální techniky barvení pomocí redoxní Janosovy zeleně. V této době nebyla funkce mitochondrií ještě známá. V letech 1900-1940 probíhaly první studie biologických oxidačních reakcí, kde byly mitochondrie označeny za centra energetického metabolismu. V této době se postupně odhalovaly procesy v mitochondriích. Hans Adolf Krebs učinil objev Krebsova cyklu a byly izolovány jednotlivé enzymy v cyklech (Tzagoloff 1982).

Rozdíl mezi eukaryotními organismy oproti Archae a bakteriím je mimo jiné v přítomnosti mitochondrií, peroxizomů a chloroplastů. U všech eukaryotických organismů jsou mitochondrie přítomné nebo alespoň mají předka, který mitochondrie měl. I přesto, u některých eukaryotických organismů, jsou popsány tzv. hydrogenosomy, což jsou organely podílející se na metabolismu cukrů. Tyto organely také jako mitochondrie produkují ATP a vyskytují se u fylogeneticky vzdálených organismů. Zatímco hydrogenosomy užívají cestu fermentace pro metabolismus pyruvátu, mitochondrie užívají Krebsův cyklus (Dyall and Johnson 2000).

Oblíbeným modelem vysvětlujícím původ mitochondrií je sériová endosymbióza. Tato teorie předpokládá, že mitochondrie jsou přímí potomci endosymbiotické bakterie (pravděpodobně zástupce alfa-proteobakterie), která se stala semiautonomní organelou v průběhu vzniku eukaryotní buňky. Genové sekvence podporují monofyletický původ mitochondrií z eukaryotického předchůdce. Nedávné studie na prvocích však naznačují, že mitochondrie mohla vzniknout ze společného předka všech eukaryot ve stejné době jako jaderné složky a nikoli odděleně o něco později (Gray, et al. 1999).

Mitochondrie byly objeveny pomocí světelného mikroskopu, ale jejich struktura byla blíže popsána až díky elektronové mikroskopii s mnohem vyššími rozlišovacími schopnostmi. Snímky různých tkání z elektronové mikroskopie odhalily, že mitochondrie mají stejnou členitou morfologii. Společným rysem jsou dvě membrány, které definují dva odlišné vnitřní prostory (matrix a mezimembránový prostor). Poměr těchto membrán je jedním znakem, který nám tvoří rozdíly mezi mitochondriemi různých tkání (Obr. 1). Vnější membrána obklopuje celý obsah mitochondrie a obsahuje podstatné množství enzymů, mezi které patří například monoaminoxidáza a rotenon-necitlivá NADH-cytochrom c reduktáza. Membrána obsahuje i řadu enzymů spojených s biosyntézou fosfolipidů, jako například glycerofosfátacyltransferáza a systém elongace mastných kyselin. Vnitřní membrána se zanořuje do nitra mitochondrie a tvoří tzv. krysty. Zde jsou lokalizovány komplexy dýchacího řetězce, pyridinnukleotid-transhydrogenázy, β hydroxybutyrátdehydrogenázy a enzymové systémy zodpovídající za transport iontů, substrátů a nukleotidů. V lipidovém složení membrán jsou hlavními fosfolipidy fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a kardiolipin, který jako jediný dokáže mitochondrie syntetizovat *de novo*. Větší koncentrace lipidů se nachází ve vnější membráně, což způsobuje její nižší denzitu. Dalším rozdílem je absence kardiolipinu ve vnější membráně (detekované stopové množství je pravděpodobně následkem kontaminace vnitřní membránou). Proteinové složení membrán je odlišné v závislosti na typu tkáně. Vnější membrána mitochondrií z potkaních jater obsahuje 5% z celkového množství proteinu, zatímco vnitřní membrána 21%. Většina ostatních proteinů je lokalizován v matrix, kde jsou solubilizované enzymy nezbytné pro Krebsův cyklus a oxidaci mastných kyselin, transkripční a translační aparát atd. V buňkách pracovního myokardu se v matrix nachází pouze 30% proteinů a zbytek je většinou ve vnitřní membráně. V mezimembránovém prostoru je nejdůležitější adenylátkináza, která udržuje rovnováhu adeninových nukleotidů (Tzagoloff 1982).

Obrázek č. 1: Elektronové snímky jater (A), pankreatu (B) a srdce (C) zobrazující mitochondriální profily s rozdílným poměrem vnější a vnitřní membrány



Na řezu srdcem je viditelná velmi hustá síť vnitřní membrány, z důvodu lokalizace proteinů dýchacího řetězce a závislosti srdce na aerobním metabolismu. Převzato z (Tzagoloff 1982).

2.1.2. MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina (mtDNA, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*) byla popsána v 60. letech díky objevu elektronové mikroskopie. Dnes je mtDNA již plně charakterizována pomocí sekvenace u mnoha organismů jako např. včely, háďátka, kvasinky, octomilky, myši, rýže, potkana, ale i člověka (Snustad and Simmons 2009). MtDNA se nachází v cirkulární formě, ojediněle ve formě diméru či oligomeru. U některých řas nacházíme i lineární formy mtDNA. Obsahuje především geny kódující ribozomální ribonukleovou kyselinu (rRNA), transferovou ribonukleovou kyselinu (tRNA) a proteiny účastnící se oxidativní fosforylace, konkrétně 7 podjednotek komplexu I, 1 podjednotku komplexu III, 3 podjednotky komplexu IV a 2 podjednotky komplexu V u člověka. MtDNA mnohobuněčných organismů studovaných do této současnosti se nachází v cirkulární formě, která má až na vzácné výjimky velikost

kolem 16 000 nukleotidů. Z analýzy pomocí restrikčních enzymů je patrné, že nukleotidové sekvence jsou specifické pro jednotlivé organismy (Goddard, et al. 1981).

Analýzou mtDNA pomocí detekce polymorfismu délky restrikčních fragmentů RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), byl laboratorní potkan *Rattus Norvegicus* rozdělen do 6 kmenů: Wistar, Wistar Munich, Brown Norway, Wistar Kyoto, SHR a SHR-SP. Analýza pomocí 26 restrikčních enzymů odhalila nízkou genetickou divergenci mezi kmeny. Místa štěpení pomocí restrikčních endonukleáz EcoRI, NcoI a XmnI se ukázala jako polymorfní. Užití těchto tří enzymů nám umožnilo rozdělit šest výše zmíněných kmenů do čtyř haplotypových skupin a identifikovat specifické markery pro každou z nich. Kmeny Wistar Kyoto, SHR a SHR-SP spadají do jedné holotypové skupiny (Tab. 1) (Hilsdorf and Krieger 1999).

Tabulka č. 1: Rozdělení šesti kmenů *Rattus Norvegicus* do skupin haplotypů založené na restrikčních místech restriktáz EcoRI, NcoI a XmnI

Clone	EcoRI	NcoI	XmnI	Strains
A	I	II	I	Wistar
B	II	II	II	Wistar Munich
C	III	I	I	Wistar Kyoto, SHR, SHR-SP
D	III	II	I	Brown Norway

Římské číslice označují štěpný vzor pro jednotlivé enzymy. Převzato z (Hilsdorf and Krieger 1999).

Procento sekvenční divergence mezi všemi páry haplotypů se pohybuje mezi 0,035 – 0,33%. Tyto haplotypy jsou snadno prokazatelné RFLP analýzou a mohou být použity ke genetickému monitorování v chovech. Vnitrodruhový polymorfismus mtDNA u *Rattus Norvegicus* byl sledován pomocí endonukleázy EcoRI. Vzory fragmentů po použití endonukleázy EcoRI nám dovoluje rozdělit potkaní kmeny do dvou skupin, typ A a typ B. (Brown and Simpson 1980; Francisco, et al. 1979; Francisco and Simpson 1977) našli rozsáhlé inter- a intraspecifické polymorfismy mtDNA užitím nejen EcoRI restrikční endonukleázy, ale také pomocí endonukleáz HhaI, HindII, HinfIII, HinfI and HaeIII (Hilsdorf and Krieger 1999).

Jaderný a mitochondriální genom velmi úzce kooperují. Do mitochondrií je exportována řada produktů jaderných genů, které mohou zesilovat nebo zeslabovat

funkci mtDNA. Například mitochondriální ribozomy jsou složené z rRNA kódované mtDNA a proteinů kódovaných geny jadernými. Nejedná se pouze o ribozomy, ale například i proteiny oxidativní fosforylace (Snustad and Simmons 2009). Proteiny jsou importovány do mitochondrií v nesbalené formě pomocí speciálních transportních kanálů. Každý protein nese specifickou cílovou sekvenci, která je specificky rozpoznána určitým kanálem. Podle této sekvence dojde k transportu proteinu na místo, kam je určen.

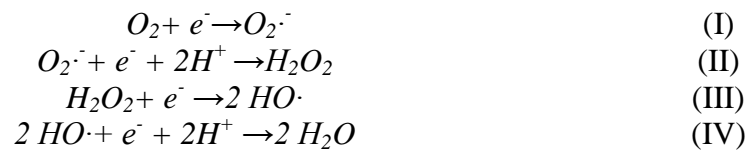
2.1.3. MITOCHONDRIE A JEJICH POŠKOZENÍ

Poškození mitochondrií bývá převážně způsobeno zvýšenými koncentracemi reaktivních forem kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*), které mohou poškozovat struktury mitochondrií na úrovni proteinu, lipidů i DNA. MtDNA mutuje 10x rychleji než DNA jaderná. To je dáno její lokalizací v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, kde ROS uplatňují své mutagenní účinky v bezprostřední blízkosti. Zároveň mtDNA nemá dostatečné reparační mechanismy jako DNA jaderná, která je chráněna histony (Kočárek 2008). Mutace mtDNA postihují zejména tkáň závislé na oxidativní fosforylaci, vzhledem k jejich velkému metabolickému obratu. Vznik ROS a následné hromadění mutací se také dává do spojitosti s mitochondriální teorií stárnutí.

Mitochondriální teorie stárnutí je založena na skutečnosti, že mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS v organismu a mtDNA, která má rychlejší mutabilitu proti DNA jaderné, může být snadněji poškozena. V důsledku toho jsou poškozeny respirační komplexy a vznikají další radikály. Jejich hromadění rozvíjí srdeční selhání, svalovou slabost, diabetes mellitus, demenci a neurodegeneraci. Za průkaz mitochondriální teorie je považován *Life-time Energy Potencial*, kdy u většiny savců je délka života dána sumou srdečních tepů/spotřeba kyslíku (Hulbert, et al. 2007; Rodney 2011).

ROS vznikají v organismu za fyziologických podmínek i jako odpověď na extrémní stimuly. Vznikají jako produkty intracelulárního metabolismu sloučenin, toxinů a léčiv katalyzovaných cytochromem p450, makrofágů a neutrofilů během fagocytózy, ale i jako meziprodukty působení enzymů (xantinoxidázy, lipoxygenázy a cyklogenázy) (Rosen, et al. 1995; Szocs 2004). ROS jsou neustále produkovány především elektronovým transportem v mitochondriích. Dle posledních studií jsou za vysokou koncentraci ROS v kardiomyocytech zodpovědné právě mitochondrie a jejich dýchací řetězec. Většina elektronů je v mitochondriích redukována na vodu v komplexu

IV, avšak během průchodu elektronů řetězcem nemusí být redukce kompletní. Unikající elektrony z řetězce umožňují vznik především superoxidovému aniontu (I) a to hlavně v komplexu I a III. Za normálních podmínek dojde ihned k odbourání na peroxid vodíku pomocí enzymu superoxidodismutázy (II) (Murphy 2009). Dalším enzymem, který produkuje ROS v srdci je monoaminoxidáza A na vnější mitochondriální membráně (Di Lisa, et al. 2009). Pro kompletní redukci kyslíku na vodu jsou potřeba 4 elektrony, z toho vyplývá, že se formují částečně redukováné meziprodukty (superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál (III)) (W.A. Pryor, et al. 2006).



Upraveno dle (Hondlík 2008).

Vyšší koncentrace ROS může mít za následek oxidaci membrán, proteinů a DNA s následným poškozením celých struktur a tkání (McCord 1985). V srdci může mít toto poškození za následek hypertrofii, apoptózu buněk a intersticiální fibrózu (Siwik, et al. 1999). Za běžných fyziologických podmínek jsou ROS likvidovány antioxidačními enzymy, jako jsou například superoxidodismutázy a glutathion peroxidázy (Toussaint, et al. 1993). Důležitým obranným mechanismem je také mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), který je kódovaný nukleárním genomem a svou vazbou na mtDNA ji stabilizuje a brání degradaci (Scarpulla 2002).

Mitochondrie se velmi výrazně podílí na integraci signalizačních drah v reakci na stresory. Mezi důležité mediátory, na které mitochondrie reagují, patří ROS a vápenaté ionty. Hladina těchto mediátorů může regulovat transkripci genů dýchacího řetězce. Například zvýšená koncentrace peroxidu vodíku zvyšuje expresi genu PGC1 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*), hlavního regulátoru mitochondriální biogeneze. Bylo shledáno zmnožení menších mitochondrií, které mají větší poměr povrchu k objemu, což umožňuje větší absorpci kyslíku v adaptaci na hypobarickou chronickou hypoxii (Friedman, et al. 1971). Jiné studie prokázaly zvýšenou mitochondriální respiraci a syntézu ATP u zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii. Změny těchto parametrů pravděpodobně závisí na intenzitě a době trvání adaptace. Zvýšená koncentrace vápenatých iontů hraje významnou úlohu v aktivaci

Krebsova cyklu při jejich vstupu do mitochondrií s následnou stoupající produkcí ATP. Byla zjištěna i vyšší koncentrace fosfokreatinu, což by odrazilo možnou odpověď na hypoxii zvýšenou produkcí energetických fosfátů (Cervós Navarro, et al. 1999). V souvislosti s hypoxií je také důležitá izoforma protein kinázy C (PKC ϵ), která snižuje propustnost přechodně otevřeného mitochondriálního póru (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*). Otevření tohoto póru většinou vede k aktivaci apoptózy, proto působení PKC ϵ je dáváno do souvislosti s mechanismy chránící mitochondrie. Zároveň aktivace PKC ϵ v průběhu hypoxie posiluje mitochondriální funkci v srdci a vykazuje zvýšení mitochondriální a bioenergetické kapacity (McCarthy, et al. 2005). Při silné hypoxii však dochází nejen ke snížené mitochondriální produkci, ale i k oslabení mitochondriálních respiračních funkcí. Se zvyšující se úrovní hypobarické hypoxie byly měřeny nižší oxidační potenciály ve svalové tkáni (Green, et al. 1989).

2.1.4. MITOPATIE

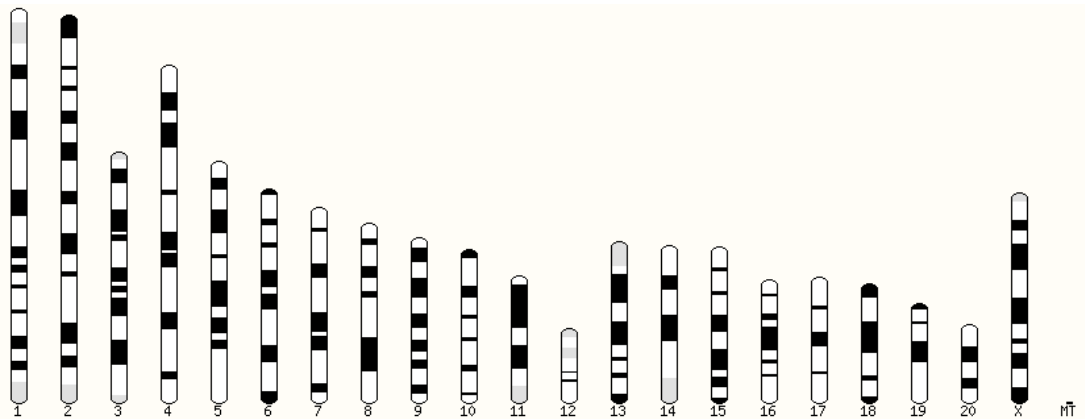
Mitochondrie jsou orgány, které se dědí výlučně od matky. V mitóze dochází ke zcela náhodné distribuci mitochondrií do buněk. V závislosti na distribuci mitochondrií do buněk si můžeme definovat pojem heteroplazmie a homoplazmie. Heteroplazmie popisuje výskyt více geneticky odlišných forem mitochondrií v jedné buňce. Tento jev je komplikací především u stanovení rizika přenosu mitochondriálně podmíněných chorob z matky na potomky. Opakem heteroplazmie je homoplazmie, kdy všechny molekuly mtDNA v buňce (resp. organismu) jsou identické (Kočárek 2008). Následkem heteroplazmie se u mitopatií (=onemocnění způsobená porušenou mtDNA) často setkáváme s variabilní expresí choroby, pleiotropním účinkem genů a rozdílným nástupem nemoci. Klinické příznaky se začínají projevovat při 80 % mutované mtDNA. Nelinearita mezi úrovní heteroplazmie a manifestací choroby je popisována jako tzv.: prahový efekt (*threshold effect*). Jedná se o nelineární vztah pozorovaných projevů choroby v závislosti na typu tkáně, kdy různé tkáně reagují jinak na stejnou míru poškození proteinů oxidační fosforylace (Rossignol, et al. 2003). Mutace mtDNA jsou asociovány především s neuromuskulárními poruchami. Mezi typické příznaky mitopatií se řadí encefalopatie (onemocnění mozku), ataxie (ztráta kontroly volných pohybů), degenerace retiny, ztráta funkce zevních okohybných svalů, myopatie, popř. postižení funkce jater, útlum krvetvorby, funkce Langerhansových ostrůvků či hluchota (Calvo and Mootha 2010).

Mitopatie mohou mít jak maternální, tak mendelovskou dědičnost. O mendelovskou dědičnost se jedná v případě, že se dědí mutace genu jaderného genomu, který úzce kooperuje s mitochondriemi. Jedná se o geny, které kódují sestavovací (*assembly*) faktory, proteiny účastníci se na biogenezi proteinů oxidativní fosforylace, regulační geny, geny pro transport apod. Sporadicky se setkáváme i s mutacemi *de novo* (Calvo and Mootha 2010).

2.2. POTKAN JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS

Potkan, latinsky *Rattus Norvegicus*, patří do říše *Animalia* (zvířecí), kmene *Chordata* (strunatci), třídy *Mammalia* (savců), řádu *Rodentia* (hlodavců), rodiny *Muridae* a rodu *Rattus* (potkan). Jedná se o jednoho z nejrychleji stárnoucích savců ze skupiny laboratorních zvířat. Pravděpodobně nejpřesnější údaje o délce života pocházejí ze studie s tisíci zvířaty, kde vyšla maximální životnost 3,8 roku. Hmotnost při narození je kolem 5,81g a v dospělosti dosahuje 300g. U samic dochází k pohlavní dospělosti ve věku 90 dní, zatímco u samců ve věku 70 dní. Březost trvá 21 dní (The Animal Ageing and Longevity Database).

Celý genom *potkana* je velký 2,75 Gb, obsahuje 23 153 genů lokalizovaných na 20 párech autozomů a jednom páru gonozomů (Obr. 2). Jednotlivé geny kódují proteiny a 27 genů kóduje RNA. Tyto data pocházejí z celogenomové sekvenace kmene Brown Norway. Potkaní, myší a lidské genomy kódují podobný počet genů. Většina jich přetrvává bez delecí či duplikací od posledního společného předka. Intronové struktury jsou vysoce konzervované. Téměř všechny známé lidské geny, které jsou asociovány s chorobami, mají orthology v potkaním genomu, ale mají výrazně odlišnou mutační rychlost synonymní substituce od ostatních genů. Zhruba 3% genomu potkana obsahují velké segmentální duplikace vyskytující se převážně v pericentromerických regionech. Část eukaryotického jádra potkana (5-6% genomu) vykazuje selektivní omezení u hlodavců a primátů, zatímco zbytek se vyvíjel neutrálně (Weinstock and Gibbs 2004).

Obrázek č. 2: Karyotyp *Rattus Norvegicus*

Převzato z www.ensembl.org.

Po staletí jsou potkani užívání ke studii kardiovaskulárního systému. Zvířecí modely umožňují studovat kardiovaskulární nemoci v raném stádiu, zjišťovat mechanismy patogeneze a účinky léků. Cílem těchto studií je stanovit jasné přístupy pro vybraná vyšetření u člověka. Ideální zvířecí model pro kardiovaskulární onemocnění u lidí by měl splňovat pět bodů: napodobovat lidské nemoci, umožňovat studium v chronickém stádiu nemoci, generovat předvídatelné a kontrolovatelné symptomy, splňovat ekonomické a technické podmínky (včetně dobrých životních podmínek zvířat) a umožnit měření příslušných srdečních, biochemických a hemodynamických parametrů (Doggrell and Brown 1998).

Užití potkanů jako modelových organismů je ekonomické a navíc již bylo vyvinuto mnoho technik pro měření příslušných funkčních parametrů. Užití těchto modelů však skýtá i mnohé problémy. Kardiovaskulární onemocnění, jako je například hypertenze a srdeční selhání, jsou spjata převážně s vysokým věkem, a přesto se pokusy provádí na dospělých, ale mladých potkanech. Dále se například setkáváme s odlišným pohledem na vývoj aterosklerózy, kde u potkanů je vývoj aterosklerózy velmi neobvyklý i za trvale zvýšené přítomnosti krevních lipidů, zatímco u člověka se jedná o významný faktor hypertenze a srdečního selhání. V neposlední řadě jsou tyto nemoci u lidí obvykle pomalu se vyvíjející s neurohumorální adaptací. Naproti tomu u zvířecích modelů se často jedná o vyvolání symptomů akutně pomocí léků nebo chirurgicky (Doggrell and Brown 1998). V tomto případě je důležité zvolit vhodný přístup. K dispozici máme dva základní modely experimentální hypertenze. U tzv. indukovaných modelů se jedná o vyvolání hypertenze farmakologickým nebo

operačním zásahem, který vede k definované změně krevního tlaku u normotenzních kmenů. Druhým typem jsou genetické modely, u kterých k hypertenzi dochází genetickou změnou, která se během vývoje projeví zvýšením krevního tlaku, ať už spontánně nebo indukovaně (Havlenová 2008).

2.2.1. KMEN SHR

Spontánně hypertenzní potkan (SHR, *Spontaneously hypertensive rat*) je velmi užívaný model lidské esenciální hypertenze a s ní spojené hypertenze levé komory srdeční. Jedná se o inbrední kmen laboratorního potkana, který byl vyvinut japonskými vědci z potkaního kmene Wistar. Hypertenze u tohoto modelu je způsobena zvýšenou periferní rezistencí vyvolanou v počátečních stádiích funkční neurogení vazokonstrikcí a později udržovanou strukturálními změnami cév. Z SHR, jako základního kmene, byly vyselektovány další podkmeny. Existují varianty zvířat se spontánní obezitou, ischemickou chorobou srdeční, spontánní trombogenní aktivitou nebo kmeny s 80% výskytem iktu ve věku 9-13 měsíců (Havlenová 2008).

Pro naši studii byl použit podkmen SHR/OlaIpcv. Jedná se o inbrední kmen potomků SHR, kteří jsou původně z Národního institutu zdraví. K udržování tohoto kmene v Akademii věd České republiky docházelo křížením bratra a sestry po dobu více než 15 let. Tento kmen byl využit například ve studii, kdy byly navrženy QTL (*Quantitative trait loci*) úseky DNA asociované s regulací krevního tlaku a velikostí srdce. Jeden z těchto lokusů se nacházel na chromozomu 2. Vznikl nový kongenní kmen, kde úsek chromozomu 2 mezi D2Rat171 a D2Arb24 byl nahrazen úsekem od normotenzního kmene Brown Norway (BN). Výsledkem měření bylo, že SHR kongenní kmen nesoucí segment z BN má signifikantně menší systolický a diastolický tlak. Toto snížení hypertenze bylo navíc doprovázeno zlepšením srdeční hypertrofie. Tato studie poukazuje na to, že geny přímo související se změnami krevního tlaku se pravděpodobně nachází v nahrazeném úseku chromozomu 2 (Pravenec, et al. 2001).

Tento kmen byl podroben více podobným pokusům, jejichž výsledky nám tvoří charakteristiku tohoto kmene. Tento kmen se vyznačuje těmito následnými fenotypovými znaky: menší tělesná hmotnost, zvýšená hmotnost srdce, inzulinová rezistence, zvýšený systematický arteriální krevní tlak a zvýšený systematický arteriální systolický krevní tlak. V uvedené databázi lze nalézt všechny studie spjaté s výše uvedenými fenotypovými znaky (Rat Genom Database).

2.2.2. KMEN BN

Kmen Brown Norway (BN) pochází původně z roku 1976 z Institutu Radiobiologie v Nizozemsku, odkud byl předán do Charles River ve Wilmingtonu v roce 1977. V únoru 1989 se dostal do chovu Charles River v Německu. Původně byl tento kmen křížen za záměrem selekce histokompatibility hnědé mutace v kmeni divokých potkanů. Barva srsti je *non-agouti* hnědá. Ve výzkumu se využívá ke genetickému mapování, ke studiu zánětů dýchacích cest, dysfunkci imunitního systému, stárnutí a při výzkumu transplantací (Velaz 2013)

2.2.3. KMEN SHR/OLAIPCV-MT^{BN/CRL}

Vztah mezi variantami mtDNA a rizikovými faktory diabetu typu II a ostatních společných nemocí získává velkou pozornost. Poznání v této oblasti je bohužel limitováno z mnoha důvodů. Jedním z nich je ten, že fenotypový efekt variant mtDNA lze jen velmi těžko izolovat a tedy rozpoznat od nukleárního genomu, fenoménu imprintingu a environmentálních faktorů. Dalším důvodem je malé množství zvířat, které je dostupné pro přímé zkoumání vlivu mtDNA na komplexní metabolický fenotyp *in vivo*. Variantou, jak izolovat účinky mitochondriálního genomu je jeho nahrazení na stejném nukleárním genetickém pozadí u konplastických kmenů. Nové konplastické SHR kmeny vznikly nahrazením mitochondriálního genomu SHR mitochondriálním genomem od kmene BN a tak vznikl kmen SHR/OLAIPCV-MT^{BN/CRL}, který pro zjednodušení bude označen v celém spisu zkratkou SHR-mtBN. Vzhledem k tomu, že SHR konplastické kmeny a SHR progenitorové kmeny jsou geneticky identické, s výjimkou rozdílného mitochondriálního genomu, můžeme fenotypové změny přičíst sekvenčním rozdílům v jejich mtDNA (Pravenec, et al. 2007).

Sekvenční analýza odhalila rozdíly mitochondriálního genomu SHR a BN. Srovnání kompletních mtDNA sekvencí odhalilo několik polymorfismů, které by mohly mít potenciačně funkční význam. Jedná se o 7 genů pro mRNA ze 13, 5 genů pro tRNA z 22 a oba geny pro rRNA. Žádný z pozorovaných rozdílů mezi mitochondriálními genomy SHR a BN nejsou asociované s heteroplazmií. Detekované polymorfismy v mRNA způsobují rozdíly v sedmi genech. Predikují aminokyselinovou substituci v mitochondriální cytochrom c oxidázové podjednotce I, ATP syntázové

podjednotce 6, ATP syntázové podjednotce 8, cytochromu b, NADH dehydrogenázové podjednotce 2, NADH dehydrogenázové podjednotce 4 a NADH dehydrogenázové podjednotce 6. Rozdíly v mtDNA obou kmenů jsou přehledně shrnuty v tabulce č. 2 (Pravenec, et al. 2007).

Tabulka č. 2: Varianty mtDNA kódující rozdílné aminokyseliny kmene SHR a SHR-mtBN

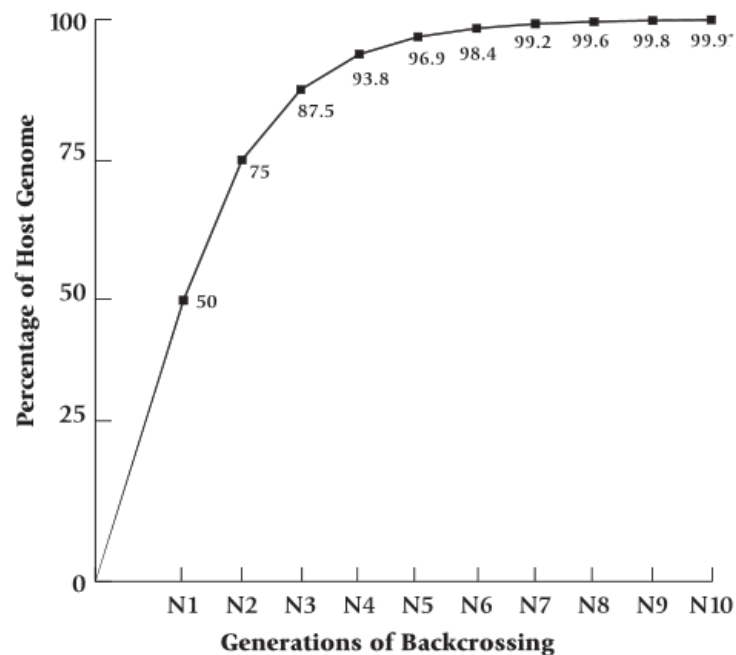
Gen	Nukleotid	Kodón		Aminokyselina	
		BN	SHR	BN	SHR
mt-Nd2	3956	GTA	GCA	Val	Ala
	4352	AAC	AGC	Asn	Ser
	4633	ACA	GCA	Thr	Ala
	4696	GCA	ACA	Ala	Thr
mt-Co1	5326	CTC	TTC	Leu	Phe
mt-Atp8	7930	ACC	ATC	Thr	Ile
mt-Atp6	8021	GAA	AAA	Glu	Lys
mt-Nd4	10227	1TC	ACC	Ile	Thr
	11225	GCA	ACA	Ala	Thr
	11360	GTC	ATC	Val	Ile
	11374	ATC	ATA	Ile	Met
mt-Nd6	13647	ATT	GTT	Ile	Val
	13974	CTT	TTT	Leu	Phe
mt-Cyb	14775	GAC	AAC	Asp	Asn
	15135	ATC	GTC	Ile	Val

V tabulce jsou shrnuty mitochondriální geny (mt-ND2,4,6 – NADH dehydrogenázová podjednotka 2,4,6, Co1 – cytochrom c oxidáza, podjednotka 1, Atp6,8 – ATP syntázová podjednotka 6,8, Cyb – cytochrom b), které jsou polymorfní mezi kmene SHR a BN, s uvedenou pozicí polymorfního nukleotidu, konkrétním polymorfním kodómem a fenotypovou změnou aminokyselin. Upraveno dle (Pravenec, et al. 2007).

