

**KARLOVA UNIVERZITA**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra fyziologie živočichů**

**Mgr. Jitka Šantorová**

**Úloha proteinů CIDE při apoptóze a  
morfologie mitochondriální sítě v patogeneze**

**Disertační práce**

**Školitel: RNDr. Petr Ježek, DrSc.**  
**Odd. 75, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.**  
**Praha 2008**

<b>I. ÚVOD</b> .....	4
<b>2. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	6
<b>2.1. Mitochondrie</b> .....	6
2.1.1. Struktura mitochondrií .....	7
2.1.2. Morfologie mitochondriální sítě .....	8
2.1.2.1. Buněčné role mitochondriální fúze a dělení .....	8
2.1.2.2. Molekulární mechanismy mitochondriální fúze .....	9
2.1.2.2.1. Mitofuziny .....	9
2.1.2.2.2. OPA1 .....	10
2.1.2.3. Molekulární mechanismus dělení mitochondrií .....	10
2.1.2.4. Regulace dělení a fúze mitochondrií .....	11
2.1.2.5. Prohibitin .....	11
2.1.3. Krebsův cyklus, oxidativní fosforylace .....	12
<b>2.2. Apoptóza</b> .....	14
2.2.1. Kaspázy (cystein aspartát specifické proteázy) .....	14
2.2.2. Proteiny rodiny Bcl-2 .....	15
2.2.3. Vnitřní signalizace buněčné smrti .....	15
2.2.3.1. Mechanismy uvolnění proapoptotických proteinů. ....	16
2.2.3.2. Protein p53.....	16
2.2.4. Vnější signalizace buněčné smrti .....	16
2.2.4.1. DR receptory ( <i>Death receptors</i> ).....	16
2.2.4.2.1. FasL signalizace .....	17
2.2.4.2.2. Signalizace TNF .....	19
2.2.5. Apoptóza a dělení mitochondrií .....	19
<b>2.3. Protein CIDEa</b> .....	20
2.3.1. Struktura.....	20
2.3.1.1. DFF ( <i>DNA fragmentation factor</i> ).....	20
2.3.1.2. Struktura promotoru.....	21
2.3.2. Tkáňová distribuce .....	21
2.3.3. Distribuce v buňce.....	22
2.3.4. CIDEa a apoptóza .....	22
2.3.4. CIDE a metabolismus lipidů.....	22
2.3.4.1. CIDEa knockout .....	23
2.3.5. Další proteiny CIDE rodiny .....	24
2.3.5.1. CIDEb .....	24
2.3.5.2. CIDE-3 .....	25
2.3.5.2.1. FSP 27 a metabolismus lipidů .....	25
2.3.6. Změny hladiny exprese CIDE proteinů .....	26
2.3.7. Molekulární evoluce CIDE proteinů .....	27
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	28
<b>3.1. Přístroje</b> .....	28
<b>3.2. Materiál</b> .....	28
3.2.1. Experimentální modely .....	28
3.2.2. Chemikálie, enzymy, roztoky .....	29
3.2.2.1. Příprava RNA a elektroforéza.....	29
3.2.2.2. PCR, RT-PCR .....	30
3.2.2.3. Příprava konstruktů.....	30
3.2.2.4. Tkáňové kultury .....	30
3.2.2.5. Příprava buněk pro 4pi .....	31
3.2.2.6. Indukce apoptózy .....	32
<b>3.3. Metody a postupy</b> .....	33
3.3.1. Izolace celkové RNA .....	33
3.3.2. Izolace mRNA z celkové RNA a buněk.....	33

3.3.4. Stanovení koncentrace RNA pomocí spektrofotometru.....	34
3.3.5. Navrhování primerů.....	34
3.3.6. Kvantitativní PCR- Real-time PCR.....	35
3.3.6.1. LightCycler™ Instrument 2.0.....	36
3.3.6.2. Detekce signálu.....	37
3.3.6.3. Absolutní kvantifikace.....	37
3.3.6.4. Normalizace.....	38
3.3.6.5. Provedení.....	38
3.3.6.6. Konstrukce kalibračních přímek.....	39
3.3.7. Agarózová elektroforéza.....	40
3.3.8. Příprava konstruktů.....	40
3.3.8.1. Klonování pomocí restriktáz.....	40
3.3.8.1.1. CIDE-N a CIDE-C.....	40
3.3.8.1.3. Určení pozitivních klonů metodou PCR.....	43
3.3.8.1.4. Sekvence.....	43
3.3.8.2. Metoda Gateway.....	43
3.3.8.3. Metoda Lumio.....	45
3.3.8.4. Transformace E.coli.....	46
3.3.8.5. Izolace plasmidů.....	46
3.3.9. Práce s tkáňovými kulturami.....	46
3.3.9.1. Pěstování buněk.....	46
3.3.9.2. Transfekce.....	47
3.3.9.3. Příprava stabilní linie s roGFP.....	47
3.3.9.3.1. roGFP.....	48
3.3.9.4. T.REx systém.....	48
3.3.10. Konfokální mikroskopie.....	49
3.3.11. Vizualizace mitochondriální sítě.....	49
3.3.11.1. 4Pi mikroskopie.....	49
3.3.11.2. Příprava vzorků, fixace.....	51
3.3.11.3. Analýza obrazu.....	51
3.3.12. Western blot.....	51
3.3.13. Izolace buněčných frakcí.....	52
3.3.14. Indukce apoptózy.....	52
3.3.14.1. TUNEL.....	53
3.3.14.2. <i>Cell death assay</i> .....	53
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Stanovení hladin transkriptu CIDEa v tkáních.....</b>	<b>55</b>
4.1.1. Optimalizace kvantitativní PCR.....	55
4.1.2. Konstrukce kalibračních přímek.....	56
4.1.3. Stanovení základních hladin mRNA CIDEa.....	57
4.1.4. Stanovení proteinu CIDEa.....	58
<b>4.2. Zvýšená exprese proteinu CIDEa vedla k apoptóze.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3. Lokalizace proteinu CIDEa v buňkách.....</b>	<b>60</b>
4.3.1. Deleční mutanty CIDE-N a CIDE-C.....	60
4.3.2. Redistribuce proteinu CIDEa po inkubaci s induktory apoptózy.....	68
<b>4.4. Zobrazení mitochondriální sítě metodou 4Pi.....</b>	<b>70</b>
4.4.2. Morfologie mitochondriální sítě v závislosti na kultivačních podmínkách.....	71
4.2.2.1. Linie INS1E.....	71
4.2.2.2. Linie HEPG2.....	71
4.4.3. Morfologie mitochondriální sítě při inhibované respiraci.....	75
4.4.4. Morfologie mitochondriální sítě při odpražení.....	75
4.4.5. Morfologie mitochondriální sítě po inkubaci s odpražovačem i rotenonem.....	75
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>79</b>

<b>5.1. Kvantifikace bazálních hladin CIDEa mRNA .....</b>	<b>79</b>
<b>5.2. Distribuce proteinu CIDEa ve vztahu k apoptóze .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3. Morfologie mitochondriální sítě .....</b>	<b>82</b>
<b>7. PŘEHLED LITRATURY .....</b>	<b>87</b>
Přílohy:.....	92
Seznam zkratk:.....	94

---

## I. ÚVOD

---

Mitochondrie jsou dynamické organely, které zastávají řadu buněčných funkcí, jako je produkce energie nebo regulace hladiny vápníku v buňce a hrají také klíčovou roli v procesu apoptózy a v modulaci oxidativního stresu. Mitochondriální síť efektivně dodává energii a zajišťuje distribuci vápníku mezi různými buněčnými kompartmenty. Počet a tvar mitochondrií je regulován procesy dělení a fúze, jejichž vyváženost udržuje morfologii mitochondrií. Dělení mitochondrií je spojeno s apoptózou, sebedestrukčním buněčným mechanismem, který je nezbytný pro řadu dějů, týkajících se vývoje a udržování homeostázy ve tkáních či odstranění nepotřebných nebo poškozených buněk. Poruchy regulace apoptózy mohou způsobit řadu patologických změn v organismu. Apoptóza je řada regulovaných vzájemně propojených drah. Vnitřní dráha zahrnuje iniciaci apoptózy, jakožto výsledek narušení intracelulární homeostázy. V tomto kroku jsou pro její realizaci důležité mitochondrie, je tedy označena jako mitochondriální dráha buněčné smrti. Vnější dráha zahrnuje iniciaci apoptózy přes spojení s receptory plasmatické membrány. Existují i další typy buněčné smrti jako autofagie a mitoptóza, jejichž studie v současnosti bouřlivě probíhají.

Synchronizace molekulárně fyziologických dějů i procesů programované buněčné smrti mezi mitochondriemi a ostatními kompartmenty buňky vyžaduje oboustranný informační tok realizovaný nejen jednoduchými substancemi, jako druhými posly (např.  $\text{Ca}^{2+}$ ), ale především importem signalizačních proteinů a proteinkináz a na druhé straně exportem signalizačních proteinů do cytosolu i jádra buňky. Mitochondrie obsahují specializované komplexy importu proteinů tzv. TOM a TIM komplexy, jejichž varianty zajišťující import nematurovaných konformací proteinů buď s matrix adresující presekvencí, která je odštěpena či s adresou obsaženou v sekvenci proteinu. Naopak informační signální kaskády zahrnující povrch vnější mitochondriální membrány žádný import nevyžadují, a proto je vnější membrána přirozeným centrem integrace informačních signálů. Kromě fosforylací, SUMOylací, a jiných postranlačních modifikací proteinů vnějšího povrchu vnější mitochondriální membrány je zajištěn neustálý přísun informačních proteinů, jejichž vzájemné působení vede k výsledné reakci. Například přesný sled interakcí proapoptotických proteinů rodiny Bcl s rezidentními proteiny rodiny Bcl a proteiny účastnícími se procesů dynamiky mitochondriální sítě (Mfn1, Mfn2, FIS1, DRP1 na vnější membráně a OPA1 na vnitřní) rozhoduje o iniciaci apoptózy. Fosforylace DRP1 naopak vede k dezintegraci mitochondriální sítě bez apoptotických projevů. Pro mnoho buněčných dějů je však zapotřebí i export informačních proteinů. Není dosud znám přesný mechanismus, jak tento proces probíhá. Již po dekádu je definovaný dosud nepotvrzený tzv. *permeability transition pore* (PTP) pro nějž účast všech dosud navrhovaných komponent nebyla v podstatě prokázána. Co však existuje, je export mnoha proteinů při iniciaci apoptotické kaskády zahrnující mitochondrie, tj. proteinů jako cytochrom c, AIF, NOXA/ PUMA, Smac/Diablo, a v posledních letech hypoteticky se rovněž hovoří o proteinech CIDE. Na rozdíl od

PTP byl prokázán prostup cytochromu c přes hexamerní komplex tvořený Bak či Bad proteiny, tedy proteiny rodiny Bcl. Rovněž bylo zjištěno, že trimer mitodynaminu OPA1 tvoří doslova "bránu" krist protrudujících do matrix a řídí prostup cytochromu c z intrakristálních prostor dále. Mechanismus exportu proteinů z mitochondrií nebyl dosud detailně popsán a není znám. Mnohé proteiny, včetně např. CIDEa jsou příliš velké pro to, aby prostoupily Bak/Bad hexamery. Rovněž existuje představa, že i při četných dezintegracích mitochondriální sítě, tedy přechodných porušeních integrity obou mitochondriálních membrán, k žádnému exportu proteinů z mitochondrií nedochází. Naopak, hypoteticky, malé kulovité objekty odštěpující se z velké kontinuální mitochondriální sítě by mohly představovat signalizující jednotky, tzv. signalosomy. Takový mechanismus je dnes však pouze ve stadiu spekulací. CIDEa se hypoteticky účastní apoptózy zprostředkované iniciujícími mechanismy nezávislými na kaspázové kaskádě. Molekulární fyziologie CIDE je však stále v začátcích, bylo publikováno několik ne dost dostatečně ověřených výsledků a podpořených hypotéz. Proto ověření základních charakteristik fyziologie CIDE, ověření mitochondriální lokalizace a možnosti exportu CIDE z mitochondrií bylo stanoveno jako první cíl této disertační práce.

Druhá část práce se zabývá morfologií mitochondriální sítě v souvislosti s patofyziologickými stavy buňky. V poslední dekádě je s rozvojem konfokální mikroskopie zjišťováno, že mitochondrie vytváří retikulární síť, hypoteticky jedinou v klidovém intaktním stavu buňky jejíž tvar se však neustále mění díky kontinuálním procesům dezintegrace a fúze tubulárních aj. objektů sítě. Izolované mitochondrie jako solitérní ledvinovité orgány jsou tedy izolačním artefaktem, stejně tak jako známé učebnicové obrazy na bázi elektronové mikroskopie. Elektronová mikroskopie je při šetrné fixaci schopna zobrazit většinou pouze příčné průřezy tubuly mitochondriálního retikula, ne však průřezy podélné. Elektronová tomografie sice přispěla k objasnění vnitřních tvarů krist v podobě spíše protrudujících "sáčků" či vaků, ale není příliš výstižná pro zobrazení morfologie mitochondriální sítě. Při šetrných fixačních postupech nám i klasická konfokální mikroskopie prokáže např. u buněk kultivovaných v kultuře jedninou kontinuální mitochondriální síť, ze které se odštěpují menší tubuly, respektive kulovité útvary, avšak na jiném místě s ní zase fúzí. Proto není možné říci, kolik mitochondrií je v jedné buňce. Kvantitu mitochondrií v buňce je nutno vyjadřovat celkovým objemem mitochondriálního retikula (tubulů) anebo pomocí dalšího parametru, kterým je počet molekul mitochondriální DNA. Cílem proto bylo objasnění dynamiky morfologie mitochondriální sítě pomocí přesného zobrazení 4Pi mikroskopie.

---

## 2. PŘEHLED LITERATURY

---

### 2.1. Mitochondrie

Mitochondrie produkují energii v podobě ATP pomocí oxidativní fosforylace, podílejí se na metabolismu, vápníkové signalizaci, apoptóze a mnoha fyziologických procesech, jako je glukosou stimulovaná sekrece inzulínu, synaptický přenos, či mnoho dalších buněčných procesů, např. signálních kaskád, buněčného cyklu a buněčného růstu, apod. Jsou to semiautonómni organely, vyskytující se u eukaryotických organismů.

Podle endosymbiotické teorie se odhaduje, že mitochondrie vznikly fagocytózou bakteriální buňky. Jako semiautonómni organely si mitochondrie ponechaly část DNA. U člověka jsou v mitochondrii kódovány dvě rRNA, 22 tRNA a 13 proteinů dýchacího řetězce a celková velikost mtDNA je 16,6kbp. Obecně je však velikost mitochondriálního genomu různá a nemusí nutně korespondovat s počtem genů kódovaných mtDNA. U rostlin může dosahovat velikost mtDNA až 366,9kbp zatímco některé houby mají pouze 20kbp. Nicméně dominance mitochondrií u savců a člověka je právě vyjádřena tím, že mtDNA kóduje esenciální, protony pumpující, podjednotky komplexu I dýchacího řetězce, podjednotku cyt b komplexu III a dvě podjednotky ATPsyntázy (plus dvě podjednotky cytochrom c oxidázy). Mutací těchto proteinů je vytvářen tzv. oxidační stres, tedy zvýšené produkce superoxidu v mitochondriích. Konjugovaná kyselina superoxidového aniontu, hydroperoxylový radikál, je tak nepřetržitě vytvářena jako neodmyslitelný produkt respirace a tvorby ATP. 1-5% kyslíku spotřebovaného během oxidativní fosforylace je tak přeměněno na superoxid jako nevyhnutelný postranní produkt respiračního řetězce, a z něj je přibližně v 1% vytvářen hydroperoxylový radikál. Kromě proteinů a iniciace lipoperoxidace mitochondriálních membrán, je oxidačně modifikována i mitochondriální DNA, denně vzniká 500 oxoguaninových tj. oxidačně modifikovaných bází. Protože mitochondriální DNA polymeráza i přes existenci reparačních mechanismů tyto báze převádí na mutace, mutace DNA vznikají konstantně a nevyhnutelně v průběhu života. Mutované podjednotky především komplexu I způsobují zpomalení pumpování protonů, a tím zvýšenou tvorbu superoxidu, a tedy i hydroperoxylového radikálu, a tedy i zvýšenou četnost mutací mtDNA. Tento cyklus akceleruje až do stadia, kdy je velká většina počtu kopií mtDNA v buňce zmutována. Tímto základním mechanismem je dán vznik nemocí z oxidačního stresu a stárnutí. Základní mechanismus může být akcelerován například mitochondriálně adresovanými antioxidanty. Existují mechanismy, které právě při dosažení podprahové hodnoty v modifikacích mtDNA způsobují vznik apoptózy apod. Tyto mechanismy stejně jako přenos mutované mtDNA při buněčném dělení nejsou dosud objasněny.