Ke vzniku kongenních i konplastických kmenů dochází klasickým zpětným křížením a selekcí. Kongenní kmene mají cíleně vnesenou část genomu od jednoho inbredního kmene na genetické pozadí jiného inbredního kmene. Konplastické kmene jsou speciálními případy kmenů kongenních, kdy se vnáší jaderný genom inbredního kmene do odlišného cytoplazmatického prostředí s odlišnými mitochondriemi kmene odlišného. Pro naši studii byly tedy připraveny konplastické kmene (Silver 1995). F1 kříženci dvou inbredních kmenů (v našem případě SHR, BN) se zpětně kříží s kmenem, ze kterého má vzniknout konplastický kmen (SHR) s některou vlastností kmene druhého (BN) (Pravenec, et al. 2007). Tradiční vznik konplastických kmenů zpětným

křížením se opírá o Mendelovy zákony. Genom dárce je redukován na 50% s každým zpětným křížením hostitelského inbredního kmene. Po 10 generacích křížení se selekcí je kongenní kmen z 99,9% identický hostitelskému inbrednímu kmenu (Obr. 3) (Harbor 2001).

Obrázek č. 3: Procento hostitelského genomu se vzrůstajícím počtem generací zpětného křížení



Na ose x jsou znázorněné generace zpětného křížení a na ose y procento hostitelského genomu v dané generaci. Převzato z (Harbor 2001).

Tato metoda je bohužel časově náročná a obvykle zabere více než 3 roky. Existují dva způsoby urychlení tohoto procesu. (1) „*marker-assisted*“, tzv. vznik rychlých kmenů nebo (2) užití superovulace k produkci „*supersonic*“ kongenních kmenů. Oba přístupy se také dají kombinovat. Tzv. rychlé kongenní kmeny vznikají pomocí panelu zmapovaných SSLP markerů, které pokrývají celý genom (kromě X a Y chromozomu) a jsou polymorfní mezi oběma inbredními kmeny. Tato metoda využívá faktu, že potomci zpětného křížení mají celou řadu genomických identit. Detekcí těchto markerů se mohou vybrat potomci, kteří obsahují největší procento hostitelského genomu a ty použít do dalšího křížení. Díky tomuto přístupu můžeme dosáhnout 99% hostitelského genomu u kongenního kmene po 5 generacích (cca 12-16 měsíců) (Harbor 2001).

Ke vzniku SHR-mtBN kmene byl použit přístup „*supersonic*“ popsaný Behringerem (Landa, et al. 2010). V každé generaci zpětného křížení, mezi SHR samcem a BN samicí, byly superovulovány 4týdenní F1 samice, které byly oplodněné SHR samcem. Superovulace byla vyvolána podáním gonadotropinu produkovaného chorionem březí klisny (PSMG, *pregnant mare's serum gonadotropin*) s následnou aplikací lidského choriového gonadotropinu (hCG, *human chorionic gonadotropin*) po 48h. Oplozená vajíčka byla nasbíraná propláchnutím vejcovodů v prvním dni těhotenství a následně byla přenesena v počtu 7-9 dvoubuněčných embryí do pseudopregnanční SHR samice, která byla přes noc pářena s potkanem sterilizovaným vazektomií. K přenosu embryí do vejcovodů pseudopregnanční samice došlo v první den falešné březosti. Výsledkem byly SHR těhotné matky „pěstounky“. Za 3 týdny byly narozené samičky použity k dalšímu zpětnému křížení. Potomci byli superovulováni a když dorostli věku 4 týdnů, byli nakryti SHR samci a cyklus se opakoval. Těmito návaznými procesy došlo ke kompresi délky každého zpětného křížení na celkem 7 týdnů (Pravenec, et al. 2007).

Ke studiím byli použiti samci konplastických potkanů, kteří byli výsledkem sedmého až devátého zpětného křížení. Po sedmi až devíti zpětných kříženích bude vzniklý konplastický kmen totožný s inbredním partnerem v 98,4-99,6% genomu (Silver 1995). Na těchto kmenech byla provedena genotypová analýza polymorfních markerů rozmístěných od sebe ~10 cM napříč jaderným genomem, která neodhalila rozdíly mezi konplastickým a progenitorovým SHR kmenem. Z tohoto důvodu je vysoká pravděpodobnost, že konplastické a progenitorové kmene používané v této studii jsou homozygotní v každém z daných lokusů v jaderném genomu (Pravenec, et al. 2007).

Bez sekvenčních analýz jaderného genomu nemůžeme mít absolutní jistotu, že se v organismu nenachází ani jeden heterozygotní úsek, a proto byla zvolena doplňková metoda testování. Samice F1 generace mají identické jaderné genomy, ale rozdílné genomy mitochondriální podle toho, který mateřský kmen byl ke křížení použitý. Potomstvo generace F1, která vznikla křížením SHR samce a BN samice získá BN mitochondriální genom, zatímco potomstvo generace F1 vzniklé křížením BN samce a SHR samice získá SHR mitochondriální genom. Protože SHR a BN progenitorové kmene jsou zcela inbrední po více než 40 generací, všichni potkani generace F1 musí mít stejné jaderné genomy. Studie na samicích F1 generace mohou vyloučit změny v jaderném genomu, ale nemohou vyloučit potenciální efekt mateřského prostředí a

genového imprintingu, zatímco studie konplastických kmenů efekty prostředí a imprintingu odstraňuje. Proto doplňkové studie u samic vzájemných F1 hybridů spolu se studii konplastických potkaních samců poskytují dobré podmínky na izolované posuzování míry vlivu variant mitochondriálního genomu na komplexní fenotyp (Pravenec, et al. 2007).

2.3. HYPOXIE

Hypoxie je stav, který je definovaný nerovnováhou mezi dodávkou a poptávkou kyslíku. Za normoxických podmínek, kdy je v okolním prostředí 21% kyslíku, je dostupnost kyslíku pro embryonální nebo zralé buňky velmi odlišná. Koncentrace kyslíku v jejich bezprostřední blízkosti se většinou pohybuje ve velmi nízkých hodnotách v intervalu mezi 2 až 9% kyslíku, což odpovídá 14,4 až 64,8 mmHg. (Simon and Keith 2008) . Spotřeba kyslíku v srdci, které je vysoce aerobním orgánem, kolísá v závislosti na jeho vytíženosti. Při pomalém pulsu se spotřeba pohybuje mezi 8-15ml O₂/min/100g srdeční tkáně. Při vysoké fyzické zátěži se však spotřeba může zvýšit zhruba 5x tj. až na 70ml O₂/min/100g srdeční tkáně (Giordano 2005). Dostatečné zásobení srdce kyslíkem je základní podmínkou pro zachování jeho zdravé funkce a optimální produkce energie k udržení základních buněčných procesů. Hypoxie je charakterizována sníženou dodávkou kyslíku při zachování průtoku koronárními cévami a zásobení substráty bez změny metabolických produktů, na rozdíl od ischemie (Verdouw, et al. 1998). Ischemie popisuje stav, kdy dochází k nedostatečnému zásobení tkání krví, což vede nejen k nedostatku zásobení kyslíkem, ale i energetickými substráty. Tímto dochází k posunu k anaerobnímu metabolismu a insuficienci kontraktilní funkce. Ischemie zahrnuje nejen nedostatečné zásobení, ale i nedostatečný odvod zplodin metabolismu, které se hromadí. Následkem toho dochází k ischemickému poškození tkáně, jehož rozsah je závislý na více faktorech, např. na době a intenzitě hypoxického stimulu a stupni odolnosti srdeční tkáně (Ostadal and Kolar 2007).

Podle mechanismu vzniku hypoxie v myokardu můžeme definovat 4 základní typy. Hypoxickou (anoxickou) hypoxii, která je způsobena poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriích, ischemickou (stagnační), která je indukována snížením nebo nedostatečným průtokem krve, anemickou, u které je snižená koncentrace nebo funkce hemoglobinu transportujícího kyslík a histotoxickou, kdy tkáň není schopna využít

dostatečně přiváděný kyslík z důvodu existujícího toxického poškození. Poslední případ nastává například u lékové inhibice proteinů dýchacího řetězce (Ostadal and Kolar 2007).

Experimentálně jsou v laboratořích simulované podmínky vysokohorského prostředí pomocí hypoxických komor. Komory užívané k těmto simulacím jsou buď hypobarické, kde dochází ke snížení pO_2 částečným odčerpáním vzduchu a nebo normobarické, kde je podmínek docíleno řízenou směsí plynů.

2.3.1. ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII

Hypoxické působení na myokard je provázeno řadou morfologických a fyziologických změn, které jsou závislé na druhu a stupni hypoxie, délce trvání ale i stáří zvířete. Adaptace na chronickou hypoxii indukuje kompenzační mechanismy, které obecně zahrnují zvýšenou tvorbu erytrocytů a rozvoj angiogenního systému za účelem zvýšení dodávky kyslíku. Dlouhodobé adaptační mechanismy jsou charakterizovány celou řadou změn, jak protektivních tak škodlivých, za účelem udržení energetické a metabolické homeostázy (Semenza 1999).

Hypoxie způsobuje vazokonstrikci a následnou remodelaci cév v plicním řečišti, které se stávají více rezistentní. Následkem je zvýšení odporu v celém plicním oběhu, což klade vysoké mechanické nároky na pravou komoru srdeční, která musí odpor překonat. Tímto dochází k plicní hypertenzi, která mechanicky zatěžuje činnost pravé komory a má za následek její hypertrofii (Setty, et al. 2008). Následkem přetížení dochází také ke zvýšené syntéze extracelulárních proteinů a to především kolagenu I a III (Pelouch, et al. 1997), což snižuje elasticitu myokardu (Jalil, et al. 1989). Ke změnám však dochází i na molekulární úrovni, kde se setkáváme se změnou genové exprese kontraktilních proteinů, enzymů energetického metabolismu i metabolické aktivity některých enzymů. Hlavním zdrojem energie se stává glykogen (Opie 1969) díky aktivaci anaerobního metabolismu glukózy. V důsledku hypoxie se také mění vodivost některých iontových kanálů, čímž se prodlužuje akční potenciál (Sharma, et al. 2004).

Adaptace na chronické působení hypoxie odpovídající 5000 až 7000 m.n.m. vede ke třem fyziologickým změnám, které zvyšují odolnost srdce k ischemii (Ostadal and Kolar 2007). Jedná se o protektivní mechanismy, které se manifestují jako (1) zmenšení infarktového ložiska, (2) zlepšení postischemických kontraktilních funkcí

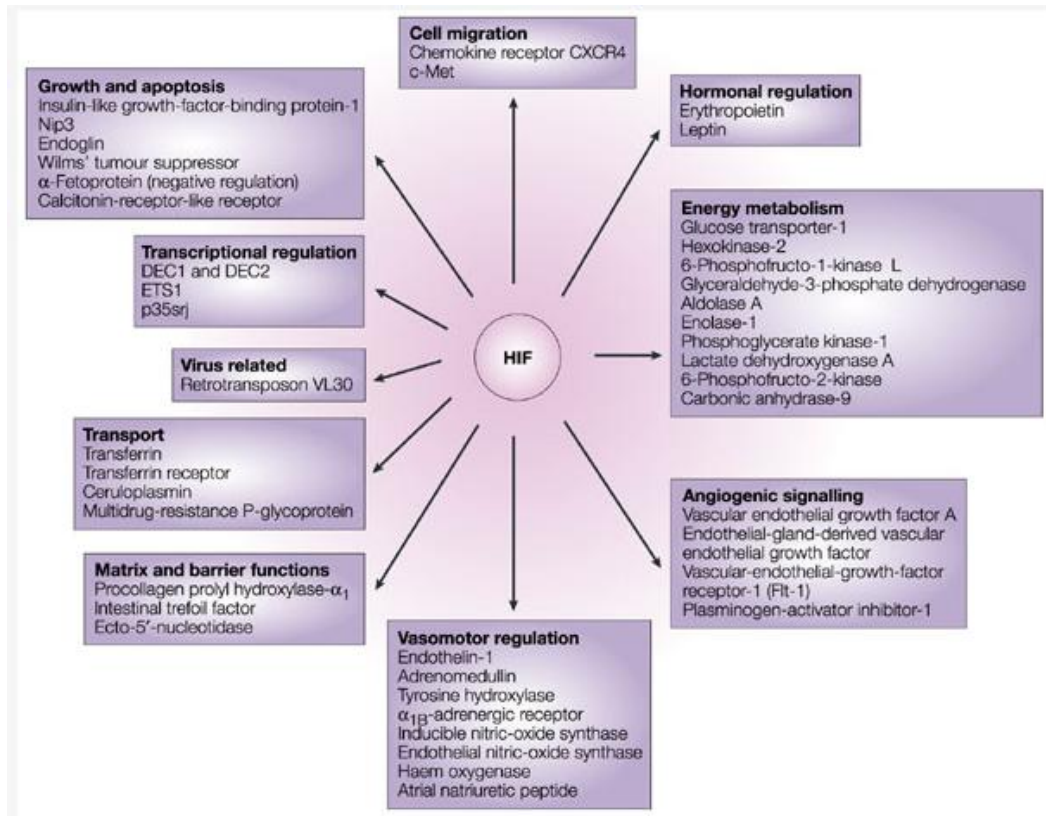
srdce, (3) snížení ischemických a reperfučních arytmií komor. Kardioprotektivní účinky v rychlé odpovědi na střídavý hypoxický stres prokázal také tzv. *preconditioning*, který je navozen krátkými epizodami ischemického stresu před vlastním ischemickým inzultem. Při studiích exprese v levé komoře srdeční po adaptaci na chronickou hypoxii dochází ke změnám úrovně exprese různých genů ze skupiny antioxidantních systému a energetické metabolismu (Neckar, et al. 2002). Z posledních studií vyplývá velmi důležité postavení mitochondrií, které jsou díky adaptaci na chronickou hypoxii více odolné k akutnímu nedostatku kyslíku v důsledku ischemie (Zemanová 2007). Mitochondrie vykazují zvýšenou respirační funkci pro udržení a zvýšení efektivity výroby energie pro zachování kontraktility srdce (Lomnický 2010).

2.3.2. HYPOXIÍ INDUKOVANÝ FAKTOR (HIF)

Hypoxii indukovaný faktor (HIF) je hlavním transkripčním faktorem aktivovaným hypoxií, který je hlavním regulátorem homeostázy v odpovědi na kyslík. V srdci má dvě majoritní izoformy: obecně přítomnou HIF-1 izoformu a tkáňově více specifickou izoformu HIF-2. HIF-1 se skládá ze dvou podjednotek, inducibilně exprimovaná HIF-1 α podjednotka a konstitutivně exprimovaná HIF-1 β podjednotka, známá také jako ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Stabilita a aktivita HIF-1 α podjednotky je regulována na posttranskripční úrovni hydroxylací, ubikvitinací, acetylací a fosforylací. Za normoxických podmínek dochází k hydroxylaci dvou specifických prolinových zbytků (Pro402 a Pro564) v ODDD (*oxygen dependent degradation domain*) oblasti a asparaginylového zbytku (Asp 803) na C-TAD doméně. ODDD oblast obsahuje dva motivy pro hydroxylaci a to bazické helix-loop-helix a PER-ARNT-SIM (PAS). Tyto domény jsou společné oběma izoformám HIF α . Tato hydroxylace spouští asociaci HIF-1 α podjednotky s pVHL E3 ligázovým komplexem a jeho následnou degradaci prostřednictvím ubikvitin-proteazomové dráhy. Poločas rozpadu proteinu se uvádí kolem 5min. V hypoxickém stavu je HIF-1 α podjednotka stabilizována a interaguje s koaktivátory transkripční aktivity, jako je například p300/CBP (*cAMP response element-binding protein binding protein/p300*). Domény v ODDD oblasti jsou zodpovědné za vznik heterodiméru HIF-1 α a HIF-1 β , který se poté translokuje do jádra, kde se váže na DNA, konkrétně na elementy odpovídající na kyslík HRE (*Hypoxia response element*). Tímto mechanismem ovlivňuje expresi řady cílových genů s mnoha rozličnými funkcemi. Komplexní ovlivnění metabolismu

aktivací tohoto transkripčního faktoru nastiňuje obrázek č. 4. (Costa 2006; Semenza 2000).

Obrázek č. 4: HIF signalizační dráha

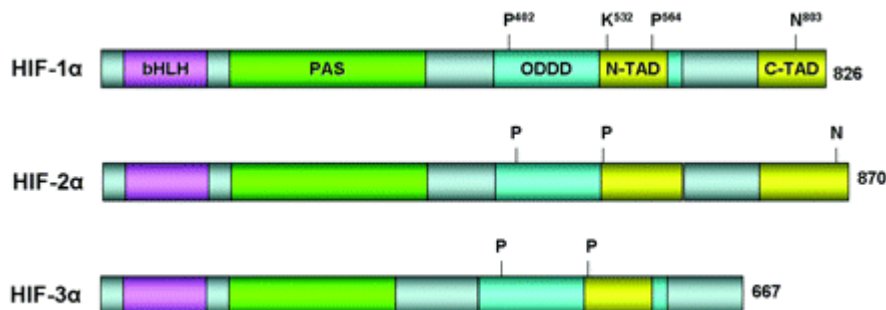


Obrázek zobrazuje komplexní ovlivnění buněčného i celotělového metabolismu, které indukuje aktivace hypoxií indukovaného faktoru (HIF). Převzato z (Schofield and Ratcliffe 2004).

Obecně z rodiny HIF proteinů rozpoznáváme tři α podjednotky: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α a tři β podjednotky HIF1 β /ARNT, ARNT2, ARNT3. Podjednotky se mezi sebou liší místem a mírou exprese, cílovými geny, ale i schopností reagovat na kyslík a dimerizovat. Časové a místní rozdíly se prokazatelně vyskytují u embryogeneze myši (Jain, et al. 1998). Tyto odlišnosti pravděpodobně zodpovídají za odlišnou citlivost různých tkání na koncentraci kyslíku. Nejprozkoumanější podjednotkou je HIF-1 α a HIF-1 β , na kterých byl popsán výše uvedený mechanismus degradace. Ostatní podjednotky mají vyšší specifitu pro tkáň. Homologie HIF-2 α s HIF-1 α je v primární sekvenci v 48%, a proto mají také strukturní (Obr. 5) a biochemické podobnosti. Na rozdíl od všudypřítomné HIF-1 α , se HIF-2 α vyskytuje specificky v plicích a endotheliálních buňkách. Vyšší koncentrace HIF-2 α byla také detekována například v myokardu v hypoxických podmínkách a vyšší exprese mRNA HIF-2 α byla

prokázána v embryonální tkáni. HIF-3 α , který byl objeven nejpozději je také exprimovaný v různých typech tkání, dimerizuje s HIF-1 β podjednotkou a váže se na HRE. Byla objevena také zkrácená forma HIF3 α IPAS (inhibitory PAS) exprimovaná v Purkyňových buňkách mozečku a epitelu rohovky. IPAS nemá žádnou endogenní transkripční aktivitu, ale spíše interaguje s aminoterminální koncem HIF-1 α a brání jeho vazbě na DNA. Působí tedy jako negativní regulátor HIF-1 α . IPAS může být také indukovaný hypoxií v srdci a plicích, což přispívá k negativní zpětné aktivitě HIF-1 α (Costa 2006).

Obrázek č. 5: Doménové struktury HIF α podjednotek



HIF-1 α – hypoxií indukovaný faktor 1, α podjednotka, HIF-2 α – hypoxií indukovaný faktor 2, α podjednotka, HIF-3 α – hypoxií indukovaný faktor 3, α podjednotka. Převzato z (Costa 2006).

HIF reguluje velké spektrum genů, které posilují metabolismus glukózy a dostupnost kyslíku. Mezi tyto geny patří například transportéry glukózy, enzymy anaerobní glykolýzy, vasodilatační faktory, angiogenní faktory a jiné. Jak již bylo řečeno, HIF reguluje geny přes vazbu na HRE nebo jemu podobný element na DNA. Tento element byl prozatím identifikován jen u některých genů, které jsou tedy přímo regulované. Jedná se o gen pro cévní endoteliální růstový faktor A (VEGF-A, *Vascular endothelial growth factor A*) a jeho receptory, erythropoetin, placentární růstový faktor, endoteliální syntáza oxidu dusného, SDF-1 (*stromal derived factor-1*) a jeho receptor, endothelin 1, cyklooxygenáza 2, kinázy sfingokinázy 1 (Fong 2008). Ostatní geny prozatím nemají HRE element identifikovaný nebo jsou regulované nepřímou. Do této skupiny patří například gen pro pyruvátdehydrogenázovou kinázu, glukózový transportér 1, fosfoglycerátkinázu 1, atriální a mozkové natriuretické peptidy a řadu růstových faktorů jako například PDGF (*platelet-derived growth factor* β , růstový faktor

β odvozený od trombocytů), TGF α , β (*transforming growth factor, α and β* , transformující růstový faktor α a β) (Bernardt, et al. 2007).

Pfeifer se spolupracovníky řešil, zda zvýšení plazmatické koncentrace atriálního natriuretického peptidu (ANP, *atrial natriuretic factor*) během hypoxie je důsledkem hypoxií indukované upregulace ANP v srdci nebo tlakovým přetížením pravé komory srdeční. Z jeho studií vyplývá, že opožděná upregulace genu ANP naznačuje, že hypoxie sama o sobě není významným stimulem a zvýšení je způsobeno spíše přetížením pravé komory. Upregulace ANP v levé komoře však zatím není úplně objasněna (Pfeifer, et al. 1997). Adaptivní odpověď na hypoxii zahrnuje upregulaci hemoxygenázy 1 (HMOX1) skrze aktivaci iNOS (inducible NOS) v srdečních buňkách. HMOX1 pomáhá regulovat cévní tonus přes oxid dusnatý a tím se podílí na důležitém obranném mechanismu (Grilli, et al. 2003).

HIF ovlivňuje transkripci některých genů i negativně. Například HIF-1 α se váže na gen *Mxi1*, jehož transkripční aktivitu zvyšuje. Tím se *Mxi1* stává zvýhodněným vazebným partnerem pro dimerizaci s Max proteinem, oproti transkripčnímu faktoru c-Myc. Tímto dochází k inhibici cílových genů c-Myc, které jsou pozitivně regulovány pouze dimerem c-Myc/Max. Mezi tímto způsobem negativně regulované geny patří například *PGC1*, který je zodpovědný za biogenezi mitochondrií (Zhang, et al. 2007).

2.4. GENY ENERGETICKÉHO METABOLISMU

Srdce je orgán, který je zcela závislý na aerobním metabolismu. Z toho důvodu téměř 40% cytoplazmatického prostoru vyplňují mitochondrie (Voet and Voetova 1995). Za anaerobních podmínek je většina energie pro srdeční sval získávána z mitochondrií procesem oxidativní fosforylace, do kterého za klidových podmínek rovnoměrně přispívají mastné kyseliny, glukóza a laktát jako primární substráty. Z Krebsova cyklu a z β oxidace mastných kyselin se uvolňuje velké množství redukováných adeninových dinukleotidů (FADH₂) a (NADH+H⁺), které jsou transportovány k vnitřní mitochondriální membráně. Zde odevzdají redukční ekvivalenty (elektrony a protony), které jsou transportovány multiproteinovými komplexy dýchacího řetězce za doprovodného vzniku koncentračního gradientu H⁺ na vnitřní mitochondriální membráně (Kolář 2011). Za normálních podmínek, jsou takto

zpracovávají substráty mastné kyseliny : glukóza : laktát v poměru 1:1:1, zatímco v hypoxických podmínkách se však tento poměr rapidně mění ve prospěch laktátu a to na 1/7:1/5:2/3 (Silbernagel and Despopoulos 2004).

2.4.1. PROTEIN KINÁZA B (PKB NEBOLI AKT)

Gen pro AKT1 (*murine thymoma viral oncogene homolog 1*) je lokalizován na chromozomu 6 v pozici q32. Vyskytuje se pod různými názvy, jako například protein kinasa B, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, thymoma viral proto-oncogene apod. Kóduje protein AKT, serin-threoninovou kinázu, která je aktivovaná skrz fosfatidylinositol-3-kinázovou (PI3) signální dráhu. AKT je vazebným proteinem pro ATP a protein kinasu C (PKC). AKT signální dráha též ovlivňuje transport glukózy závislý na inzulinu, aktivací vezikulů s glukózovým transportérem v srdci. (Rat Genom Database).

AKT hraje centrální úlohu v regulaci metabolismu, buněčného přežívání, transkripci a progresi buněčného cyklu. Klíčovou úlohu v signalizaci hraje svou interakcí s fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3K), která je asociována s receptory na buněčném povrchu a tvoří s nimi komplexy po jejich aktivaci ligandem (Gudernová 2011). Enzym PI3K se váže na fosforylovaný thyrosin vnitrobuněčné domény EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Tímto se dostane do blízkosti katalytická doména PI3K s fosfoinositidy vázanými v cytoplazmatické membráně, které fosforyluje na 3. pozici. Fosfatidylinositol-3-fosfáty ovlivňují řadu proteinů a mezi nimi i AKT. Ta se částečně aktivuje a přemísťuje se na plazmatickou membránu. Pro úplnou aktivaci je nezbytná protein dependentní kináza 1 (PDK1) a protein dependentní kináza 2 (PDK2). PDK1 fosforyluje treoninový zbytek a PDK2 tyrosinový zbytek v aktivačním místě AKT. Plně aktivována AKT se uvolní z plazmatické membrány a fosforylací inaktivuje proapoptotické proteiny a transkripční faktor FOXO3 (*forkhead box O3*), který ovlivňuje tvorbu dalších proapoptotických proteinů. Dalším působením AKT je navození transkripce genů pro buněčné přežívání a proliferaci (Tamura, et al. 1999). Aktivovaná AKT také fosforyluje HK2, pod transkripční kontrolou HIF1, která asociuje s VDAC pórem na vnější mitochondriální membráně (Riddle, et al. 2000).

Homologní protein AKT2 (*murine thymoma viral oncogene homolog 2*) je lokalizován na chromozomu 1 v pozici q22. Kóduje ATP a protein kinázu C vazebný protein se serin/treoninovou aktivitou. Je zahrnutý do buněčné odpovědi na chemické,

hormonální a inzulínové stimuly. Účastní se stejně jako AKT1 v PI3K/AKT dráze, v transportu glukózy závislém na inzulínu a E-cadherinové signalizační dráze. Je lokalizován v cytosolu, kompartmentech reagujících na inzulín a na vnitřní membráně organel (Rat Genom Database). AKT2 reguluje všechny izoformy AKT a podporuje odolnost vůči hypoxii prostřednictvím miRNA 21 při nedostatku kyslíku. Tato skutečnost byla zjištěna na pokusu s normálními a tumorovými buňkami. Oba typy buněk exprimující AKT2 jsou více rezistentní vůči hypoxii než buňky exprimující AKT1 nebo AKT3. Toto je dáno odlišnou regulací miRNA 21, která je upregulována v hypoxii v AKT2 exprimujících buňkách. Upregulací miRNA 21 pomocí hypoxie AKT2 downreguluje PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) a aktivuje všechny tři formy AKT (Polytarcho, et al. 2011). PTEN je fosfatáza, které může defosforylovat serinové, treoninové a thyrosinové zbytky. Její nejdůležitější funkcí je defosforylace fosfatidylinositol-3-fosfátů a tak působit jako jejich antagonist (Tamura, et al. 1999).

2.4.2. HEXOKINÁZA (HK)

Gen pro HK1 je u potkana *Rattus Norvegicus* lokalizován na chromozomu 20 v pozici q11. HK1 je enzym, který především katalyzuje první krok glykolýzy, a to přeměnu glukózy na glukóza-6-fosfát. Nadále se účastní v ATP katabolických procesech, různých typech fosforylací, proteinové autofosforylaci, reguluje aktivitu aniontových kanálů a negativně reguluje apoptotické procesy. Je lokalizován v kaveolách, v cytosolu, v membránových raftech, na vnější mitochondriální membráně, v mitochondriích a v jádře (Rat Genom Database).

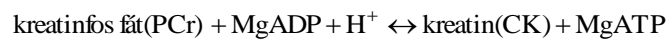
Gen pro HK2 je lokalizován na chromozomu 4 v pozici q34. HK2 patří mezi cílové geny HIF a hraje významnou úlohu v ochraně kardiomyocytů v ischemii. Za fyziologických podmínek je převážně v cytosolu avšak za ischemických podmínek, pod vlivem aktivace protein kinázy B/AKT, je translokována na vnější membránu mitochondrií, kde brání otevření mPTP póru a tím chrání mitochondrie a snižuje pravděpodobnost vzniku apoptózy (Miyamoto, et al. 2008). Během adaptace na hypoxické podmínky jsou upregulovány geny glukózového metabolismu, kde je sledován nárůst exprese HK2 (Suzette, et al. 2000).

Obě izoformy jsou v aktivní formě tetramerem a při jejich aktivitě dochází k fosforylaci glukózy za přítomnosti komplexu Mg^{2+} -ATP. Volné ATP, které není vázáno v komplexu s manganatým iontem, působí naopak jako kompetitivní inhibitor

reakce. Vlastní reakce probíhá podle náhodného bi-bi-mechanismu. HK tvoří ternální komplex s glukózou a komplexem Mg^{2+} -ATP. Mg^{2+} , který je vázán ke kyslíkovým atomům fosfátové skupiny odstiňuje její negativní náboj, čímž se atom fosforu stane přístupný nukleofilnímu ataku hydroxylové skupiny na šestém uhlíkovém atomu glukózy. Glukóza navázaná na HK způsobuje její velké konformační změny, kdy laloky tvořící aktivní místo se k sobě přiblíží a uzavřou do sebe molekulu glukózy. Tento pohyb vytlačí vodu, a proto HK katalyzuje přenos fosfátu na glukózu 40 000 x rychleji než na vodu, i když by přenos na vodu byl energeticky výhodnější (Voet and Voetova 1995).