### **2.1.1. Struktura mitochondrií**

Velikost a tvar mitochondriální sítě je značně proměnlivý v závislosti na jejich původu a metabolickém stavu. Její pohyb, tedy pohyb celé resp. jednotlivých segmentů sítě, je spojen s pohybem mikrotubulů a určuje tak orientaci a distribuci v závislosti na buněčném typu. Organela je vnitřně stratifikována, tedy složena z kompartmentů, majících speciální funkce. Kompartmenty jsou dány především velmi složitým tvarem vnitřní mitochondriální membrány. Vnější membrána tak tvoří povrch tubulů a jiných objektů mitochondriální sítě. Vnitřní membrána může tvořit povrchy a segmenty paralelní s vnější membránou, tzv. periferní vnitřní membránu (PIM). V oblasti prostoru mezi vnější membránou (OM) a PIM, tzv. periferním mezimembránovým prostorem (PIMS), jsou právě lokalizovány importní komplexy TOM-TIM. Tato místa jsou také nazývána "kontaktními místy". Většina plochy vnitřní mitochondriální membrány však vytváří výdutě vybíhající z PIM, a utvářející mitochondriálními krysty, jejichž projekce jsou typické pro zobrazení elektronovým mikroskopem. Tato složitá morfologie byla odhalena elektronovou tomografií. Rozeznáváme tzv. intrakristální část vnitřní mitochondriální membrány (ICM), tvořící "sáčky" krist protrudujících dovnitř a intrakristální prostor ICS, tedy "mezimembránový prostor". Ten však není mezi dvěma odlišnými membránami OM a PIM, ale mezi dvěma vnitřními membránami IM respektive ICM. Tyto vchlípeniny zvyšují tři až pětinašobně povrch vnitřní membrány a poskytují tak více prostoru pro membránové proteiny dýchacího řetězce. Zbývající topologie vnitřku organely se pak nazývá matrix.

Existují nálezy, že právě v ICM jsou zkoncentrovány komplexy dýchacího řetězce a ATP syntázy, jejichž obsah je nižší v PIM. Ústí krist do PIMS je kontrolováno trimery OPA1, a cytochrom c tedy může proniknout z ICS do PIMS pouze při iniciaci apoptózy. Tento mechanismus však může působit i za fyziologických podmínek při distribuci proteinů mezi dvěma kompartmenty mezimembránových prostor mezi ICS a PIMS. ICM má tak velmi vysoký obsah proteinů resp. proteinových komplexů oproti jiným buněčným membránám. Je v ní obohacen vysoce specifický mitochondriální kardiolipin a naopak potlačen obsah cholesterolu. Vnější membrána, obklopující celou organelu má naopak stejný poměr proteiny – fosfolipidy jako typická eukaryotická plazmatická membrána. Obsahuje velké množství integrálních proteinů, tzv. porinů, které umožňují průchod molekulám do 10000 Daltonů. Vnitřní membrána udržuje gradienty iontů a metabolitů, jež jsou odděleny v matrix. Nejdůležitější je prostředník mezi respirací a syntézou ATP, elektrochemický potenciál protonů. Při vydělení Faradayovou konstantou se nazývá protonmotivní silou  $\Delta p$  (termín zavedl nositel Nobelovy ceny a autor chemiosmotické teorie P. Mitchell).  $\Delta p$  je esenciální pro tvorbu ATP v procesu oxidativní fosforylace. Matrix je prostor uzavřený vnitřní membránou obsahující asi 2/3 mitochondriálních proteinů. Nalezneme zde například enzymy Krebsova cyklu, enzymy zpracovávající pyruvát a aktivované MK, speciální mitochondriální ribozomy, t-RNA a mitochondriální DNA.



### 2.1.1.2. Organizace DNA

Mitochondriální DNA je organizována průměrně v šesticích 16.6 kbp uzavřených cirkulárních dvoušroubovic v komplexech s ATAD3 proteiny vázícími se v blízkosti tzv. D-loop, nesoucí počátek replikace, proteinu a transkripčního faktoru TFAM, a mnoha enzymů replikační a transkripční mašinerie. Poslední uvedené enzymy se však zřejmě váží na mitochondriální nukleoidy pouze při aktivaci replikace resp. transkripce. Při existenci 6000 kopií mtDNA v jedné buňce tak ve spojitě mitochondriální síti existuje pouze průměrně 1000 nukleoidů. Překotná dezintegrace mitochondriální sítě tak také zabraňuje kromě přísunu nezbytných faktorů a proteinů replikační a transkripční mašinerie a tokům mRNA na mitochondriální ribozomy, zabraňuje přirozené dynamice nukleoidů uvnitř matrix a její souvislé síti. Velká důležitost této dynamiky je zřejmá z mutací profúzního proteinu OPA1.

### 2.1.2. Morfologie mitochondriální sítě

Jak již bylo uvedeno, v mnoha eukaryotických buňkách mitochondrie kontinuálně mění svůj tvar a často se dělí nebo fúzí. Tyto dynamické procesy jsou důležité pro mnoho mitochondriálních funkcí v životě a smrti buňky.

#### 2.1.2.1. Buněčné role mitochondriální fúze a dělení

Morfologie a počet objektů mitochondriální sítě závisí na rovnováze mezi procesy fúze a dělení-dezintegrace. Posun směrem k fúzi umožňuje buňce stavět dlouhou propojenou mitochondriální síť, zatímco posun k dělení produkuje mnoho morfologicky odlišných malých organel. Protáhlé vzájemně propojené mitochondriální sítě se často vyskytují u metabolicky aktivních buněk, tedy proto je možné považovat stav existence jediné kontinuální mitochondriální sítě za "klidový" a fyziologický. Naopak, za patologických stavů převažuje často dezintegrace této sítě. Tyto sítě jsou schopny přenosu mitochondriálního membránového potenciálu z oblastí bohatých na kyslík do oblastí chudých a tím umožní efektivní rozložení energie v buňce. Navíc, spojitost sítě je důležitý faktor, který určuje buněčnou závislost na kalciových signálech a fúze mitochondrií je nezbytný krok v určitých vývojových procesech, jako například embryonální vývoj a spermatogeneze. Kromě toho, fúze slouží k míchání a sjednocení mitochondriálního kompartmentu, především matrixového, ale také PIM a OM. Proto je udržování kontinuity mitochondriální sítě považováno za aktivitu, která je brána jako ustavení obranného mechanismu proti stárnutí (viz výše). Jelikož je DNA lokalizovaná přímo v místě produkce superoxidu, je náchylná k mutacím zprostředkovaným hydroperoxylovým radikálem a dalšími reaktivními kyslíkovými sloučeninami (ROS), a jak již bylo uvedeno výše, v důsledku toho vznikající mutace se stářím akumulují, dokud není porušena bioenergetická prahová úroveň, vedoucí k mitochondriálním dysfunkcím. Teorie stárnutí předpovídá, že akumulace mutací mtDNA vede k s věkem asociovaným patologiím a smrti. Fúze mitochondrií ruší projevy poruch respirace, protože umožňuje komplementaci produktů exprese mtDNA v heteroplasmických

buňkách, které mají nahromaděny somatické mutace. Stejně jako fúze, dělení mitochondrií také hraje roli v buněčném životě a smrti.

Protože se mitochondrie rozmnožují dělením již existujících organel, mitochondriální dědičnost závisí na dělení buněk během cytokineze. Navíc dělení mitochondrií je důležité v procesech buněčné diferenciaci včetně embryonálního vývoje nebo vzniku synapsí v neuronech. V neposlední řadě je dělení mitochondrií spojeno s procesem apoptózy, kdy dochází k fragmentaci mitochondriální sítě s uvolněním cytochromu c (také díky funkci OPA1) a aktivaci kaspázové dráhy (Westermann, 2008).

#### 2.1.2.2. Molekulární mechanismy mitochondriální fúze

Jelikož jsou mitochondrie organely s dvojitou membránou, musí dojít k spojení obou dvojitých membrán koordinovaně. V prvním kroku dochází k formaci trans komplexů zapojujících povrchové proteiny obou membrán. Tento krok zajišťuje specifitu reakce a zprostředkuje přilnutí sousedních membrán. V tomto procesu hrají klíčovou úlohu proteiny mitofuziny Mfn1 a Mfn2. Druhým krokem je spojení lipidových dvojvrstev dohromady.

Po splynutí vnějších membrán musí proběhnout splynutí membrán vnitřních. Fúze vnitřní membrány je částečně citlivá k disipaci elektrického membránového potenciálu a oddělená od procesů fúze vnějších membrán, tedy je založená na jiném mechanismu. Hlavní roli zde hraje protein OPA1, který také formuje trans komplexy, které přiblíží obě vnitřní membrány. Oba procesy jsou koordinované a vzájemně propojené.

K fúzi vnitřní mitochondriální membrány je zapotřebí lokální koncentrace GTP v periferní mezimembránovém prostoru PIM. GTP je produkováno v jednom z kroků Krebsova cyklu. Zrychlením respirace je tedy vytááno více GTP, a tento jednoduchý mechanismus je základem profúzní morfologie mitochondrií respirujících buněk. Není však známo jak je GTP vytvářené v matrix exportováno do PIM. (Westermann, 2008).

##### 2.1.2.2.1. Mitofuziny

Mitofuziny jsou vzdáleně příbuzné GTPáze dynaminu. Tvoří oligomery a hydrolyzují GTP, čímž indukují přestavbu mitochondriální membrány vedoucí k procesu fúze. V savčích buňkách se exprimují dvě izoformy, mitofuzin1 (Mfn1) a mitofuzin2 (Mfn2), které mohou tvořit vzájemně heterodimery. Není jisté, zda jsou vzájemně nahraditelné nebo jestli má každý jinou funkci. Byla pozorována větší GTPázová aktivita u Mfn1, navíc je potřebný pro funkci OPA1. Mutace v Mfn2 způsobuje CMT2A. Hlavním mechanismem funkce mitofuzinů je formování  $\alpha$ -helixových struktur párováním tzv. coiled-coil domén. Tyto struktury přitáhnou přilehlé membrány k sobě blíž a umožní tím spojení lipidových dvojvrstev. Navíc mitofuziny mají všechny domény nacházející se ve fúzogenu, mají nadšroubovicové oblasti, dvě transmembránové domény a GTPázovou doménu, která může poskytovat energii potřebnou k překonání energetické bariéry při spojování lipidových dvojvrstev. Není sice jisté, jestli vystupují jako fúzogeny, ale v procesech fúze jsou určitě nezbytné.

Mitofuziny jsou zakotveny ve vnější membráně transmembránovou doménou tak, že oba konce ční do cytozolu. N-konec má funkci GTPázy a C-konec je tvořen nadšroubovicí. K fúzi vnější mitochondriální membrány je tak zapotřebí lokální koncentrace GTP v periférii této membrány (Westermann, 2008).

#### 2.1.2.2.2. OPA1

Protein OPA1 je lokalizován v intermembránovém prostoru a asociuje s oběma membránami. Obsahuje mitochondriální cílovou sekvenci (MIS) na N konci, GTPázovou „coiled coil“ doménu a C koncovou GED (*GTPase Effector Domain*) doménu. Po transportu proteinu do mitochondrií je protein rozštěpen mitochondriální peptidázou MMP. Lidský gen OPA1 má 5 izoform, které vznikají z 8 variant alternativně sestříhaných mRNA a následných posttranslačních modifikací. Ztráta genu OPA1 vede k fragmentaci mitochondriálních tubulů. Jak již bylo řečeno, OPA1 může kooperovat s mitofuziny, konkrétně s Mfn1 a indukovat vznik tubulů. Dále snížená exprese OPA1 vede k zvýšení citlivosti buněk k proapoptotickým stimulům a zrychlení spontánní apoptózy a usnadňuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Tedy, reorganizace mitochondriální sítě způsobená ztrátou OPA1 může představovat mechanismus vlivu tohoto dynaminu na apoptózu. Zdá se, že OPA1 se ještě před fragmentací uvolňuje spolu s cytochromem c. Různé varianty OPA1 mají rozdílný vliv na dynamiku mitochondrií a mechanismus apoptózy. Mutace OPA1 způsobuje chorobu ADOA (autosomal dominant optic atrophy), která představuje ztrátu zraku (Olichon et al., 2006).

#### 2.1.2.3. Molekulární mechanismus dělení mitochondrií

Hlavní úlohu hrají protein vnitřní membrány Fis1 a cytosolický protein DRP1, které se shromažďují na povrchu v místech, kde probíhá dělení. V prvním kroku protein Fis1 napomáhá k shromažďování proteinu DRP1 na membráně po předchozí fosforylaci DRP1. Ten hraje klíčovou úlohu v samotném střížení membrány. Na povrchu membrány se formuje do filament spirálovitého tvaru a pokrývá její povrch. Po vazbě GTP a následné hydrolýze dojde ke konstrikci a střížení vnější membrány. O mechanismu dělení vnitřní membrány není příliš známo. Aktivita DRP1 sice je dostačující k současnému oddělení obou membrán, nicméně je možné, že pro vnitřní membránu existuje jiný nezávislý mechanismus. Průměr spirál, které DRP1 formuje je pouze okolo 100 nm, zatímco průměr mitochondrií 3-4x větší. Proto tedy pro jejich formaci musí dojít v místě střížení mitochondrií k jejich zúžení. Pravděpodobně je tato konstrikce výsledkem dělení vnitřní membrány v místě štěpení. K tomuto kroku přispívá MTP18, protein vnitřní membrány, důležitý pro integritu mitochondriální sítě (Westermann, 2008).

#### 2.1.2.4. Regulace dělení a fúze mitochondrií

Pro správnou morfologii mitochondrií je důležité, aby se mezi oběma procesy udržovala vyváženost. V závislosti na požadavcích buňky a probíhajících signálních drahách se morfologie mitochondrií mění a poměry mezi fúzí a dělením se posouvají ve prospěch jednoho či druhého mechanismu. Poruchy dynamiky mitochondrií pak vedou k různým onemocněním, například mutace genu *Mfn2* způsobuje neurodegenerativní onemocnění CMT. V případě řízení mechanismu fúze u savců se jedná především o regulaci proteinu *Mfn2*. Proapoptotické proteiny *Bax* a *Bak* indukují fúzi regulací submitochondriální distribuce tohoto proteinu. Regulace dělení je sprostředkována přes protein *DRP1*. Ten interaguje s proteinem *MARCH-V*, což je ubikvitin ligáza vnější membrány. Protein *DRP1* může být také fosforylován cyklin dependentní kinázou, což pak vede k fragmentaci mitochondrií při mitóze (Westermann, 2008).

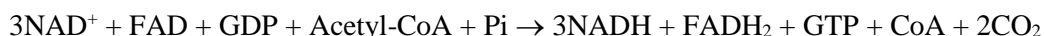
Proteiny *Bax* a *Bak* také ovlivňují fúzi u normálních neapoptotických buněk tím, že regulují shromažďování proteinu *Mfn2* do velkých komplexů. V jejich nepřítomnosti se komplexy zmenšují a protein *Mfn2* se redistribuuje z povrchových bodů na membráně do rovnoměrného rozložení po celé organele (Cervený et al., 2007).

#### 2.1.2.5. Prohibitin

Prohibitiny jsou membránové proteiny s řadou různých funkcí v různých kompartmentech buňky. Mitochondriální prohibitin kontroluje buněčnou proliferaci, morfogenezi křídla a integritu mitochondrií. Je tvořen komplexem podjednotek *PHB1* a *PHB2* a nachází se na vnitřní membráně. Každá podjednotka je ukotvena svým hydrofobním amino koncem v membráně, C konec je volný a situovaný do intermembránového prostoru. Prohibitin tvoří velké kruhové komplexy o průměru 20-25 nm na membráně, složené z mnoha kopií obou podjednotek. Jejich ztráta vede ke fragmentaci mitochondriální sítě, jsou tedy důležité pro mechanismus fúze. Strukturální změny se připisují ztrátě dlouhé izoformy *OPA1*. Aktivita *OPA1* závisí na vyváženém zastoupení dlouhé (*L-OPA1*) a krátké (*S-OPA1*) izoformy, která vzniká proteolytickým štěpením dlouhé izoformy. V nepřítomnosti prohibitinů se ztrácí dlouhá izoforma, což naznačuje zrychlené zpracování *OPA1*. Zároveň exprese neštěpící se varianty *OPA1* obnovuje původní tvar tubulů, tedy prohibitiny regulují tvar mitochondrií skrze protein *OPA1*. Nesprávné formování proteinu *OPA1* také ukazuje spojení prohibitinů s procesy apoptózy, jelikož *OPA1* reguluje restrukturalizaci mitochondrií v raných fázích apoptózy, která napomáhá uvolnění cytochromu *c* z intermembránového prostoru (Merkwirth and Langer, 2008)

### 2.1.3. Krebsův cyklus, oxidativní fosforylace

Krebsův cyklus je centrální dráhou buněčného metabolismu. Odpovídá za oxidaci většiny cukrů, mastných kyselin i aminokyselin a vytváří četné metabolické prekurzory. Do Krebsova cyklu mohou vstupovat tyto látky po degradaci na acetyl-CoA, který je za přítomnosti citrát syntázy schopen reagovat s oxalacetátem za vzniku kyseliny citronové. Ta je součástí dalších reakcí Krebsova cyklu. Stechiometrie odbourávání acetylové skupiny v KC:



Jedna acetylová skupina je tedy oxidována na dvě molekuly  $\text{CO}_2$ , přičemž vzniká energeticky bohatá molekula GTP a 4 páry elektronů, tři páry elektronů v NADH a jeden pár v  $\text{FADH}_2$ . Tato redukční činidla přenášejí energeticky bohaté elektrony do dýchacího řetězce.

V dýchacím řetězci dochází k přenosu elektronů z NADH na komplex I (NADH dehydrogenáza) a z  $\text{FADH}_2$  na komplex II (sukcinát – ubichinon dehydrogenáza). Z těchto komplexů jsou elektrony přeneseny koenzymem Q na komplex III (koenzym Q – cytochrom c reduktáza) a dále cytochromem c na komplex IV (cytochrom c oxidáza), kde jsou 4 elektrony použity k redukci  $\text{O}_2$  na dvě molekuly vody.

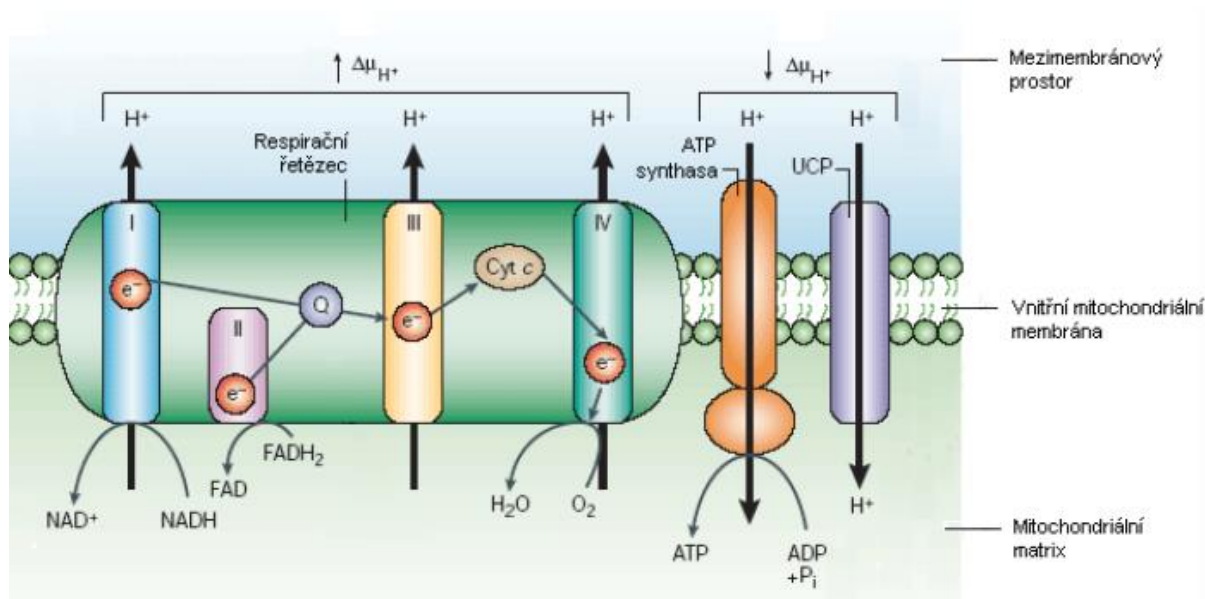
Zatímco elektrony procházejí redoxně aktivními jednotkami jednotlivých komplexů, dochází k transportu  $\text{H}^+$  z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Vzniká tak protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, tzv. protonmotivní síla. Ta je podle Mitchellovi chemiosmotické teorie spřažena se syntézou ATP.  $\text{F}_0$  jednotka mitochondriální ATPázy využívá zpětný tok protonů, který je převeden na rotaci určitých podjednotek  $\text{F}_1$  komplexu a jeho konformačních změn. Tyto změny potom zajišťují tvorbu ATP.

Elektrochemický gradient ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) je jako protonmotivní síla  $\Delta p$  obvykle vyjadřována v jednotkách mV a její hodnoty se obecně pohybují mezi 150 a 200 mV. Z něj můžeme vypočítat také protonmotivní sílu  $\Delta p$ :

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{\text{H}^+}}{F} = \Delta\Psi_m - 59\Delta p\text{H}_m \text{ [mV]},$$

kde  $F$  je Faradayova konstanta,  $\Delta\Psi_m$  elektrický potenciál membrány a  $\Delta p\text{H}_m$  chemický potenciál membrány. Maximální spřažení a tedy maximální protonmotorické síly je dosaženo v tzv. stavu 4 za absence syntézy ATP a zpětného toku  $\text{H}^+$ . Nižší stupeň spřažení mitochondrií nastává ve stavu 3. V tomto stavu, kdy probíhá oxidativní fosforylace, je část  $\Delta p$  využívána pro syntézu ATP. Respirační kontrolou je nazýván mechanismus, kdy vyšší  $\Delta p$  zabraňuje dalšímu pumpování  $\text{H}^+$ . Tím je zpětnovazně snížena respirace. Naopak odspřažením nazýváme umělé zvýšení toku  $\text{H}^+$  přes vnitřní membránu, která má za následek zvýšení respirace. Podmínkou spřažení mezi transportem elektronů a syntézou ATP je nepropustnost vnitřní mitochondriální membrány. Existují však látky s protonoforickou aktivitou, odspřažovače, které zvyšují propustnost membrány pro  $\text{H}^+$  ionty. Způsobí

tím odpřažení bez následné syntézy ATP, a tím disipaci energie na teplo, protože zpětný tok  $H^+$  se neuskutečňuje ATP-syntázou, ale probíhá mimo ni. Klasickými odpřahovači jsou např. 2,4-dinitrofenol a karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon (FCCP). Odpřahovače narušením ustálené respirační kontroly urychlují respiraci a přenos elektronů a tím indukují tvorbu tepla, protože energie elektrochemického gradientu, která měla být původně použita k syntéze ATP, je použita k přenosu  $H^+$  zpět do matrix. V průběhu fylogeneze se vyvinuly odpřahující proteiny, které slouží jako regulovatelné odpřahovače a mohou za jistých podmínek fyziologicky odpřahovat mitochondrie *in vivo* a tím disipovat energii.



Obr. 1.1. Oxidativní fosforylace (upraveno z Krauss et al. 2005)

Během oxidativní fosforylace nevzniká pouze ATP a voda, ale uvolňuje se i tzv. superoxidový aniont  $O_2^{\bullet-}$ , což je radikál - látka obsahující nepárový elektron. Ačkoliv je vytvářen v malé míře, (řádu přibližně 1%) podílí se na vzniku dalších radikálů a peroxidů (hydroperoxylový radikál  $HO_2^{\bullet}$ , hydroxylový radikál  $\bullet OH$ , uhličitánový aniont  $HCO_3^{\bullet-}$  atd.). Vzniká např. autooxidací ubisemichinonového radikálu na komplexu III. S vyšším potenciálem se vytváří více superoxidu. Je to dáno tím, že pomalejší tok elektronů umožní vyšší poločas života přechodných radikálů a tím umožní jejich reakci s kyslíkem. Proto při syntéze ATP i odpřažení je tvorba superoxidu snížena. Ve stavu 4, kdy je  $\Delta\Psi$  vysoký, respirace limitována nedostatkem ADP, je tvorba superoxidu maximální. Superoxid je dismutován matrixovou MnSOD a CuZnSOD v mezimembránovém prostoru na  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  volně difunduje přes membrány a může být zdrojem vzniku dalších a reaktivnějších intermediátů, např. hydroxylových radikálů  $OH^{\bullet}$  (Jezek and Hlavata, 2005).

## 2.2. Apoptóza

Programovaná buněčná smrt, apoptóza, je nezbytný fyziologický proces, který hraje klíčovou roli v udržování homeostáze ve tkáních a důležitý krok při odstranění buněk následující po vlivu toxických látek, stejně tak jako při vývoji buněk nebo vzniku degenerativních poruch. Na morfologické úrovni je charakterizovaná jako srašťování buněk, změna tvaru plasmatické membrány, kondenzace chromatinu a fragmentace jaderné DNA. Apoptóza není série jednotlivých jasně definovaných drah, ale spousta regulovaných vzájemně propojených drah. Vnější dráha zahrnuje iniciaci apoptózy přes spojení s receptory plasmatické membrány. Vnitřní dráha zahrnuje iniciaci apoptózy, jakožto výsledek narušení intracelulární homeostáze. V tomto kroku jsou pro její realizaci důležité mitochondrie, je tedy označena jako mitochondriální dráha buněčné smrti. (Ashe and Berry, 2003, Orrenius et al., 2003)

### 2.2.1. Kaspázy (cystein aspartát specifické proteázy)

Patří do rodiny intracelulárních proteinů, účastnících se iniciace i realizace apoptózy. Dnes je známo minimálně 14 savčích kaspáz, u člověka zatím nejsou známy všechny homologie. Také ne u všech členů je známý jejich přesný cíl a fyziologická role. Obecně ale mají vliv na apoptózu nebo zánět. Kaspázy jsou syntetizovány jako prokaspázy, které jsou proteolyticky upraveny v místě aspartátového zbytku na jejich aktivní formu. Všechny obsahují vysoce homologní proteázovou doménu a také NH<sub>2</sub> terminální prodoménu (podjednotku). Proteázová doména je složena ze dvou podjednotek asi 20 a 10kDa, které asociují a tvoří heterodimer, následující do proteolytického procesu. Dva heterodimery pak tvoří tetramer, což je aktivní forma kaspázy. NH<sub>2</sub> koncová doména má různou délku, podle funkce dané kaspázy. Iniciační a zánětlivé kaspázy mají tuto prodoménu dlouhou (více jak 100 aminokyselin), zatímco efektorové kaspázy jí mají krátkou (méně jak 30). Dlouhé prodomény obsahují specifické motivy nezbytné pro kaspázovou aktivitu. Mohou to být jak DED (*death effector domains*) u kaspáz 8 a 10, nebo CARD (*caspase recruitment domains*) u kaspáz 1, 2, 4, 5, 9, 11, 13 a 14. CARD sprostředkují interakce mezi kaspázami a různými adaptorovými molekulami (Chang and Yang, 2000).

Kaspázy obsahující DED (8 a 10) jsou iniciační, CARD kaspázy jsou jak iniciační (2 a 9), tak efektorové (ostatní). Kaspáza 12 navíc hraje i roli v stresem indukované apoptóze v endoplasmatickém retikulu. Gen pro tuto kaspázu nebyl identifikován u člověka, možná u člověka není součástí apoptotických drah.

Indukce apoptózy spočívá v aktivaci iniciačních kaspáz. DR (*death receptors*) přes adaptorové molekuly interagují s iniciačními kaspázami 2, 8 nebo 10, zatímco vnitřní signály aktivují kaspázu 9. Aktivace iniciačních kaspáz je první krok vysoce regulované nevratné proteolytické dráhy. Iniciační kaspázy jsou schopny štěpit prokaspázy a tedy být schopny aktivovat efektorové kaspázy (3, 6 a 7) nebo mohou zesílit kaspázovou dráhu zvýšenou aktivací iniciačních kaspáz. Efektorové kaspázy

jsou společné pro vnitřní i vnější dráhy, tedy konečné morfologické a biochemické znaky apoptózy nejsou závislé na jejich induktoru (Ashe and Berry, 2003).

### **2.2.2. Proteiny rodiny Bcl-2**

Bcl-2 proteiny jsou důležité intracelulární mediátory rozhodující o dalším přežití buňky či nastolením apoptózy, jejími členy jsou tedy pro i antiapoptotické proteiny. Jejich klasifikace je spojena s přítomností či absencí BH (*Bcl-2 homology*) domén. Byly popsány čtyři BH domény: BH1, BH2, BH3 a BH4. Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> obsahují všechny BH domény, jsou inhibitory apoptózy, ačkoli jejich mechanismus zůstává nezjištěn. Předpokládá se, že fungují jako antagonisté proapoptotických členů. Další dvě skupiny jsou proapoptotické. Je to bax rodina (proteiny Bax, Bok a Bak), jejíž členové mají domény BH1, BH2 a BH3 a rodina BH3-only (proteiny Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa a PUMA). Zdá se, že BH3-only proteiny mají funkci závislou na expresi Bax proteinů, protože neindukují apoptózu bez jejich přítomnosti. Nicméně, jejich mechanismy jsou také nejasné (Lindsten et al., 2000).

### **2.2.3. Vnitřní signalizace buněčné smrti**

Tyto dráhy vycházejí z proapoptotických signálů v důsledku porušení intracelulární rovnováhy, tedy signály pro buněčnou „sebevraždu“ pocházejí z buňky samotné. Primárním intracelulárním místem iniciace jsou mitochondrie (ikdyž to bylo také prokázáno u endoplasmatického retikula). Mitochondrie hrají dominantní úlohu v metabolismu buňky, ale také mají důležitou roli při apoptóze. Mnoho apoptotických proteinů je lokalizováno v mitochondriích a po určitém stimulu uvolněno. Cytochrom c (lokalizovaný v mezimembránovém prostoru, především intrakristálním ale i v periferním mezimembránovém prostoru) je uvolněn do cytozolu, kde interaguje s Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), ATP/dATP a kaspázou 9 a vytváří spolu apoptozóm. Apaf-1 obsahuje CARD doménu, kterou sprostředkuje interakci s kaspázou 9. Zároveň má doménu WD-40, která zajišťuje inaktivitu proteinu v nepřítomnosti cytochromu c. V přítomnosti cytochromu c a ATP/dATP se Apaf-1 agreguje a váže kaspázu 9, ta se proteolyticky aktivuje a dále pak aktivuje kaspázy 3 a 7. Jejich dalším působením dochází k buněčné smrti. Dalším proteinem uvolněným po stimulu z mitochondrie je Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases/ direct IAP-binding protein of low isoelectric point*). Tento protein se váže k BIR doménám proteinů IAP (*inhibitor of apoptosis protein*), čímž odstraní jejich inhibiční efekt na aktivitu kaspáz. Třetí mitochondriální faktor, zapojený do apoptózy je AIF (*apoptosis-inducing factor*). Je to flavoprotein, který se translokuje do jádra a tam indukuje částečnou fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu. Pravděpodobně spouští apoptózu nezávisle na kaspázách, asi v kooperaci s dalšími faktory (Zou et al., 1999, Ashe and Berry, 2003).



#### 2.2.3.1. Mechanismy uvolnění proapoptotických proteinů.

Existuje několik teorií, jak se proteiny uvolňují při apoptóze. Jedna hypotéza předpokládá otevření PTP (*permeability transition pore*) či také MPT (*mitochondrial permeability transition*) pórů a ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu. Póry jsou ale malé, jen pro proteiny do 1500 Da. Je možné, že se póry dostane do mitochondrie tekutina a naruší se pak vnější membrána a proteiny se uvolní. Ačkoliv, ukázalo se také, že cytochrom c se objevuje ještě před ztrátou mitochondriálního membránového potenciálu. Další hypotéza je založená na schopnosti Bcl-2 proteinů zabránit uvolnění cytochromu c. Antiapoptotické členy interagují s proapoptotickými, čímž inhibují jejich schopnost uvolnit protein z mitochondrie. Tato hypotéza je podpořena strukturou Bcl-2 proteinů i jejich schopností translokace z cytozolu do mitochondrie během apoptózy. Jsou strukturně stejné s póry formujícímu toxinu diphtherie, je tedy možné, že proapoptotické proteiny rodiny Bax oligomerizují a vytvářejí mitochondriální kanály, kterými mohou procházet proapoptotické proteiny. Navíc, Bcl-2 může bránit této oligomerizaci na vnější membráně (Mikhailov et al., 2001, Sun et al., 2002). V poslední době se ukazuje důležitost mechanismu dělení (*fission*) mitochondrií v procesu apoptózy. GTPáza DRP1 asociuje s vnější mitochondriální membránou skze interakci s proteinem Fis1 a dochází k fragmentaci mitochondriální sítě. Reorganizace membrány vede k uvolnění cytochromu c, procesu se účastní proteiny Bak a Bax. Možné mechanismy kooperace jsou popsány v kapitole 2.5.5. (Youle and Karbowski, 2005).

#### 2.2.3.2. protein p53

p53 je tumor supresorový protein hrající roli v regulaci buněčné smrti. Aktivuje se při poškození DNA v buňce a účastní se při apoptóze. Přímou aktivuje Bax, i když jeho zvýšená exprese může indukovat apoptózu nezávisle na Bax. Navíc p53 indukuje i členy BH3 rodiny, Noxa a PUMA. Apaf-1 byl také identifikován jako další cíl pro p53. Kromě těchto cílů bylo zjištěno mnoho dalších genů regulovaných p53, které jsou zapojeny do apoptózy, p53 je pravděpodobně součástí vnitřních drah a účastní se i regulace DR receptorů (Nakano and Vousden, 2001, Fortin et al., 2001).

### **2.2.4. Vnější signalizace buněčné smrti**

#### 2.2.4.1. DR receptory (*Death receptors*)

DR receptory buněčného povrchu patří do rodiny receptorů TNFR (*tumor necrosis factor receptor*). Váží příslušné ligandy a tyto komplexy pak spouští apoptotické kaskády. Nejznámějšími členy jsou Fas (jinak také Apo1 nebo CD95) a TNFR1. Dalšími členy jsou DR3 (jinak také Apo3, WSL-1, TRAMP nebo LARD), DR4, DR5 (jinak také Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 nebo KILLER) a DR6. Tyto proteiny jsou transmembránové receptory typu 1, charakteristické extracelulárními doménami bohatými na cystein (CRD) a intracelulárními doménami (DD; *death domains*). CRD jsou zodpovědné za vzájemnou asociaci receptoru (CRD1) a za interakci s ligandem

(CRD2 a CRD3). Proteiny této rodiny se musí nejdříve složit a pak až dochází k vazbě ligandu. Cytoplasmatický konec obsahuje DD velkou asi 80 AK, která signalizuje buněčnou smrt. Skládá se z šesti antiparalelními amfipatickými  $\alpha$ -helixy složenými v konfiguraci, tvořící povrch vystavující mnoho nabitých zbytků. Po navázání ligandu doména DD pravděpodobně interaguje skrze elektrostatické interakce. Další proteiny s DD doménou jsou navázány a fungují jako adaptorové proteiny signální dráhy. S těmi interagují další proteiny, mimo jiné CARD (Ashe and Berry, 2003).