2.4.3. KREATINKINÁZA (CK)

CK je enzym, který se nachází ve vysoké koncentraci ve všech excitabilních buňkách, např. ve svalu a nervové tkáni, kde katalyzuje následující reverzibilní reakci:

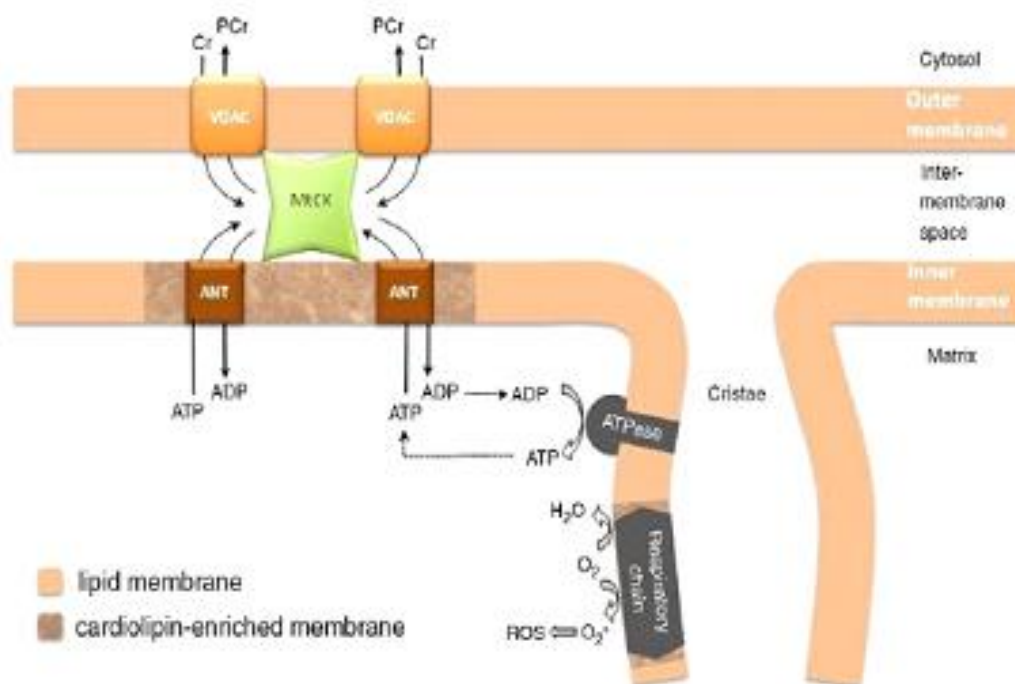


Izoformy CK v buňce funkčně spojují místa produkce a spotřeby ATP a tím zajišťují pohotovostní regeneraci ATP v okamžiku jeho náhlé poptávky a současně stimulují respiraci mitochondrií přímou dodávkou ADP ke komplexu V respiračního řetězce (Wallimann, et al. 1998). Rozeznáváme 4 CK izoformy. Dvě cytosolické mezi které patří izoforma svalová (CKM, *creatine kinase muscle*) a mozková (CKB, *creatine kinase brain*). Další dvě izoformy jsou mitochondriální a patří sem sarkomerická (CKs, *creatine kinase sarcomeric*) a všudypřítomná (CKu, *creatine kinase ubiquitous*). Izoforma CKB, je kódovaná genem lokalizovaným na chromozomu 6 v pozici q32, k jehož expresi dochází především ve vývoji mozku a srdce a za patologických stavů. Izoforma CKM je lokalizována na chromozomu 1 v pozici q21 a hraje důležitou úlohu v blízkosti ATPáz, kde přímo regeneruje ATP a reguluje koncentraci H^+ iontů. Tímto se významně podílí na udržení energetické homeostázy při svalové kontrakci. Mitochondriální izoforma CK-mt1B (*creatine kinase, mitochondrial 1B*), jinak nazývaná také CKu, má lokalizovaný gen na chromozomu 3 v pozici q35. Tento protein je zahrnut především ve fosfokreatinových biosyntetických procesech v širokém spektru tkání, vyjma srdce. Dále CK-mt2 (*creatine kinase, mitochondrial 2*), jinak nazývaná CKs (*creatine kinase, sarcomeric*), s lokalizací genu na chromozomu 2 v pozici q12, je

opět zahrnuta v fosfokreatinových biosyntetických procesech a je typická pro svalovou tkáň (Rat Genom Database).

Mitochondriální izoformy CK (mtCK) jsou lokalizovány na vnitřní mitochondriální membráně se zásahem do intermembránového prostoru (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Ke kotvení do vnitřní mitochondriální membrány dochází díky doméně na C konci, která je bohatá na kladně nabitou aminokyselinu lysin (Schlattner, et al. 2004). Tato doména může snadno vázat aniontové lipidy, ze kterých je nejdůležitějším zástupcem kardiolipin. Specifické místo pro vazbu kardiolipinu se vyskytuje pouze u izoformy CK-mt1B. Mt CK dokáže reverzibilně oligomerizovat, díky čemuž je schopna propojit vnitřní a vnější membránu mitochondrií a umožnit transport lipidů mezi membránami (Stachowiak, et al. 1996). Tento transport je však také termodynamicky řízen koncentrací CK. CK může oligomerizovat do dimerní nebo oktamerční formy, přičemž oktamerční forma aniontové lipidy váže mnohem rychleji (Rojo, et al. 1991).

Fosfátová skupiny z ATP (*adenosin triphosphate*) vzniklého v mitochondriích je pomocí mtCK přenesena na kreatin, za vzniku ADP (*adenosin diphosphate*) a kreatinfosfátu. Kreatinfosfát je důležitá makroergní sloučenina ze skupiny guanidinfosfátů (Miller, et al. 1993). ADP je zpět transportováno do mitochondriální matrix pomocí translokázy adeninových nukleotidů (ANT), kde dojde opět k defosforylaci na ATP. Fosfokreatin se transportuje do míst spotřeby ATP a po odevzdání fosfátu difunduje vzniklý kreatin zpět do mitochondrie. Tímto mechanismem dochází ke stimulaci oxidativní fosforylace (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Oktamerční forma mtCK je vedle ANT funkčně propojena s napěťově ovládaným iontovým kanálem (VDAC) (Adams, et al. 1989) a plní tak důležitou strukturální funkci, která brání otevření MPT póru (Abu-Hamad, et al. 2008) (Obr. 6).

Obrázek č. 6: Schéma funkce mitochondriální CK

MtCK – mitochondriální kreatinkináza, je funkčně propojena s ANT – translokázou adeninových nukleotidů a VDAC - napětově ovládaným iontovým kanálem, kde plní strukturální funkci a stimuluje oxidativní fosforylaci přímou dodávkou ADP – adenosindifosfátu ke komplexu V respiračního řetězce. ADP je produkováno, přenosem fosfátové skupiny z ATP - adenosintrifosfát na Cr – kreatin, za vzniku PCr – fosfokreatinu. Převzato z (Schlattner 2009).

Při anemické hypoxii (nedostatek železa v potravě) nebyla detekována změna celkové aktivity CK v srdci, ale byl zde detekován nárůst mitochondriální CK, stejně jako nárůst kapacity mitochondriální respirace stimulované kreatinem a ADP. Vzestup fosfofruktokinázové aktivity (o 20%) byl interpretován jako signifikantní nárůst glykolytické aktivity v srdci. Detekován byl i nárůst enzymu laktátdehydrogenázy (o 30%), což naznačuje posun metabolismu ve prospěch laktátu a tím pádem podporu anaerobní glykolýzy. Zároveň byl detekován pokles ATP (Field, et al. 1994).

2.4.4. CYTOCHROM C OXIDÁZA (COX)

Gen pro cytochrom c oxidázu, podjednotku IV, izoformu I (COX4.1) je lokalizován na chromozomu 19 v pozici q12. Tento gen kóduje protein s cytochrom c oxidázovou aktivitou. Nachází se na vnitřní mitochondriální membráně, v mitochondriích a jádře. Druhou izoformou genově kódovanou na chromozomu 3

v pozici q41 je cytochrom c oxidáza, pojednotka IV, izoforma II (COX4.2). Tato izoforma je však pouze mitochondriálně lokalizovaná (Rat Genom Database).

COX je terminální enzym dýchacího řetězce na vnitřní mitochondriální membráně přebírající elektrony od cytochromu c a přenášející je na kyslík, jako konečný akceptor elektronů v procesu mitochondriální respirace (Voet and Voetova 1995). V savčích buňkách je kyslíkem regulovaná exprese izoform COX4.1 a COX 4.2. Za hypoxických podmínek HIF-1 reguluje expresi těchto podjednotek aktivací genů kódujících COX 4.2 a mitochondriální proteázy LON, zodpovídající za degradaci COX 4.1. Efekt exprese a aktivity COX, ATP produkce, spotřeba kyslíku a produkce ROS naznačuje, že přepnutí exprese COX 4 podjednotky mezi oběma izoformami je součástí homeostatické odpovědi, která optimalizuje účinnost respirace v rozdílných kyslíkových koncentracích.

2.5. GENY MITOCHONDRIÁLNÍ SIGNALIZACE A BIOGENEZE

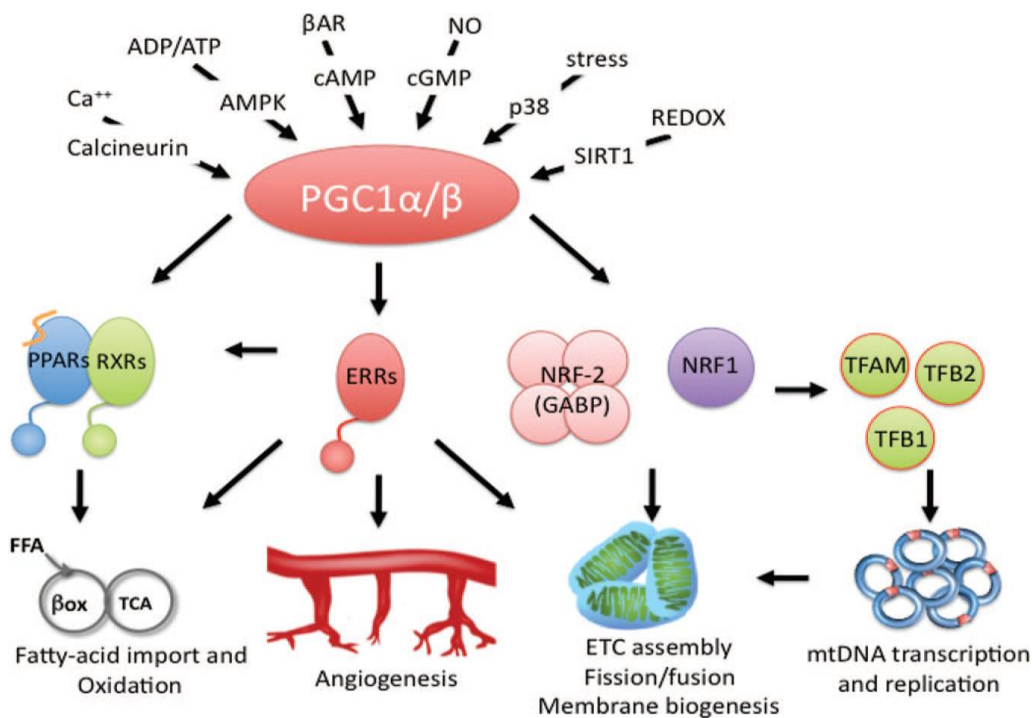
2.5.1. KOAKTIVÁTOR PEROXIZOMÁLNÍ PROLIFERACÍ AKTIVOVANÉHO RECEPTORU GAMMA (PGC1)

Gen pro PGC1 α je lokalizován na chromozomu 14, v pozici q11, gen pro PGC1 β je lokalizován na chromozomu 18 pozici q12.1 (Rat Genom Database). PGC1 α je členem rodiny transkripčních koaktivátorů, které hrají ústřední roli v regulaci energetického metabolismu. Interaguje s velkým množstvím transkripčních faktorů, které mají vysoce variabilní buněčnou odpověď, včetně reakce na chladovou adaptaci. PGC1 α stimuluje mitochondriální biogenezi a podporuje remodelaci svalové tkáně na kompozici vláknitého typu, která je metabolicky více oxidativní a méně glykolytická (Liang and Ward 2006). Částečně se podílí na regulaci sacharidů a lipidů. S vysokou pravděpodobností je zapojen do poruch, jako je obezita, diabetes a kardiomyopatie (Rat Genom Database).

K regulaci exprese mitochondriálních proteinů dochází nejčastěji na transkripční úrovni. Jedná se o velmi propojenou síť ko-regulátorů a DNA vazebných transkripčních faktorů, které řídí celou řadu jaderných genů, kódujících mitochondriální proteiny. PGC1 α je hlavním regulátorem energetického metabolismu na úrovni genové exprese. Prostřednictvím interakce s mnoha transkripčními faktory, jako jsou receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPARs, *peroxisome proliferator-activated*

receptors), jaderné receptory pro estrogen (ERRs, *estrogen receptor related receptors*) nebo jaderné respirační faktory (NRFs, *nuclear respiratory factors*) (Obr. 7). PGC1 α zvyšuje mitochondriální kapacitu oxidace mastných kyselin a oxidativní fosforylace a spouští koordinovanou expresi jaderně a mitochondriálně kódovaných genů vztahujících se k mitochondriální biogenezi. Ve skutečnosti PGC1 α také aktivuje transkripci a replikaci mtDNA pomocí transkripčních aktivátorů a koaktivátorů NRFs, které aktivují transkripci nukleárně kódovaného mitochondriálního transkripčního faktoru (TFAM) a dvou proteinů, které interagují se savčími mitochondriálními RNA polymerázami a TFAM, TFB1M a TFB2M (Kelly and R.C. 2004; Puigserver and Spiegelman 2008; Ventura-Clapier, et al. 2008).

Obrázek č. 7: Regulační kaskáda PGC1 α/β



PGC-1 α – Koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru 1 α/β je ovlivňován řadou faktorů a řadu transkripčních faktorů ovlivňuje. Mezi tyto faktory patří estrogenové jaderné receptory (ERRs, *estrogen receptor related receptor*), jaderné respirační faktory (NRFs, *nuclear respiratory factor*), receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPARs, *peroxisome proliferator-activated receptors*). Tyto faktory jsou známy tím, že regulují energetický metabolismus, angiogenezi a mitochondriální biogenezi a oxidaci mastných kyselin. Převzato z (Rowe, et al. 2010).

PGC1 α patří do malé rodiny koaktivátorů spolu s PGC1 β a PGC1 souvisejícím koaktivátorem PRC (PGC1 related coactivator) (Scarpulla 2008). Důležitější je však genová exprese vzájemně zastupitelných PGC1 α a PGC1 β . Genová exprese na úrovni mRNA je u PRC výrazně nižší a nevykazuje ve tkáni specifický způsob exprese (Ventura-Clapier, et al. 2010).

Mitochondriální biogeneze zahrnuje také morfologické změny mitochondriálního retikula ve formě fúze a štěpení (*fusion and fission*) mitochondrií, dále import a úpravy proteinů a biosyntézu kardiolipinu. *Fusion and fission* mitochondriálních membrán určuje tvar a velikost mitochondrií a je zprostředkované proteiny s GTPázovou aktivitou na N-terminální doméně. *Fission* zahrnuje dynamin související proteiny (DRP1, *dynamine-related proteins*) a jejich receptory Fis1, zatímco *fusion* je zprostředkován dvěma dynamin-příbuznými proteiny mitofusinem (Mfn1 a 2), který je zapojen do fúze vnějších membrán a OPA1 (*optic atrophic type 1 protein*), který úzce souvisí s fúzí membrán vnitřních. *Fusion and fission* jsou vyvážené procesy, kdy posun rovnováhy mezi nimi může způsobit dezorganizaci mitochondriální sítě a dysfunkci. Mitochondriální dynamika zatím bohužel nebyla dobře popsána pro zralé kardiomyocyty. Exprese těchto proteinů v srdci je vysoká, ale není vyloučeno, že tento jev může být zapojen v mnohem pomalejších procesech a hrát například roli během mitochondriální biogeneze během srdečního růstu a postnatální buněčné maturace. Zatím není příliš jasné, zda je transkripční regulace těchto procesů zahrnuta ve stejné nebo podobné kaskádě. Nicméně v kosterním svalu PGC1 α a mitochondriální obsah silně koreluje s expresí proteinů zapojených do mitochondriální dynamiky a úpravy proteinů (Ventura-Clapier, et al. 2008).

2.5.2. PROTEIN SOUVISEJÍCÍ S DYNAMINEM (DRP1)

DRP1 (*Dynamine-related protein 1*) je lokalizovaný na chromozomu 11, v pozici q23 (Rat Genom Database). DRP1 je hlavním regulátorem mitochondriálního dělení ve většině eukaryotních organismů. Jedná se o rozpustný protein, obsahující N terminální GTPázovou doménu a C terminální GTPázovou efektorovou doménu, která umožňuje vzájemné uspořádávání. Buňky s delecí genu pro DRP1 vykazují vysokou propojenost mitochondriální sítě, která je důsledkem probíhajícího procesu *fusion* s absencí *fission* aktivity (Westermann 2010).

2.5.3. DESMIN (DES)

Gen pro desmin je lokalizovaný na chromozomu 9 v pozici q33. Kóduje protein, který váže cytoskeletální proteiny. Nachází se ve svalech kosterních a srdečním. V rámci svalových vláken je desmin důležitý cytoskeletální protein udržující strukturu sarkomer, které jsou nezbytné ke svalovému tonu a současně má integrální signální funkci mezi kontraktilním aparátem, mitochondriemi a sarkolemálními strukturami. Desmin propojuje Z disky a spojuje sousední sarkomery do myofibrily (Kouloumenta, et al. 2007). Studie uvádí, že v případě delece genu kódujícího desmin, dochází k průkaznějšímu mechanickému poškození a k nižší izometrické síle v odpovědi na mechanický stres (Sam, et al. 2000).

2.5.4. KONEXIN (CX43)

CX43 je kódovaný genem *Gjal* lokalizovaným na 20 chromozomu v pozici q11 (Rat Genome Database). Jedná se o strukturální protein, který se skládá v hexamerní strukturu konexonu, základní jednotku mezerového vodivého spoje mezi buňkami. Tyto spoje mají svou důležitou úlohu v buněčné komunikaci a regulaci (Forejtníková and Kubínová 2009). Dochází přes ně k pasivnímu transportu malých hydrofilních molekul do velikosti 1kDa (ionty, druzí poslové) (Kumar and Gilula 1996). Protein je zahrnutý i v transportu ATP a apoptotických procesech (Rat Genome Database).

CX43 hraje důležitou roli v protekci vyvolané tzv. *preconditioningem*. Studie na myším mozku s delecí genu pro tento protein neprokázaly protektivní efekt v odpovědi na hypoxický *preconditioning*, zatímco u *wild-type* dochází tímto mechanismem k signifikantní redukci infarktu. Studie ukazuje, že *preconditioning* snižuje degradaci CX43 (Lin, et al. 2008). Mutace v genu pro tento protein a v genu pro CX40 způsobují srdeční arytmie, které jsou následkem poruchy přenosu signálu mezi sousedními buňkami zprostředkované právě konexiny (Masopust 2005).

2.5.5. CITRÁTSYNTÁZA (CS)

CS je enzym kódovaný genem *Cs* lokalizovaným na chromozomu 7 v pozici q11 (Rat Genome Database). Tento enzym katalyzuje první krok Krebsova cyklu, kdy dochází ke kondenzaci acetyl-CoA a oxalacetátu za vzniku citrátu podle rovnice:



Převzato z (Gerike, et al. 1998). Za normoxických podmínek je glukóza hlavním zdrojem acetyl-CoA pro citrátový cyklus. V některých typech buněk za hypoxických podmínek se glutamin stává hlavním zdrojem citrátu. Glutamin odvozený od α ketoglutarátu je redukčně karboxylovaný pomocí mitochondriální NADH-dependentní izocitrátdehydrogenázou za vzniku izocitrátu, který může být izomerovaný na citrát. Tato redukční karboxylace glutaminu je součástí metabolické změny pod vlivem HIF-1 (Wise, et al. 2011).

2.5.6. ALDEHYDDEHYDROGENÁZA (ALDH)

ALDH je enzym, který oxiduje aldehydy na karboxylové kyseliny v játrech. Ty jsou dále metabolizovány ve svalech a v srdci (Crabb, et al. 2004). Existují tři izoformy. Gen pro protein ALDH1 je lokalizován na chromozomu 1, v pozici q51 a jedná se o protein lokalizovaný v cytoplasmě a jádře. Mitochondriálně lokalizovaná je izoforma ALDH2 kódovaná genem na chromozomu 12, v pozici q16 (Rat Genome Database). Třetí izoforma ALDH3 má specifickou lokalizaci v žaludku, rohovce a některých nádorech (Crabb, et al. 2004). Mitochondriální izoforma ALDH2 hraje důležitou roli v metabolismu acetaldehydu a dalších toxických aldehydů vyvolaných ROS.

Nové studie poukazují na možnou protektivní úlohu aktivace ALDH2 u ischemického poškození srdce. Podávání etanolu před ischemickým inzultem může zvýšit aktivitu ALDH2 a zpomalovat vznik 4-hydroxy-2nonenal (4-HNE) proteinových aduktů. 4-HNE, specifický elektrofilní reaktivní aldehyd je schopen klíčové inhibice enzymu. 4-HNE může být produkován v důsledku I/R poškození v různých tkáních, včetně srdce, kde ukládá toxické myokardiální toxiny, související se zhoršenou kontraktilitou. Nové poznatky naznačují, že zvýšení 4-HNE může modifikovat například cAMP dependentní proteinkinázu a AKT. Je možné tedy spekulovat o funkci ALDH2 v I/R poškození skrz detoxikaci toxických aldehydů (Ma, et al. 2011).

2.6. GENY ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU

Oxidační stres v buňce navozuje jak fyziologické, tak patofyziologické změny a je výsledkem rovnováhy mezi působením přirozených systémů, které ROS produkují a degradují. Při koncentraci 21% kyslíku (úroveň hladiny moře) je cytoplazma všech aerobních savců udržována v redukované formě a jsou v ní detekovány volné sulfhydrylové skupiny. K udržování v redukované formě dochází přes dva hlavní systémy: thioredoxinový a glutathionový (Koháryová and Kolárová 2008).

2.6.1. THIOREDOXINOVÝ SYSTÉM

Thioredoxiny (TRX) spolu s thioredoxinreduktázou (TXNRD) tvoří důležitý oxidoredukční systém s antioxidační rolí (Holmgren 1985). Rozeznáváme dvě hlavní izoformy thioredoxinu. Gen pro Trx1, je lokalizován na chromozomu číslo 5, na pozici q24 a kóduje protein s cytoplazmatickou lokalizací. Gen pro Trx2 je lokalizován na chromozomu 7, na pozici q34 a kóduje protein, který se vyskytuje převážně v mitochondriích (Rat Genom Database). Je popsána ještě třetí izoforma Txn3 neboli spTRX (*sperm specific TRX*), která není uvedena v databázi RGD (Rat Genom Database). Jedná se o první specificky exprimovaný enzym ve spermatozoidech (Miranda-Vizuete, et al. 2001).

Thioredoxin je malý protein s dvěma redoxně aktivními cysteiny v aktivním místě. Jeho funkcí je elektronový transport pomocí reverzní oxidace dvou sousedních -SH skupin proteinu na disulfidický můstek. Oxidovaná forma TRX je regenerována redukční aktivitou TXNRD. Redukovaná forma TRX umožňuje redukci disulfidických můstků na cystinových zbytcích, které vznikají následkem oxidace -SH skupin a tím modulují aktivitu proteinů. Thioredoxinový systém se skládá z NADPH, flavoproteinu TXNRD, TRX a redox aktivních proteinů, které regulují aktivitu různých enzymů, včetně antioxidačních (Holmgren 1989). Thioredoxinový systém je významný antioxidační systém k udržení redoxního stavu uvnitř buňky, který zároveň redukuje ROS a přímo inhibuje proapoptotické bílkoviny, jako je například apoptotický signál regulující kináza (ASK1, *apoptotic signal-redgulated kinase*). Jeho inhibice vede k apoptóze (Tonissen and G 2009).

Mezi substráty TRX patří například ribonukleázy, glukokortikoidní receptor, inzulin, ale mimo i jiné i transkripční faktory, jako již výše zmíněný protein p53, NF- κ B

a AP-1 (*activator protein 1*) (Obr. 8) (Ameyar, et al. 2003). Expres TRX1 může být indukovaná pomocí TNF α . Takto indukovaná exprese TRX1 indukuje DNA vazebnou aktivitu a expresi NF- κ B. Toto naznačuje, že TRX1 může být pozitivním regulátorem NF- κ B a hrát roli v zánětlivé reakci (Sakurai, et al. 2004). AP-1 komplex patří do třídy signálních faktorů používajících cysteinový motiv, který může reverzibilně upravovat specifické proteiny signální kaskády upravující další proteiny. AP-1 komplex s redox senzitivním cysteinem reaguje na oxidativní stres. Je modifikován pomocí DNA reparačního enzymu REF-1 (*redox factor 1*), který má endonukleázovou aktivitu a jeho aktivita je modifikována právě TRX. AP-1 reguluje expresi dalších genů ovlivňujících proliferaci, diferenciaci a apoptózu (Hirota, et al. 1997).

Obrázek č. 8: Působení thioredoxinu

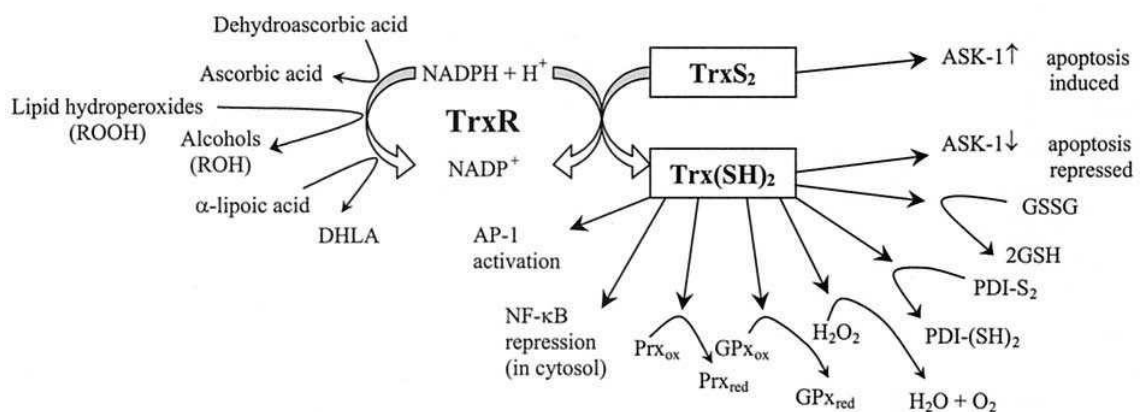


Schéma zobrazuje spektrum substrátů, které jsou redukovány pomocí redukovaného thioredoxinu (Trx(SH)_2), který je v redukovaném stavu udržován pomocí TrxR (thioredoxinreduktázy). Převzato z (Nordberg and Arnér 2001)

Studie na buňkách produkujících mutantní nebo normální formu TRX ukázaly zvýšenou apoptotickou aktivitu, na rozdíl od buněk, které nadprodukovaly TRX a byly před apoptózou chráněny. Zároveň byla zjištěna aktivace proteinu p53 a Chk1/Chk2 proteinu v mutantních a normálně exprimujících buňkách, zatím co u poslední skupiny, s nadměrnou produkcí TRX, se aktivace neprokázala. Přestože bylo prokázáno, že hypoxie indukuje tvorbu ROS v mitochondriích, které na to odpovídají expresí proteinu p53, data z této studie ukazují, že hypoxií indukovaná exprese proteinu p53 a fosforylace je nezávislá na ROS. Celkově tedy ze studie vyplývá, že redoxní stav TRX je modulován v hypoxii, je nezávislý na ROS a je rozhodujícím regulátorem buněčného cyklu (Muniyappa, et al. 2009).

TXNRD má tři izoenzymy. TXNRD1, kódovaná genem *Txnrd1* na 7 chromozomu v pozici q13, TXNRD2 s genem *Txnrd2* na chromozomu 11 v pozici q23 a TXNRD3 kódované genem *Txnrd3* na chromozomu 4 v pozici q34. Všechny izoenzymy mají za funkci redukovat thioredoxin a jiné substráty za přítomnosti NADH (Rat Genom Database). Liší se v lokalizaci, přičemž TXNRD1 se vyskytuje v cytosolu a druhá izoforma TXNRD2 v mitochondriích. TXNRD3 se vyskytuje ve většině buněčných kompartmentů a to v jádře, cytoplazmě, endoplazmatickém retikulu a mikrozomech (Rat Genom Database).

2.6.2. PEROXIREDOXINY (PRX)

PRX se také nazývají thioredoxin peroxidázami z toho důvodu, že právě TRX poskytuje elektrony pro jejich redukci (Chaea, et al. 1999). Jedná se o skupinu enzymů, které mimo jiné řídí peroxidem indukované cytosiny, které hrají důležitou roli v signalizaci v savčích buňkách. Jejich regulace probíhá pomocí fosforylace, změnou redoxních stavů nebo oligomerizace. PRX rozdělujeme do 3 skupin, typické 2-Cys, atypické 2-Cys a 1-Cys PRX. Všechny skupiny mají stejný katalytický mechanismus aktivního místa s cysteinem, který je peroxidovým substrátem oxidovaný na kyselinu sulfanilovou (Wood, et al. 2003).

Savci mají 6 izoform peroxiredoxinů: PRX1 až PRX6. PRX3, který je lokalizován na chromozomu 1 v poloze q55 kóduje protein s cysteinovou endopeptidázovou inhibiční aktivitou zahrnutou v apoptotickém procesu. Podílí se na negativní regulaci apoptózy (redukci peroxidu vodíku), buněčné odpovědi na oxidační stres, katabolických procesech peroxidu vodíky a je lokalizován v mitochondriích. Stejně tak v mitochondriích nalézáme PRX5, protein s antioxidační aktivitou, který obsahuje RNA polymeráza III regulační oblast se schopností vazby na DNA. Tento protein je lokalizován také na chromozomu 1, ale v bližší pozici q43 (Rat Genom Database).

2.6.3. SUPEROXID DISMUTÁZA (SOD)

SOD je další důležitý antioxidační enzym, z rodiny metaloenzymů, který katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Rozeznáváme jeho 4 izoformy a to Cu/ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), Cu/ZnSOD (SOD3) a FeSOD.

FeSOD se vyskytuje u prokaryotických organismů a některých vyšších rostlin. MnSOD a Cu/ZnSOD se nachází jak u prokaryotických (Cu/ZnSOD jen u některých), tak i u eukaryotických organismů (Rat Genom Database).

Cu/ZnSOD, která má svou zkratku odvozenou od obsahu měďnatých a zinečnatých iontů se vyskytuje v cytoplazmě jako homodimér. Dvě 26kDA podjednotky jsou propojeny disulfidickým můstkem (Furukawa and Halloran 2006). Její gen *Sod1* je lokalizován na chromozomu 11 v pozici q11. Protein negativně reguluje apoptotické procesy a je zahrnutý, jak už je z jeho funkce vyplývá, do biosyntetické dráhy peroxidu vodíku (Rat Genom Database).