#### 2.3.4.2. Receptory DR zprostředkovaná apoptóza

##### 2.2.4.2.1. FasL signalizace

Protein Fas je zastoupen v řadě tkání, ale nejvíce je exprimován v srdci, brzlíku, játrech a ledvinách. Ligandem pro tento receptor je FasL, transmembránový protein typu II, exprimovaný takřka výhradně v aktivovaných T buňkách. FasL obsahuje extracelulární samosestavovací doménu nezbytnou pro oligomerizaci ligandu. Gen pro FasL je obecně transkripčně inaktivní, tedy Fas/FasL zprostředkovaná akce je regulována jeho aktivací. Fas/FasL systém je zodpovědný za tři způsoby zabíjení buňky: aktivací indukovaná buněčná smrt T buněk, zabíjení buněk prostřednictvím cytotoxických T lymfocytů a zabíjení zánětlivých buněk ve výsadně imunitních místech a cytotoxických T lymfocytů nádorovými buňkami. V poslední době se ukázal i vliv Fas/FasL systému apoptóze neuronů následující po poškození mozku, mozkové ischemii a apoptóze během vývoje neuronů. Spojení Fas a FasL navozuje vazbu cytozolového adaptorového proteinu FADD (*Fas-associated death domain protein*; také zvaný MORT1). Tento protein má kromě DD také aminokoncovou DED doménu, přes kterou asociuje s dalšími proteiny, mající DED, jako jsou kaspázy 8 a 10. Tento komplex, obsahující Fas, FasL, FADD a kaspázu 8 nebo 10, se nazývá smrt-indukující signální komplex (*death-inducing signaling complex*; DISC). Oligomerizací se tedy indukuje proteolytická aktivace iniciátorových kaspáz a proces apoptózy se dokončí štěpením následných cílů.

Kromě tvorby komplexu DISC jsou ještě typy buněk, užívající přímou Fas signalizaci. První typ buněk požaduje aktivaci kaspázy 8 a následně kaspázy 3 a v druhém typu buněk regulovaná aktivace kaspázy 8 jde smyčkou přes mitochondriální aktivaci. Tedy vnější apoptotická dráha kooperuje s vnitřní. Mezi buňky prvního typu patří periferní T buňky a thymocyty, druhého typu jsou buňky jaterní nebo neurony. V buňkách typu I kaspáza 8 přímo aktivuje následně kaspázy 3, 6 a 7. Apoptóza je zde asociována s poškozením mitochondrií a uvolněním cytochromu c, nedochází zde k inhibici vlivem antiapoptotických Bcl-2 proteinů. Mitochondriální cesta u buněk typu II zahrnuje štěpení proteinu Bid (rodina BH3-*only*) kaspázou 8. Štěpený Bid (tBID) je důležitý pro uvolnění cytochromu c z mitochondrií a také podporuje uvolnění Smac/DIABLO, který pravděpodobně hraje roli u buněk typu I i typu II. Tento protein obchází antiapoptotický účinek Bcl-X u buněk typu II, konvertuje je na buňky typu I (Kischkel et al., 2000).

Kromě regulace Fas expresí FasL ligandu existují ještě další přídavné mechanismy. Aktivací proteinu p53 dochází k redistribuci Fas na buněčném povrchu a tím zcitlivění buněk k apoptóze sprostředkované Fas. Tato apoptóza není inhibována aktinomycinem D ani cykloheximidem, což indikuje, že za těchto okolností apoptóza není závislá na transkripci ani translaci. Zdá se, že transkripce p53 má roli v apoptóze sprostředkované Fas. V genu pro myši i lidský Fas byly detekovány responzivní elementy pro p53, což znamená, že p53 po aktivaci může na úrovni transkripce přímo zvyšovat expresi Fas. Také byla pozorována zvýšená exprese Fas po působení různých chemoterapeutických látek, v závislosti na přítomnosti nativního p53. Navíc, byla pozorována odlišná regulace Fas v tkáních kontrolní a p53<sup>-/-</sup>-knockout myši. Je zde rovněž tkáňová specifita. V játrech a slezině je exprese Fas závislá na přítomnosti p53, v jiných tkáních (např. v mozku) nikoliv. Neplatí to však stoprocentně, byla pozorována korelace mezi Fas a p53 v neuronech poškozených kainátem (Munsch et al., 2000, Tan et al., 2001).

Regulace apoptózy sprostředkované Fas může také probíhat skrz asociaci FasL s receptorem DcR3 (*decoy receptor 3*), což je sekretovaný extracelulární DR. DcR receptory inhibují apoptózu kompeticí. Odebírají ligandy pryč z jejich příslušných DR receptorů. Řada nádorových buněk exprimuje zvýšené hladiny DcR, čímž může být dána jejich rezistence k náporu cytotoxickým imunitním mechanismům. Regulace se děje na úrovni kaspázy 8. Protein FLIP (*FLICE inhibitory protein*) má dvě formy, FLIP<sub>S</sub> a FLIP<sub>L</sub>. Obě asociují s FADD přes interakci s DED. FLIP<sub>L</sub> také může přímo interagovat s prokaspázou 8 (přes DED a C koncový region homologní s kaspázou). Tím kompetuje s kaspázou 8 o vazebné místo na FADD a zároveň inhibuje zpracování prokaspázy 8. Zvýšená exprese FLIP byla zjištěna u melanomových nádorových buněk rezistentních k FasL, tedy jeho exprese může zprostředkovat rezistenci k apoptóze u nádorových buněk (Ashe and Berry, 2003).

Dále existuje proapoptická Fas/FasL dráha nezávislá na FADD. Protein Daxx, který se váže na DD doménu Fas, aktivuje dráhu JNK (Jun NH<sub>2</sub>-terminální kináza). Daxx může být spojení mezi Fas a Ask1 (*apoptosis signal-regulating kinase*), což je MAPKKK (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*). Apoptóza sprostředkovaná Ask1 je závislá na aktivaci kaspázy 9, která je zase závislá na uvolnění cytochromu c z mitochondrií. JNK posiluje apoptózu skrz fosforylaci a tím inaktivaci Bcl-2 a fosforylaci a stabilizaci c-Myc (ten je výsledkem narušení integrity mitochondrií způsobené proteinem Bax a uvolnění proapoptických faktorů). Tato dráha proteinů Fas, Daxx a Ask1 je nezávislá na aktivaci kaspázy 8. Jiná práce naopak tvrdí, že JNK apoptická dráha může být na FADD a kaspáze 8 závislá. U neuronů ošetřených β-amyloidem se aktivoval JNK a následně indukovala tvorba transkripčního faktoru c-jun. Ten zvýšil expresi FasL, který indukuje apoptózu sprostředkovanou FADD a kaspázou 8. Přesná úloha JNK ve Fas apoptóze je ovšem nejasná (Hatai et al., 2000, Juin et al., 2002, Morishima et al., 2001)

#### 3.2.4.2.2. Signalizace TNF

Druhá hlavní apoptotická dráha je sprostředkována přes TNF (*tumor necrosis factor*). TNF je exprimován hlavně v aktivovaných makrofázích, T buňkách a některých epiteliálních nádorových buněčných liniích. Signál je přenášen dvěma receptory na buněčném povrchu TNF-R1 a TNF-R2. Oba sprostředkovávají přímé buněčné odpovědi, TNF-R1 cytotoxicitu a TNF-R2 proliferaci T buněk. Po vazbě TNF na receptor se připojuje adaptorový protein TRADD (*TNF receptor associated DD*). Ten může interagovat s FADD, TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) nebo RIP (*receptor interacting protein*) a indukovat apoptózu. FADD podobným mechanismem jako výše popsany Fas, RIP přes kaspázu 2, která podobně jako kaspáza 8 uvolní proapoptotické faktory cytochrom c, DIABLO a AIF (Guo et al., 2002). TRAF2 aktivuje jaderný faktor NF- $\kappa$ B a JNK. Dále se pak dráhy větví, NF- $\kappa$ B indukuje transkripci antiapoptotických proteinů, navíc se zdá, že aktivace NF- $\kappa$ B zprostředkovaná TNF inhibuje aktivaci JNK, což by mohl být další její antiapoptotický mechanismus (Li and Stark, 2002, Tang et al., 2001).

Kromě výše popsanych drah Fas a TNF existují ještě další, méně prozkoumané mechanismy spojené s DR receptory. Je to například signalizace přes receptor Apo3 a jeho ligand Apo3L, které vykazují značnou podobnost s s TNF-R1 a TNF i podobný mechanismus signalizace, mají ale širší tkáňovou distribuci (Pan et al., 1997).

#### **2.2.5. Apoptóza a dělení mitochondrií**

Změny tvaru mitochondrií úzce souvisí s procesem apoptózy. Byly navrženy čtyři možné mechanismy, jakými dělení mitochondrií kooperuje s průběhem apoptózy.

- I. Oba procesy translokace proteinu Bax i dělení mitochondrií indukované proteinem DRP1 jsou zodpovědné za apoptózu a pracují tandemově. Aktivní Bax vytváří kanály ve vnější membráně a zároveň se účastní na aktivaci dělení indukovaného DRP1. Indukce apoptózy ale probíhá u obou nezávisle.
- II. Aktivace DRP1 je podporována translokací Bax a je zodpovědná za permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Translokace Bax bez DRP1 není dostatečná pro uvolnění cytochromu c.
- III. Dělení mitochondrií je nezbytné pro permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Apoptotický signál vyvolá uvolnění vápníku z ER a to spustí translokaci DRP1 do mitochondrie a indukuje fragmentaci mitochondrií. Tento proces pak dále indukuje translokaci Bax, což vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.
- IV. Dělení mitochondrií je ve sledu za procesem permeabilizace vnější mitochondriální membrány a není pro něj nezbytné. Po indukci apoptózy se Bax translokují do mitochondrie a po permeabilizaci vnější mitochondriální membrány se uvolní z mitochondrie proteiny

OPA1 a DDP. Uvolnění OPA1 může pak inhibovat fúzi a zároveň se DDP váže k DRP1 a napomáhá mu vstoupit do mitochondrie a zahájit dělení sítě. (Jeong and Seol, 2008)

## 2.3. Protein CIDEa

Jako další protein s pravděpodobnou s mitochondriální lokalizací a související s procesem apoptózy je CIDEa; *Cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-a)-like effector A*, člen proteinové rodiny CIDE.

### 2.3.1. Struktura

CIDEa je protein s velkou homologií k N koncové oblasti proteinu DFF45. Lidský gen CIDEa vykazuje 83% homologii s myší. Analýzy sekvencí cDNA u myši i člověka ukázaly dva potenciální translační počátky vzdálené 51 nukleotidů po směru translace. Podle těchto iniciačních kodónů jsou produkovány dva produkty. Delší protein o velikosti 217 aminokyselin, kratší protein postrádá 17 N (amino) koncových aminokyselin. N- koncová oblast proteinů CIDE (CIDE-N doména) vykazuje 39 a 29% homologii s DFF45 a C (karboxy) koncová část (CIDE-C doména) 53 a 54% homologii s FSP27 (CIDE-C), jehož exprese je asociována s terminální diferenciací tukových buněk (Inohara et al., 1998). Srovnání sekvencí proteinů CIDE rodiny je na obr. 1.3.

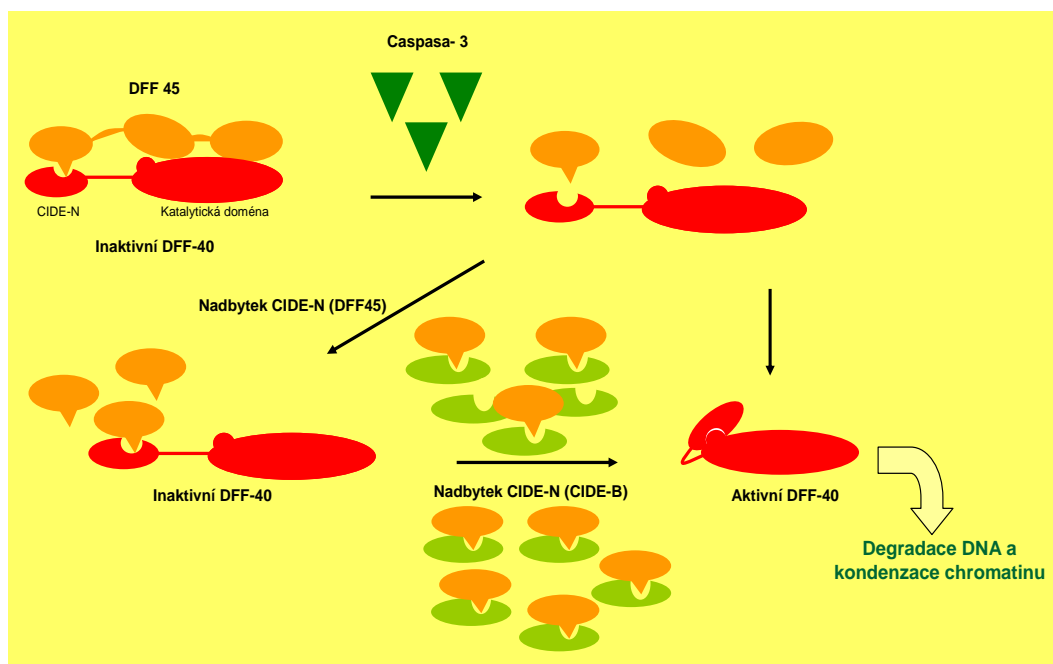
#### 2.3.1.1. DFF (DNA fragmentation factor)

DFF je heterodimerický protein, který zprostředkovává fragmentaci DNA v jádře. Je tedy složen ze dvou podjednotek, podjednotka DFF40 (také CAD nebo Dffb) má velikost 40kDa a funguje jako nukleáza aktivovaná kaspázou-3, podjednotka DFF45 (také ICAD nebo Dffa) je její inhibitor o velikosti 45kDa. DFF40 je složena z C koncové katalytické domény a N koncové regulační domény. Regulační doména vykazuje homologii s N koncovou oblastí DFF45 a CIDE proteinů (49 až 55%) a sprostředkuje vazbu k DFF45. (Tato homologní část se nazývá CIDE-N doména). Také je zodpovědná za optimální nukleázovou aktivitu katalytické domény. Když je podjednotka DFF40 vázaná k DFF45 přes svou N koncovou oblast, její nukleázová aktivita je touto interakcí inhibována. Působením kaspázy-3 se inhibitor DFF45 štěpí na tři části a uvolní se DFF40. Volný N konec této podjednotky aktivuje svou C koncovou katalytickou doménu, což vede k indukci nukleázové aktivity, kondenzaci jádra a fragmentaci DNA (in vitro). (Inohara et al., 1999). Tento krok je pravděpodobně nezbytný pro fragmentaci DNA. Samotný DFF nemá nukleázovou aktivitu, což značí, že pouze nepřímo zprostředkovává fragmentaci DNA jako součást signální kaskády (Inohara et al., 1998).

Předpokládaný model tohoto mechanismu je na obr.1.2.

### 2.3.1.2. Struktura promotoru

Byla popsána struktura promotoru proteinu CIDEa u člověka. Promotor obsahuje dvě Sp1/Sp3 vazebná místa, potřebná pro jeho funkci. Ačkoliv všudypřítomně exprimované Sp1 a Sp3 jsou důležité, samotné nemohou přiměřeně regulovat specifickou expresi Cidea. Expresie je dále regulovaná CpG metylací promotorového regionu, silně methylované oblasti jsou spojeny s nízkou expresí CIDEa v tkáních. Naopak CIDEa negativní buňky po indukci 5-aza-2'-deoxycytidinem, která vedla k demethylaci CpG míst a rozvolnění chromatinu, obnovily opětovným posílením vazby Sp1/Sp3 do promotorové oblasti expresi CIDEa proteinu a metylace tedy hraje důležitou roli v regulaci exprese CIDEa (Li et al., 2008).



Obr. 1.2. Model aktivace a inhibice DFF40

### 2.3.2. Tkáňová distribuce

Ve vysokých hladinách je CIDEa exprimována v hnědé tukové tkáni (BAT), 50-100x více než v dalších tkáních. U embrya myši byla detekována v 15. dnu v interskapulární oblasti stejně jako UCP1. Ve stejné oblasti se oba proteiny exprimovaly i u týden starých myši. Nízké hodnoty mRNA byly také detekovány v srdci, mozku, svalu, kostní dřeni a thymu myši.

Dále byla detekována v srdci, nižší hladiny v kosterním svalu, mozku, lymfatických uzlinách, thymu, appendixu a kostní dřeni člověka jako 1,3kb transkript. Menší o velikosti 1kb byl detekován v nižší hladině v placentě. Dále byl detekován transkript o velikosti 7kb v ledvinách a v nižších hladinách v srdci, plicích, mozku a placentě. Také byla zjištěna v embryonálních ledvinných

buňkách 293T, buňkách karcinomu prsu MCF-7 a buňkách neuroblastomu SHEP a v bílé tukové tkáni (Zhou et al., 2003, Inohara et al., 1998).

CIDEa je exprimovaná v játrech dospělých starých a diabetických myší (Kelder et al., 2007b).

### **2.3.3. Distribuce v buňce**

CIDEa je pravděpodobně distribuována v mitochondriích a hypoteticky tvoří komplex s proteinem specifickým pro hnědý tuk, s mitochondriálním odpřahujícím proteinem UCP1. Tato spekulace byla založena na pozorování, že koexprese těchto dvou proteinů v kvasinkách snižuje odpřahující schopnost UCP1 (Li, 2004).

### **2.3.4. CIDEa a apoptóza**

CIDEa indukuje fragmentaci DNA v buňkách 293T a ta je inhibována proteinem DFF45. To naznačuje, že DFF45 ruší apoptotické vlivy CIDE proteinů, možná přes interakci DFF45 s CIDE nebo jinými proteiny s homologií k N konci DFF45, například s proteinem DFF40. CIDEa je negativně regulována skrze svou N koncovou oblast. Apoptózu neovlivňují inhibitory kaspáz zVAD-fmk a CrmA, ale CIDEa ovlivňuje apoptotickou signální dráhu CD95/Fas, posiluje apoptózu zprostředkovanou Fas a CLARP (*caspase-like protein*, interaguje s kaspázou-8, která je komponentou dráhy CD95/Fas), oproti tomu DFF45 inhibuje apoptózu indukovanou CLARP a Fas.

Pokusy s delečními mutanty ukázaly, že C koncová oblast proteinu je důležitá a nezbytná pro zabíjení buněk, zatímco N konec proteinu, homologický s DFF45, je důležitý pro interakci s DFF45 a tím k inhibici apoptózy (Inohara et al., 1998).

Dále byl zjištěn vliv TGF $\beta$ 1 na glykosylaci proteinu CIDEa. TGF $\beta$ 1 je regulátor buněčného růstu, diferenciace a apoptózy. TGF $\beta$ 1 neovlivňoval expresi proteinu, ale inhiboval jeho glykosylaci. Deglykosylace proteinu CIDEa korelovala s posíleným nukleárním exportem proteinu a vysoké hladiny neglykosylované CIDEa inhibovaly TGF $\beta$ 1 řízenou buněčnou smrt, tedy inhibice glykosylace CIDEa může být mechanismus chránící buňky před apoptózou (Iwahana et al., 2006)

### **2.3.4. CIDE a metabolismus lipidů**

Růstový hormon (GH) může ovlivňovat expresi proteinu CIDEa v bílé tukové tkáni, který je zapojen do metabolismu lipidů. Lipolytická aktivita růstových hormonů v bílé tukové tkáni snížila tělesný tuk u obřích GH transgenních myší. Nepřítomnost GH měla depotní efekt na hladiny RNA a ovlivnila velikost adipocytů. Exprese CIDEa u GHR $^{-/-}$  myší v podkožním tuku byla snížena a adipocyty zvětšeny. Vysokotučná dieta snížila expresi CIDEa u kontrolních myší, ale ne u GHR $^{-/-}$  myší v podkožním tuku. Tedy, CIDEa je snížena v dvou různých modelech myší obezity a to může přispívat k změnám v metabolismu lipidů (Kelder et al., 2007a)

CIDEa je tedy exprimovaná jak v WAT a v BAT a hraje důležitou roli v rozvoji obezity a diabetu u hlodavců (Lin and Li, 2004). Výskyt proteinu CIDEa v játrech dospělých starých myší a v játrech hyperinsulinomních a diabetických myších pozitivně koreluje s jaterní steatózou obézních myší (Kelder et al., 2007b)

Experimenty vzorku lidské populace ve Švédsku ukázaly, že u obézních lidí měla CIDEa dvakrát vyšší hladinu a poklesla po redukční dietě. V podobné práci založené na studii vzorku lidské populace míra exprese proteinu CIDEa negativně korelovala s úrovní bazálního metabolismu, ale je nezávislá na věku, tělesných proporcích a pohlaví. Hladina exprese klesla po nasazení nízkotučné diety a znovu stoupla po jejím ukončení. Snížená exprese CIDEa byla asociovaná s vyšším obsahem tuku v těle a s vyššími hladinami inzulínu.

In vitro, RNA interference stimulovala lipolýzu a zvýšila sekreci TNF $\alpha$ . Naopak po indukci TNF $\alpha$  poklesla hladina CIDEa v adipocytech přes mitogen aktivovanou (MAP) kinázu c-Jun. CIDEa tedy hraje roli v regulaci lipolýzy, pravděpodobně zčásti ve vztahu k TNF $\alpha$  (Gummesson et al., 2007) (Nordstrom et al., 2005). Pokusy s lidskými adipocyty ukázaly, že TNF $\alpha$  negativně reguluje transkripci genu CIDEa, která je řízena z oblasti prvních 97 bází od počátku transkripce. Tato regulace nejspíš zahrnuje aktivaci faktoru NF $\kappa$ B (Pettersson et al., 2008).

Nedávno bylo zjištěno, že CIDEa kolokalizuje okolo lipidových kapek s perilipinem, regulátorem lipolýzy. Snížení proteinu CIDEa vede k lipolýze v lidských adipocytech. Je stejně jako FSP27 kontrolován peroxizomálním PPAR $\gamma$ . (Puri et al., 2008).

Dále byl zjištěn vliv polymorfismu genu CIDEa, kde alela s mutací v pozici 115, měnící aminokyselinu valin za fenylalanin, způsobuje náchylnost k obezitě ve švédské populaci. Podobně v Japonsku tento polymorfismus asociuje s obezitou a je rizikovým faktorem pro vznik metabolického syndromu (obezita, diabetes mellitus 2, vysoký krevní tlak, nízká hladina HDL atd.) (Zhang et al., 2008, Dahlman et al., 2005).

#### 2.3.4.1. CIDEa knockout

CIDEa knockout myši měly vyšší hladiny mRNA některých proteinů hnědé tukové tkáně (BAT), jako například UCP1 (45% více), Fsp27 (138% více), lipoprotein lipáza (24% více) a PPAR $\gamma$  (33% více). Nicméně, hladina UCP1 proteinu byla stejná jako u kontrolních myší a stejně tomu bylo i u bílé tukové tkáně (WAT). Dále BAT před i po vystavení chladovému šoku obsahovala stejné množství apoptotických buněk u CIDEa knockout jedinců i kontrol, což by naznačovalo, že CIDEa v BAT nemá přímou roli při řízení apoptózy. Naproti tomu CIDEa knockout myši, vystavené chladu, měly vyšší rychlost metabolismu, lipolýzu v hnědé tukové tkáni a tělesnou teplotu než kontrolní jedinci. Také byly štíhlejší a rezistentní k indukované obezitě a diabetu. Pravděpodobně tedy hraje roli v termogenezi a metabolismu lipidů a sacharidů, možná sprostředkovaně přes inhibici aktivity UCP1 (Zhou et al., 2003). (Li and Li, 2007)



### **2.3.5. Další proteiny CIDE rodiny**

#### **2.3.5.1. CIDEb**

CIDEb patří do rodiny proapoptotických proteinů CIDE, jež sdílí homologii s N koncovou doménou DFF. Je lokalizován v mitochondriích a vytváří homodimery nebo heterodimery s dalšími členy rodiny. Deleční analýzy ukázaly, že signál pro lokalizaci v mitochondriích a oblast potřebná pro dimerizaci se překrývají a nachází se v C koncové oblasti (30 aminokyselin). Lokalizace v mitochondriích a dimerizace jsou nezbytné pro indukci apoptózy (Chen et al., 2000). Naproti tomu v jiné práci neprokázali jistou lokalizaci ani v mitochondriích, ani v endoplasmatickém retikulu, lysozómech či v golgiho komplexu (Liang et al., 2003).

Exprese je řízena ze dvou promotorů, které jsou zodpovědné za vznik dvou transkriptů. Sp1 a Sp3 jsou klíčovými regulátory obou promotorů. Pokusy ukázaly, že vnější promotor byl hypermetylován v buňkách neexprimujících dlouhý transkript, naopak byl hypometylován v buňkách, které ho exprimovaly. Metylace snížila aktivitu promotoru na 5%. Zatímco na vnitřní promotor se vázal faktor HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ ), posílil jeho aktivitu a indukoval expresi krátkého transkriptu. Exogenní HNF4 $\alpha$  indukoval expresi krátkého transkriptu i v buňkách, kde se normálně netvoří, tedy má vliv na buněčně specifickou expresi krátkého transkriptu (Da et al., 2006).

Hlavní transkript o velikosti 1,3kb byl detekován u člověka v játrech fetálních i dospělých. Jiný transkript o velikosti 2,5kb byl zjištěn v nižších hladinách ve slezině, lymfocytech, kostní dřeni a fetálních játrech (Inohara et al., 1998). Jiná práce prokázala lokalizaci v játrech, slezině, v tenkém střevu, v menších hladinách v tlustém střevu, ledvinách a slezině člověka (Liang et al., 2003). CIDEb je hodně exprimován v játrech myši. CIDEb  $-/-$  myši měly nižší hladiny triglyceridů a volných mastných kyselin a byly rezistentní k obezitě vyvolané vysokotukovou dietou a ke steatóze (ztučnění) jater. Navíc, CIDEb mutantní myši měly výrazně zvýšenou citlivost k insulinu a zvýšenou rychlost celotělového metabolismu a oxidaci jaterních mastných kyselin. Dále CIDEb  $-/-$  myši vykazovaly sníženou lipogenezi a snížené hladiny exprese acetyl-CoA karboxylázy, syntézy mastných kyselin a sterol-CoA desaturázy. Tedy, CIDEb je důležitý regulátor metabolismu lipidů a hraje roli ve vývoji obezity regulací mnoha metabolických drah v játrech (Li et al., 2007), (Li and Li, 2007)

### 2.3.5.2. CIDE-3

Zatím poslední identifikovaný člen CIDE proteinů u člověka je CIDE-3, homolog myšičího proteinu FSP27. Jeho velikost je 238 aminokyselin a homologie s proteiny CIDEa je 44% a s CIDEb 38%.

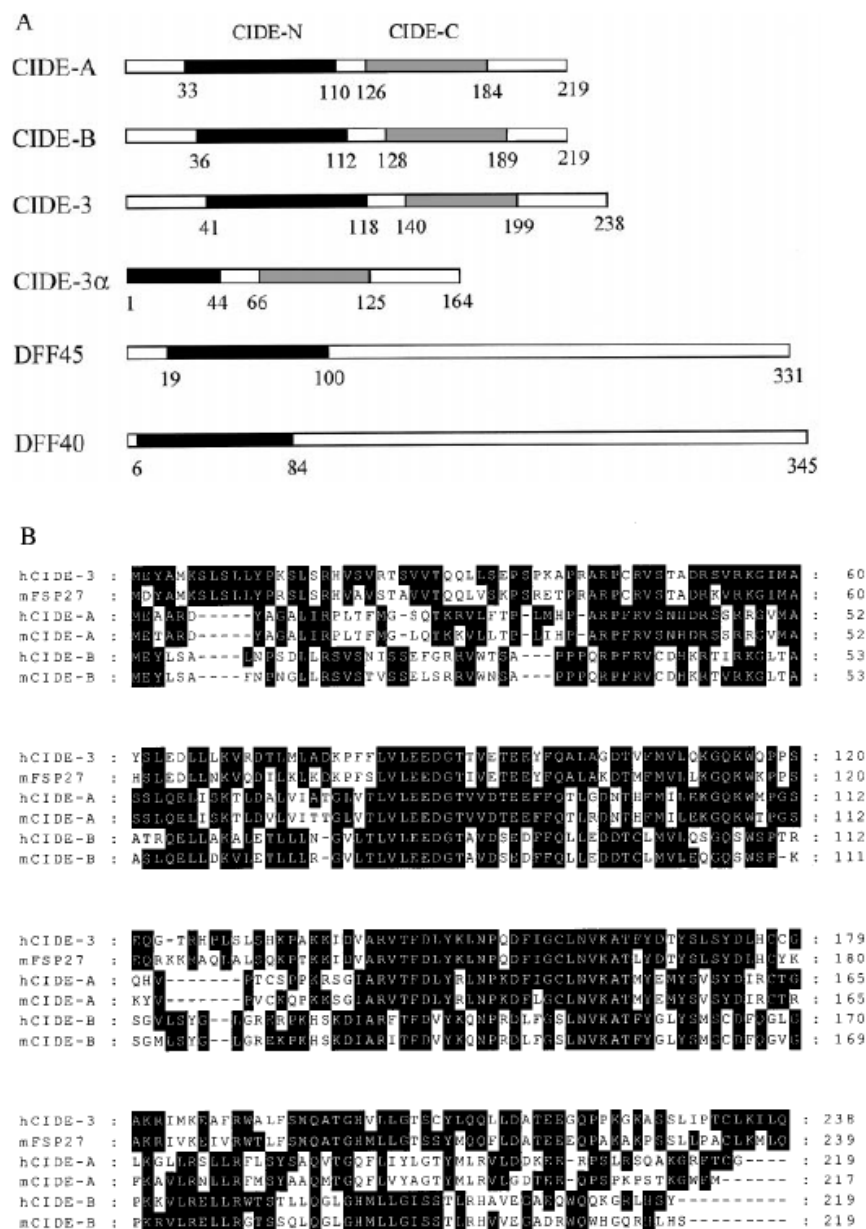
Alternativním sestřihem vznikají dvě transkripční varianty, CIDE-3 (238 aminokyselin, 26,8kDa) a CIDE-3 $\alpha$ , které chybí třetí exon (164 aminokyselin). Obě izoformy mají zachovanou schopnost navodit apoptózu a vykazují stejnou buněčnou lokalizaci, ve formě cytozolických částic. V genomu se nachází na chromozómu 3 (3p25). Tento region je často deletovaný u mnoha typů tumorů a CIDE-3 může tedy hrát roli v prevenci tumorogeneze. Je exprimován hlavně v tenkém střevu, srdci, tlustém střevu a žaludku člověka (Liang et al., 2003).

#### 2.3.5.2.1. FSP 27 a metabolismus lipidů

Bylo zjištěno, že protein FSP27 reguluje velikost lipidových kapének a podporuje ukládání lipidů v adipocytech. Regulace exprese není známa. Transkript FSP27 u adipocytů byl inverzně regulován TNF-alfa a insulinem, souhlasně s antilipolytickou funkcí. Byl skoro nulový po inkubaci s TNF-alfa, zatímco po inkubaci s insulinem vzrostl osmkrát. Výhradní zastoupení v hnědé a bílé tukové tkáni u myši, ačkoliv u ob/ob myši výrazná exprese v játrech. Expese v 293T a 3T3-L1 buňkách vedla k apoptóze. Ale navzdory upregulaci při adipogenezi u 3T3-L1 buněk, neobjevily se znaky apoptózy. Tedy, adipogeneze je doprovázena sníženou citlivostí k proapoptickým účinkům FSP27 (Kim et al., 2008)

Další práce ukazuje, že zvýšená exprese FSP27 zvyšuje apoptózu 293T a 3T3-L1 buněk, ale vyšší hladiny exprese stimulují akumulaci lipidů v různých buňkách bez indukce adipocytových genů. Zvýšený triacylglycerol je asi v důsledku snížené beta oxidace neesterifikovaných mastných kyselin. Změněný tok mastných kyselin do triacylglycerolu může být přímý efekt funkce FSP27, který je lokalizován v lipidových kapkách v adipocytech. Knockdown genu FSP27 během adipogeneze vede k zmenšení velikosti tukových kapek, zvyšuje počet mitochondrií a lipidových kapek a mírně zvyšuje příjem glukózy a lipolýzu. Tedy FSP27 se váže k lipidovým kapkám a reguluje jejich růst (Keller et al., 2008).

FSP27 v játrech ob/ob myši je přímý cílový gen pro PPAR $\gamma$  a může zvyšovat hladiny trigliceridů v játrech. Je to protein vážící lipidové kapénky a podporuje akumulaci lipidů v adipocytech. Je vysoce exprimován v játrech ob/ob myši a ve značně menším množství v játrech ob/ob, které nemají PPAR $\gamma$ . Zvýšená exprese pomocí virové transfekce vedla ke zvýšení hladin trigliceridů in vitro a in vivo., zatímco knockdown ke snížení jejich akumulace v játrech., tedy FSP27 je mediátorem PPAR $\gamma$  dependentní steatózy jater (Matsusue et al., 2008).



Obr.1.3. Struktura a srovnání sekvencí proteinů CIDE rodiny. A- struktura lidských CIDE proteinů, CIDE-C a CIDE-N domény jsou označeny a černou resp. šedou barvou. Čísla označují počet aminokyselin. B- srovnání aminokyselinových sekvencí, černé oblasti jsou identické (Inohara et al., 1998).

### 2.3.6. Změny hladiny exprese CIDE proteinů

V této kapitole jsou zmíněny bodově publikované experimenty související s proteiny CIDE:

- Oxid arsenitý zvyšoval hladiny exprese genů CIDE rodiny u myelomatických buněk (Xiong et al., 2005).
- 5-fluorouracil (FU) zvyšoval hladinu CIDEb u HeLa buněk (Yim et al., 2004).

- Kokain ovlivnil expresi CIDEb v mozku u myších embryí (Novikova et al., 2005).
- U937 buňky inkubované s 500  $\mu$ M DPTA-NO (syntetický donor ( $\cdot$ NO)) po dobu 14 hodin vykazovaly sníženou expresi CIDEb (Turpaev et al., 2005).
- Buňky epitelu mléčné žlázy myši HC11 transfekované Expi (*Extracellular proteinase inhibitor*, proapoptotický protein mléčné žlázy) vykazovaly vyšší expresi CIDEa (3,5x) než kontrolní buňky (Jung et al., 2004).

### **2.3.7. Molekulární evoluce CIDE proteinů**

Komparativní analýza genomu ukázala, že zatímco CIDE-N doména má širokou fylogenetickou distribuci u různých živočišných druhů od žahavců po savce, CIDE-C doména je výlučně u obratlovců. Zatímco u bezobratlých proběhla řada intronových inzercí v CIDE-N doméně, u obratlovců je genomická struktura CIDE rodiny konzervativní. Pravděpodobně se CIDE-N doména vyvinula duplikací N-domény proteinu DFF $\alpha$ . CIDE-N nějak získal CIDE-C doménu, která vznikla ve stejný čas a zformoval se CIDE protein. Tím vznikla nová rodina Cide proteinů (Wu et al., 2008).