MnSOD je 80kDA tetrametr, který se vyskytuje v mitochondriální matrix. Je kódovaný genem *Sod2* na chromozomu 1 v pozici q21. Funkci má stejnou jako výše zmíněná SOD, ale navíc je ještě zahrnutý v buněčné odpovědi na ethanol.

Existuje ještě třetí forma SOD u eukaryotických buněk a to SOD3, která obsahuje stejně jako Cu/ZnSOD měďnaté a zinečnaté ionty, ale jedná se o homotetramer o hmotnosti 30kDA, který je lokalizován v extracelulárním prostoru (Wispe, et al. 1989). Je zahrnutý do buněčných odpovědí na hladinu měďnatých iontů, oxidační stres a oxidoredukčních procesech. Gen *Sod3* pro tento protein se nachází na chromozomu 14 v pozici q11 (Rat Genom Database).

Liu a spolupracovníci ve své studii srovnávali efekt chronické hypoxie (pO_2 cca 15 Torr) na peritoneální makrofágy v porovnání s alveolárními, na mozku, plicích, srdci a kosterní svalovině u myši. Peritoneální makrofágy měly prokazatelně nižší aktivitu SOD, než makrofágy alveolární. Nižší SOD činnost byla zaznamenána také v homogenátech plic a mozku, zatímco v srdci a kosterní svalovině nedošlo k signifikantní změně (Liu et al., 1977).

2.6.4. MONOAMINOOXIDÁZA (MAO)

MAO jsou flavoproteinové enzymy (kovalentně váží FAD) ze skupiny oxidoreduktáz, které se účastní degradace neurotransmiterů. Existují dvě izoformy A a B. Izoforma A odbourává preferenčně serotonin, adrenalin a noradrenalin, zatímco izoforma B odbourává betafenyletylamin a tryptamin. Izoforma B se nachází převážně v lidském mozku (Saura, et al. 1996). Gen *Maoa*, kódující enzym MaoA metabolizující monoaminy, je lokalizován na chromozomu X, v pozici q12. Je zahrnutý v metabolické cestě fenylalaninu, serotoninu a katabolické cestě dopaminu (Rat Genome Database).

Tato reakce probíhá za vzniku aldehydu a amoniaku. MaoA je lokalizován na vnější mitochondriální membráně, kde zastává funkci hlavního producenta ROS, konkrétně peroxidu vodíku (Di Lisa, et al. 2009).

2.6.5. AKONITÁZA (ACO)

Gen *Aco1*, lokalizovaný na 5 chromozomu v pozici q22, kóduje RNA vazebný protein, který je zahrnutý především v udržení homeostázy železa a v Krebsově cyklu. Nachází se v solubilní formě v cytosolu, endoplazmatickém retikulu a Golgiho komplexu (Rat Genom Database). Protein obsahuje elementy odpovídající na koncentraci železa (IREs, *iron responsive elements*), které spolu s proteiny odpovídající na koncentraci železa (IRPs, *iron responsive proteins*) hrají důležitou úlohu v regulaci železa. IREs jsou vlásečkové struktury na obou koncích nepřekládaných oblastí (UTR, *untranslated regions*) mRNA kódujících železem regulované proteiny. V případě nedostatku železa, IRPs váží IREs, čímž dojde k ovlivnění tvorby proteinů metabolismu železa, ve prospěch zadržování železa buňkou. V případě nadbytku železa brání cluster IRP1 vazbě na IREs, čímž dojde k destabilizaci mRNA a snížené expresi transferinu. Ve stavu nízké koncentrace železa se IRP1 váží právě na mitochondriální akonitázu (ACO2), čímž je blokována její translace (Sedláčková and Racek 2009).

Výše zmíněná mitochondriální akonitáza ACO2 je kódována genem *Aco2*, lokalizovaném na chromozomu č. 7 v pozici q34. Funkční rysy má stejné jako ACO1. Hlavní funkcí mitochondriální izofomy je přeměna citrátu na izocitrát v Krebsově cyklu (Rat Genom Database). Obsahuje $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ klastr v aktivním místě enzymu, který může být oxidován superoxidem za vzniku inaktivní akonitázy s klastrem $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$. Produktem této reakce jsou Fe^{2+} , které vstupují do Fentonovy reakce, kde se spolu s peroxidem vodíku podílejí na vzniku hydroxylových radikálů (Gourley, et al. 2003).

2.6.6. HEMOXYGENÁZA (HMOX)

Gen pro HMOX 1 je lokalizován na chromozomu č. 19 v pozici p11. Kóduje protein, který se uplatňuje v angiogenezi, buněčné smrti a buněčné odpovědi na nutriční stav. Je lokalizován v kaveolách, cytosolu a endoplazmatickém retikulu, kde participuje v HIF signalizační dráze a katabolismu hemu (Rat Genom Database). Jedná se o

inducibilní izoformu, reagující na hypoxii, stres a cytokiny. Druhou konstitutivně exprimovanou izoformou je HMOX2. Obě izoformy katalyzují konverzi hemu na žlučová barviva (antioxidační biliverdin a bilirubin) za doprovodné produkce železa a oxidu uhelnatého. U tohoto enzymu, který reguluje vnitrobuněčnou oxidační rovnováhu, byly prokázány antioxidační, prozánětlivé a antiapoptotické účinky (Idriss, et al. 2008). Gen pro HMOX2 je lokalizován na chromozomu č. 10 v pozici q12 (Rat Genom Database). Vyskytuje se specificky v nervových buňkách. V mozku produkuje CO, který zde funguje jako neurotransmiter. CO signalizace je silně spjata s NO signalizací a regulace těchto systémů je provázaná. Další známou izoformou je HMOX3, která byla nalezena ve slezině, thymu, srdci, játrech, prostatě, ledvinách, mozku a varlatech (Santa Cruz Biotechnology). Vyskytuje se také pod názvem HMOX2, pseudogen 1, lokalizovaný na chromozomu 2 v pozici q41. (Rat Genom Database).

HMOX2 je známá také jako potenciální kyslíkový senzor. Relativní obsah CO v arteriální krvi, který odráží celkové množství endogenní degradace hemu, ukazuje u myši dynamické změny v adaptaci na normobarickou hypoxii. U analýzy na myších játrech byla po 7 dnech adaptace snížena hladina HMOX 1 o 20% a HMOX2 o 40%. Hladiny se po 14 dnech dostaly na bazální úroveň exprese. U analýzy srdce byla naopak zjištěna 2x vyšší exprese u HMOX1 a 1,3x vyšší exprese u HMOX2. Tyto výsledky naznačují, že změny HMOX v adaptaci na hypoxii jsou závislé na buněčném mikroprostředí (Hana, et al. 2005).

2.7. PRINCIPY POUŽITÝCH METOD

2.7.1. ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza je základní separační metoda, která slouží k rozdělení proteinů s hmotností heterogenitou na základě izoelektrického bodu. Hlavní veličinou této elektromigrační separační metody je mobilita m neboli pohyblivost. „Mobilita je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$m=v/E \quad [m]=m^2V^{-1}s^{-1},$$

kde v je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě E .“ Po dosazení dalších vzorců na výpočet intenzity elektrického pole (pro přehled (Kašička 1997)) získáme rovnici, ze které vyplývá, že pohyblivost iontu je přímoúměrná náboji a nepřímoúměrná poloměru a viskozitě roztoku.

Elektroforetická vodivost je ovlivněna samozřejmě dalšími faktory v závislosti na typu látky. Na příklad u silných elektrolytů je důležitá teplota, u slabých elektrolytů jejich schopnost disociace, tedy pH prostředí. Tento fakt se týká i bílkovin a peptidů. Proto se elektroforéza bílkovin provádí v pH, při kterém jsou maximální efektivní rozdíly pohyblivosti sledovaných látek (Kašička 1997).

Podle elektroforetického média můžeme elektroforézu rozdělit na gelovou nebo zónovou. U zónové elektroforézy jsou částice o různé mobilitě unášeny elektroosmotickým pufrem kapilárou až k detektoru. Dochází k detekci jak kationtů, tak aniontů a neutrálních částic, které jsou s sebou v úzké kapiláře strhávány tokem kationtů. U gelové elektroforézy dochází k separaci na základě mobility a velikosti pórů. Podle způsobu uložení gelu, se elektroforézy dělí na vertikální, horizontální a kapilární (Fajkus 2011). Pro separaci makromolekul je nejvyužívanější horizontální gelová elektroforéza. Velikost póru můžeme ovlivnit změnou koncentrace agarózy. Separace je potom závislá jak na pohyblivosti látek, tak na jejich velikosti, přičemž velké molekuly putují gelem pomaleji.

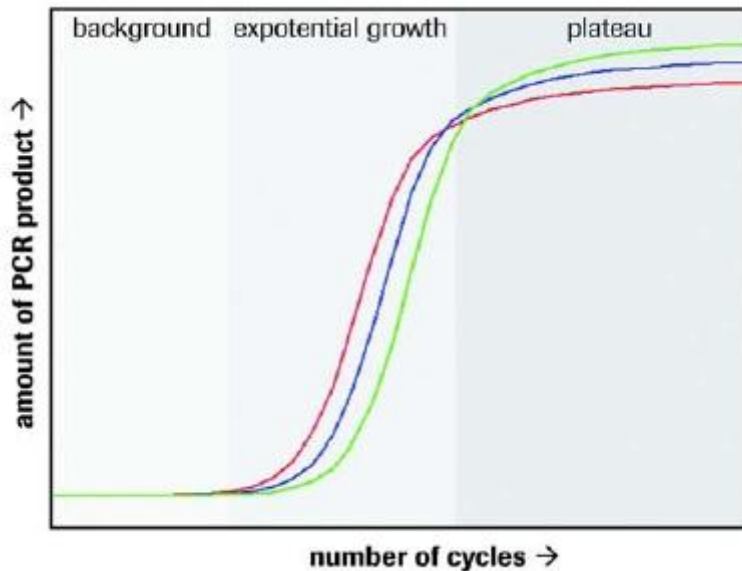
2.7.2. REAL-TIME RT PCR (LIGHTCYCLER LC480, ROCHE APPLIED SCIENCE)

Reverzní transkripce (RT) následovaná polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) je technika analýzy exprese mRNA. Jedná se o vysoce senzitivní techniku, umožňující analýzu vzácných transkriptů a identifikaci malých změn exprese (Pfaffl 2001).

Principem je snímání fluorescence vzorku v každém cyklu PCR a vynesení jeho intenzity do křivky proti číslu cyklu. Počáteční templátová koncentrace koreluje nepřímo až do detekce prvního fluorescenčního signálu. Signál se objeví tím dříve, čím vyšší je koncentrace templátu. Protože PCR produkty rostou exponenciálně, je korelace logaritmická (The Wittwer Lab for DNA Analysis). Když vyneseme

fluorescenci proti číslu cyklu, dostaneme křivku, která se podobá křivce bakteriálního růstu. Rozlišujeme 3 fáze - latentní, exponencionální a plató fázi (Obr. 9).

Obrázek č. 9: Křivka průběhu real-time PCR reakce s oddělenými fázemi



Na ose x je směrem doprava rostoucí počet cyklů, na ose y množství PCR produktu. Převzato z (PCR Applications Manual, Roche).

Latentní fáze končí v době, kdy fluorescence produktu překročí signál pozadí systému. Exponencionální fáze růstu začíná, když je nahromaděné dostatečné množství produktu, které je detekováno nad signálem pozadí a končí v době úpadku efektivity růstu. Během exponencionální fáze platí matematický vzorec popisující nárůst kopií PCR produktu:

$$N_n = N_0 \times (E_{const})^n$$

kde N_n je počet molekul v n cyklu, N_0 je iniciační počet molekul, E_{const} je konstantní efektivita amplifikace a n je počet cyklů.

Exponencionální fáze je obvykle detekována mezi 4 a 40 cyklem. Po exponencionálním růstu dojde k vyčerpávání reakčních komponent a nadchází fáze plató, která je definována vzorcem:

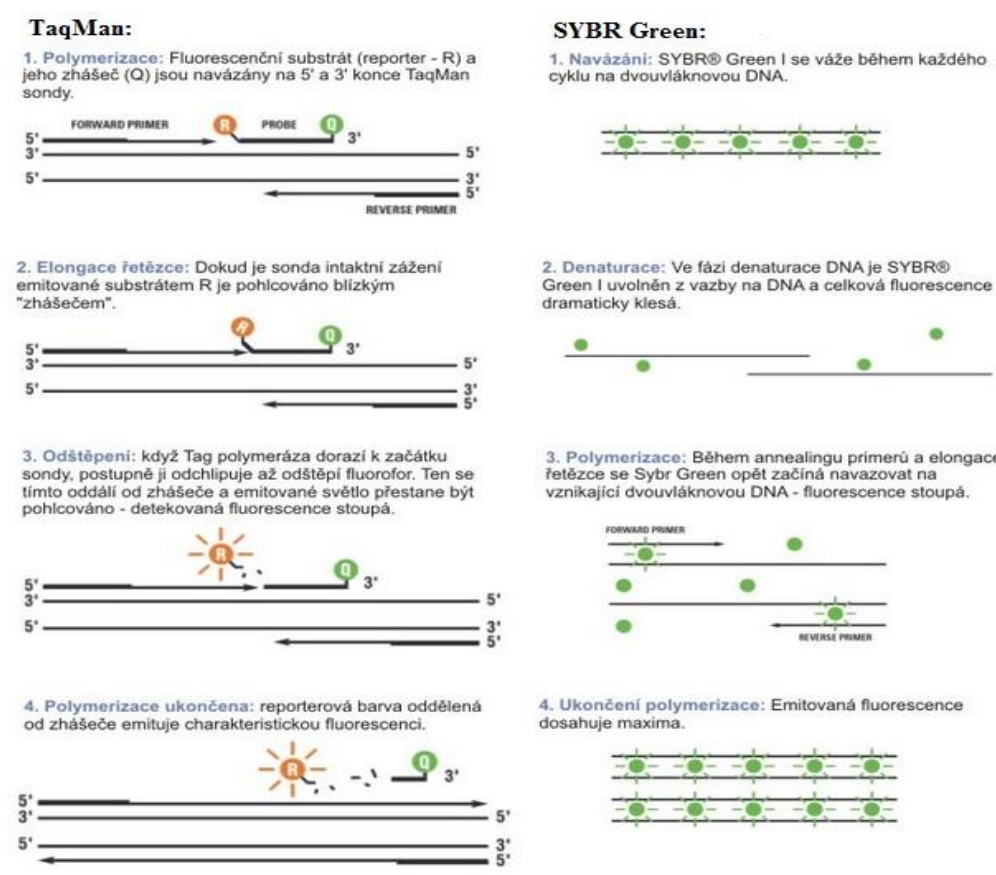
$$N_n = N_0 \times (E_{var})^n$$

Kde E_{var} není znám a N_0 není možno spočítat (PCR Applications Manual, Roche).

Všechny real-time PCR systémy detekují emisi fluorescenčního barviva (fluoroforu) a korelují tento fluorescenční signál s množstvím PCR produktu. K fluorescenční detekci je možné využít sekvenčně specifické próby nebo sekvenčně nezávislou metodu (Obr. 10). Detekce pomocí prób je založena na hybridizaci oligonukleotidových sond s komplementární sekvencí na PCR produktu. Na 5' konci próby je kovalentně vázaný fluorofor a na 3' konci zhášec. Princip je založen na využití 5'-3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy. Množství detekované fluorescence je přímo úměrné množství fluorochromu uvolněné z DNA v reakci (Obr. 10) (Caplin, et al. 1999). Výhodou této metody je specifita ke komplementární sekvenci, kde nemusíme testovat specifitu produktu a nenacházíme výskyt primerových dimerů (PCR Applications Manual, Roche).

Jednodušší a námi užívanou metodou detekce je použití SYBR Green I, fluorescenčního barviva, které se nespecificky váže do dvouvláknové DNA a dochází k detekci narůstající fluorescence v okamžiku vytvoření dsDNA (Morrison, et al. 1998).

Obrázek č. 10: Srovnání detekce pomocí TaqMan sondy a SYBR Greenu



Upraveno dle (Applied Biosystems, 2010).

Při použití Sybr Green I musí být generována křivka tání, pro ověření specifity produktu. Tato analýza se provádí na konci PCR reakce, protože se jedná o separaci komplementárních dvouřetězcových DNA indukovaný postupným zvyšováním teploty. DNA taje nejrychleji v rozsahu teplot, blížíci se tzv. teplotě tání T_m . Systém zaznamenává celkovou fluorescenci v závislosti na změně teploty v reálném čase a generuje nám křivku, která má největší strmost v okolí T_m . Teplota v inflexním bodě křivky se rovná T_m a vyjadřuje se pomocí druhé derivace této křivky, kde se zobrazí jako amplituda. Analýza křivky tání nám také odhalí případnou přítomnost dimerů. (PCR Applications Manual, Roche).

Díky malé velikosti jsou dimery viditelné obvykle před vlastním produktem. Přítomnost nespecifických sekundárních produktů a primerových dimerů nám může snižovat amplifikační efektivitu a snižovat přesnost dat. Dimery navíc mohou limitovat dynamiku rozsahu standardní křivky díky kompetici (Brisson 2000). Další nevýhodou SYBR Green je nespecifita signálu u různě dlouhých produktů a omezené použití pro multiplex PCR (analýza dvou a více odlišných DNA úseků v jedné reakci) (Applied Biosystems, 2002).

Kvantifikace v této metodě zahrnuje determinaci *cp* (*crossing point*). *Cp* označuje cyklus, ve kterém fluorescence překročí signál pozadí a jsou první detekovatelná data. Na křivce je *cp* viditelný jako bod, kdy začne ostře stoupat křivka. Tento bod koresponduje s maximem druhé derivace křivky. *Cp* je automaticky vypočtený softwarem Lightcycler® Carousel-Based systém Roche (PCR Applications Manual, Roche).

Kvantifikace je možná absolutní, založena na kalibrační křivce nebo relativní, kdy se vztahuje k referenčnímu neboli *housekeeping* genu. Za referenční gen můžeme považovat gen, jehož exprese je potvrzena jako stabilní ve sledované tkáni za daných experimentálních podmínek. Vzhledem k tomu, že mnoho studií poukazuje na variabilní expresi v různých experimentálních podmínkách, je nezbytné tento gen stanovit pro konkrétní experiment (Bhatia, et al. 1994; Zhang and Snyder 1992).

V absolutní kvantifikaci je koncentrace prezentována v konkrétních jednotkách (např. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Metoda absolutní kvantifikace používá kalibrační křivku sestavenou z vnějších standardů o známé koncentraci k určení koncentrace neznámého vzorku. Tato metoda poskytuje platné výsledky pouze, pokud standard a neznámý vzorek jsou amplifikovány a detekovány se stejnou efektivitou. Standardy jsou amplifikovány v separátních reakcích, ale ve stejné analýze jako vzorky. Koncentrace zvolené pro

sestavení kalibrační křivky by měly spadat do očekávaného rozmezí koncentrace neznámého vzorku. Pro vyšší přesnost by měla analýza obsahovat dostatečné množství standardů pro zvýšení přesnosti standardní křivky. Metoda absolutní kvantifikace je velmi vhodná ve virologii a mikrobiologii, kde je potřeba určit počet kopií specifického produktu. Pokud používáme dvě fluorescenční sondy, můžeme absolutní kvantifikaci kombinovat s vnitřním standardem tzv. multiplex PCR (PCR Applications Manual, Roche).

V relativní kvantifikaci je cílená koncentrace prezentována jako poměr cílového a referenčního genu. Referenční gen, je neregulovaná oblast nukleové kyseliny, která se nachází za daných podmínek experimentu v konstantní hladině. Relativní kvantifikace odráží rozdíly v kvalitě a kvantitě mezi jednotlivými vzorky (zvířaty), kam můžeme zahrnout například variabilitu zvířat, efektivitu syntézy cDNA nebo i chyby při pipetování (PCR Applications Manual, Roche).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Stanovit vhodný referenční gen pro relativní kvantifikaci mRNA transkriptů v levé komoře srdeční potkana pomocí real-time RT PCR u konplastických kmenů SHR a SHR-mtBN chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na chronickou normobarickou hypoxii.
- Stanovit expresi v levé komoře srdeční potkana u vybraných genů na úrovni mRNA transkriptů, které přímo a nepřímo souvisí s oxidativním stresem a s funkcí mitochondrií. Zjistit případné rozdíly mezi jednotlivými kmeny (SHR vs SHR-mtBN) a v adaptaci na hypoxii.

Sledované geny jsou rozčleněny do 3 skupin:

(1) geny energetického metabolismu přímo související s mitochondriální funkcí,

(Akt1, Akt2, CKmt2, Hk1, Hk2, Cox4i1, Cox4i2, Cs)

(2) geny mitochondriální signalizace a biogeneze,

(Des, Gjal, Dnm1l, Ppargc1, Aldh2, Hif1a, Hif2a)

(3) geny přímo související s oxidativním stresem.

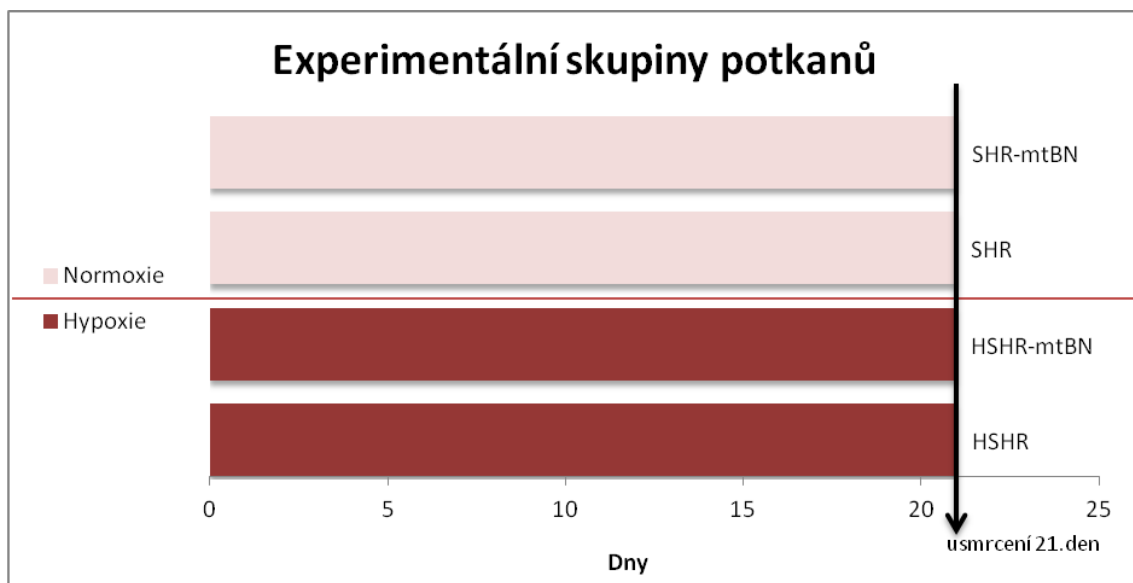
(MaoA, Sod1, Sod2, Txnrd2, Txn2, Prdx3, Prdx5, Aco1, Aco2, Hmox2)

4. MATERIÁL A METODY

4.1. ADAPTACE A ODBĚR VZORKŮ

V této diplomové práci byly použity konplastické kmeny potkanů detailně charakterizované v teoretické části v kapitole 2.2. *Potkan jako modelový organismus* - kmen SHR a SHR-mtBN. Oba kmeny byly adaptovány na hypoxii a tím byly vytvořeny 4 experimentální skupiny, kdy byla kontrolní skupina od každého kmene chována po dobu 21 dní v normoxii a experimentální skupina adaptována v kontinuální normobarické hypoxii odpovídající 5000 m.n.m, dle následujícího schématu (Obr. 11). Počet zvířat v každé skupině byl osm.

Obrázek č. 11: Experimentální skupiny potkanů



SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, H-SHR – spontánně hypertenzní potkan v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii, H-SHR-mtBN - spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii.

Zvířata byla narozena 10. února 2012, adaptace probíhala od 18. dubna do 9. května 2012 po dobu 21 dnů. Na konci adaptace byla všechna zvířata 24 hodin v normoxických podmínkách a následně usmrcena cervikální dislokací. Srdce bylo okamžitě operativně vyjmuto a vloženo do vychlazeného fyziologického roztoku a

ponecháno po několik úderů, aby byla vypuzena zbylá krev. Srdce bylo na ledu rozděleno na jednotlivé části: levá komora, pravá komora a septum. Tyto části byly ihned vhozeny do tekutého dusíku (LN) a zváženy. Levá komora, která byla použita k následujícím experimentům, byla vzhledem ke své vysoké hmotnosti rozstřížena na dvě části. K Real-time RT-PCR analýzám byla použita část levé komory označená jako LV1. Všechny části byly uschovány v LN do doby zpracování. V tabulce č. 3 v přílohouvé části je přehled hmotností zvířat a jednotlivých částí jejich srdce.

4.2. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ A ANALÝZA PCR

Pro veškeré zpracování vzorku byly použity sterilní plasty a originální roztoky pro PCR, byly dodržovány zásady sterilní práce.

4.2.1. HOMOGENIZACE VZORKŮ

Homogenizace vzorků uchovaných v tekutém dusíku (-196°C) byla provedena za podmínek zachovávajících stále velmi nízkou teplotu vzorku, aby nedocházelo k oteplení tkáně a nastartování degradačních mechanismů. Před vlastní homogenizací byly označeny 2ml mikrozkušavky, do kterých byly vloženy 3 malé a 3 velké skleněné kuličky pro budoucí homogenizaci tkáně pomocí MIXER MM200, Retsch a 0,5ml RNazolu. RNazol je činidlo na bázi guanidium chloridu a fenolu užívané k rychlé jednostupňové izolaci RNA z tkáně. Takto připravené mikrozkušavky byly zváženy na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa a byly vychlazeny na ledu. Pro izolaci RNazolem je ideální množství 80 - 120µg tkáně.

V digestoři byla připravena polystyrenová krabice s tekutým dusíkem, do které byly vloženy třecí misky, tloučky, pinzeta a špachtle k vychlazení. Do vychlazené misky s malým obsahem tekutého dusíku byla přenesena svalová tkáň a vychlazeným tloučkem byla rozbita a rozmělněna o stěny misky na jemný prášek. Ten byl ihned převeden do vychlazené 2ml mikrozkušavky s kuličkami a 0,5 ml RNazolu. Tkáň byla ihned zakápnuta dalším 0,5ml RNazolu a provedeno další vážení. Pokud bylo v mikrozkušavce více tkáně než 100 µg, bylo přidáno 0,5ml nebo 1ml RNazolu, které bylo úměrné nadbytku tkáně. Hmotnosti mikrozkušavek v jednotlivých krocích a výpočet množství svalové tkáně jsou uvedeny v tabulce č. 4 v přílohouvé části. Po

zakápnutí RNAzolem byly mikroskopicky dynamicky protřepány v ruce, zcentrifugovány na ruční centrifuze a vráceny zpátky na led.

Homogenizace byla prováděna ve vychlazených kyvetách na homogenizátoru MIXER MM200, Retsch po dobu 10min při frekvenci 30Hz. Poté následovala centrifugace ve vychlazené centrifuze při 11000g po dobu 10min. Získaný supernatant v objemu 1ml byl převeden do nové označené 2ml mikroskopicky a uchován v -80°C do dalšího zpracování.

4.2.2. IZOLACE RNA

K supernatantu (1 ml) z předchozí homogenizace bylo přidáno 400 μ l vody a dynamicky promícháno. Voda užívaná pro PCR je ultračistá dvakrát klávovaná miliporQ voda nebo DEPC (diethyl pyrokarbonát) ošetřená voda firmy Roche nebo Fermentas, dále jen voda. Proběhla 15min inkubace při pokojové teplotě a následná centrifugace 15 min při 12000g. 1ml supernatantu obsahující RNA byl odebrán do nové označené mikroskopicky, kde byla provedena precipitace RNA přidáním 1ml izopropanolu a 10min inkubací. Následovala centrifugace 10min při 12000g v chlazené centrifuze. Poté bylo přidáno 400 μ l 75% ethanolu, který byl čerstvě připravený z destilovaného 96% ethanolu. Mikroskopicky byla lehce promíchána překlopením a centrifugována 2min při 4000g. Vznikla sraženina RNA a ethanol byl odebrán. Postup s přidáním ethanolu byl ještě jednou zopakován. Po konečném odebrání ethanolu se nechaly mikroskopicky minutu vyschnout v termostatickém bloku vyhříváném na 37°, aby došlo k jeho úplnému odpaření. Ke sraženině bylo přidáno 200 μ l vody, ve které se sraženina RNA rozpustila. Ve vzniklém roztoku byla v následujícím kroku měřena čistota a koncentrace RNA.

4.2.3. MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA

Do malých mikroskopicky bylo napipetováno 9 μ l 0,5% SDS (dodecylsulfátsodný) pufru a 1 μ l roztoku s izolovanou RNA, čímž se nám roztok 10x naředil. Vzniklý roztok byl spektrofotometricky analyzován na přístroji Nanodrop proti samotnému SDS, užitému jako blank. Jako měřítko čistoty se používá poměr absorbance při 260 a 280nm, který by se měl pohybovat mezi 2,0 – 2,2 pro čistou RNA. Pokud je číslo nižší, může se jednat o přítomnost látek absorbujících v blízkosti měřené

absorbance, jako například fenoly či proteiny (manual NanoDrop Technologies, 2007). Důležitým faktorem je také pH roztoku, kdy kyselé roztoky mohou poměr snižovat o 0,2 – 0,3 a naopak zásadité tento poměr zvyšovat (Wilfinger, et al. 1997). Nezanedbatelná je také iontová síla roztoků. Výsledky z měření byly použity jako vstupní informace pro reverzní transkripci.