---

## 3. MATERIÁL A METODIKA

---

### 3.1. Přístroje

Box s laminárním prouděním vzduchu: Heraeus instruments HS12/2

Box s laminárním prouděním vzduchu: Heraeus KS12

CO2 inkubátor: Innova CO-170 New Brunswick Scientific

Centrifuga: Hermle Z323K

Centrifuga: Eppendorf centrifuge 5417R

Digitální kamera: Kodak DigitalScience DC40

Elektroforetická aparatura: Hoefer HE33, USA

Elektroforetický zdroj napětí: Amersham EPS301

Elektroforetická aparatura: Pharmacia Biotech

Elektroforetický zdroj napětí: DC Power Supply PS 3000, Hoefer

Blotovací aparatura: E a K Scientific Products INC

LightCycler™ Instrument 2.0 Roche

Spektrofotometr: Agilent 8453E UV-VIS Spectroscopy System a Milton Roy Spectronic 3000 Stolní centrifuga a vortex: CombiSpin Kisker-Biotech

Vortex: Vibromix Technica

UV transiluminátor: Ultra-Lum

Termolázeň: Julabo SW22

Termoblok: MB-102 Bioer

Teplotní inkubátor s třepačkou: Shel Lab

Laboratorní váhy: AG204 Mettler Toledo

Invertované mikroskopy:

Leica DM IL

Olympus IX 71

Konfokální Leica TSC SP2 (oddělení biomatematiky, FGÚ)

Konfokální Leica TSC 4PI ( Jackson laboratory, Maine, US)

### 3.2. Materiál

#### 3.2.1. Experimentální modely

**Laboratorní potkan.** Jako experimentální model pro zjištění základních hladin transkriptu CIDEa genu byly použity samice laboratorního potkana *Rattus norvegicus* kmene Wistar. Po usmrcení byly sterilně odebrány tkáně, vloženy do kryoskopických zkumavek a zmrazeny v tekutém dusíku. Poté byly skladovány při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Laboratorní potkani byli z místního chovu Fyziologického ústavu.

**Escherichia coli.** Byl používán bakteriální kmen Escherichia coli DH5 $\alpha$ . Transformace chemicky kompetentních buněk se prováděla tepelným šokem (viz metody). Bakterie byly kultivovány v médiu LB s příslušným antibiotikem (podle typu plasmidu).

**Buněčné linie.** Byly užity buněčné linie: T293 (lidské embryonální ledvinné buňky stabilně exprimující Tet represor z plasmidu pcDNA6/TR; Invitrogen), T.RExHeLa (lidská buněčná linie karcinomu děložního čípku stabilně exprimující Tet represor z plasmidu pcDNA6/TR; Invitrogen), INS1E (Insulinoma; linie z Langerhansových ostrůvků slinivky břišní z potkana; věnováno od prof. Maechlera, universita Ženeva), HeLa (lidská buněčná linie karcinomu děložního čípku) a HEPG2 (hepatocelular carcinoma; lidská buněčná linie karcinomu jater; European culture collection).

### **3.2.2. Chemikálie, enzymy, roztoky**

#### 3.2.2.1. Příprava RNA a elektroforéza

2-merkaptóetanol	Sigma
Acetát sodný	Sigma
Agaróza	Top-Bio
Citran sodný	Spolchemie
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA marker	Fermentas
Elektroforetický vzorkový pufr	Fermentas
Ethanol	Lachema
Ethidiumbromid	Sigma
Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma
Guanidin thiokyanát (GITC)	Sigma
Chloroform	Lachema
Kyselina boritá	Sigma
Lithium dodecylsulfát	Sigma
Lithiumchlorid (LiCl, 99%)	Sigma
Oligo dT 3' Bio_oligo(dT)20	Metabion
Fenol pH 4,3	Sigma
Streptavidinové magnetické partikule	Roche
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma
Jehly, injekční stříkačky (průměr 0,9mm)	Braun
Magnetický separátor	Roche

#### 3.2.2.2. PCR, RT-PCR

Pwo polymeráza	Roche
dNTP 50x Mastermix	Invitex
LightCycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes	Roche
LightCycler kapiláry	Roche
Hybridizační primery a fluorescenční próby	TIB Molbiol

#### 3.2.2.3. Příprava konstruktů

PCR mix (viz 3.2.2.2.)	
Lumio™ In-Cell Labeling Kit	Invitrogen
BP,LR Clonase Mix	Invitrogen
Agar, kvasinkový extrakt, tripton (kaseinový extrakt)	BD Company
Chlorid sodný	Penta
T4 DNA Ligáza	USB
Plasmid miniprep kit	Sigma
QIA filter plasmid Midiprep kit	Qiagen
Kit na eluci DNA z gelu (NucleoSpin Extract II)	Macherey-Nagel
Restriktázy: XhoI, EcoRI	Fermentas
Plasmidy:	
ORF lidská CIDEa ( IOH22361) v pENTRY221	Invitrogen
pAcGFP-C1, roGFP (pEGFP-N), pDsRed- Monomer-C1	Clontech
pDONR221, pT-REx-DEST30, pcDNA-DEST53, pcDNA™6.2/nLumio™-DEST (Invitrogen)	

#### 3.2.2.4. Tkáňové kultury

Kultivační láhve	Orange Scientific
Plastové jednorázové pipety	Orange Scientific
Pipetman Acu-jet	Brand
Skříčka	GmbH α Co.KG
FugeneHD	Roche
Optimem	Gibco
Poly-L-lysin	Sigma
Glycerol	Merck
Geneticin	Gibco
Blasticidin	Invitrogen
Tetracyklin	Amresco

#### Médium pro INS1E

RPMI 1640 s L-glutaminem, bez glukózy, 10 mM HEPES (pAA Laboratories GmbH), 1 mM pyruvát, 5% fetální hovězí sérum dialyzované (pAA Laboratories GmbH), 50 µM merkaptoethanol, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 11 mM nebo 5 mM glukóza.

#### Médium pro T293

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), 10% fetální hovězí sérum bez tetracyklinu (pAA Laboratories GmbH), 2 mM L-glutamin, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, Blastidicin (5 µg/ml)

#### Médium pro T.RExHeLa

EMEM (Eagle's minimum essential medium) , 2 mM L-glutamin, 10% fetální hovězí sérum bez tetracyklinu, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, Blastidicin (5 µg/ml)

#### Médium pro HeLa

DMEM, 10% fetální hovězí sérum dialyzované (pAA Laboratories GmbH), 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES (pAA Laboratories GmbH), 1 mM pyruvát, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,5M galaktóza

#### Médium pro HEPG2

DMEM bez glukózy, 3 mM glutamin, 5% (v/v) fetální hovězí sérum dialyzované (pAA Laboratories GmbH), 10 mM HEPES (pAA Laboratories GmbH), 10 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 25 mM nebo 5 mM glukóza

Všechny složky médií, pokud není uvedeno jinak, byly vyrobeny v přípravně médií na ústavu molekulární genetiky v Praze-Krči.

Trypsin/EDTA: 5 mg/ml (Sigma)

PBS: NaCl 8 g; KCL 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,53 g; Dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml; pH = 7,2

#### 3.2.2.5. Příprava buněk pro 4pi

poly-L-lysin	Sigma
FCCP	Sigma
Rotenon	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Borohydrát sodný	Sigma
Kovové nosiče	Leica
4Pi krycí sklíčka se zrcátkem	Quartz



### 3.2.2.6. Indukce apoptózy

HEPES	Sigma
Chlorid draselný	Chemapol
Chlorid hořečnatý	Lachema
Dithiothreitol	Sigma
NP-40	Sigma
EDTA	Sigma
Fenylmethansulfonyl fluorid ( PMSF)	Sigma
PVDF membrána	Biotech
Dodecyl sulfát sodný (SDS)	Sigma
Akrylamid	Sigma
Temed	Sigma
Amoniumpersulfát (APS)	Sigma
Protilátka Anti-CIDEa	ProSci
Protilátka Anti-rabbit IgG	Sigma
Luminol	SantaCruzBiotechnology
Full Range Rainbow Recombinant (proteinový marker)	Amersham
Mercaptoethanol	Sigma
Camptothecin	Sigma
Valinomycin	Sigma
A23187	Calbiochem
CCCP	Sigma
Hoechst 33258	Molecular Probes
Tetramethylrhodamin (TMRE)	Molecular Probes
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL)	Roche

### 3.3. Metody a postupy

#### 3.3.1. Izolace celkové RNA

Bylo užito fenol-chloroformové izolace RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987). Veškerá manipulace s RNA se prováděla na ledu. V krocích s použitím fenolu a chloroformu se pracovalo v laminárním boxu. Veškeré nástroje na manipulaci s tkání (nůžky, pinzety, třecí misky) byly sterilizovány v sušárně po dobu 8 hodin. Laboratorní plasty, voda a roztoky byly sterilizovány autoklávováním (2 krát 25 min, 120 kPa).

Postup:

1. Bylo odebráno (sterilními nůžkami nebo pinzetou) cca 200 mg tkáně z kryozkumavky a rozdroveno ve třecí misce s tekutým dusíkem na prášek.
2. Prášek nadrcené tkáně byl přenesen do 50 ml zkumavky, přidáno 2 ml lyzačního roztoku a 200  $\mu$ l acetátu sodného, poté vortexováno nebo mícháno až do úplného rozpuštění tkáně.
3. Bylo přidáno 1,8 ml fenolu a 600  $\mu$ l chloroformu a rychle rozmícháno na vortexu, aby se vytvořil bílý zákal. Směs se inkubovala 10 minut na ledu.
4. Směs byla rozpipetována do 1,5 ml mikrozkuvek a centrifugována na 10 000 g 10 minut.
5. Centrifugací se vytvořily 2 fáze a mezifáze obsahující DNA. Hroní frakce se opatrně odebrala do nových 1,5 ml mikrozkuvek a byl přidán dvojnásobný objem ethanolu (98%), směs se nechala precipitovat v  $-20^{\circ}\text{C}$  minimálně 1 hodinu.
6. Precipitát se centrifugoval 20 minut při 20 000 g. Pelet se poté 2x promyl 75% ethanolom (centrifugace 20 minut při 15 000 g).
7. Pelet byl vysušen a rozpuštěn v RNA vodě. RNA byla skladována v  $-70^{\circ}\text{C}$  anebo ihned použita.

Lyzační roztok: 4 M GITC, 25 mM citran sodný, 0,5% N-lauroylsarkosil, 0,7% 2-merkaptoetanol, upraveno 1 M NaOH na pH 7

Acetát sodný 2 M, pH 4,3.

#### 3.3.2. Izolace mRNA z celkové RNA a buněk

Na izolaci mRNA byl použit *mRNA isolation kit* (Roche). Metoda izolace mRNA využívá polyA sekvence na 3' konci mRNA, pomocí které ji lze úspěšně odlišit a separovat od ostatních typů RNA. K separaci se používá magnetických partikulí s kovalentně navázaným tetramerním proteinem streptavidinem, který velmi pevně váže molekulu biotin. Biotin je navázán na oligo dT sekvence hybridizující s polyA sekvencemi mRNA.

Postup:

1. Celková RNA byla naředěna lyzačním pufrém (neředit lyzační pufr víc než 2 krát) a inkubována 2 minuty při  $65^{\circ}\text{C}$  (v lázni nebo v termocykleru). V případě izolace mRNA z buněk

byly buňky resuspendovány v lyzačním pufru a nasávány jehlou, aby se lyzace zefektivněla. Následný postup byl pak stejný

2. Příprava magnetických kuliček: 150  $\mu\text{l}$  streptavidinových magnetických kuliček v mikrozkuhavce bylo promyto 1-krát v 250  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru.
3. Do připraveného vzorku (z kroku 1) bylo přidáno 1,5 event. 2  $\mu\text{l}$  oligo(dT)<sub>20</sub> a zamícháno.
4. Imobilizace: Mix z kroku 3 byl přidán k připraveným magnetickým kuličkám, zamíchán a inkubován 5 minut při teplotě 37°C.
5. Na magnetickém stojánku se oddělily kuličky od supernatantu (přibližně 2 minuty).
6. Magnetické partikule s navázanou mRNA byly promyty 3 krát v 250  $\mu\text{l}$  promývacího pufru.
7. Eluce mRNA: směs byla inkubována při 65°C v 25  $\mu\text{l}$  redestilované vody, poté odděleny magnetické kuličky od supernatantu. Supernatant (mRNA) byl přenesen do nové mikrozkuhavky.

Streptavidinové magnetické kuličky mohou být použity 3-4 krát. Pro znovupoužití necháme kuličky inkubovat 2 minuty při 65°C v 100  $\mu\text{l}$  redestilované vody.

Lyzační pufr: 0,1 M Tris, 0,3 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% litium dodecylsulfát, 5 mM DTT, pH 7,5

Promývací pufr: 10 mM Tris, 0,2 M LiCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

### **3.3.4. Stanovení koncentrace totální RNA a mRNA pomocí spektrofotometru**

Koncentrace nukleových kyselin byla stanovena spektrofotometricky. Nukleová kyselina o známém ředění byla měřena v rozmezí vlnových délek 200 až 600 nm. Výhodou měření na spektrofotometru je vizualizace průběhu spektra, z kterého můžeme určit kvalitu RNA. Od maxima ( $A_{260}$ ) se odečetlo pozadí při 260 nm, koncentrace byla potom vypočtena podle vzorce Lambert-Beerova zákona:

$$c = A \cdot \epsilon \cdot l$$

kde  $l$  je optická dráha (byla použita kyveta o tloušťce 0,5 cm),  $\epsilon$  je absorpční koeficient specifický pro danou látku (v našem případě 40  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  pro RNA a 50  $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  pro DNA a  $A$  absorbance. Do výpočtu zařazujeme taky ředění měřené látky. Konečná hodnota koncentrace ( $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) byla vypočtena podle rovnice:

$$c = A_{260} \cdot \epsilon \cdot 2 \cdot (V_{VZ+H_2O}/V_{VZ}).$$

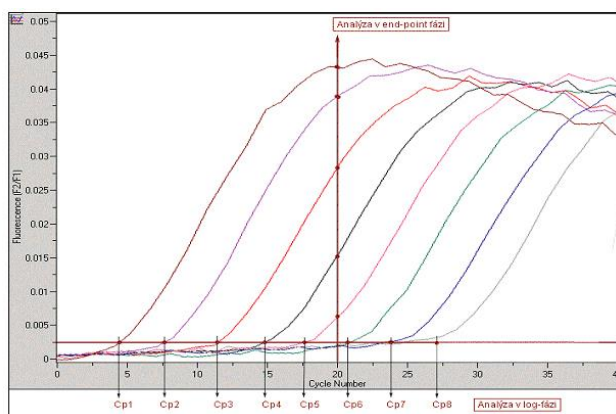
### **3.3.5. Navrhování primerů**

Primery pro kinetickou PCR se nijak neliší od běžně používaných primerů pro klasickou PCR. Délka primerů by se měla pohybovat od 18-26 nukleotidů, poměr zastoupení purinových a pyrimidinových nukleotidů by měl být přibližně 1:1. Nasedací teplota primerů v páru by se neměla lišit o víc než 5°C. Fluorescenční próby se navrhují do oblasti mezi nasedacími místy primerů a jejich  $T_m$  musí být minimálně o 5°C vyšší než nasedací teplota primerů. První próba je na 3'konci označena fluoresceinem a druhá próba, která nasedá 1-3 nukleotidy za první, je na 5'konci (tedy ve směru orientovaném k první próbě, viz obr. 3.2.) označena jednou ze tří dostupných fluorescenčních

fluoroforů LC-530, LC-640 anebo LC-710. Dále je nutno otestovat primery a próby na vznik sekundárních struktur a dimerů. Primery a próby byly navrhovány s použitím programu GeneRunner.

### 3.3.6. Kvantitativní PCR- Real-time PCR

Kvantitativní real-time PCR je progresivní metoda stanovování koncentrace mRNA. Proti klasickým blotovacím technikám a „end-point“ PCR analýzám přináší nesporné výhody jako přesnost, reprodukovatelnost atd. Podstatou metody je detekce fluorescence, a to v každém cyklu, takže je možné sledovat průběh celé amplifikace a ne pouze množství výsledného produktu. Proto se metoda real-time PCR nazývá také kinetická PCR. Průběh reakce je reprezentován sigmoidní křivkou a rozlišují se dvě fáze amplifikace: tzv. log-fáze, neboli exponenciální fáze a tzv. end-point fáze (Obr. 3.1.). Přístroj LightCycler™ umožňuje kvantifikaci produktu již během log-fáze. Díky detekci fluorescence po každém cyklu, lze rozlišit více než dvojnásobné rozmezí řádů koncentrací a lze kvantifikovat opravdu výchozí koncentraci, aniž bychom do měření vnášeli chybu způsobenou rozdílnou amplifikační účinností. Vyhodnocen je tzv. „crossing point“ (Cp), který představuje cyklus, ve kterém je aximální druhá derivace křivky průběhu fluorescence.



Obr.3.1. Porovnání log-fáze a end-point analýzy

Přesnost této techniky závisí na kvalitě a čistotě RNA, přičemž kvalitou myslíme co nejmenší podíl jakkoli degradované RNA ve vzorku a čistotou míru kontaminace DNA.

Genomová DNA, na kterou mohou primery specificky nasedat, znamená zkreslení výsledků kvantifikace exprese genu, jelikož se jedná o účinnou amplifikační PCR techniku. Nejjistějším

způsobem odlišení určité RNA a odpovídající genové sekvence je založený na nepřítomnosti intronových sekvencí v mRNA. Jednou z možností praktického využití této skutečnosti je situování primerů nebo práb do oblasti místa sestřihu. Tento způsob zaručuje specifickou amplifikaci pouze sestřihaných molekul i v kontaminovaném vzorku (míra kontaminace ovšem nesmí být extrémní). Druhý způsob odlišení mRNA od DNA využívá opět sestřih a také fakt, že polymeráza, která je používána pro Real-time PCR, amplifikuje úseky jen do určité velikosti (stovky bazí). Navržením primerů na sousedící exony, mezi kterými se před sestřihem nacházel dlouhý intron, opět zajistíme specifitu mRNA amplifikace. Kvalita RNA je závislá na šetrnosti izolační techniky, celkovém provedení izolace a skladování.