4.2.4. ELEKTROFORÉZA

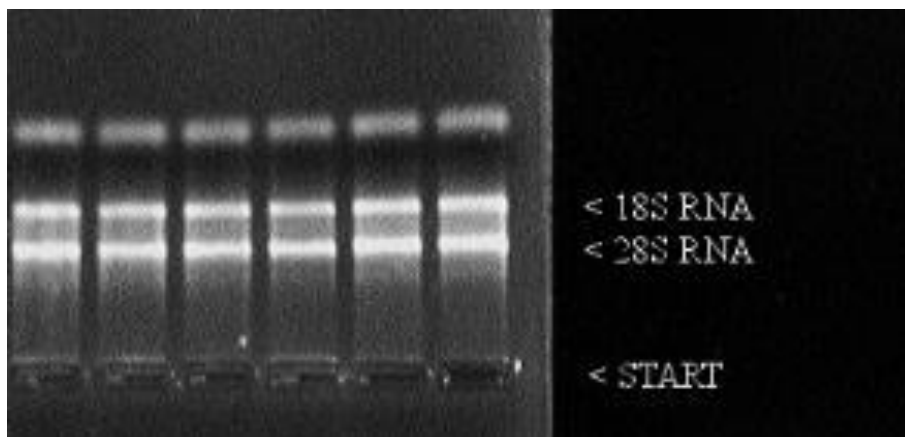
Elektroforéza je separační metoda, která se využívá k dělení látek s odlišnou pohyblivostí ve stejnosměrném elektrickém poli. V našem případě použita jako kontrola čistoty a případné degradace izolované RNA, kde fosfátové skupiny RNA nesoucí záporný náboj umožňují pohyb molekul ke kladnému pólu. Analýza byla prováděna na přístroji pro horizontální gelovou elektroforézu v 1xTAE (Tris base, acetic acid, EDTA) pufru. Byla použita směs LE (*Low Electroendosmosis*) a GTG (*Genetic Technology Grade*) agarózy v koncentraci 1,5%. Do rozpuštěné agarózy byl přidán ethidium bromid pro vizualizaci transiluminátorem.

Koncentrovaný pufr 50xTAE je složen z 40mM TRIS, 20mM kyseliny ledové octové a 2mM Na₂EDTA. Gel byl vyroben rozvařením 125mg LE a 250mg GTG agarózy v 25ml vody s následným přidáním 500μl 50xTAE pufru a 5μl ethidium bromidu. Při teplotě kolem 60°C byl gel nalit na elektroforetickou mističku s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu byl žebříček vyndán, gel byl přelit elektrodovým pufrem a do jamek byly nanášeny vzorky.

Vzorky byly nanášeny ve směsi s nanášecím pufrem („loading buffer“), který obsahuje glycerol a způsobí usazení vzorku na dno jamky. Další složkou nanášecího pufru je bromfenolová modř, která roztok obarví, což umožňuje snadnější nanášení vzorku do gelové jamky. Bylo nanášeno 0,5ug (1ug pouze u první skupiny SHR) RNA na jamku. Nanášky byly spočítány z koncentrace RNA změřené spektrofotometrickým systémem Nanodrop (Tab. 5 v přílohové části).

Zdroj byl nastaven na 80V, bez omezení proudu po dobu 60min. Poté byl gel exponován UV záření v transluminátoru a okometricky zhodnocen. Ukázka agarózového gelu je na obrázku č. 12, kde vidíme 2 typické bandy pro ribozomální podjednotky 28SRNA a 18SRNA. V případě přítomnosti DNA by byl detekován band, který by zůstal na startu v jamce.

Obrázek č. 12: Ukázka elektroforetického agarózového gelu u vybraných vzorků hypoxické skupiny HSHR-mtBN



4.2.5. REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Reverzní transkripce (RT) je posledním krokem před vlastní real-time RT PCR, která kvantitativně převede RNA na cDNA. Abychom docílili co nejpřesnější kvantifikace genové exprese, vnášíme do reakce 1 μg RNA, který je vypočítaný z koncentrace RNA změřené systémem Nanodrop a provádíme RT ve všech skupinách najednou. Přepočet jednotlivých vzorků na množství μl RNA shrnuje tabulka č. 6 v přílohové části. RNA byla ředěna vodou do objemu 11 μl . Následně byl přidán 1 μl oligo (dT)₁₈ a směs byla inkubována 5min při 65°C. Po inkubaci byla ihned zchlazena na ledu. Ke každému vzorku bylo přidáno 7,9 μl premixu, který se skládá z těchto komponent: 4 μl 5X reaction buffer, 0,95 μl Ribolock, 2 μl 10 nM dNTP mix a 0,95 μl H-Minus. Premix byl vytvořen jako jedna směs a následně pipetován po 7,9 μl , aby byly zachovány stejné podmínky pro všechny vzorky. Po přidání premixu byly mikrozkušavky inkubovány při 42°C 60 minut. Reakce byla zastavena 5minutovou inkubací při 70°C a následným zchlazením na ledu. Screening primerů a testování housekeeping genů bylo testováno na cDNA z jedné RT. Pro vyšší výtěžnost cDNA na vlastní analýzu byla provedena dvojitá RT.

4.2.6. REAL TIME RT-PCR

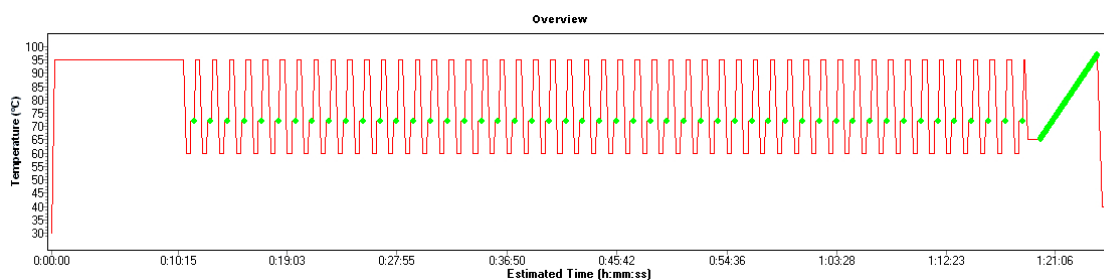
Princip celé metody je uveden v kapitole 2.7.2. *Real-time RT PCR (Lightcycler LC480, Roche Applied Science)*. K vlastní reakci byly použity primery od firmy

Eurogentec, jejichž sekvence a efektivita jsou uvedeny v tabulce č. 33 v přílohouvé části. Primery byly dodány v lyofilizované formě, čištěné odsolením a následně byly naředěny na zásobní koncentraci 500 μM . V této podobě byly uchovány v -20°C . Pro PCR reakci byly oba primery pro daný gen, tzn. levá (L) - forward (F) i pravá- reverse (R) forma, rozředěny na 5 μM . Výsledný roztok pro PCR reakci tedy obsahoval směs pravého i levého primeru v roztoku Premix Sybr Green od firmy Eurogentec a vody. Premix pro celou destičku byl vypočítán z počtu PCR reakcí s patřičnou rezervou. Na každou PCR reakci připadlo: 5 μl Sybr Green premix, 3 μl vody a 1 μl primeru (směs reverse + forward formy), podle návodu Light Cycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche Applied Science).

Před vlastní analýzou byly všechny primery testovány na specifitu produktu pomocí křivky tání, stanovení efektivita z kalibrační křivky a dostatečný odstup negativních kontrol nejméně 10 cp. Byla použita 3bodová kalibrační křivka s ředěním desítkovou soustavou. Kalibrační křivky byly též analyzovány pro každý premix.

Samotná PCR reakce probíhala na cykleru LightCycler $\text{\textcircled{R}}$ 480 Real-Time PCR na 384 jamkové destičce s objemem reakce 10 μl (9 μl premixu + 1 μl cDNA) dle následujícího protokolu. Preinkubace při teplotě 95° po dobu 10 minut s následnými 50 cykly s teplotním profilem: $95^\circ\text{C}/10\text{ sec}$; $60^\circ\text{C}/30\text{ sec}$; $72^\circ\text{C}/1\text{ sec}$. Dále byla v každém protokolu vygenerována křivka tání produktů. Posledním krokem je zchlazení na teplotu 40°C . Změny teploty dokumentuje obrázek č. 13.

Obrázek č. 13: Změny teploty během PCR reakce



Na ose x je časový záznam, na ose y teplota ve stupních Celsia.

Každý vzorek byl na destičce měřen v triplikátech a k výpočtu průměrné hodnoty cp měřeného genu byly použity hodnoty, které nepřesáhly směrodatnou odchylku 0,4. Pro přesný výpočet relativní hodnoty mRNA, byla efektivita jednotlivých primerů počítána ze standardní křivky. Hladina analyzované transkriptu byla

normalizována na hladinu referenčního genu ribozomální podjednotky S18 s ohledem na efektivitu podle vzorce:

$$\text{Normalizované množství} = \frac{(1 + E)^{-C_{\text{referenční transkript}}}}{(1 + E)^{-C_{\text{sledovaný transkript}}}}$$

Upraveno dle (Pfaffl 2004).

Ke statistickému hodnocení dat byl využit software GRAPHPAD Prism6. Data byla analyzována nepárovým neparametrickým Mann-Whitneyho testem, kde počet testovaných zvířat byl n=8 (kromě DRP1, kde jsou u skupiny HSHR testována pouze čtyři). Data hodnotíme na hladině významnosti testu p<0,05.

4.3. TESTOVÁNÍ HOUSEKEEPING GENŮ

Vzhledem ke skutečnosti, že analýzy na srdci v hypoxické adaptaci u těchto konplastických kmenů jsou nové a prozatím téměř nikde nepublikované, byly otestovány možné referenční geny. Byly analyzovány tyto geny: HPRT (*hypoxanthine fosforibozyl transferáza*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-fosfát dehydrogenáza*), B2M (*beta-2 microglobulin*), Cyclophilin, S18 (*ribozomální protein*) a Actin. Tři vybrané kandidátní geny byly po prvním screeningu analyzovány opakovaně za účelem potvrzení reprodukovatelnosti. Po vyhodnocení reprodukovatelnosti, efektivity a stability byl vybrán nejvhodnější housekeeping geny užitý ke kvantifikaci genové exprese.

Každý z vybraných kandidátních genů byl proměřen na všech zvířatech všech experimentálních skupin, tj. na 32 vzorcích. Zároveň byly sestrojeny 3bodové kalibrační křivky a odečteny efektivity. Výstupy z těchto analýz ve formě *cp* byly vloženy do dvou softwarových systémů a vyhodnoceny. Byly použity dva modely výpočtu v softwarovém programu Genex 5.0. Jedná se o model, který vyhodnocuje směrodatnou odchylku (SD, *standard deviation*) mezi všemi měřeními genu (analýza NormFinder) a vyhledá nejstabilnější gen. Druhý model vypočítává střední hodnotu, konkrétně medián (analýza GeNorm) a hledá nejvhodnější kombinaci dvou genů.

5. VÝSLEDKY

Před vlastní analýzou genů, byl zvolen vhodný referenční gen, ke kterému byla vztahována relativní kvantifikace. Při analýze pomocí softwaru NormFinder byly stanoveny nejvhodnější kandidátní geny HPRT, S18 a cyclophilin. Graf č. 1 a 2 v přílohové části nám zobrazuje testované geny v závislosti na směrodatné odchylce a znázorňuje odchylky měření. Tyto 3 geny byly dále testovány na jejich reprodukovatelnost. Výstupem tohoto testování je graf č. 3 v přílohové části, který nám ukazuje vysokou heterogenitu mezi měřeními cyclophilinu a graf č. 4 s důrazem na odchylky měření. HPRT a S18 mají stále podobnou směrodatnou odchylku. HPRT má SD nejnižší (0,0921), ale jedna hodnota ze čtyř se vyskytuje ve vyšších hladinách (0,2409), zatímco S18 má své SD homogenní (0,196; 0,2315; 0,2436; 0,2634), i když s o něco větší odchylkou. Softwarový program GeNorm vyhodnotil ve screeningu housekeeping genů jako nejvhodnější kombinaci HPRT a Cyclophilinu (Graf 5 v přílohové části) a potvrdil heterogenitu cyclophilinu (Graf 6 v přílohové části). Gen pro ribozomální podjednotku S18 byl na třetím místě (Graf 5 v přílohové části). Cyclophilin byl vyloučen na základě heterogenity potvrzené oběma programy. Analýza HPRT transkriptu vykazoval nízkou efektivitu (Tab. 33 v přílohové části), a proto byl nakonec zvolen jako nejvhodnější kandidát gen pro ribozomální podjednotku S18.

Výsledkem vlastní analýzy genů jsou grafy s tabulkou výchozích hodnot, uvedené v přílohové části, dokumentující eventuelní změny genové exprese. Na grafech jsou znázorněné relativní hladiny mRNA vybraných genů u dvou sledovaných kmenů v normoxii (SHR; SHR-mtBN) a jako odpověď na adaptaci na chronickou hypoxii (HSHR; HSHR-mtBN). Výsledky jsou statisticky hodnoceny nepárovým neparametrickým Mann-Whitney testem ($p < 0,05$) a interpretovány jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

Sledované geny jsou rozčleněny do 3 skupin: (1) geny energetického metabolismu, (2) geny mitochondriální signalizace a biogeneze (3) geny antioxidačního systému.

Geny energetického metabolismu

Kvantitativní analýza hladiny mRNA genu *Akt1*, kódujícího stejnojmenný protein AKT1 prokázala rozdíl mezi kmeny v normoxii a v odpovědi na hypoxii u

kmene SHR-mtBN. Signifikantně vyšší hladinu jsme zaznamenali u SHR-mtBN ($0,114 \pm 0,017$) proti SHR ($0,091 \pm 0,013$) v normoxii. V odpovědi na hypoxii u kmene HSHR-mtBN, byl detekován pokles na hodnotu $0,094 \pm 0,011$, který se od HSHR nelišil. U kmene SHR v odpovědi na hypoxii však není významná změna (Tab. 7a, graf. 7b v přílohové části). U její izoformy AKT2 nebyla detekována žádná změna mezi kmeny ani v odpovědi na hypoxii (Tab. 8a, graf 8b v přílohové části). Efekt hypoxie je však potvrzen ve změně exprese genu pro hexokinázu 1 (*Hk1*). V normoxii se u kmene SHR pohybuje na hladině $0,023 \pm 0,005$ a v hypoxii narůstá na hodnotu $0,0032 \pm 0,008$. U kmene SHR-mtBN je také sledován nárůst a to z normoxické hladiny $0,019 \pm 0,005$ na $0,021 \pm 0,008$ (Tab. 9a, graf 9b v přílohové části). Hypoxický efekt je také sledován u izoformy *Hk2*, která odpovídá na hypoxický stimulus následujícím signifikantním zvýšením. Hladina u kmene SHR se zvedá z normoxie $0,008 \pm 0,003$ na hladinu $0,011 \pm 0,003$ v hypoxii. Nárůst je i u kmene SHR-mtBN a to z $0,009 \pm 0,002$ na $0,015 \pm 0,005$. U HK2 můžeme vidět signifikantní rozdíl i mezi kmeny v adaptaci na hypoxii. Kmen HSHR-mtBN má o cca 60% vyšší expresi s vyšším nárůstem v odpovědi na adaptaci než kmen HSHR (Tab. 10a, graf 10b v přílohové části).

Vybrané geny mitochondriální signalizace a biogeneze

U mitochondrií by mohlo dojít k poklesu jejich biogeneze u obou kmenů v hypoxii. Tento pokles naznačuje snížená exprese genu *Ppargc1*, kódujícího protein PGC1. U kmene SHR je viditelný pokles z hladiny $0,048 \pm 0,005$ v normoxii na $0,037 \pm 0,006$ v hypoxii. U kmene SHR-mtBN z $0,051 \pm 0,007$ v normoxii klesá na $0,036 \pm 0,007$ v hypoxii (Tab. 11a, graf 11b v přílohové části). Z dalších mitochondriálních markerů, u kterých nebyla detekována signifikantní změna exprese se stanovovala hladina desminu, konexinu 43 a DRP1. Hladina desminu u kmene SHR v normoxii je $2,207 \pm 0,268$, v hypoxii $2,565 \pm 0,893$. U kmene SHR-mtBN nalzáme normoxické hodnoty $2,246 \pm 0,297$ a hypoxické hodnoty $2,739 \pm 1,139$ (Tab. 12a, graf 12b v přílohové části). Hladina konexinu 43 u kmene SHR má v normoxii hodnotu $0,354 \pm 0,037$, v hypoxii $0,344 \pm 0,060$. Kmen SHR-mtBN v normoxii $0,367 \pm 0,077$ a v hypoxii $0,376 \pm 0,069$ (Tab. 13a, graf 13b v přílohové části). Gen pro DRP1 má v normoxii hladiny mRNA u SHR kmene $0,031 \pm 0,012$, v hypoxii $0,038 \pm 0,004$ a kmen SHR-mtBN v normoxii $0,040 \pm 0,007$, v hypoxii $0,041 \pm 0,006$ (Tab. 14a, graf 14b v přílohové části). Další mitochondriální markery související s Krebsovým cyklem a respiračním řetězce vykazaly určité změny. Jedná se o gen pro citrátsynthásu (CS), u

kteřé byl detekován pokles mRNA v hypoxii u kmene SHR-mtBN a to z $0,174 \pm 0,053$ na $0,096 \pm 0,019$, zatímco u kmene SHR jsou hodnoty v normoxii ($0,151 \pm 0,034$) a v hypoxii ($0,138 \pm 0,033$) bez významné změny (Tab. 15a, graf 15b v přílohové části). Stejně tak zaznamenáváme pokles u první i druhé izofomy mitochondriálně kódované čtvrté podjednotky cytochrom c oxidázy, COX4.1 a COX4.2. U COX4.1 kmene SHR je pokles z $1,947 \pm 0,098$ v normoxii na $1,410 \pm 0,519$ v hypoxii. U kmene SHR-mtBN je zachován stejný trend při normoxických hodnotách $2,045 \pm 0,113$ na hypoxické hodnoty $1,600 \pm 0,150$ (Tab. 16a, graf 16b v přílohové části). U druhé izofomy COX4.2 detekujeme pokles v hypoxii jen u kmene SHR-mtBN a to z $0,009 \pm 0,001$ na $0,007 \pm 0,001$, zatímco u SHR k signifikantní změně nedochází (normoxie $0,009 \pm 0,001$, hypoxie $0,008 \pm 0,002$) (Tab. 17a, graf 17b v přílohové části). Další pokles v adaptaci na hypoxii jsme zaznamenali u mitochondriální kreatinkinázy (CKS). U kmene SHR došlo k poklesu z $1,374 \pm 0,120$ na $1,086 \pm 0,207$ a u kmene SHR-mtBN z normoxické hodnoty $1,427 \pm 0,248$ na $1,078 \pm 0,225$ (Tab. 18a, graf 18b v přílohové části). Jediný gen z měřených mitochondriálních markerů, který zaznamenává v hypoxii vzestup je mitochondriální aldehyd dehydrogenáza (ALDH2). Její hodnota mRNA stoupá v hypoxii u kmene SHR z $0,296 \pm 0,053$ na $0,396 \pm 0,087$. U kmene SHR-mtBN je také viditelný nárůst, avšak pod hranicí významnosti (normoxie $0,323 \pm 0,093$, hypoxie $0,435 \pm 0,113$) (Tab. 19a, graf 19b v přílohové části).

Vybrané geny antioxidačního systému

U genů kódujících proteiny antioxidačního systému sledujeme snížení mRNA v hypoxii u thiredoxinového systému, tedy jak u thiredoxinu 2 (TXN2), tak u thiredoxinreduktázy 2 (TXRD2). TXN2 u kmene SHR klesá v hypoxii z normoxické hladiny $0,137 \pm 0,020$ na hladinu $0,110 \pm 0,018$. U kmene SHR-mtBN je pokles z hodnoty $0,143 \pm 0,014$ na hodnotu $0,097 \pm 0,010$ (Tab. 20a, graf 20b v přílohové části). U TXRD2 je stejný trend. U kmene SHR je pokles z $0,112 \pm 0,014$ na $0,092 \pm 0,014$ a z SHR-mtBN z $0,119 \pm 0,025$ na $0,087 \pm 0,013$ (Tab. 21a, graf 21b v přílohové části). Pokles v odpovědi na hypoxii nacházíme i u peroxiredoxinu 5 (PRX5), u kmene SHR z hodnoty $0,415 \pm 0,044$ na $0,348 \pm 0,033$ a u SHR-mtBN z $0,469 \pm 0,059$ na $0,353 \pm 0,046$ (Tab. 22a, graf 22b v přílohové části). U izofomy PRX3 můžeme sledovat změnu mezi kmeny. V hypoxii se jedná o významný rozdíl, kdy hodnota u HSHR $0,270 \pm 0,062$ je nižší oproti hodnotě HSHR-mtBN ($0,398 \pm 0,070$). Stejný trend v rozdílu mezi kmeny můžeme vidět i v normoxii, avšak pod hladinou významnosti (SHR $0,275 \pm 0,096$, SHR-

mtBN $0,366 \pm 0,076$) (Tab. 23a, graf 23b v přílohové části). Dalšími významnými antioxidantními enzymy jsou superoxid dimutázy (SOD). Zatímco u cytosolické CuSOD zaznamenáváme u obou kmenů pokles v adaptaci (SHR pokles z $1,856 \pm 0,691$ na $1,217 \pm 0,457$, SHR-mtBN pokles z $1,624 \pm 0,149$ na $1,365 \pm 0,086$) (Tab. 24a, graf 24b v přílohové části) u mitochondriální MnSOD nevidíme žádné změny (SHR v normoxii $0,603 \pm 0,052$, v hypoxii $0,541 \pm 0,086$; SHR-mtBN v normoxii $0,635 \pm 0,118$, v hypoxii $0,541 \pm 0,065$) (Tab. 25a, graf 25b v přílohové části). Významný vzestup (cca o 50%) v adaptaci však vidíme u významného producenta ROS a to enzymu monoaminoxidázy (MAOA). U kmene SHR stoupá hladina z hodnoty $0,245 \pm 0,053$ na $0,504 \pm 0,100$ a u kmene SHR-mtBN z hodnoty $0,184 \pm 0,035$ na $0,442 \pm 0,108$ (Tab. 26a, graf 26b v přílohové části). U genu *Cat*, kódujícího protein katalázu vidíme v adaptaci vzestup u kmene SHR-mtBN z hodnoty $0,012 \pm 0,003$ na $0,017 \pm 0,005$, zatímco u kmene SHR není změna (normoxie $0,014 \pm 0,002$, hypoxie $0,013 \pm 0,002$) (Tab. 27a, graf 27b v přílohové části). Zajímavým enzymem ovlivňujícím toxicitu buněk v odpovědi na ROS je akonizáza (ACO). Ani u jedné z jejích izoform není detekována změna. ACO1, udržující homeostázu železa, má u kmene SHR v normoxii hladinu $0,00059 \pm 0,00010$, v hypoxii $0,00063 \pm 0,00014$ a u kmene SHR-mtBN v normoxii $0,00070 \pm 0,00015$ a v hypoxii $0,00062 \pm 0,00012$ (Tab. 28a, graf 28b v přílohové části). ACO2, která má katalytickou účast v Krebsově cyklu má u kmene SHR v normoxii hodnotu $0,282 \pm 0,035$ a v hypoxii $0,236 \pm 0,051$. Kmen SHR-mtBN má v normoxii hodnotu $0,310 \pm 0,061$ a v hypoxii $0,260 \pm 0,040$ (Tab. 29, graf 29b v přílohové části). Posledním představitelem v této skupině je konstitutivně exprimovaná hemoxygenáza (HMOX2), jejíž exprese se snižuje v adaptaci u kmene SHR-mtBN z $0,089 \pm 0,012$ na $0,069 \pm 0,007$, zatímco u kmene SHR je beze změny (normoxie $0,090 \pm 0,008$, hypoxie $0,081 \pm 0,011$) (Tab. 30a, graf 30b v přílohové části).

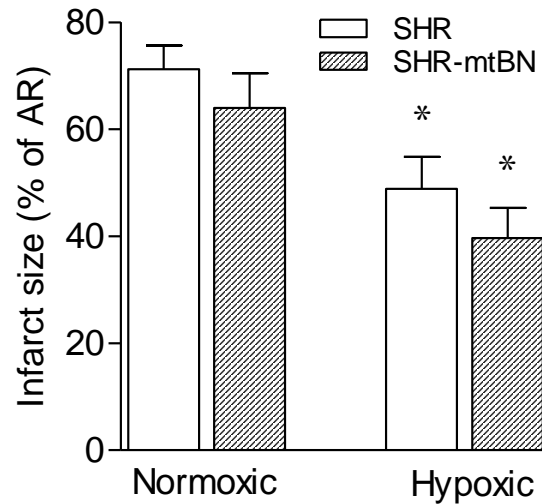
Hypoxická odpověď velkého množství proteinů je pod přímou či nepřímou regulací hypoxií indukovaného faktoru (HIF). U HIF-1 α byl zjištěn v hypoxii očekávaný nárůst u kmene SHR z $0,0007 \pm 0,0001$ na $0,0009 \pm 0,0002$, u kmene SHR-mtBN z $0,0008 \pm 0,0001$ na $0,0012 \pm 0,0002$ (Tab. 31a, graf 31b v přílohové části). Signifikantní rozdíl je i mezi kmeny v hypoxii. Avšak HIF2 se v adaptaci na hypoxii snižuje u obou kmenů. U kmene SHR z $0,164 \pm 0,023$ na $0,139 \pm 0,020$ a u kmene SHR-mtBN z $0,186 \pm 0,023$ na $0,116 \pm 0,020$ (Tab. 32a, graf 32b v přílohové části). V tabulce č. 33 v přílohové části jsou uvedeny sekvence a příslušné efektivy jednotlivých primerů.

6. DISKUZE

Tato diplomová práce měla zjistit významnost mitochondriálního genomu v ischemicko-reperfučním poškození srdce v adaptaci na hypoxii u konplastických kmenů SHR a SHR-mtBN, které byly vyšlechtěny velmi nedávno (Pravenec, et al. 2007). Proto má tato studie charakter screeningu na úrovni mRNA, který by měl přispět k charakteristice rozdílů mezi těmito kmeny a zároveň sledovat odlišnosti v odpovědi těchto kmenů na hypoxii. Byly vytvořeny 4 experimentální skupiny. Jednalo se kmen SHR a SHR-mtBN v normoxii a oba tyto kmeny v adaptaci na 21 dní dlouhou kontinuální chronickou hypoxii navozenou pomocí normobarické hypoxické komory. Laboratorní kmen, BN vykazuje obecně lepší odolnost myokardu, a proto byl jeho mitochondriální genom vnesen do spontánně hypertenzního potkana (SHR) (Baker, et al. 1999). Cílem tohoto pokusu bylo zjištění, zda mitochondriální genom z odolnějšího kmene na pozadí stejného jaderného genomu může mít protektivní vliv. Na začátku je důležité zdůraznit, že se jedná o expresi na úrovni mRNA. Výsledkem analýzy jsou tedy hypotézy. Cesta od mRNA k proteinu a jeho funkci jde přes mnohé posttranslační regulace a modifikace. Vezmeme-li v úvahu komplexitu regulačních kaskád, možnosti modifikací proteinů a jejich funkcí, lze usuzovat pouze na aktivaci transkripčních faktorů příslušných genů a jen velmi obtížně lze určit, jaký dopad má změna v expresi na metabolismus samotný.

Na uvedených konplastických kmenech bylo v Akademii věd České republiky Pavlínou Zajíčkovou prováděno měření velikosti infarktů pod vedením RNDr. Jana Neckáře, PhD. Experimentální skupiny byly stejné jako v této práci. Infarkt myokardu byl navozen podvazem levé koronární arterie a poté byly zhotoveny příčné řezy svalovinou a histochemické obarvení. Výsledky (Graf 33) potvrzují signifikantní zmenšení infarktového ložiska vzhledem k oblasti ohrožení (AR, *area of risk*) u zvířat adaptovaných na hypoxii proti kontrolám, jak u kmene SHR, tak u kmene SHR-mtBN. Jak je patrné na grafu, konplastický kmen SHR-mtBN má tendenci k menšímu infarktovému ložisku i v normoxii, ale tento rozdíl není signifikantní. Tato tendence však napovídá, že by konplastické kmeny SHR-mtBN mohly mít zvýšenou odolnost.

Graf č. 33: Velikost infarktového ložiska u kmene SHR a SHR-mtBN v normoxii a v adaptaci na hypoxii



Velikost infarktového ložiska ve vztahu k oblasti ohrožení (AR), u kmene SHR (spontánně hypertenzního potkana) s SHR-mtBN (spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway) v normoxii a v adaptaci na hypoxii, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny.

Co se týká rozdílů v mRNA genové expresi mezi těmito dvěma testovanými kmeny, vidíme rozdíl jen u několika málo z vybraných genů. Jedním z těchto genů je *Akt1* kódující protein AKT1, který moduluje příjem glukózy do buňky a mimo jiné fosforyluje HK2, která pak zvyšuje odolnost mitochondrií (Miyamoto, et al. 2008). Kmen SHR-mtBN má cca o 20% více mRNA kódující HK2 v normoxickém stavu vzhledem k SHR a v hypoxii se signifikantně snižuje, na rozdíl od kmene SHR, kde zůstává beze změny. Dalšími geny, které zaznamenávají změnu mezi kmeny je HK1, která je v hypoxii o třetinu nižší u kmene SHR-mtBN proti SHR. U kmene SHR dochází v hypoxii k nárůstu HK1 také cca o 1/3, což odpovídá vyšší snaze srdce glykolytického metabolismu v kyslíkové deprivaci. U kmene SHR-mtBN nedochází v hypoxii ke změně. Rozdíl mezi kmeny v hypoxii je i u HK2, která je o cca 30% vyšší u konplastického kmene SHR-mtBN. U obou kmenů je signifikantní nárůst v hypoxii, u SHR-mtBN je však rapidnější. HK2 v hypoxii zvyšuje svou expresi, aby zvýšila efektivitu glykolýzy. Tomu že HK1 se u konplastického kmene v hypoxii nezvyšuje, odpovídá kompenzačně větší zvýšení exprese HK2. Je tedy otázka proč je snížena HK1

v konplastickém kmene. Můžeme usuzovat, že u kmene SHR-mtBN je nižší hladina HK1 v hypoxii kompenzována zvýšenou expresí HK2 a v souvislosti se zvýšenou Akt1 expresí u konplastického kmene SHR-mtBN, to může svědčit o tendenci dosáhnout vyššího příjmu glukózy do kardiomyocytů. Tyto otázky budou předmětem další naší studie. Další gen, který zaznamenává rozdíl mezi kmeny v odpovědi na hypoxii je gen pro HIF-1 α , který je transkripčním faktorem pro HK2. Trankripční faktor pro HK1 u eukaryot, dle našeho šetření, není dosud znám. HIF-1 α exprese je po adaptaci u kmene SHR-mtBN o 25% vyšší než u kmene SHR. Znamenalo by to efektivnější regulaci genů, spadajících do regulační dráhy HIF. U HIF proteinu je ale více vypovídající jeho vlastní transkripční aktivita, která se měří vazbou na DNA než exprese mRNA. Posledním genem, který zaznamenává signifikantní rozdíl v hypoxii mezi kmeny je PRX3. Ten je u SHR-mtBN cca o 30% více exprimovaný než u kmene SHR, což je v souladu s cílovým genem HIF, HK2 i v souladu s upregulací HIF-1 α samotného. U PRX5 je potvrzen motiv ACGTG sekvence HRE v promotoru, který je potenciální vazebné místo pro HIF1, stejně tak je znám další motiv TGACNNNGC sekvence ARE/EpRE (*antioxidant/electrophile response element*), který je potenciálním vazebným místem pro NF-kappa-B a na RARE motiv AGGTSMNNAGWTCR (*Alu-associated retinoic acid-response element*) (Krutilina, et al. 2006). Z toho lze usuzovat, že peroxiredoxiny reagují jak na hypoxii a oxidativní stres, tak na zánětlivou reakci. U PRX3 jsem takto detailní studie nenalezla. PRX3 negativně reguluje apoptózu, což by vypovídalo o lepší obranně tohoto kmene efektivnější redukcí peroxidu vodíku.