#### 3.3.6.1. LightCycler™ Instrument 2.0

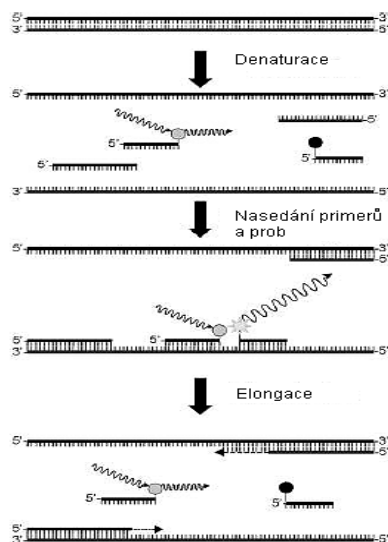
LightCycler™ je přístroj, který umožňuje provádět PCR reakci a zároveň sledovat výsledky amplifikace díky průběžnému monitorování fluorescence. Výsledky měření fluorescence se kontinuálně po každém provedeném cyklu zobrazují na obrazovce počítače. PCR prováděná na tomto přístroji umožňuje použití velice malých reakčních objemů (10 – 20  $\mu$ l) a amplifikace i detekce produktu je prováděna v jediné kapiláře, takže je riziko kontaminace amplifikovaného vzorku při manipulaci sníženo na minimum. Reakce probíhá v kapilárách z borosilikátového skla, které se ukládají do karuselu, jehož kapacita je 32 vzorků. Kapiláry mají vysoký poměr povrchu k objemu, přenos tepla je tedy velice efektivní a to umožňuje provedení 30 – 40 cyklů během 20 – 30 minut. Rychlost teplotních změn se pohybuje v rozmezí 0,1 – 20°C.sec<sup>-1</sup>.

Změny teploty v termální komoře LightCycleru™ zajišťuje vzduch, jehož teplota je regulována ohřevnou spirálou umístěnou uprostřed komory. Excitaci zajišťuje modrá LED dioda jako zdroj světla, jenž je součástí fluorimetru, který detekuje emitované světlo o třech vlnových délkách 530, 640 a 705 nm. Přístroj je vybaven dvěma motory, které zajišťují vzájemné polohování fluorimetru a karuselu s kapilárami pro detekci fluorescence jednotlivých vzorků.

LightCycler software poskytuje 2 možné metody stanovení množství amplifikované mRNA, a to „*second derivation maximum*“ metodu využívající maxima 2.derivace; anebo prostřednictvím fit-point analýzy. Použitou metodou *second derivation maximum* určuje tzv. crossing pointy (*threshold cycle*) neboli cykly, ve kterých fluorescenční signál poprvé překročí pozadí. Crossing point je tedy nepřímo úměrný množství dané mRNA resp. cDNA v reakci.

### 3.3.6.2. Detekce signálu

Z dostupných způsobů detekce signálu v real-time PCR jsme se rozhodli pro detekci pomocí dvojice hybridizačních prób. Tato detekce je více specifická než např. často používaná SYBRGreen technika, protože využívá kromě specifických primerů navíc dvojici hybridizačních prób, nasedajících mezi nasedacími místy pro primery. Průběh analýzy je znázorněn na obrázku. První próba je na 3'konci označena fluoresceinem a druhá próba, která nasedá 1-3 nukleotidy za první, je na 5'konci (tedy ve směru orientovaném k první próbě) označena jednou ze tří dostupných fluorescenčních fluoroforů LC-530, LC-640, LC-710. Fluorescein je excitován UV světlem (470nm) a emituje zelené fluorescenční světlo, kterým je následně excitována akceptorová fluorescenční barva a emituje fluorescenční světlo (640nm). Výsledná emise je snímána přístrojovým analyzátozem na konci reasociační fáze po nasednutí prób. Fluorescence koreluje s množstvím amplifikující se cDNA. Použitý způsob detekce je poměrně specifický, a proto vhodný i pro rozlišení více isoform stejného genu, jako bylo užito v našem případě.

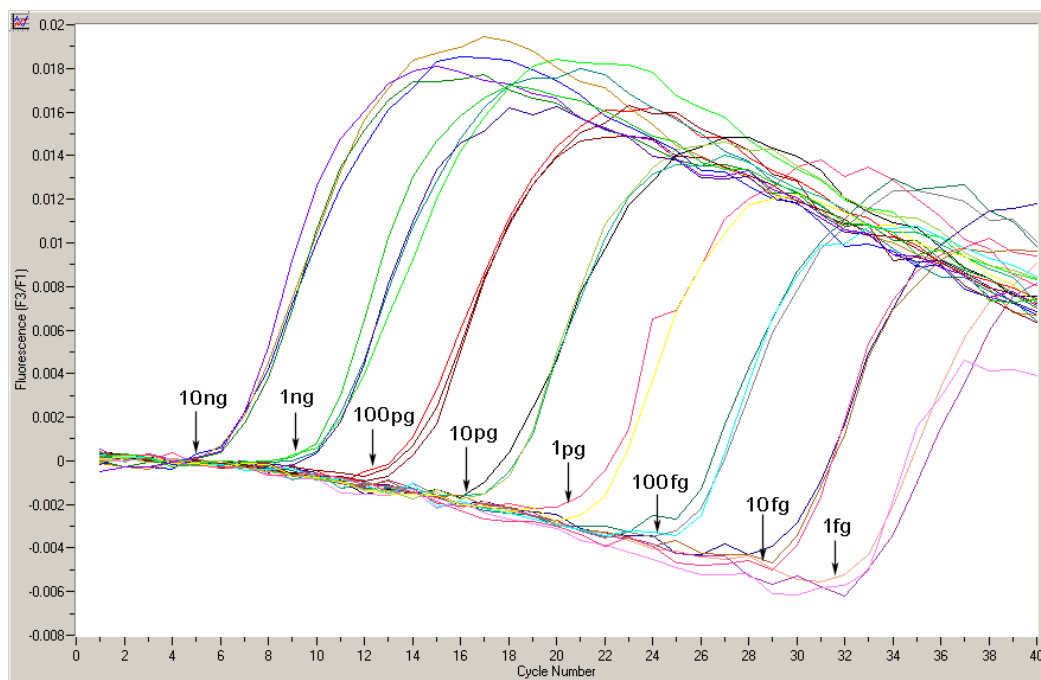


Obr.3.2. Princip detekce signálu systémem hybridizačních prób (Bustin, 2000)

### 3.3.6.3. Absolutní kvantifikace

Ke kvantifikaci mRNA jednotlivých UCP transkriptů byla použita metoda absolutní kvantifikace s externím standardem. Absolutní kvantifikací je možné stanovit aktuální počet molekul DNA v reakci. Jako externí standard byla použita cDNA zkoumaných genů nařaděna na množství

v rozmezí 10 ng – 100 ag. Na obr. 3.3. vidíme, že s množstvím cDNA v reakci negativně koreluje crossing point. Z hodnot crossing pointů jednotlivých standardů byla sestrojena kalibrační křivka pro gen CIDEa, která byla později použita ke stanovení množství mRNA pro gen CIDEa. Teoreticky se v každém cyklu množství amplikonu zdvojnásobí, proto je v logaritmickém měřítku teoreticky směrnice kalibrace 3x, to znamená 3 cykly na jeden řád rozdílu množství.



Obr.3.3. Ukázka reakce s ředěným vzorkem pro konstrukci kalibrační přímky

#### 3.3.6.4. Normalizace

Normalizace pomocí housekeeping genu využívá předpokladu, že hladina housekeeping genů je v různých buňkách a za různých fyziologických podmínek konstantní. Toho se využívá ke korekci individuálních odchylek crossing pointů vzniklých při pipetování, ředění či měření koncentrace vzorku. Jako housekeeping gen byl použit gen *gapdh*.

#### 3.3.6.5. Provedení

Složení reakční směsi o objemu 10  $\mu$ l pro 1 vzorek:

- LightCycler RT-PCR Reaction
 

Mix Hybridization Probes 5x	2 $\mu$ l
-----------------------------	-----------
- LightCycler RT-PCR Enzyme Mix 0,2  $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> zásobní roztok 25 mM 0,4  $\mu$ l ..... 4 mM (výsledná koncentrace)
- H<sub>2</sub>O, sterilní, PCR kvalita 3 $\mu$ l
- Primery (10 $\mu$ M) 2 x 0,5  $\mu$ l ..... 0,5  $\mu$ M (výsledná koncentrace)

- Hybridizační próby (3 $\mu$ M) 2 x 0,7  $\mu$ l ..... 0,2  $\mu$ M (výsledná koncentrace)
- mRNA 20 – 50ng 2  $\mu$ l

Reakční mix obsahuje základní hladinu 15 mM MgCl<sub>2</sub> (výsledná koncentrace v reakci 3mM), dNTP (obsahuje dUTP místo dTTP). Enzymový mix obsahuje směs enzymů pro RT-PCR (RNA- a DNA-dependentní DNA polymerasy).

Podle počtu vzorků byl připraven mastermix (+ 5%rezerva), obsahující všechny uvedené složky, kromě mRNA. Směs se rozpipetuje do kapilár, až poté se připipetovává mRNA. Kapiláry se vkládají do speciálních předem vychlazených centrifugačních adaptérů, umožňujících jednak centrifugaci kapilár na stolní centrifuze, jednak přenos kapilár se směsí bez přístupu světla a v chladu.

Souprava *LightCycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes* (Roche) je určena pro jednostupňovou RT-PCR. Reakce probíhají ve skleněných kapilárách LightCycler Capillaries (Roche) na přístroji LightCycler Instrument (Roche).

Amplifikační protokol je rozdělen na čtyři části: reverzní transkripce, denaturace, amplifikace a chlazení. Průběh programu je znázorněn v tabulce 3.1.

Tab.3.1. Průběh programu real-time PCR. \* teplota se liší u jednotlivých sad primerů a prób

		Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce		55°C	30 min	1
Počáteční denaturace		94°C	2 min	1
Denaturace		95°C	30 s	1
Amplifikace	Denaturace	94°C	2 s	40
	Annealing	*	25 s	
	Elongace	72°C	25 s	
Chlazení		40°C	30 s	1

### 3.3.6.6. Konstrukce kalibračních přímek

Kalibrace byla prováděna z cDNA konkrétního genu naředěné koncentrační řadou na koncentraci od 5 ng /  $\mu$ l do 50 ag /  $\mu$ l. Do reakce se přidávalo vždy 2  $\mu$ l cDNA, množství cDNA v reakci se tedy pohybovalo od 10 ng do 100 ag. Výsledná kalibrace nás informuje o amplifikační účinnosti pro jednotlivé zkoumané geny.

Sekvence, délky a nasedací teploty použitých primerů a hybridizačních prób jsou uvedeny v tabulce 3.2. Návrh primerů a prób pro protein CIDEa je také zobrazen v příloze 1.



Tab. 3.2. Primery a próby pro gen CIDEa laboratorního potkana; X – fluorescein, p - fosfát modifikující 3' konec hybridizačních prób

GAPDH S	AACTCCTCAAgATTgTCAgCAA	23mer	58,3°C
GAPDH A	ATgTCAgATCCACAACggATACA	23mer	56,4°C
GAPDH FL	CAGTCTTCTgAgTggCAgTgATggCA X	26mer	66,0°C
GAPDH LC	LC Red705-ACTgTggTCATgAgCCCTTCCACg p	24mer	65,5°C
CIDEa #1	ATCAgCAAgACTCTggATgTC	21mer	57,0°C
CIDEa#2	ggCCTTgAAgCTTgTgCA	18mer	55,6°C
CIDEa HP#1	gAgTCACCTTCgACCTATACAaggCTgAA X	28mer	67,2°C
CIDEa HP#2	LC Red604-CCCAaggACTTCCTCggCTgTCTCAAT p	27mer	66,8°C

### 3.3.7. Agarózová elektroforéza

Pro analýzu výsledků bylo užito horizontální elektroforézy v agarózovém gelu. Tato metoda sloužila k vizualizaci produktů PCR, plasmidové DNA, DNA po restrikci, případně k ověření kvality izolované RNA. Byl používán agarózový 1,5% gel a pufr 1x TBE.

Postup:

1. Navážené množství agarózy se rozmíchalo v 40 ml pufru a rozpustilo se.
2. Do agarózy ochlazené asi na 50°C se přidal 1 mM ethidiumbromid (60 µl na 100 ml TBE) a rozmíchal.
3. Agaróza byla nalita do vany s hřebenem. Po ztuhnutí se hřeben opatrně vyjmul a gel se umístil do elektroforetické aparatury s pufrem.
4. Do každého vzorku byla napipetována barva (2µl na vzorek).
5. Vzorky byly naneseny (cca. 12 µl) do jamek, nanesen byl i standardní marker.
6. Pro rozdělení byla užita intenzita elektrického pole 6 V / cm po dobu přibližně 90 min.
7. Gel byl prohlížen na UV transluminátoru

10x TBE pufr 1 litr:108g Tris, 55g kyselina boritá, 40ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8

### 3.3.8. Příprava konstruktů

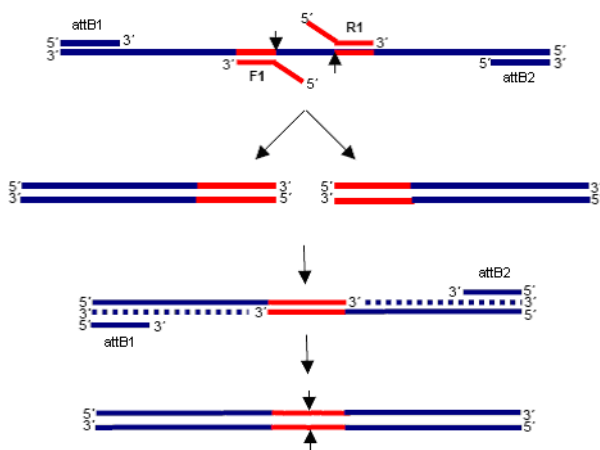
#### 3.3.8.1. Klonování pomocí restriktáz

##### 3.3.8.1.1. CIDE-N a CIDE-C

Pro přípravu delečních mutantů CIDE-N a CIDE-C bylo použito metody delece nukleotidů interních sekvencí pomocí PCR. Pro tuto metodu se navrhuje dva typy primerů, vnitřní a vnější. Vnější primery obsahují tzv. attB místa (viz.dále) a vnitřní jsou navrženy tak, aby polovinou byly komplementární ke 3'konci té části templátu, která má být ponechána a druhá přesahující polovina primeru k novému 5'konci. V prvním kroku PCR se ve dvou oddělených reakcích nasyntetizují dvě poloviny produktu s komplementárními přesahy. V druhém kroku se obě reakce smíchají a při

průběhu druhé PCR v místech komplementárních úseků vytvoří spoje a polymeráza dosyntetizuje i druhou polovinu řetězce. Základní schéma a popis delece nukleotidů interních sekvencí metodou PCR je znázorněno na obr.3.4. Složení PCR reakce a teplotní průběh je uvedeno v tabulce 3.3.

Podle sekvence (viz. příloha 2) byly navrženy primery pro amplifikaci a klonování požadovaných úseků DNA do vektoru pDONR221, z kterého byly mutanty překlonovány pomocí LR reakce (viz níže) do plasmidu pDEST53.



Obr.3.4. Základní schéma pro deleci nukleotidů metodou PCR

Vnější primery s přesahy att :

PRIMER1 :

*attB1* GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGCGAGGGGACCGGGCTTCTGG

PRIMER2 :

*attB2* GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CTATCCACACGTGAACCTGCC

Vnitřní primery:

Pro CIDE-C:

PRI1 : TTGCTCGCCGCCGAAGAGGTCG/CAGTTTCTCATCTATCTGGGCA

PRI2 : TGCCAGATAGATGAGAACTG/CGACCTCTTCGGCGCGAGCAA

Pro CIDE-N:

PRI1 : ACCCGCTCATGCATCCAGCT/CAGCACGTCCCCACTTGCTCG

PRI2 : CGAGCAAGTGGGGACGTGCTG/AGCTGGATGCATGAGCGGGGT

Tab.3.3. Složení PCR reakce, počet a délka cyklů:

H <sub>2</sub> O	40,5 µl	1. denaturace	94°C	5 min.
10 x PCR Pufr	5 µl	2. denaturace	94°C	1 min.
Směs dNTP (a' 10mM)	1 µl	3. renaturace	53°C	2 min.
DNA (50-100ng)	1 µl	4. syntéza	72°C	2 min.
Primer1(10uM)	1 µl	krok č. 2 až 4	35 x	
Primer2 (10uM)	1 µl	5. syntéza	72°C	10 min.
Pfu poly (1U)	0,5 µl	15°C	∞	

### 3.3.8.1.2. GFP-CIDEa a dsRed -CIDEa

Jako templát pro PCR reakci byl užit ORF hCIDEa ve vektoru pENTR221. Primery byly navrženy s komplementární sekvencí k začátku a konci genu CIDEa a přesahem obsahujícím restrikční místo pro restriktázy XhoI a EcoRI. Byla provedena PCR podle protokolu z předchozí kapitoly a produkt byl zkontrolován pomocí agarové elektroforézy. V případě nespecifických produktů byla provedena eluce fragmentu z gelu.

Postup:

1. Požadovaný fragment se vyříznul skalpelem z gelu a zvažil
2. Bylo přidáno dvojnásobné množství NT lyzačního pufru- inkubace 10 minut při 50°C
3. Rozpuštěný gel se zcentrifugoval v mikrozkušavce s membránou- 11000xg, 1 min
4. Membrána se promyla 600 µl NT3 pufru- centrifugace 11000xg, 1 min
5. Pro odstranění zbytku pufru se centrifugace zopakovala
6. DNA se eluovala v 50 µl NE pufru (Tris-EDTA)-centrifugace 11000xg, 1min

PCR produkt byl po restriktaci zaklonován do vektorů pAcGFP1-C1a pDsRed-Monomer-C1, které byly linearizovány stejnými enzymy, pomocí T4 DNA ligázy. Ligace byla provedena při 16°C přes noc v celkovém objemu 50 µl ve směsi: voda, ligační pufr, PCR produkt, plasmid a 1U T4 ligázy. Pro účinnou ligaci je dobré zachovat molární poměr plasmidu ku PCR produktu 1: 3-10. Proto byla u obou DNA změřená koncentrace a převod koncentrace na molaritu spočítán pomocí rovnice:

$$\text{ng} = (\text{fmol})(N)(660\text{fg}/\text{fmol})(1\text{ng}/10^6\text{ fg}); \quad \text{kde } N \text{ je velikost DNA v bp}$$

Ligačním produktem byly transformovány kompetentní buňky E.coli DH5α, následně nasety na misky s LB médiem a selekčním antibiotikem kanamycinem o koncentraci 50 µg/ml. Vybrané pozitivní klony byly ověřeny sekvenací.