Efekt hypoxie způsobuje signifikantní změny u velké škály testovaných genů, které jsou rozděleny do tří skupin: (1) geny energetického metabolismu, (2) Geny mitochondriální signalizace a biogeneze (3) geny antioxidačního systému. Geny energetického metabolismu *Akt1*, *Akt2*, *Hk1* a *Hk2* a jejich změny byly diskutovány již ve výše uvedeném odstavci díky signifikantním změnám mezi kmeny. Co se týká druhé skupiny, genů souvisejících s mitochondriemi, byla stanovena exprese velice důležitého koaktivátoru PGC1, který ovlivňuje celou řadu dalších genů. Exprese genu tohoto koaktivátoru není nijak rozdílná mezi kmeny, ale je zde vidět signifikantní pokles v hypoxii. Tento cca 20% pokles u obou kmenů může naznačovat pokles biogeneze mitochondrií. PGC1 α podporuje remodelaci svalové tkáně ve prospěch oxidativního typu, která je metabolicky více oxidativní a méně glykolytická (Liang and Ward 2006). Pokles nám tedy koreluje se sníženou remodelací na oxidativní typ v závislosti na snížené dodávce kyslíku a se zvýšenou expresí *Hk* za účelem zefektivnění glykolytické

aktivity a aktivaci AKT dráhy pro zvýšení dodávky glukózy. Geny kódující desmin, konexin 43 a DRP1 nemají žádnou signifikantní změnu exprese. Tento fakt nám poukazuje na to, že nedochází k žádnému poškození mitochondrií a ani k výraznému posunutí rovnováhy v procesu *fussion and fission*. MtCK nám v hypoxii u obou kmenů signifikantně klesá o cca 20%, což je pravděpodobně kompenzováno expresí HK. V literatuře je uváděn nárůst mitochondriální CK v odpovědi na anemickou hypoxii (Field, et al. 1994), avšak naše výsledky na kmene Wistar ukazují nárůst po adaptaci na normobarickou hypoxii (nepublikovaná data). První reakce Krebsova cyklu, kdy dochází ke kondenzaci acetylkoenzymu A s oxalátem za vzniku citrátu a koenzymu A je katalyzována enzymem CS. Exprese genu *Cs* se nám významně snižuje v odpovědi na hypoxii u kmene SHR-mtBN o cca 45%, zatímco u kmene SHR zůstává nezměněna. Toto snížení vypovídá o snížení aerobního podílu glykolýzy ve prospěch anerobního režimu a o snížené efektivitě Krebsova cyklu a tudíž snížené dodávce redukčních ekvivalentů. Dochází tedy k útlumu společné metabolické dráhy aerobní oxidace sacharidů, lipidů a proteinů. V souvislosti s dýchacím řetězcem byla stanovena exprese genů pro cytochrom c oxidázu, podjednotku 4, izoformu 1 a 2. U COX4.1 dochází ke snížení exprese o 38% u kmene SHR a o 27% u kmene SHR-mtBN. Izoenzym této podjednotky se podle literatury v hypoxii snižuje, pod kontrolou HIF, díky HIF aktivovaným mitochondriálními protézám LON, které ho degradují. HIF zároveň aktivuje geny kódující COX 4. 2 izoformu, která by měla mít zvýšenou afinitu ke kyslíku. Signifikantní aktivace však byla prokázána pouze v játrech a plicích. U srdce nebyla viditelná významná změna exprese a je pozorována spíše tendence k poklesu (Fukuda 2007), stejně tak jako v naší analýze u kmene SHR. U kmene SHR-mtBN v naší analýze došlo ke snížení o 28%. Dalším mitochondriálním enzymem, který katalyzuje oxidaci aldehydů je druhá izoforma aldehyddehydrogenázy. U ALDH2 zaznamenáváme signifikantní nárůst v hypoxii u kmene SHR o 33%. U kmene SHR-mtBN je také tendence zvyšování v hypoxii, ale bez signifikance. Znamená to tedy, sníženou tvorbu aldehydů v játrech u kmene SHR-mtBN proti SHR v hypoxii, což by nasvědčovalo jistému zlepšení kondice metabolismu u kmene SHR-mtBN (Crabb, et al. 2004). Aldehydy jsou intermediáty glykolýzy a ALDH je oxiduje na karboxylové kyseliny, současně jsou však v srdci metabolizovány aldehydy vznikající v játrech při detoxikačních reakcích. Vzhledem k tomu, že játra jsou též vysoce oxidativní orgán, může být jejich metabolismus zasažen hypoxií.

Thioredoxinový systém, který tvoří thioredoxin a thioredoxinreduktáza, je signifikantně snížen u obou kmenů v odpovědi na adaptaci. Snížená exprese thioredoxinu o 20% u SHR a o 33% u SHR-mtBN může být odpovědí na snížení thioredoxinreduktázy, u SHR o 18% a SHR-mtBN o 17%. Efekt thioredoxinu se neodvíjí jen od jeho exprese, ale i od stavu ve kterém se nachází (oxidovaný/redukovaný). Podle literatury je redoxní stav modulován hypoxií a je nezávislý na tvorbě ROS (Muniyappa, et al. 2009). Thioredoxinový systém redukuje ROS a inhibuje proapoptotické bílkoviny (Tonissen and G 2009). Jeho snížená exprese by tedy mohla znamenat menší ochranou reakci nebo nedostatečnou stimulaci produkcí ROS (tomu ale odporuje literatura, uvádějící nezávislost na ROS). Snížená aktivita reduktázy umožňuje zvýšení produkce ROS. Thioredoxin v redukované formě redukuje peroxiredoxin, který redukuje peroxid vodíku. Peroxiredoxin 5, který je mitochondriálně lokalizován, má v hypoxii také signifikantně sníženou expresi u obou kmenů v této práci. Toto snížení koreluje se snížením aktivity thioredoxinového systému, díky jejich provázanosti se sníženou funkcí tohoto antioxidačního systému u sledovaných kmenů. Tyto výsledky jsou v souladu se snížením transkripčního faktoru PGC1 v hypoxii, jehož jsou peroxiredoxiny cílovými geny. Avšak na další izoformě peroxiredoxinu 3 nepozorujeme žádné signifikantní změny v odpovědi na hypoxii. Lu a kol. ukázali, že delece genu pro PGC1 nevedl ke změně exprese PRX3 na úrovni mRNA, zatímco u PRX5 je detekován signifikantní pokles (Lu, et al. 2010). Tento efekt by mohl tedy znamenat, že PRX3 je na PGC1 méně závislý než PRX5 a mohl by být regulován dalšími mechanismy. Naše výsledky tedy potvrzují výše uvedenou studii, kdy pozorujeme u PRX3 výše popsáný rozdíl mezi kmeny v hypoxii, kdy SHR-mtBN má tendenci ke zvýšení oproti SHR v normoxii a v hypoxii dochází u HSHR-mtBN k signifikantnímu zvýšení oproti HSHR. Tato vyšší exprese by mohla vypovídat o zlepšení antioxidační kapacity u konplastického kmene SHR-mtBN oproti kmeni SHR. Dalšími antioxidačními enzymy jsou superoxidismutázy. Tyto enzymy katalyzují přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a obě vnitrobuněčné izoformy jsou považovány za cílový gen HIF-2a (Scortegagna, et al. 2003). Exprese cytoplazmatické CuSOD je v hypoxii snížena ve shodě se svým transkripčním faktorem. Toto snížení by mohlo odpovídat opět snížené ochraně před ROS a nebo také odpověď na nižší koncentraci ROS. ROS jsou produkovány enzymem MaoA na vnější mitochondriálně membráně, který má u obou kmenů cca 100% nárůst v expresi v hypoxii. Toto zvýšení by mohlo znamenat zároveň i zvýšenou produkci ROS a z toho důvodu je nutná otázka,

kteří antioxidantní systémy zde udržují redoxní rovnováhu. MnSOD, která se vyskytuje v mitochondriální matrix a má stejnou funkci má svou expresi nezměněnou. HMOX2, která reguluje koncentraci NADPH v buňce a rozhoduje o antioxidantní metabolické ochraně se nám u kmene SHR-mtBN také snižuje po adaptaci na hypoxii. Toto by opět mohlo souviset se sníženou antioxidantní kapacitou obou kmenů, o něco více však postihující kmen SHR-mtBN. Další enzymy s antioxidantní funkcí, které nevykazují žádné změny v mRNA expresi, jsou izoformy akonitázy. Cytosolická ACO1 udržuje především homeostázu iontů železa, zatímco ACO2 mění citrát na isocitrát přes intermediát cis-akonitát, katalyzuje druhý krok Krebsova cyklu. Významným antioxidantem se stává kataláza, která je zvýšená v hypoxii u kmene SHR-mtBN o cca 40%. Kataláza, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu, nám tedy ukazuje směr antioxidantních mechanismů, které jsou indukovány. Jedná se tedy o efektivní degradaci peroxidu vodíku (produkt SOD) a negativní regulaci apoptózy. Zvýšená exprese katalázy v hypoxii koreluje se zvýšenou expresí monoaminoxidázy v hypoxii. Znamenalo by to buněčnou reakci na oxidační stres a jeho účinné zvládnutí buňkou. Zvýšení MaoA může zvyšovat hladinu aldehydu v kardiomyocytech, na které reaguje *Aldh2* zvýšením své exprese.

V adaptaci na hypoxii je samozřejmě velmi důležitý HIF, který reguluje expresi většiny genů v odpovědi na dostupnost kyslíku. mRNA exprese HIF-1 α , regulovaného hypoxií, se nám v adaptaci zvyšuje podle předpokladu u kmene SHR o cca 30% a u kmene SHR-mtBN až o 50%. Exprese genu pro HIF-2 se nám v hypoxii překvapivě snižuje a to u kmene SHR o 20% a u kmene SHR-mtBN o 38%. HIF-1 velmi dobře koreluje s poklesem PGC1 v hypoxii, který je negativně regulován právě HIF. Mezi cílové geny HIF-2 se řadí PRX3, cytosolické izoformy SOD i kataláza (Bertout 2009). Snížená odpověď exprese těchto antioxidantů je v souladu se sníženou expresí HIF-2. Na druhé straně rostoucí exprese HK2 je v souladu se zvýšenou expresí HIF-1, jehož je cílovým genem.

Na stejných experimentálních skupinách byly prováděny analýzy Romanou Weissovou, studentkou navazujícího magisterského oboru buněčné biologie PřFUK pod vedením Doc. RNDr. Martina Kalouse, CSc. Jednalo se o kvantitativní proteinové analýzy pomocí Western blotu a analýzy enzymové aktivity. V přílohové části jsou uvedeny grafy proteinů, které byly zároveň analyzovány metodou real-time RT PCR v této práci, abychom mohli získat vyšší výpovědní hodnotu. Jak můžeme vidět na grafu č. 33 v přílohové části, aktivita CS je u obou kmenů v obou experimentálních

podmínkách velmi podobná. Stejně tak nezaznamenáváme rozdíl v aktivitě u celkové cytochrom c oxidázy (Graf č. 34 v přílohové části).

Co se týká kvantifikace proteinů, v hypoxii je signifikantní pokles Cu/ZnSOD v hypoxii u kmene SHR-mtBN (Graf 35 v přílohové části), který koreluje s poklesem genové exprese. V analýze pomocí real-time PCR nám klesá signifikantně v hypoxii i u kmene SHR. U proteinové analýzy je tento pokles také patrný, ale není statisticky významný. MnSOD nevykazuje žádné významné změny jak v kvantitě proteinu (Graf 36 v přílohové části), tak v expresi. Dalším kvantifikovaným proteinem je kataláza, u které v hypoxii detekujeme velmi výrazný vzestup u obou kmenů na proteinu (Graf 37 v přílohové části), zatímco v expresi mRNA se nám zvyšuje pouze u kmene SHR-mtBN. Z toho plyne, že se zde uplatňují ještě jiné regulační mechanismy než pouze na úrovni transkripce, např. posttranslační modifikace či inhibice degradace atd. Pomocí western blotu byly analyzovány všechny podjednotky komplexů oxidační fosforylace (Graf 38 v přílohové části). Pro nás je velmi zajímavý pokles COX4, zaznamenaný protilátkou proti oběma izoformám, COX4.1 i CO4.2 v hypoxii. Stejný pokles zaznamenáváme na mRNA expresi u obou COX izoform separátně. V proteinové analýze byla samostatně zpracována mitochondriálně kódovaná podjednotka COX4.1, která pokles také potvrzuje.

7. ZÁVĚR

Práce je součástí rozsáhlého projektu zaměřeného na studium kardioprotektivních mechanismů vyvolaných adaptací na chronickou hypoxii a je výsledkem spolupráce přírodovědecké fakulty s oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR. Na konplastickém kmene hypertenzního potkana SHR-mtBN, který je nositelem mitochondriálního genomu z velmi odolného normotenzního kmene BN a jeho kontrole SHR, byla stanovena hladina mRNA transkriptů genů, které reprezentují tři základní skupiny. Do první skupiny byly zařazeny vybrané geny energetického metabolismu přímo související s mitochondriálním metabolismem, kde bylo zjištěno, že mtCK, která je velmi citlivá na oxidativní stres, se mezi kmeny neliší a po adaptaci na hypoxii klesá. Zdá se, že její funkce přímé dodávky ADP pro komplex V respiračního řetězce, která brání nadměrné tvorbě ROS, je kompenzována narůstající expresí hexokinázy po této adaptaci, která plní stejnou funkci pokud je vázána na vnější membránu mitochondrií. Zde je zajímavý nálezn, ve kterém se kmeny liší. Zatímco SHR kompenzuje mtCK deficit v hypoxii výrazným zvýšením izofomy HK1, konplastický kmen SHR-mtBN zvyšuje HK2. Vzhledem k odlišné funkci a regulaci těchto izoforem, se budeme touto skutečností dále zabývat. V souladu s tímto nálezem má SHR-mtBN vyšší expresi AKT1, která HK2 fosforyluje a přes dráhu mTOR – HIF-1 může regulovat i jeho expresi. Výsledky získané ve druhé sledované skupině genů, která se zabývala oxidativním stresem jsme zjistili, že výrazně roste mRNA transkript producenta volných radikálů MaoA v obou kmenech. Tento nárůst jsme u normotenzních potkanů nikdy nepozorovali. Avšak jediné antioxidanty, z námi zvolených genů, které odpovídají na tuto zvýšenou produkci ROS zvýšením mRNA, je PRX3 a CAT po adaptaci na hypoxii u konplastického kmene SHR-mtBN. Ve výše zmíněných skupinách genů tedy pozorujeme určité posílení antioxidační ochrany pomocí HK2, PRX3 a CAT u konplastického kmene SHR-mtBN v levé komoře srdeční. Třetí skupina zahrnovala vybrané transkripty genů pro mitochondriální signalizaci a biogenezi v hypoxii. Z těchto výsledků vyplývá, že nedochází k žádným výrazným změnám na úrovni komunikace mitochondrií, avšak svědčí o mírném snížení mitochondriální biogeneze v hypoxii, na kterou usuzujeme z poklesu PGC1 a snížené COX4.1 a COX4.2 respiračního řetězce. Avšak je třeba zmínit, že CS se nesnížila. Co se týká indukce transkripce izoforem HIF v hypoxii, došlo k vyššímu nárůstu HIF-1a u SHR-mtBN, avšak k poklesu HIF-2a u obou kmenů, což považujeme za zajímavý nálezn, který bude

předmětem dalšího studia. Závěrem lze říci, že manifestace „zdravého“ mitochondriálního genomu na pozadí genetických změn u hypertenzního kmene SHR, přineslo zajímavé výsledky, které naznačují pozitivní změny v signálních drahách souvisejících s posílením mechanismů antioxidační ochrany mitochondrií. Zde je nutné zdůraznit, že se nejedná se o geny kódované mtDNA a z toho usuzujeme na přímý vliv kondice mitochondrií, které jsou hlavními producenty ROS v kardiomyocytech, na signální dráhy buněčné adaptace a ochrany.

8. PŘÍLOHOVÁ ČÁST

Tabulka č. 3: Hmotnosti zvířat a jednotlivých částí srdce.

	Zvířata	BW [g]	RV [mg]	S [mg]	LV [mg]	LV1 [mg]	LV2 [mg]
SHR	SHR1	298	178	227	551	245	306
	SHR2	308	194	232	580	181	399
	SHR3	319	208	262	569	251	318
	SHR4	292	203	230	519	212	307
	SHR5	307	179	237	566	227	339
	SHR6	298	166	216	609	263	346
	SHR7	319	188	216	626	239	387
	SHR8	300	179	216	552	237	315
Hypoxie SHR	HSHR1	274	392	244	581	242	339
	HSHR2	260	405	237	572	247	325
	HSHR3	288	382	233	631	261	370
	HSHR4	275	393	227	598	293	305
	HSHR5	250	350	212	585	255	330
	HSHR6	244	330	226	538	271	267
	HSHR7	260	381	232	614	269	345
	HSHR8	255	389	204	610	245	365
SHR-mtBN	SHR-mtBN1	270	172	242	582	239	343
	SHR-mtBN2	284	163	225	544	223	321
	SHR-mtBN3	251	139	206	568	207	361
	SHR-mtBN4	264	189	234	591	260	331
	SHR-mtBN5	273	143	177	639	302	337
	SHR-mtBN6	269	175	209	563	252	311
	SHR-mtBN7	272	180	228	556	220	336
	SHR-mtBN8	266	180	237	557	214	343
Hypoxie SHR-mtBN	HSHR-mtBN1	232	379	203	552	243	309
	HSHR-mtBN2	214	332	228	546	293	253
	HSHR-mtBN3	229	346	228	538	236	302
	HSHR-mtBN4	245	368	215	669	328	341
	HSHR-mtBN5	199	376	210	488	235	253
	HSHR-mtBN6	259	389	246	598	293	305
	HSHR-mtBN7	213	309	185	496	244	252
	HSHR-mtBN8	232	327	207	595	240	355

BW (*Body weight*)- váha zvířete; RV (*Right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*Left ventricle*) – levá komora. SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, HSHR – spontánně hypertenzní potkan v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii, HSHR-mtBN - spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii.

Tabulka č. 4: Hmotnosti eppendorfek a výpočet hmotnosti svalu

Číslo vzorku	ID vz	m1[g] (epp + kuličky + 0,5ml Trizolu)	m2[g] (epp + kuličky + 1 ml Trizolu + sval)	m tkáně [mg] ((m2-m1-0,556)*1000)	+ ml RNazol
1	SHR1	1,8136	2,4510	81,40	
2	SHR2	1,7918	2,4330	85,20	
3	SHR3	1,7987	2,4580	103,30	
4	SHR4	1,8112	2,4740	106,80	
5	SHR5	1,7823	2,4653	127,00	300
6	SHR6	1,7578	2,4400	126,20	300
7	SHR7	1,7763	2,4512	118,90	
8	SHR8	1,7779	2,4275	93,60	
9	HSHR1	1,7800	2,4536	117,63	200
10	HSHR2	1,8017	2,4780	120,27	200
11	HSHR3	1,7853	2,4870	145,66	500
12	HSHR4	1,7474	2,4456	142,15	500
13	HSHR5	1,7693	2,4427	117,40	
14	HSHR6	1,7804	2,4595	123,14	200
15	HSHR7	1,7571	2,4668	153,73	500
16	HSHR8	1,8169	2,4998	126,93	200
17	SHR-mtBN1	1,7682	2,4234	99,21	
18	SHR-mtBN2	1,7970	2,4820	129,03	300
19	SHR-mtBN3	1,7585	2,4237	109,21	
20	SHR-mtBN4	1,8040	2,5077	147,72	500
21	SHR-mtBN5	1,7989	2,4507	95,76	
22	SHR-mtBN6	1,7822	2,4402	102,02	
23	SHR-mtBN7	1,7681	2,4323	108,15	
24	SHR-mtBN8	1,7572	2,4480	134,82	300
25	HSHR-mtBN1	1,8015	2,4684	110,87	
26	HSHR-mtBN2	1,7742	2,5045	174,30	600
27	HSHR-mtBN3	1,7370	2,3766	83,62	
28	HSHR-mtBN4	1,7688	2,4425	117,68	
29	HSHR-mtBN5	1,7688	2,4115	86,74	
30	HSHR-mtBN6	1,7051	2,4242	163,10	600
31	HSHR-mtBN7	1,7859	2,4611	119,18	
32	HSHR-mtBN8	1,7924	2,4400	91,63	

pozn.: 0,5ml RNazolu = 0,556g

SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, HSHR – spontánně hypertenzní potkan v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii, HSHR-mtBN - spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii.

Tabulka č. 5: Nanáška RNA a pufru na agarózový gel

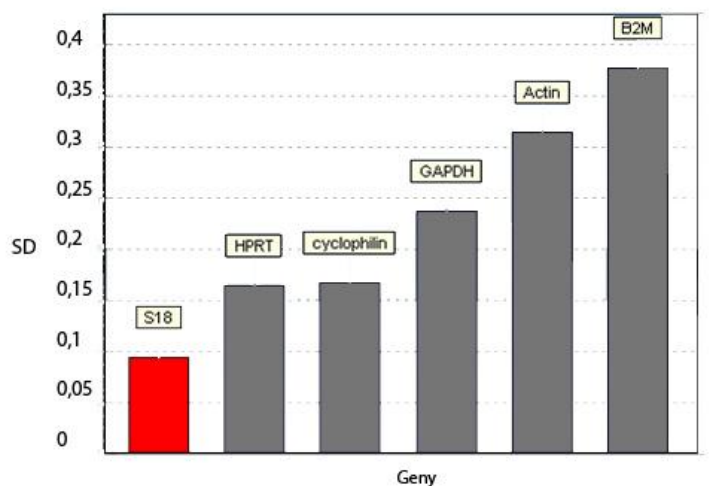
Číslo vzorku	Sample ID	kolik ul RNA do reakce (1ug)	nanáška RNA na gel [ul]	nanášk a pufru 6xkonc	total volume [ul]	
1	SHR1	1,9	1,9	1	2,9	nanáška 1ug + 1 ul pufru
2	SHR2	1,7	1,7	1	2,7	
3	SHR3	1,6	1,6	1	2,6	
4	SHR4	1,7	1,7	1	2,7	
5	SHR5	1,5	1,5	1	2,5	
6	SHR6	1,9	1,9	1	2,9	
7	SHR7	1,3	1,3	1	2,3	
8	SHR8	1,6	1,6	1	2,6	
9	HSHR1	1,4	0,7	1,5	2,2	nanáška 0,5 ug RNA + 1,5 ul pufru
10	HSHR2	2,3	1,1	1,5	2,6	
11	HSHR3	1,9	0,9	1,5	2,4	
12	HSHR4	1,3	0,7	1,5	2,2	
13	HSHR5	1,4	0,7	1,5	2,2	
14	HSHR6	2,3	1,2	1,5	2,7	
15	HSHR7	1,3	0,6	1,5	2,1	
16	HSHR8	1,6	0,8	1,5	2,3	
17	SHR-mtBN1	1,9	1,0	1,5	2,5	nanáška 0,5 ug RNA + 1,5 ul pufru
18	SHR-mtBN2	1,6	0,8	1,5	2,3	
19	SHR-mtBN3	1,9	1,0	1,5	2,5	
20	SHR-mtBN4	2,1	1,1	1,5	2,6	
21	SHR-mtBN5	2,4	1,2	1,5	2,7	
22	SHR-mtBN6	1,4	0,7	1,5	2,2	
23	SHR-mtBN7	1,7	0,8	1,5	2,3	
24	SHR-mtBN8	3,2	1,6	1,5	3,1	
25	HSHR-mtBN1	1,3	0,6	1,5	2,1	nanáška 0,5 ug RNA + 1,5 ul pufru
26	HSHR-mtBN2	2,3	1,1	1,5	2,6	
27	HSHR-mtBN3	1,8	0,9	1,5	2,4	
28	HSHR-mtBN4	1,8	0,9	1,5	2,4	
29	HSHR-mtBN5	1,6	0,8	1,5	2,3	
30	HSHR-mtBN6	2,0	1,0	1,5	2,5	
31	HSHR-mtBN7	1,4	0,7	1,5	2,2	
32	HSHR-mtBN8	1,6	0,8	1,5	2,3	

SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, HSHR – spontánně hypertentní potkan v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii, HSHR-mtBN - spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii.

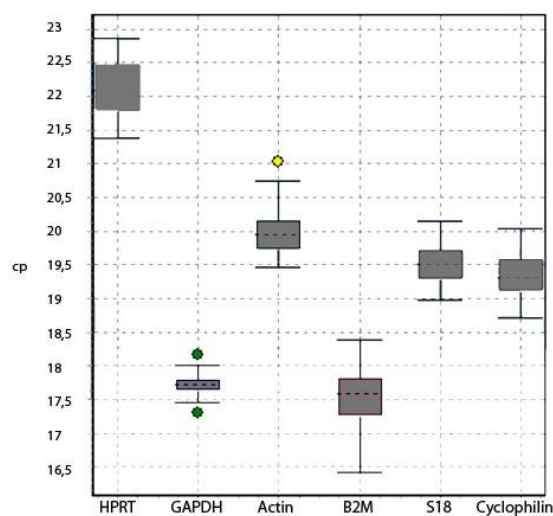
Tabulka č. 6: Výpočet množství RNA vstupujícího do RT

Číslo vzorku	260/280	Sample ID	ug/ul	x 10 [ug/ul]	kolik ul RNA do reakce (1ug)	ul H ₂ O	2x RNA	2x voda
1	2,11	SHR1	0,0539	0,54	1,9	9,1	3,7	18,3
2	2,14	SHR2	0,0576	0,58	1,7	9,3	3,5	18,5
3	2,10	SHR3	0,0618	0,62	1,6	9,4	3,2	18,8
4	2,11	SHR4	0,0600	0,60	1,7	9,3	3,3	18,7
5	2,05	SHR5	0,0665	0,67	1,5	9,5	3,0	19,0
6	2,05	SHR6	0,0534	0,53	1,9	9,1	3,7	18,3
7	2,13	SHR7	0,0747	0,75	1,3	9,7	2,7	19,3
8	2,10	SHR8	0,0625	0,63	1,6	9,4	3,2	18,8
9	2,10	HSHR1	0,0714	0,71	1,4	9,6	2,8	19,2
10	2,26	HSHR2	0,0435	0,44	2,3	8,7	4,6	17,4
11	2,00	HSHR3	0,0534	0,53	1,9	9,1	3,7	18,3
12	2,12	HSHR4	0,0745	0,75	1,3	9,7	2,7	19,3
13	2,12	HSHR5	0,0713	0,71	1,4	9,6	2,8	19,2
14	2,25	HSHR6	0,0427	0,43	2,3	8,7	4,7	17,3
15	2,08	HSHR7	0,0791	0,79	1,3	9,7	2,5	19,5
16	2,16	HSHR8	0,0613	0,61	1,6	9,4	3,3	18,7
17	2,17	SHR-mtBN1	0,0523	0,52	1,9	9,1	3,8	18,2
18	2,17	SHR-mtBN2	0,0621	0,62	1,6	9,4	3,2	18,8
19	2,02	SHR-mtBN3	0,0515	0,52	1,9	9,1	3,9	18,1
20	2,14	SHR-mtBN4	0,0472	0,47	2,1	8,9	4,2	17,8
21	2,20	SHR-mtBN5	0,0415	0,42	2,4	8,6	4,8	17,2
22	2,18	SHR-mtBN6	0,0705	0,71	1,4	9,6	2,8	19,2
23	2,19	SHR-mtBN7	0,0599	0,60	1,7	9,3	3,3	18,7
24	1,90	SHR-mtBN8	0,0308	0,31	3,2	7,8	6,5	15,5
25	2,19	HSHR-mtBN1	0,0775	0,78	1,3	9,7	2,6	19,4
26	2,39	HSHR-mtBN2	0,0442	0,44	2,3	8,7	4,5	17,5
27	2,30	HSHR-mtBN3	0,0557	0,56	1,8	9,2	3,6	18,4
28	2,14	HSHR-mtBN4	0,0564	0,56	1,8	9,2	3,5	18,5
29	2,13	HSHR-mtBN5	0,0635	0,64	1,6	9,4	3,1	18,9
30	2,00	HSHR-mtBN6	0,0490	0,49	2,0	9,0	4,1	17,9
31	2,15	HSHR-mtBN7	0,0702	0,70	1,4	9,6	2,8	19,2
32	2,16	HSHR-mtBN8	0,0632	0,63	1,6	9,4	3,2	18,8

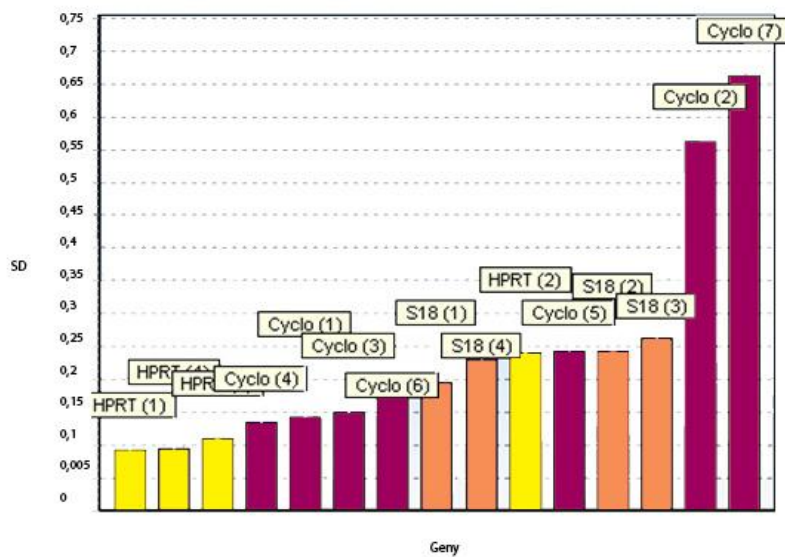
SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, HSHR – spontánně hypertenzní potkan v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii, HSHR-mtBN - spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway v adaptaci na kontinuální chronickou hypoxii.

Graf č. 1: Testované housekeeping geny (NormFinder)

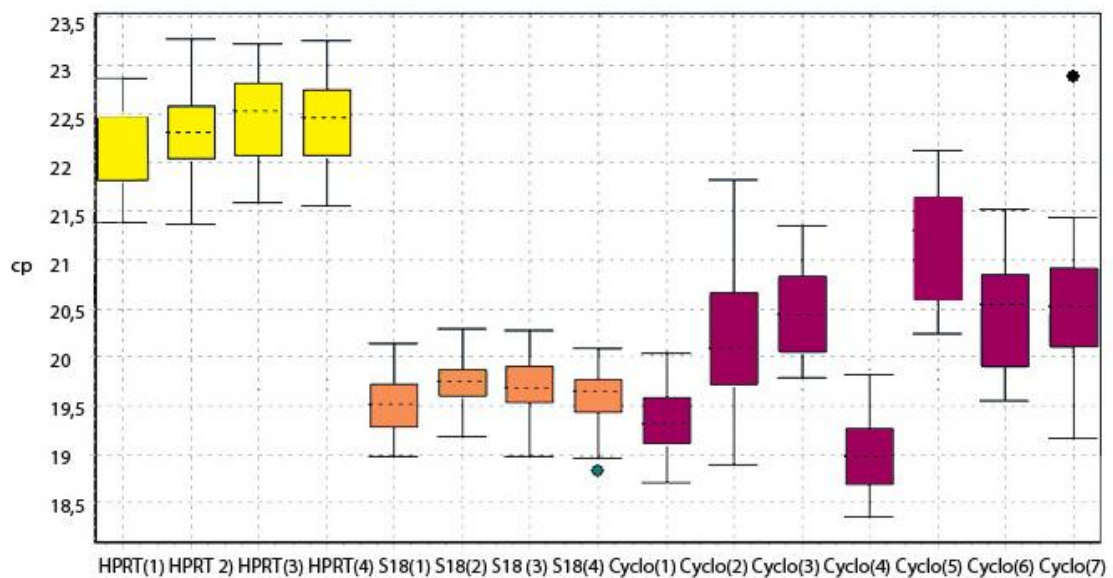
Na ose x máme jednotlivé geny a na ose y hodnotu směrodatné odchylky.

Graf č. 2: Testované housekeeping geny s grafickým znázorněním odchylek (NormFinder)

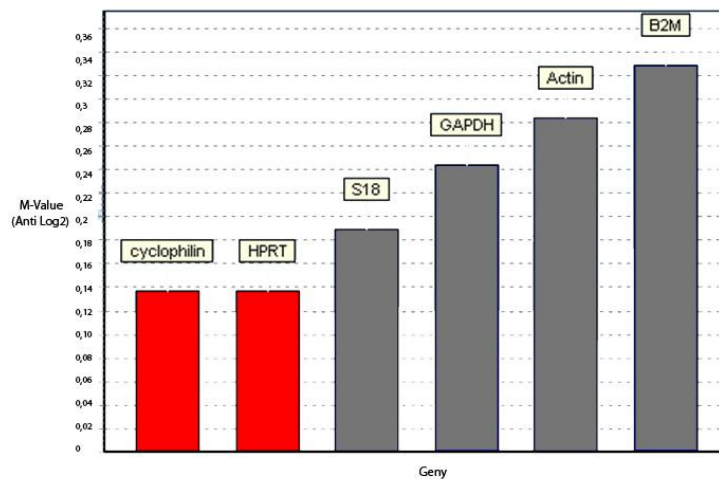
Na ose x máme názvy měřených genů, na ose y *cp* daného genu. Hranice barevného sloupce jsou dány 25% a 75% percentilem a jeho střed určuje hodnota mediánu. Minimální a maximální hodnoty jsou graficky znázorněny tzv. „fousků“ (*whiskers*). Barevné body nad a pod minimálními a maximálními hodnotami zobrazují extrémně odlehle hodnoty.

Graf č. 3: Reprodukovatelnost měření (NormFinder)

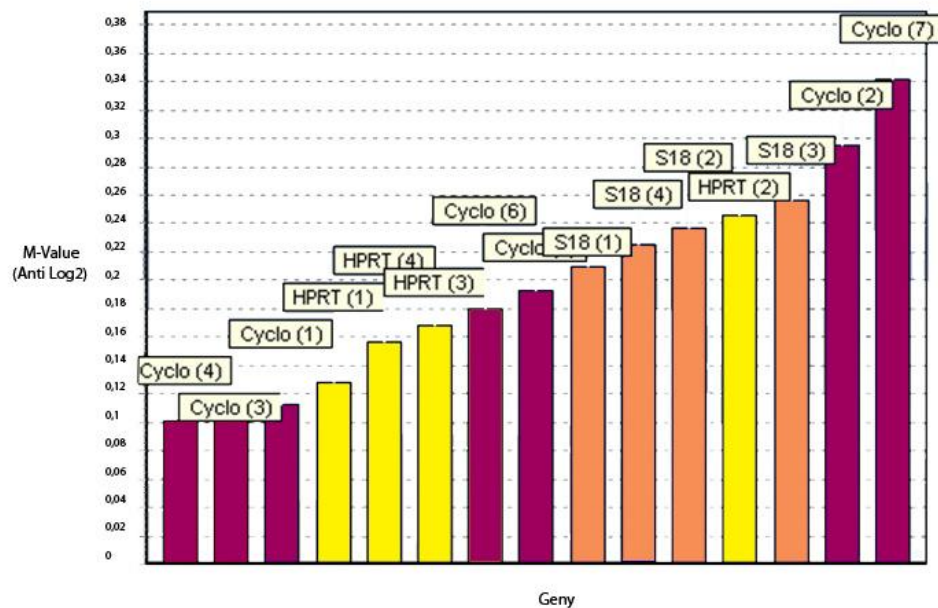
Na ose x máme jednotlivé geny (čísla v závorce znázorňují počet měření jednotlivého genu) a na ose y hodnotu směrodatné odchylky.

Graf č. 4: Reprodukovatelnost jednotlivých měření s grafickým znázorněním odchylek (NormFinder).

Na ose x máme názvy měřených genů, na ose y cp daného genu. Hranice barevného sloupce jsou dány 25% a 75% percentilem a jeho střed určuje hodnota mediánu. Minimální a maximální hodnoty jsou graficky znázorněny tzv. „fousků“ (*whiskers*). Barevné body nad a pod minimálními a maximálními hodnotami zobrazují extrémně odlehle hodnoty.

Graf č. 5: Screening housekeeping genů (GeNorm)

Na ose x máme jednotlivé testované geny a na ose y odchylku mezi jednotlivými měřeními prezentované střední hodnotou.

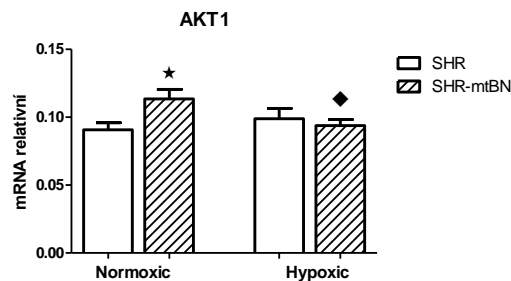
Graf č. 6: Reprodukovatelnost měření (GeNorm)

Na ose x máme jednotlivé geny (čísla v závorce znázorňují počet měření jednotlivého genu) a na ose y odchylku mezi jednotlivými měřeními prezentované střední hodnotou.

Tabulka č. 7a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,111	0,132	0,089	0,092
	0,103	0,127	0,135	0,115
	0,077	0,117	0,119	0,096
	0,108	0,138	0,084	0,081
	0,078	0,096	0,085	0,076
	0,073	0,095	0,098	0,086
	0,082	0,084	0,070	0,105
	0,094	0,119	0,111	0,099
Průměr	0,091	0,114	0,099	0,094
SD	0,013	0,017	0,019	0,011

Graf č. 7b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro AKT1

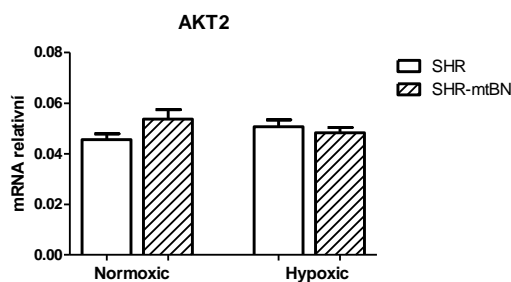


Relativní kvantifikace mRNA exprese V-akt murine thymoma viral oncogene 1 (AKT1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 8a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,046	0,062	0,043	0,041
	0,053	0,058	0,064	0,053
	0,046	0,047	0,051	0,048
	0,056	0,057	0,047	0,047
	0,043	0,047	0,039	0,038
	0,044	0,041	0,054	0,054
	0,035	0,044	0,056	0,053
	0,041	0,073	0,051	0,052
Průměr	0,046	0,054	0,051	0,048
SD	0,006	0,010	0,007	0,005

Graf č. 8b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro AKT2

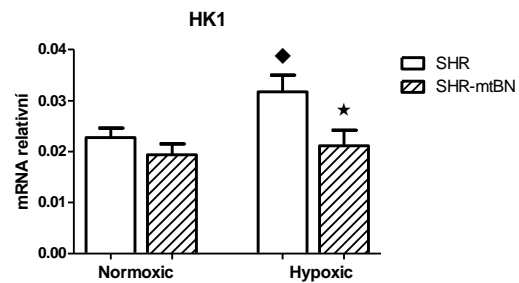


Relativní kvantifikace mRNA exprese V-akt murine thymoma viral oncogene 2 (AKT2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 9a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,020	0,029	0,021	0,006
	0,024	0,021	0,044	0,017
	0,022	0,022	0,043	0,016
	0,035	0,019	0,022	0,021
	0,018	0,017	0,023	0,019
	0,022	0,009	0,037	0,029
	0,020	0,015	0,033	0,032
	0,021	0,023	0,031	0,029
Průměr	0,023	0,019	0,032	0,021
SD	0,005	0,005	0,008	0,008

Graf č. 9b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro HK1

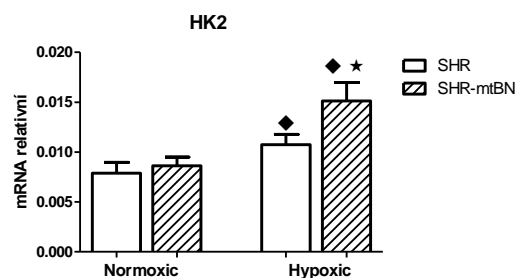


Relativní kvantifikace mRNA exprese hexokinázy 1 (HK1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 10a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,007	0,008	0,007	0,005
	0,007	0,007	0,014	0,015
	0,005	0,011	0,010	0,011
	0,015	0,009	0,008	0,017
	0,007	0,006	0,009	0,014
	0,009	0,006	0,014	0,021
	0,006	0,009	0,014	0,020
	0,007	0,013	0,010	0,018
Průměr	0,008	0,009	0,011	0,015
SD	0,003	0,002	0,003	0,005

Graf č. 10b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro HK2

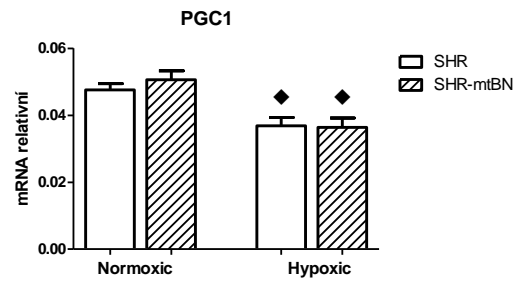


Relativní kvantifikace mRNA exprese hexokinázy 2 (HK2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 11a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,042	0,051	0,031	0,027
	0,045	0,044	0,050	0,045
	0,042	0,052	0,036	0,032
	0,056	0,052	0,031	0,035
	0,047	0,042	0,030	0,027
	0,054	0,048	0,044	0,034
	0,050	0,049	0,036	0,046
	0,045	0,067	0,037	0,045
Průměr	0,048	0,051	0,037	0,036
SD	0,005	0,007	0,006	0,007

Graf č. 11b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro PGC1

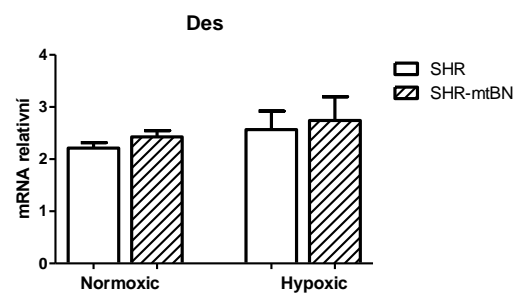


Relativní kvantifikace mRNA exprese koaktivátoru peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma 1 (PGC1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 12a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	2,236	2,640	2,035	1,045
	2,230	2,194	2,143	1,127
	1,965	2,841	1,582	1,898
	2,738	2,033	1,358	3,039
	1,887	2,158	3,736	3,640
	1,856	2,278	3,781	4,789
	2,485	2,326	3,701	3,170
	2,260	2,938	2,181	3,205
Průměr	2,207	2,426	2,565	2,739
SD	0,268	0,297	0,893	1,139

Graf č. 12b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro Des

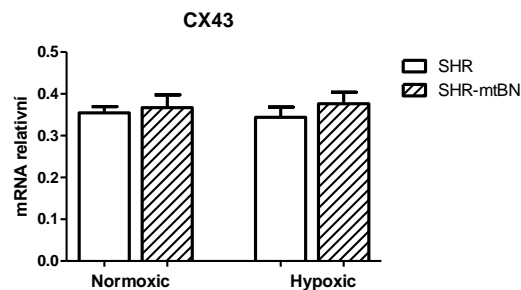


Relativní kvantifikace mRNA exprese desminu (Des) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 13a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,371	0,438	0,317	0,264
	0,392	0,380	0,418	0,488
	0,329	0,396	0,371	0,431
	0,388	0,365	0,281	0,281
	0,307	0,291	0,214	0,345
	0,388	0,274	0,367	0,430
	0,284	0,270	0,383	0,359
	0,376	0,521	0,399	0,413
Průměr	0,354	0,367	0,344	0,376
SD	0,037	0,077	0,060	0,069

Graf č. 13b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro CX43

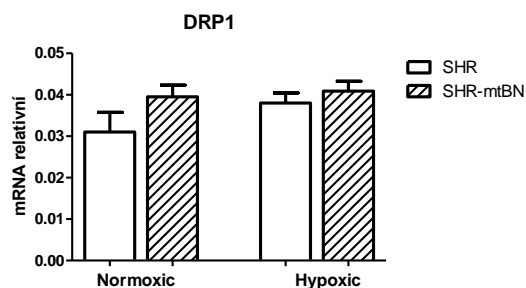


Relativní kvantifikace mRNA exprese konexinu 43 (CX43) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\diamond < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 14a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,042	0,047	0,033	0,030
	0,015	0,044		0,048
	0,015	0,032		0,040
	0,015	0,042		0,037
	0,044	0,035	0,033	0,036
	0,040	0,035	0,046	0,050
	0,035	0,029	0,040	0,040
	0,042	0,052	0,038	0,046
Průměr	0,031	0,040	0,038	0,041
SD	0,012	0,007	0,004	0,006

Graf č. 14b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro DRP1

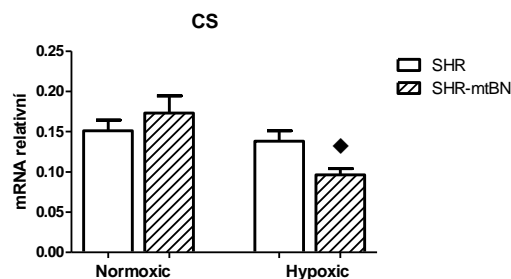


Relativní kvantifikace mRNA exprese proteinu souvisejícího s dynaminem 1 (DRP1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\diamond < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 15a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,125	0,176	0,102	0,060
	0,177	0,216	0,172	0,122
	0,142	0,198	0,145	0,114
	0,213	0,192	0,099	0,094
	0,140	0,122	0,084	0,071
	0,189	0,086	0,173	0,111
	0,123	0,125	0,170	0,090
	0,101	0,273	0,160	0,109
Průměr	0,151	0,174	0,138	0,096
SD	0,034	0,053	0,033	0,019

Graf č. 15b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro CS

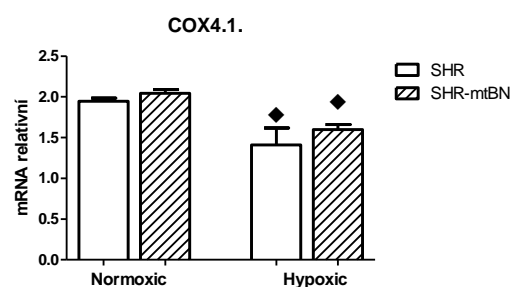


Relativní kvantifikace mRNA exprese citrátsyntázy (CS) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 16a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	1,967	2,247	1,316	1,433
	2,017	2,057	1,999	1,704
	1,994	1,913	1,539	1,463
	1,996	2,061	1,364	1,553
	1,742	2,021	0,064	1,412
	1,886	1,966	1,821	1,602
	1,868	1,891	1,575	1,901
	2,103	2,207	1,604	1,728
Průměr	1,947	2,045	1,410	1,600
SD	0,098	0,113	0,519	0,150

Graf č. 16b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro COX4.1

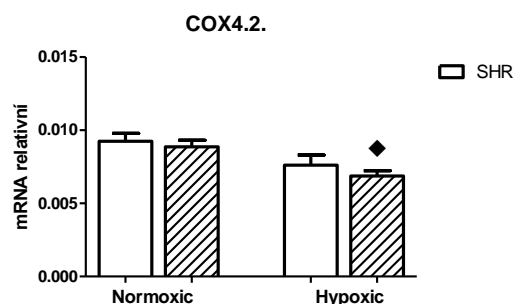


Relativní kvantifikace mRNA exprese cytochrom c oxidázy, podjednotky IV, izoformy I (COX4.1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 17a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,010	0,010	0,007	0,007
	0,010	0,009	0,012	0,007
	0,008	0,009	0,008	0,007
	0,011	0,008	0,006	0,006
	0,007	0,007	0,008	0,005
	0,008	0,008	0,006	0,008
	0,009	0,009	0,007	0,007
	0,011	0,011	0,007	0,008
Průměr	0,009	0,009	0,008	0,007
SD	0,001	0,001	0,002	0,001

Graf č. 17b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro COX4.2

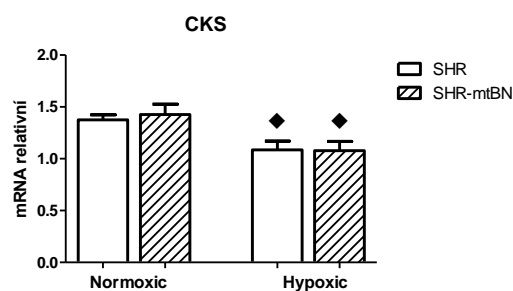


Relativní kvantifikace mRNA exprese cytochrom c oxidázy, podjednotky IV, izoformy 2 (COX4.2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 18a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	1,410	1,426	0,919	0,612
	1,352	1,579	1,519	1,286
	1,327	1,390	1,092	0,996
	1,319	1,496	1,045	0,962
	1,647	1,168	0,787	0,905
	1,456	1,259	1,301	1,369
	1,187	1,100	1,122	1,196
	1,294	1,995	0,906	1,297
Průměr	1,374	1,427	1,086	1,078
SD	0,120	0,248	0,207	0,225

Graf č. 18b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro CKS

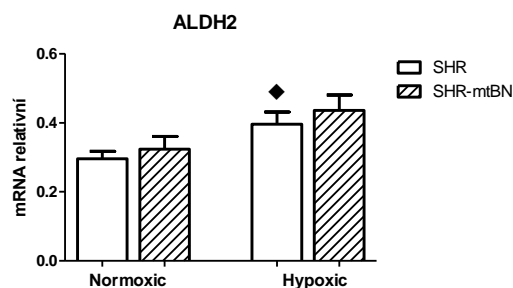


Relativní kvantifikace mRNA exprese sarkomerické kreatinkinázy (CKS) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 19a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,270	0,354	0,322	0,266
	0,342	0,450	0,515	0,533
	0,293	0,314	0,409	0,538
	0,341	0,326	0,360	0,391
	0,320	0,232	0,220	0,431
	0,376	0,195	0,511	0,637
	0,215	0,229	0,443	0,289
	0,210	0,486	0,387	0,397
Průměr	0,296	0,323	0,396	0,435
SD	0,053	0,093	0,087	0,113

Graf č. 19b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro ALDH2

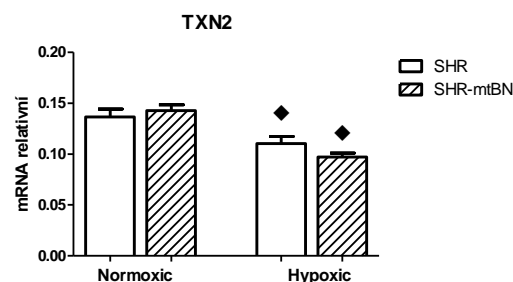


Relativní kvantifikace mRNA exprese aldehyddehydrogenázy 2 (ALDH2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 20a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,136	0,155	0,097	0,086
	0,139	0,134	0,118	0,115
	0,136	0,144	0,103	0,098
	0,163	0,160	0,084	0,084
	0,086	0,132	0,150	0,085
	0,147	0,129	0,122	0,104
	0,137	0,122	0,098	0,104
	0,148	0,167	0,110	0,101
Průměr	0,137	0,143	0,110	0,097
SD	0,020	0,014	0,018	0,010

Graf č. 20b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro TXN2

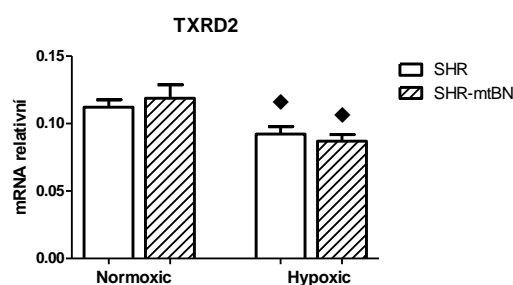


Relativní kvantifikace mRNA exprese thiredoxinu 2 (TXN2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 21a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,109	0,131	0,082	0,076
	0,115	0,145	0,114	0,104
	0,110	0,095	0,096	0,088
	0,127	0,144	0,083	0,076
	0,128	0,096	0,063	0,068
	0,128	0,094	0,106	0,108
	0,089	0,087	0,096	0,081
	0,091	0,157	0,097	0,094
Průměr	0,112	0,119	0,092	0,087
SD	0,014	0,025	0,014	0,013

Graf č. 21b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro TXRD2

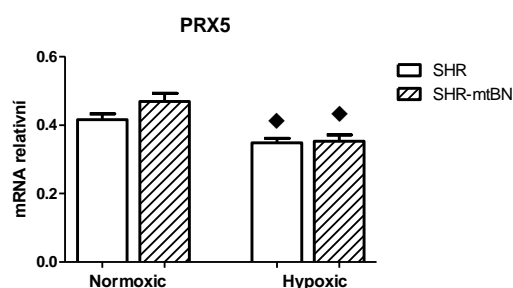


Relativní kvantifikace mRNA exprese thioredoxinreduktázy 2 (TXRD2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 22a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,475	0,454	0,316	0,270
	0,345	0,478	0,407	0,423
	0,487	0,447	0,336	0,381
	0,404	0,544	0,331	0,367
	0,443	0,475	0,349	0,285
	0,398	0,446	0,393	0,394
	0,364	0,344	0,357	0,361
	0,405	0,563	0,295	0,340
Průměr	0,415	0,469	0,348	0,353
SD	0,044	0,059	0,033	0,046

Graf č. 22b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro PRX5

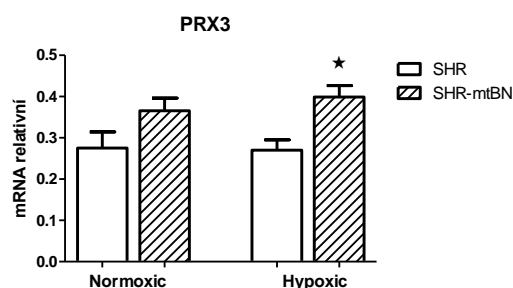


Relativní kvantifikace mRNA exprese peroxiredoxinu 5 (PRX5) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 23a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,379	0,352	0,236	0,264
	0,301	0,403	0,298	0,478
	0,343	0,332	0,208	0,366
	0,023	0,340	0,173	0,403
	0,274	0,289	0,233	0,341
	0,307	0,385	0,378	0,513
	0,251	0,275	0,351	0,378
	0,324	0,550	0,280	0,444
Průměr	0,275	0,366	0,270	0,398
SD	0,096	0,076	0,062	0,070

Graf č. 23b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro PRX3

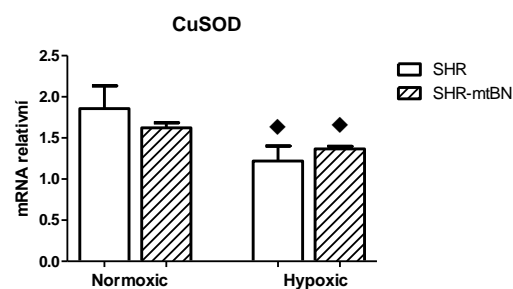


Relativní kvantifikace mRNA exprese peroxiredoxinu 3 (PRX3) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 24a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	1,598	1,801	1,479	1,218
	1,670	1,483	1,671	1,486
	1,586	1,540	1,358	1,397
	1,656	1,735	1,216	1,362
	1,630	1,564	1,170	1,218
	1,520	1,529	1,508	1,393
	1,402	1,433	1,337	1,445
	3,782	1,907	0,000	1,399
Průměr	1,856	1,624	1,217	1,365
SD	0,691	0,149	0,457	0,086

Graf č. 24b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro CuSOD

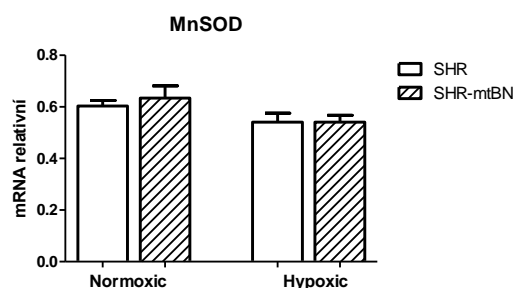


Relativní kvantifikace mRNA exprese Cu superoxidismutázy (CuSOD) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 25a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,651	0,778	0,445	0,484
	0,596	0,752	0,753	0,647
	0,546	0,501	0,516	0,528
	0,680	0,579	0,451	0,456
	0,647	0,502	0,567	0,461
	0,616	0,590	0,490	0,593
	0,499	0,539	0,573	0,533
	0,591	0,836	0,535	0,627
Průměr	0,603	0,635	0,541	0,541
SD	0,052	0,118	0,086	0,065

Graf č. 25b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro MnSOD

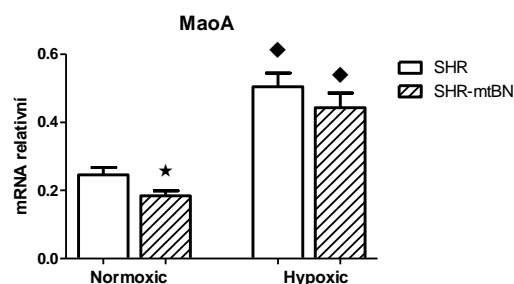


Relativní kvantifikace mRNA exprese Mn superoxidismutázy (MnSOD) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 26a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,302	0,210	0,518	0,355
	0,274	0,211	0,484	0,223
	0,319	0,173	0,520	0,502
	0,247	0,215	0,602	0,505
	0,276	0,160	0,440	0,389
	0,222	0,123	0,615	0,627
	0,146	0,144	0,586	0,428
	0,176	0,237	0,265	0,510
Průměr	0,245	0,184	0,504	0,442
SD	0,053	0,035	0,100	0,108

Graf č. 26b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro MaoA

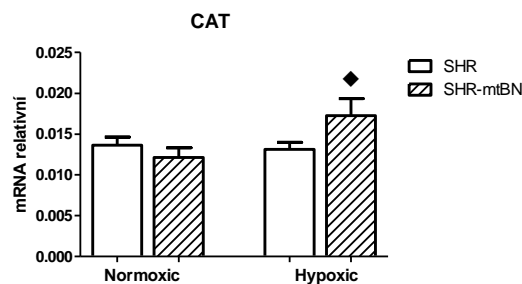


Relativní kvantifikace mRNA exprese monoaminooxidázy A (MaoA) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 27a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,013	0,013	0,012	0,010
	0,012	0,018	0,017	0,022
	0,012	0,010	0,013	0,015
	0,010	0,013	0,013	0,014
	0,018	0,009	0,009	0,014
	0,017	0,011	0,016	0,029
	0,012	0,008	0,012	0,016
	0,015	0,015	0,013	0,018
Průměr	0,014	0,012	0,013	0,017
SD	0,002	0,003	0,002	0,005

Graf č. 27b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro CAT

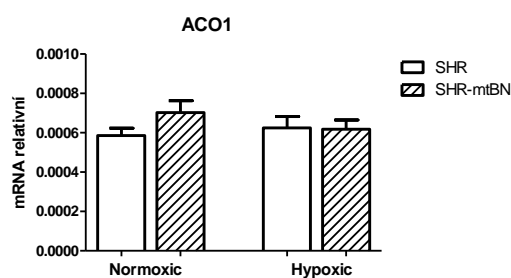


Relativní kvantifikace mRNA exprese katalázy (CAT) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 28a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,00052	0,00077	0,00042	0,00036
	0,00072	0,00076	0,00087	0,0007
	0,00054	0,00067	0,00058	0,00067
	0,00073	0,00067	0,00049	0,00056
	0,00047	0,00065	0,00048	0,00051
	0,00068	0,00045	0,00079	0,0008
	0,00047	0,0006	0,00064	0,00067
	0,00055	0,00105	0,00073	0,00067
Průměr	0,00059	0,00070	0,00063	0,00062
SD	0,00010	0,00015	0,00014	0,00012

Graf č. 28b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro ACO1

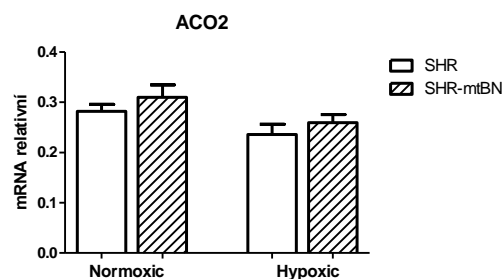


Relativní kvantifikace mRNA exprese akonitázy 1 (ACO1) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 29a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,293	0,345	0,183	0,187
	0,322	0,358	0,319	0,323
	0,249	0,32	0,243	0,288
	0,337	0,304	0,191	0,244
	0,289	0,239	0,148	0,221
	0,297	0,254	0,275	0,306
	0,223	0,229	0,251	0,237
	0,248	0,433	0,279	0,272
Průměr	0,282	0,310	0,236	0,260
SD	0,035	0,061	0,051	0,040

Graf č. 29b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro ACO2

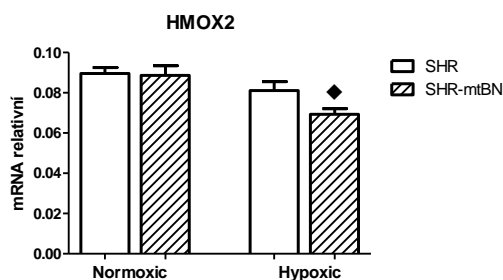


Relativní kvantifikace mRNA exprese akonitázy 2 (ACO2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 30a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,086	0,110	0,069	0,065
	0,097	0,096	0,104	0,074
	0,091	0,077	0,078	0,066
	0,097	0,083	0,073	0,059
	0,090	0,076	0,071	0,059
	0,098	0,079	0,096	0,078
	0,072	0,081	0,080	0,073
	0,085	0,107	0,078	0,080
Průměr	0,090	0,089	0,081	0,069
SD	0,008	0,012	0,011	0,007

Graf č. 30b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro HMOX2

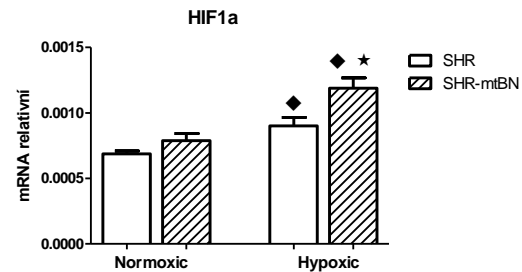


Relativní kvantifikace mRNA exprese hemoxygenázy 2 (HMOX2) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, ($\blacklozenge < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 31a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,0007	0,0008	0,0008	0,0009
	0,0007	0,0008	0,0012	0,0013
	0,0006	0,0007	0,0009	0,0012
	0,0007	0,0009	0,0009	0,0009
	0,0007	0,0007	0,0006	0,0012
	0,0008	0,0007	0,0011	0,0016
	0,0006	0,0006	0,0009	0,0011
	0,0007	0,0011	0,0008	0,0013
Průměr	0,0007	0,0008	0,0009	0,0012
SD	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002

Graf č. 31b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro HIF-1a

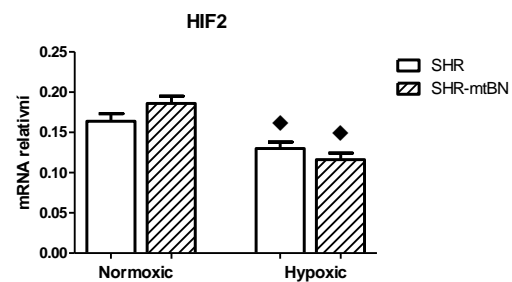


Relativní kvantifikace mRNA exprese hypoxií indukovaného faktoru 1a (HIF-1a) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptaci na hypoxii oproti normoxické hladině.

Tabulka č. 32a: Relativní hodnoty mRNA jednotlivých experimentálních skupin

Skupiny	SHR	SHR-mtBN	HSHR	HSHR-mtBN
	0,156	0,208	0,095	0,091
	0,193	0,200	0,163	0,164
	0,182	0,189	0,141	0,114
	0,202	0,192	0,110	0,113
	0,135	0,181	0,110	0,094
	0,166	0,135	0,138	0,128
	0,130	0,164	0,148	0,115
	0,149	0,218	0,135	0,112
Průměr	0,164	0,186	0,130	0,116
SD	0,023	0,023	0,020	0,020

Graf č. 32b: Relativní hodnoty mRNA transkriptu pro HIF-2

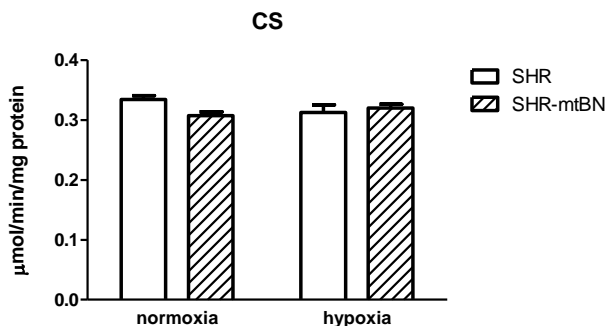


Relativní kvantifikace mRNA exprese hypoxií indukovaného faktoru 2a (HIF-2a) k referenčnímu genu S18 ribozomální podjednotce v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (♦ $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptaci na hypoxii oproti normoxické hladině.

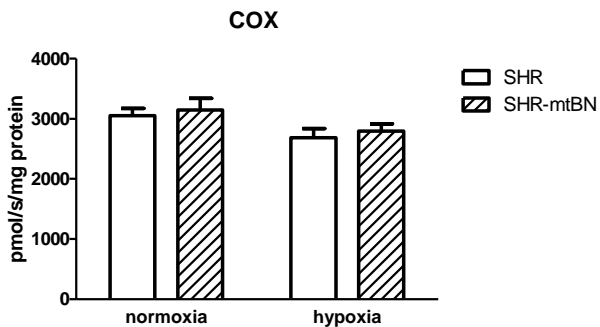
Tabulka č. 33: Sekvence a efektivita primerů pro dané transkripty

Transkript	Efektivita	Levá forma primeru forward F	Pravá forma primeru reverse R
ACO1	2,261	ttgctgtgtctgagattgaaaag	cttgaaaacctttaaatccttgct
ACO2	1,872	cgcttacagcctactggtc	ggcagaggccacatggta
Actin	2,008	tacaacctccttgagctcc	ttctgacctatgcccacca
AKT1	1,876	aacgacgtagccattgtgaa	cctcattcttgaggaagt
AKT2	1,974	ccgctattatgcatgaagat	tgtgggcgacttcatct
ALDH2	1,956	agacgtcaaagatggcatga	ttgaggatctgcatcactgg
B2M	1,879	cgctcggtgaccgtgatcttctg	ctgaggtgggtggaactgagacag
CK-S	1,941	gccacccttcattaagactg	caaaaaggtcagcaaacct
COX 4.1	1,969	cactgcgcttgtgctgat	cgatcaaaggtatgagggatg
COX 4.2	2,037	agaactcaaggacacacagc	tcaacatagggggtcatct
CS	1,987	agacatcggttcttgatcatctg	gccaaaataagccctcaggt
CuSOD	1,881	taagaaacatggcggtcca	tggacacattggccacac
CX43	1,9	agcctgaactctcattttcctt	ccatgtctgggcacctct
Cyclophilin	1,751	agcatacaggtcctggcat	tcacctcccaaagaccac
Desmin	1,893	gatcaacctccgatccaga	ttgctcagggtggtttct
DRP1	2,003	gctggtccacgttcacc	ccccattcttctgctcaac
GAPDH	1,841	cccctctggaaagctgtg	ggatgcagggatgatgttct
HIF1 α	2,249	aagcactagacaaaagctcacctg	ttgaccatcgcgtgcccac
HIF2 α	1,87	gcaactacctgttcaccaacc	ttcatcaaagttctggcttcc
HK1	2,017	tctgggttcaccttctcat	atcaagattccacagtcagggt
HK2	1,968	ccagcagaacagcctagacc	agatgccttgaatccctttg
HMOX2	1,901	tacggcaccagaaaaggaaa	gtgcttcttggctcccttc
HPRT	1,575	gaccggttctgcatgtcg	acctggttcatcactaatcac
KAT	1,979	cagcgaccagatgaagca	ggtcaggacatcggtttc
MaoA	2,026	tggatcatgaccagatgga	tgtgctgcaaagtaaatcct
MnSOD	1,887	tggacaaacctgagccctaa	gacccaaagtcacgcttgata
PGC1	1,966	aaagggccaagcagagaga	gtaaatcacacggcgtctt
PRX3	1,89	aatgaccttccggtggtaaa	gctgttgacttggcttgat
PRX5	1,892	gactatggccccgatcaa	aaaacaccttcttgccttgaa
S18	1,911	tctagacaacaagctgcgtga	cctctatgggctcggatttt
TXN2	1,9	cacacagaccttgccattga	acgtccccgttcttgatg
TXRD2	1,852	gcacatggtgaagctacctaga	gctccatccacatcttctcag

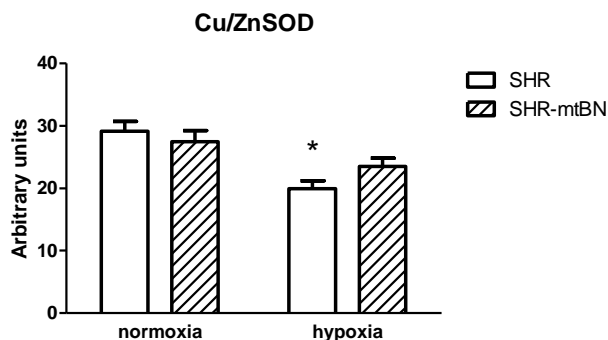
Primer pro transkript genu beta2mikroglobulin byl na screening zapůjčen z Akademie věd České republiky a jeho sekvence je převzatá z literatury (Sládek, et al. 2007).

Graf č. 33: Aktivita CS

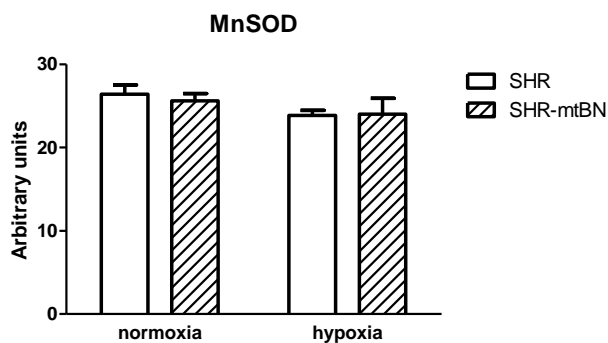
Aktivita enzymu citrátsyntázy (CS) v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Graf č. 34: Aktivita COX

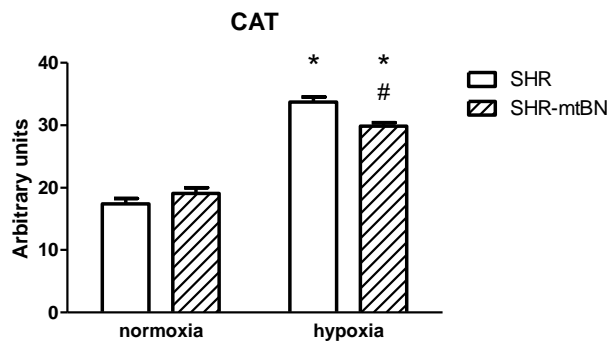
Aktivita enzymu cytochrom c oxidázy (COX) v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Graf č. 35: Kvantitativní analýza Cu/Zn SOD pomocí metody Western blot

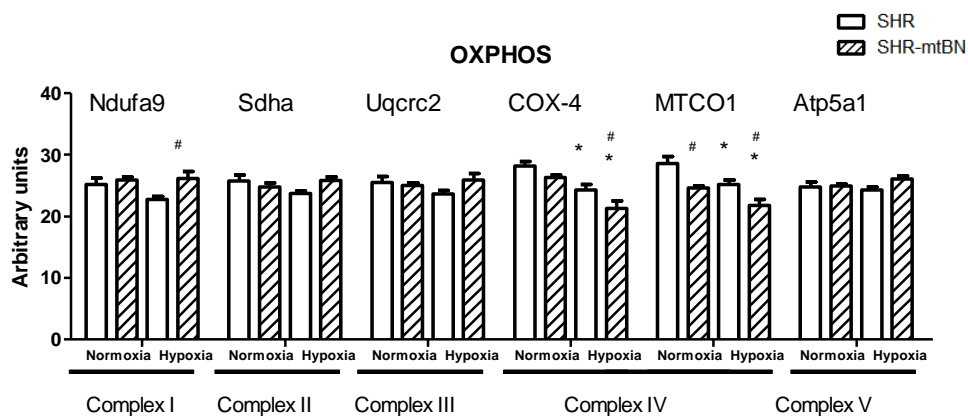
Kvantitativní analýza proteinu Cu/Zn superoxiddismutázy (Cu/ZnSOD; SOD2) metodou Western blot v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Graf č. 36: Kvantitativní analýza Mn SOD pomocí metody Western blot

Kvantitativní analýza proteinu Mn superoxiddismutázy (MnSOD) metodou Western blot v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Graf č. 37: Kvantitativní analýza CAT SOD pomocí metody Western blot

Kvantitativní analýza proteinu katalázy (Cat) metodou Western blot v levé komoře (LV). SHR - spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway, (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

Graf č. 38: Kvantitativní analýza jednotlivých podjednotek komplexů oxidační fosforylace pomocí metody Western blot

Kvantitativní analýza mitochondriálně kódovaných proteinů oxidačního řetězce metodou Western blot. Ndufa9 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 9), Sdha (succinate dehydrogenase complex, subunit A), Uqcrc2 (ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II), COX-4 (cytochrom c oxidáza 4), MTCO1 (mitochondriálně kódovaná podjednotka cytochrom c oxidázy), Atp5a1 (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial), SHR – spontánně hypertenzní potkan, SHR-mtBN – spontánně hypertenzní potkan s mitochondriálním genomem kmene Brown Norway. (# $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi kmeny, (* $< 0,05$) signifikantní rozdíl v adaptace na hypoxii oproti normoxické hladině.

9. INTERNETOVÉ ZDROJE

Applied Biosystems 2002

http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Information_Sheets/Real-time%20PCR/7900syberProtocol.pdf

Applied Biosystems 2010

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>

Manual NanoDrop Technologies, 2007

<http://bio.classes.ucsc.edu/bio1001/MANUALS/SPECTROPHOTOMETERS/nd1000.pdf>

PCR Applications Manual, Roche

<http://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf>

Rat Genom Database – RGD

<http://rgd.mcw.edu/>

Roche Applied Science - Light Cycler 480 DNA SYBR Green I Master

<http://www.cbmg.umd.edu/files/cbmg/corelab/SYBRGreen.pdf>

The Animal Ageing and Longevity Database

http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Rattus_norvegicus

The Wittwer Lab for DNA Analysis

<https://dna.utah.edu>

Velaz

<http://www.velaz.cz/product/brown-norway/>

10. POUŽITÁ LITERATURA

Abu-Hamad S, Zaid H, Israelson A, Nahon E, Shoshan-Barmatz V 2008. Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. *J Biol Chem* 283: 13482-13490.

Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D 1989. Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. *Biochim Biophys Acta* 981 (2): 213-225.

Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman J 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochemie* 85(8): 747-752.

Baker JE, Konorev EA, Gross GJ, Chilian WM, Jacob HJ 1999. Resistance to myocardial ischemia in five rat strains: is there a genetic component of cardioprotection? *Heart and Circulatory Physiology* 278: H1395-H1400.

Bernardt W, Warnecke C, William C, Tanaka T, Weisner M, Eckardt K-U 2007. Organ protection by hypoxia nad Hypoxia inducible factors. *Methods in Enzymology* 435: 221-245.

Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA 1994. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 216: 223-226. doi: 10.1006/abio.1994.1028

Brisson M. 2000. Identification of Nonspecific Products Using Melt-Curve Analysis on the iCycler iQ Detection System. In: Bio-Rad Laboratories. p. 6.

Brown G, Simpson M 1980. Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetisc* 97: 125-143.

Calvo SE, Mootha VK 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11: 25-44.

Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT 1999. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *BIOCHEMICA* 1.

Cervós Navarro J, Kunas R, Sampaolo S, Mansmann U 1999. Heart mitochondria in rats submitted to chronic hypoxia. *Histol Histopathol* 14: 1045–1052.

Costa M 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology* 70: 1469-1480

Crabb D, Matsumoto M, Chang D, You M 2004. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-

related pathology. *The Proceedings of the Nutrition Society* 63: 49–63. doi: DOI:10.1079/PNS2003327

Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M 2009. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Research in Cardiology* 104(2): 131-139.

Doggrell SA, Brown L 1998. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* 39: 89-105.

Dyall SD, Johnson PJ 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current opinion in Microbiology* 3(4): 404.

Fajkus P 2011. Praktická výuka základních metod molekulární biologie na střední škole. [Masarykova univerzita.

Field M, Clark J, Henderson C, Seymour A, Radda G 1994. Alterations in the myocardial creatine kinase system during chronic anaemic hypoxia. *Cardiovasc Res.* 28: 86-91.

Fong G 2008. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 11: 121-140.

Forejtníková H, Kubínová R 2009. Přírodní látky ovlivňující mezibuněčnou komunikaci. *Chemické Listy* 97: 1168-1175.

Francisco J, Brown G, Simpson M 1979. Further studies on types A and B rat mtDNAs: Cleavage maps and evidence for cytoplasmic inheritance in mammals. *Plasmid* 2: 426-436.

Francisco J, Simpson M 1977. The occurrence of two types of mitochondrial DNA in rat populations as detected by EcoRI endonuclease analysis. *FEBS Letters* 79: 291-294.

Friedman I, Moravec J, Reichart E, PY H 1971. Subacute myocardial hypoxia in the rat. An electron microscopic study of the left ventricular myocardium. *JMol Cell Cardiol* 5: 125–132.

Furukawa Y, Halloran T 2006. Antioxid Redox Signal. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. 8: 847-867.

Gerike U, Hough DW, Russell NJ, Dyall-Smith ML, Danson MJ 1998. Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary relationships *Microbiology* 144: 929-935.

Giordano FJ 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation* 115(3): 500-508.

Goddard JM, Masters J, Jones S, Ashworth WJ, Wolstenholme D 1981. Nucleotide sequence variants of *Rattus norvegicus* mitochondrial DNA. *Chromosoma* 82: 595-609.

Gourley BL, Parker SB, Jones BJ, Zumbrennen KB, Leibold EA 2003. Cytosolic Aconitase and Ferritin Are Regulated by Iron in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 3227-3234.

Gray MW, Burger G, Lang BF 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283: 1476-1481 doi: 10.1126/science.283.5407.1476

Green H, Sutton J, Cymerman A, Young P, Houston C 1989. Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 66: 2454-2461.

Grilli A, De Lutiis M, Patrino A, Speranza L, Gizzi F, Taccardi A, Di Napoli P, De Caterina R, Conti P, Felaco M 2003. Inducible Nitric Oxide Synthase and Heme Oxygenase-1 in Rat Heart: Direct Effect of Chronic Exposure to Hypoxia. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 33.

Gudernová I 2011. Dráha kináz PI3K/Akt v regulaci exprese ABC transportérů.

Hana F, Takeda K, Yokoyama S, Ueda H, Shinozawa Y, Furuyama K, Shibahara S 2005. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Dynamic changes in expression of heme oxygenases in mouse heart and liver during hypoxia 338: 653-659.

Harbor B 2001. Production of Congenic Strains Using Marker-Assisted (“Speed”) Technologies. *JAX Communication* 6.

Havlenová T 2008. Zvýšený krevní tlak u lidí a experimentálních zvířat [

Hilsdorf AW, Krieger JE 1999. Characterization of six rat strains (*Rattus norvegicus*) by mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 32(3): 267-273.

Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3633-3638.

Holmgren A 1985. Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* 54: 237-271.

Holmgren A 1989. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *The Journal of Biological Chemistry* 264.

Hondlík O 2008. Reaktivní oxidační částice ve fotodynamické terapii, test produkce hydroxylových radikálů v přítomnosti ftalocyaninových senzitizerů. [Univerzita v Českých Budějovicích.

Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA 2007. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev.* 87: 1175-1213

Chaea HZ, Kimb HJ, Kang SW, Rheec SG 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice* 45(2-3): 101-112.

Idriss N, Blann A, Lip G 2008. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 52(12): 971-978. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.019.

Jain S, Maltepe E, Lu M, C S, Bradfield C 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of Development* 73: 117-123.

Jalil J, Doering C, Janicki J, Pick R, Shroff S, Weber K 1989. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left-ventricle. *Circulation Research* 64: 1041-1050.

Kašička V 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod *Chem. Listy* 91: 320-329.

Kelly DP, R.C. S 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18: 357–368.

Kočárek E. 2008. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Praha.

Koháryová M, Kolárová M 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys* 27: 71-84.

Kolář D 2011. Energetický metabolismus srdce při akutní a chronické hypoxii. [Charles University.

Kouloumenta A, Mavroidis M, Capetanaki Y 2007. Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J Biol Chem* 282: 35211-35221.

Krutilina RI, Kropotov AV, Leutenegger C, Serikovcorresponding VB 2006. Migrating leukocytes are the source of Peroxiredoxin V during inflammation in the airways. *J Inflamm (Lond)* 3. doi: 10.1186/1476-9255-3-13

Kumar N, Gilula N 1996. The Gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.

Landa V, Zídek V, Pravenec M 2010. Generation of Rat “Supersonic” Congenic/Conplastic Strains Using Superovulation and Embryo Transfer. *Rat Genomics, Methods in Molecular Biology* 597: 267-275.

Liang H, Ward WF 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 30: 145-151

Lin JH-C, Lou N, Kang N, Takano T, Hu F, Han X, Xu Q, Lovatt D, Torres A, Willecke K, Yang J, Kang J, Nedergaard M 2008. A Central Role of Connexin 43 in Hypoxic Preconditioning. *The Journal of Neuroscience* 16: 681-695. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3827-07.2008

Lomnický M 2010. Úloha mitochondrií v kardioprotektivním působení hypoxie u potkana

Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y 2010. PGC-1 α Regulates Expression of Myocardial Mitochondrial Antioxidants and Myocardial Oxidative Stress After Chronic Systolic Overload. *Antioxid Redox Signal* 13(7): 1011-1022. doi: 10.1089/ars.2009.2940

Ma H, Guo R, Yu L, Zhang Y, Ren J 2011. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *Eur Heart J* 32(8): 1025-1038.

Masopust J 2005. Molekulová patobiochemie srdečního selhání (1. část). *Labor aktuell*. 1: 4-8.

McCarthy J, McLeod C, Minners J, Essop M, Ping P, Sack M 2005. PKC ϵ activation augments cardiac mitochondrial respiratory post-anoxic reserve – a putative mechanism in PKC ϵ cardioprotection. *JMol Cell Cardiol* 38: 697-700.

McCord J 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312.

Miller K, Halow J, Koretsky A 1993. Phosphocreatine protects transgenic mouse liver expressing creatine kinase from hypoxia and ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: C1544-C1551.

Miranda-Vizuete A, Ljung J, Damdimopoulos A, Gustafsson J, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G 2001. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem* 276(34): 31567-31574.

Miyamoto S, Murphy A, Brown J 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 15: 521-529.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-958, 960, 962.

Muniyappa H, Song S, Mathews C, Das K 2009. Reactive oxygen species-independent oxidation of thioredoxin in hypoxia: inactivation of ribonucleotide reductase and redox-mediated checkpoint control. *J Biol Chem* 284: 17069-17081. doi: 10.1074/jbc.M109.008557

Murphy MP 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal* 417 (1): 1-13.

Neckar J, Papousek F, Nováková O, Ost'ádal B, Kolár F 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*. 97(2): 161-167.

Nordberg J, Arnér ES 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 31(11): 1287-1312.

Opie L 1969. Metabolism of heart in health and disease. *American Heart Journal* 77: 383.

Ostadal B, Kolar F 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 158 (2-3): 224-236.

Pelouch V, Kolar F, Ostadal B, Milerova M, Cihak R, Widimsky J 1997. Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and fibrosis: Effect of enalapril. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 11: 177-185.

Pfaffl M 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Pfaffl M 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR*: 87-112.

Pfeifer M, Wolf K, Blumberg F, Elsner D, Muders F, Holmer S, Riegger G, Kurtz A 1997. ANP gene expression in rat hearts during hypoxia. *Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II*.

Polytarcho C, Iliopoulos D, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou I, Struhl K, Tsihchlis P 2011. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res* 71: 4720-4731.

Pravenec M, Hyakukoku M, Houstek J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Miksik I, Dudová-Mothejzickova K, Pecina P, Vrbacky M, Drahota Z, Vojtiskova A, Mracek T, Kazdova L, Oliarynyk O, Wang J, Ho C, Qi N, Sugimoto K, Kurtz T 2007. Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Res*: 1319-1326.

Pravenec M, Zidek V, Musilová A, Vorlíček J, Kren V, St Lezin E, Kurtz T 2001. Genetic isolation of a blood pressure quantitative trait locus on chromosome 2 in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 19(6): 1061-1064.

Puigserver P, Spiegelman BM 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24: 78-90.

Riddle S, Ahmad A, Ahmad S, Deeb S, Malkki M, Schneider B, Allen C, White C 2000. Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): L407-416.

Rodney S 2011. The Mitochondrial Theory of Aging *hplusmagazine*.

Rojo M, Hovius R, Demel R, Wallimann T, Eppenberger H, Nicolay K 1991. Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study. *FEBS Letters* 281(1-2): 123-129.

Rosen GM, Pou S, Ramos C, Cohen M, Britigan B 1995. Free radicals and phagocytic cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9(2): 200-209.

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat J-P, Letellier T 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370: 751-762.

Rowe GC, Jiang A, Arany Z 2010. PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease. *Circulation Research* 107: 825-838. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223818

Sakurai A, Yuasa K, Shoji Y, Himeno S, Tsujimoto M, Kunimoto M, Imura N, S. H 2004. Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-kappa B activation. *J Cell Physiol* 198: 22-30.

Sam M, Shah S, Fridén J, Milner DJ, Capetanaki Y, Lieber RL 2000. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1116-C1122

Santa Cruz Biotechnology HemeOxygenase 2.

Saura J, Bleuel Z, Ulrich J, Mendelowitsch A, Chen K, Shih J, Malherbe P, Da Prada M, Richards J 1996. Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 70(3): 755-774.

Scarpulla RC 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576: 1-14.

Scarpulla RC 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev* 88: 611-638.

Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan L, Marck B, Matsumoto A, Shelton J, Richardson J, Bennett M, Garcia J 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 25(4): 331-340.

Sedláčková T, Racek J 2009. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klin. Biochem. Metab.* 17(38): 17-23.

Semenza GL 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 88: 1474-1480.

Semenza GL 1999. Perspectives on oxygen sensing *Cell* 98: 281-284.

Setty S, Zong P, Sun W, Tune J, Downey H 2008. Hypoxia-induced vasodilation in the right coronary circulation of conscious dogs: Role of adrenergic activation. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 138: 76-82.

Sharma S, Taegtmeier H, Adroge J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, Essop M 2004. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 286: H1185-H1192.

Schlattner U, et al. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788.

Schlattner U, Gehring F, Vernoux N, Tokarska-Schlattner M, Neumann D, Marcillat O, Vial C, Wallimann T 2004. C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem* 279: 24334-24342.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 343-354. doi: doi:10.1038/nrm1366

Silbernagel S, Despopoulos A. 2004. Atlas fyziologie člověka.

Silver L. 1995. Mouse genetics: Concepts and applications. Oxford: Oxford University Press.

Simon MC, Keith B 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 285–296.

Siwik D, Tzortzis J, Pimental D, Chang D, Pagano P, Singh K, Sawyer D, Colucci W 1999. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 85(2): 147-153.

Sládek M, Jindráková Z, Bendová Z, Sumová A 2007. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292: R1224–1229.

Snustad D, Simmons MJ. 2009. *Genetika*. Brno.

Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T 1996. Membrane-binding and lipid cross-linking kinetics of the mitochondrial creatine kinase octamer. *Biochemistry (Mosc.)* 35: 15522-15528.

Suzette RR, Hmad A, Ahmad S, Deeb S, Malkki M, Schneider B, Allen C, White C 2000. Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Lung Physiol* 278.

Szocs K 2004. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *General Physiology and Biophysics* 23(3): 269-295.

Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada K 1999. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 91(21): 1820-1828.

Tonissen K, G DT 2009. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res* 63: 87-103.

Toussaint O, Houbion A, Remacle J 1993. Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. *Toxicology* 81(2): 89-101.

Tzagoloff A. 1982. *Mitochondria*. New York: Plenum Press.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis. The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res* 79: 208-217.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F 2010. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1360-1372.

Verdouw P, van den Doel M, de Zeeuw S, Duncker D 1998. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res.* 39(1): 121-135.

Voet D, Voetova JG. 1995. *Biochemie*: Victoria Publishing.

W.A. Pryor, Kendall N. Houk, Christopher S. Foote JMF, Louis J. Ignarro, Giuseppe L. Squadrito, Kely in J. A. Davies 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3): R491-511.

Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Rück A, Brdiczka D 1998. Citace Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8(3-4): 229-234.

Weinstock GM, Gibbs RA 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521.

Westermann B 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature* 11: 872-884.

Wilfinger W, Mackey K, Chomczynski P 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22(3): 474-476, 478-481.

Wise DR, Ward PS, Shay JES, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC, Thompson CB 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Cell Biology* 108: 19611-19616.

Wispe J, Clark J, Burhans M, Kropp K, Korfhagen T, Whitsett J 1989. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta* 19: 30-36.

Wood Z, Schröder E, Robin Harris J, Poole L 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 28: 32-40.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R 2000. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiol Rev.* 80: 1107-1213.

Zemanová L 2007. Vliv různých forem chronické hypoxie na tělesný růst, hematokrit a myokardlaboratorního potkana [

Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller K, Dang C, Semenza G 2007. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11(5): 407-420.

Zhang J, Snyder SH 1992. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9382-9385.