Sekvence primerů:

PRI1: A ACA TTA TCT CGA GGA GGC ACC ATG CGA,

PRI2: GGC CGT CGA ATT CTA GTT CTA TCC ACA CG

#### 3.3.8.1.3. Určení pozitivních klonů metodou PCR

Kolonie testované na přítomnost jednotlivých konstruktů byly resuspendovány v 10 µl dest. H<sub>2</sub>O a poté podstoupily níže uvedenou teplotní reakci. Vzniklá směs denaturovaných buněk byla následně použita pro jednotlivé PCR reakce příslušných konstruktů.

1. 96°C 5 min.
2. 50°C 1 min. 30 sek.
3. 96°C 1 min. 30 sek.
4. 45°C 1 min.
5. 96°C 1 min.
6. 40°C 1 min.
7. 4°C 2 min.

#### 3.3.8.1.4. Sekvenace

Konstrukty ověřené PCR na správnost vloženého inzertu byly osekvenovány ve středisku sekvenování DNA na mikrobiologickém ústavu v Krči.

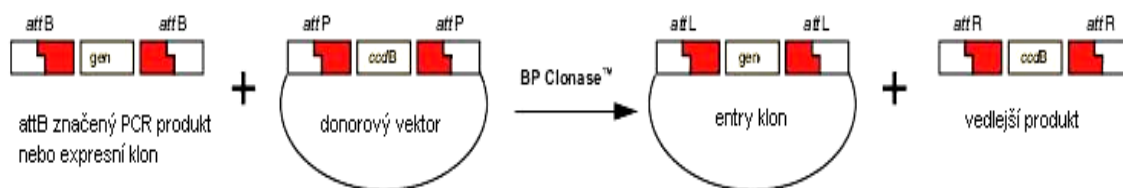
#### 3.3.8.2. Metoda Gateway

Technologie Gateway je univerzální klonovací metoda, založená na schopnosti místně specifické rekombinace bakteriofága lambda a integrace do chromozómu E.coli. Rekombinace probíhá mezi specifickými att (attachment) místy, je konzervativní a nevyžaduje DNA syntézu. Další výhodou je kompatibilita a kombinovatelnost různých expresních systémů obsahujících att místa. Tyto místa slouží jako vazebná místa pro rekombinační proteiny, přičemž samotná výměna sekvencí probíhá mezi homologními 15bp regiony dvou příslušných míst. Rekombinace je katalyzovaná směsí enzymů, které se vážou na att místa, přiblíží cílové sekvence, rozštěpí je a opět kovalentně spojí. Výsledkem jsou dva páry výměn řetězců a ligace dvou nových molekul DNA. Rekombinační proteiny v reakci se liší podle toho, jestli fág užívá lytickou nebo lysogenní dráhu.

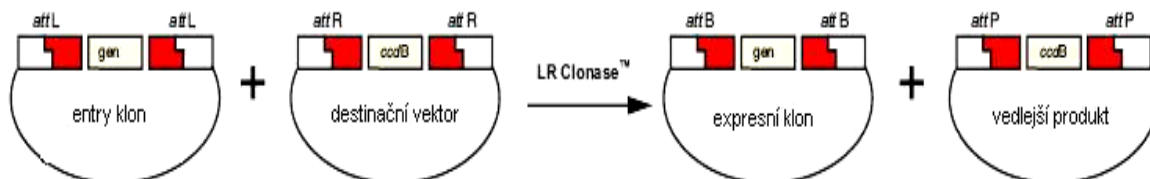
Gateway technologie užívá modifikovaného lambda rekombinačního systému pro přenos heterologních sekvencí DNA mezi vektory a je založená na dvou základních reakcích:

BP reakce (obr.3.5.) - rekombinace attB substrátu (PCR produkt ohraničený att sekvencemi nebo linearizovaný attB expresní klon) s attP substrátem (donorový vektor), vzniká attL entry klon jako meziprodukt. Reakce je katalyzovaná BP klonázovou enzymovou směsí- obsahuje Int (integráza) a IHF (Integration Host Factor).

LR reakce (obr.3.6.) - následný krok po BP reakci, rekombinace meziproduktu (attL entry klonu) s attR substrátem (destinační vektor), vzniká attB destinační expresní vektor, který po transfekci do buněk exprimuje příslušný gen. Reakce je katalyzovaná LR klonázovou směsí- obsahuje Int, IHF a Xis (excisionáza).



Obr.3.5. BP reakce



Obr.3.6. LR reakce

Pro účinnou selekci správných klonů systém užívá dvojité selekce:

1. Pomocí genu *ccdB*. Po transformaci do *E. coli* dochází k negativní selekci vektorů, u kterých neproběhla rekombinace a exprimuje se *ccdB* protein, který interferuje s DNA gyrázou. Při správné rekombinaci je gen vyštěpen a buňky vytvoří kolonie na LB plotnách.
2. Pomocí dvojích antibiotik. Entry vektory nesou rezistenci na kanamycin, zatímco destinační na ampicilin. Selekcce proběhne na LB plotnách obsahujících ampicilin, narostou pouze buňky nesoucí destinační vektor.

Spojením těchto selekcí získáme pouze klony s expresním vektorem s naší vloženou DNA.

Postup BP reakce:

1. Připravila se reakční směs

attB PCR produkt (40-100 fmol)	1-10 $\mu$ l
pDONR vektor (150 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
BP Klonázový pufr 5x	4 $\mu$ l
TE pufr, pH 8	doplnit do 16 $\mu$ l

2. Přidalo se 4 $\mu$ l BP klonázového mixu a inkubovalo 1 hodinu při 25°C
3. Přidalo se 2 $\mu$ l proteinázy K na 10 minut při 37°C
4. Směs se transformovala do kompetentních *E.coli* a selektovala na kanamycinu.

Touto metodou byly zaklonovány sekvence mutantních forem proteinu CIDEa a vytvořily se tak entry klony, které sloužily pro přípravu expresních vektorů v následné LR reakci.

Postup LR reakce:

1. Připravila se reakční směs:

Entry klon, Entry-ORF (100-300ng)	1-10 $\mu$ l
-----------------------------------	--------------

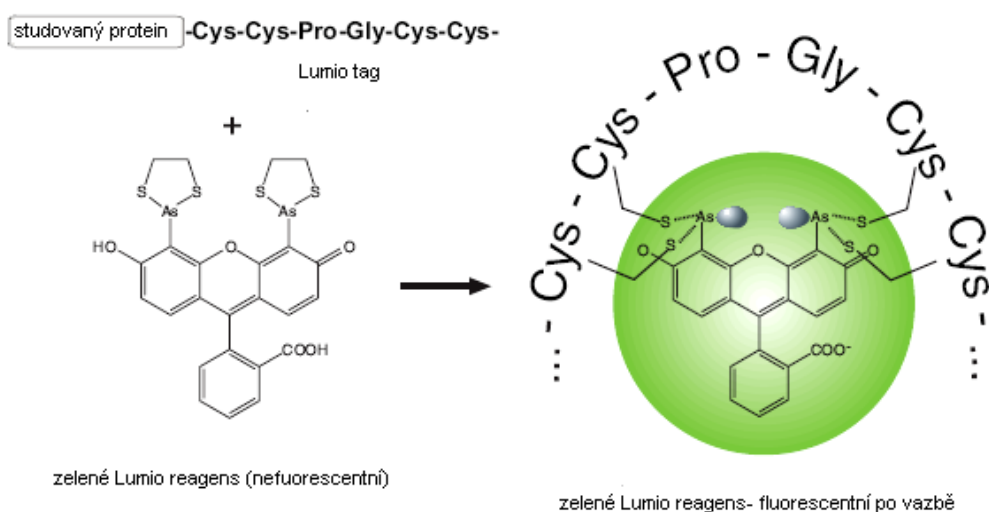
Destinační vektor (300ng)	2μl
LR Klonázový pufr 5x	4μl
TE pufr, pH 8	doplnit do 16μl

2. Přidalo se 4μl LR klonázového mixu a inkubovalo 1 hodinu při 25°C
3. Přidalo se 2μl proteinázy K na 10 minut při 37°C
4. Směs se transformovala do kompetentních E.coli a selektovala na ampicilinu.

Touto metodou byly připraveny konstrukty s plasmidem pDEST53, nesoucím sekvenci proteinu GFP (vzniklý produkt nese GFP na svém N konci) a vznikly fúzní geny GFP-CIDEa, GFP-CIDE-N a GFP-CIDE-C.

### 3.3.8.3. Metoda Lumio

Tato technologie se používá k fluorescenčnímu značení proteinů v živých buňkách a její hlavní výhoda spočívá v malé velikosti Lumio tagu, který je velký pouze 6 aminokyselin a neinterferuje tedy s přirozenou aktivitou značeného proteinu. Další výhodou je membránová propustnost barev lumio a jejich specifita k danému proteinu. Metoda je založena na technologii FIAsh (Fluorescein Arsenical Harpin), která užívá biarsenové sloučeniny k navázání na protein obsahující tetracysteinový motiv. Tyto sloučeniny jsou nefluorescentní dokud se nenavážou na tetracysteinovou sekvenci. Lumio systém obsahuje dvě komponenty. První je plasmid nesoucí tetracysteinový *Lumio* tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys), za který se vloží studovaný gen a proteinový produkt je pak tímto motivem označen. Druhou složkou je barvicí reagens, a to buď zelené, které je biarsenový derivát fluoresceinu nebo červené, které je biarsenový derivát resorufinu. Obě sloučeniny se vážou k Lumio tagu přes čtyři kovalentní vazby, dvě arsenové skupiny každé vážou dva trioly v tetracysteinové sekvenci. Po vazbě se stávají vysoce fluorescentní (obr.3.7.).



Obr.3.7. Princip značení metodou Lumio

#### 3.3.8.4. Transformace E.coli

Pro namnožení plasmidů a pro selekci kolonií po ligaci byla užitá metoda transformace heat-shockem.

Postup:

1. E.coli (50-100 $\mu$ l) skladované v  $-70^{\circ}\text{C}$  se nechaly rozmraznout na ledu
2. Bylo přidáno 1  $\mu$ l plasmidové DNA nebo 10  $\mu$ l ligační směsi a zamícháno
3. Buňky se nechaly 20 minut inkubovat na ledu
4. Heat-shock,  $42^{\circ}\text{C}$ , 30 sekund
5. Ihned přidáno 0,5ml LB média pokojové teploty
6. Inkubace v třepačce-  $37^{\circ}\text{C}$ , 1 hodina
7. Rozetřeno 50  $\mu$ l. buněk na předehřátou LB plotnu s antibiotikem, v případě ligace se buňky zcentrifugovaly (200G, 4 minuty), supernatant se slil a buňky resuspendovaly ve zbytku supernatantu a rozetřely na plotnu
8. Inkubace v termostatu-  $37^{\circ}\text{C}$ , přes noc

LB médium a plotny: 2,5 g kvasinkového autolyzátu; 5 g kaseinového hydrolyzátu; 5g NaCl; 7,5 g agaru; 500 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH = 7; sterilizovat.

#### 3.3.8.5. Izolace plasmidů

Izolace plasmidů byla prováděna pomocí kitu *Genelute plasmid mini-prep* pro výrobu konstruktů nebo *QIAfilter Midi Kit* pro izolace většího množství DNA například pro transfekce. V obou případech jde o izolaci z E.coli narostlých přes noc v LB médiu s antibiotikem a probíhá ve krocích: lyzace buněk, pročištění lyzátu (u miniprepu centrifugací, u midiprepu přes filtr), vazba na kolonku, promytí a eluce ve vodě nebo Tris-EDTA, pH8.

### **3.3.9. Práce s tkáňovými kulturami**

#### 3.3.9.1. Pěstování buněk

Buňky byly kultivovány v inkubátoru za podmínek  $37^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . INS1E byly každý týden pasažovány, T.Rex HeLa, HeLa a HEPG2 každé čtyři dny, T293 každé 3 dny. Pro dobrou kondici buněk se nesmí nechat přerůst, udržují se do 90% konfluence. Pasážování se dělalo pomocí trypsinu. Buňky se opláchly PBS a působením 0,05% trypsinu se uvolnily z povrchu kultivační láhve. Trypsin se inaktivoval přidáním stejného objemu média a následně se buňky nasáváním pipetou zhomogenizovaly a vysely na novou lávev v požadované hustotě.

Buňky INS1E byly pěstovány ve standardní 11mM glukóze a také v nízké 5mM glukóze, buňky HEPG2 v 5mM a 25mM glukóze. Dále byly buňky podle potřeby zamrazeny v 10% glycerolu pro pozdější využití a uskladněny v tekutém dusíku.

#### 3.3.9.2. Transfekce

Transfekce byla prováděna pomocí reagens *FugeneHD*. *Fugene* je směs lipidů a dalších komponent (v 80% ethanolu), která vytváří komplexy s DNA a transportuje je do savčích buněk. Vykazuje minimální toxicitu a není tedy nutné po jeho přidání měnit médium. Pro účinnou transfekci je potřeba, aby buňky byly v dobré kondici, tedy bez kontaminací například mykoplasma a nejlépe v růstové log fázi. Dále je důležitá čistota použité plasmidové DNA, nejlépe když poměr absorbancí 260/280 nm je 1,8. Také je vhodné použít plasmid rozpuštěný na koncentraci v rozmezí od 0,1 do 2 µg/ml. Při transfekci je vhodné použít médium bez antibiotik, protože mohou snížit účinnost tranfekce.

Postup (pro plochu 6jamkového plata, jamka = 9,4 cm<sup>2</sup>):

1. Buňky byly den před transfekcí vysety do konfluence asi 80%
2. V den transfekce jim bylo vyměněno médium za bezantibiotikové
3. Do 100 µl Optimemu se přidalo 2 µg plasmidové DNA a zamíchalo
4. Bylo přidáno 4 µl *FugeneHD* (před přidáním zvortexovat) a zvortexováno
5. Směs se inkubovala 15 až 20 minut při pokojové teplotě
6. Po kapkách se rozvrstvila na plochu buněk
7. Produkt je detekovatelný podle typu vneseného plasmidu, od 5hodin po transfekci

#### 3.3.9.3. Příprava stabilní linie s roGFP

Výroba stabilní linie se zakládá na selekci buněk nesoucích plasmid exprimující kromě našeho genu i gen pro rezistenci k danému antibiotiku. Při standardní transientní tranfekci plasmid zůstává v buňce asi do doby dvou týdnů a pak je v ní degradován. Při vzniku stabilní linie se plasmid vrekombinuje do genomu buňky a zůstává jeho součástí. Vložení bývá náhodné, proto vzniklé klony mohou mít různé vlastnosti. Při práci se stabilní linií se musí stále přidávat selekční antibiotikum pro případ, že některé buňky během následujících pasáží vnesený exprimovaný gen například vlivem mutace ztratí.

Pro výrobu stabilní linie je potřeba nejprve určit senzitivitu buněk k danému selekčnímu antibiotiku, což byl v tomto případě Geneticin. Byla namíchána ředící řada geneticinu o koncentracích 0, 150, 250, 500, 750 a 1000 µg/ml v médiu. Buňky byly den předem nasety o konfluenci asi 50% a následující 2 týdny kultivovány v daných koncentracích geneticinu v médiu. Médium se měnilo každé 3-4 dny. Po uplynulé době se vybrala nejnižší koncentrace geneticinu, při



kteře už žádná buňka nepřežije. Pro buňky INS1E to byla koncentrace 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pro HeLa 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Buňky byly tedy natrasfekovány plasmidem nesoucím gen roGFP a udržovány 3 týdny v médiu s 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  geneticinu. Následně byly vybrány jednotlivé kolonie buněk, zhomogenizovány špičkou v 1,5 ml eppendorfkách a přesazeny do 96 jamkového plata. Výhodou výroby této linie je, že produkt je fluorescenční a lze tedy kdykoliv kontrolovat pod fluorescenčním mikroskopem, zda vybrané kolonie svítí. Buňky se po vždy dosažení plné konfluence přesadily na větší kulturační povrch. Po napěstování dostatečného množství bylo vybráno několik kolonií, část se zamrazila a část se využila k experimentům.

#### 3.3.9.3.1. roGFP

roGFP je zelený fluorescenční protein citlivý ke změnám redukčně-oxidačním stavům buňky. Byl vyrobený z komerčního EGFP-N od firmy Clontech, u kterého byly provedeny substituce povrchových aminokyselinových zbytků za cysteinové, které vytvářejí disulfidické můstky. Protein mění intenzitu fluorescence v závislosti na změnách redox potenciálu. Další změnou je přidání mitochondriální adresy připojením sekvence E1 $\alpha$  podjednotky pyruvát dehydrogenázy. Tento plasmid nám byl darován od Dr. Rossignola z Univerzity Bordeaux, Francie.

#### 3.3.9.4. T.REx systém

Tento systém je založen na tetracyklinem regulované expresi u savců, který užívá regulační elementy z E.coli operonu tetracyklinové rezistence (Tet). Regulace tetracyklinem je založena na vazbě tetracyklinu k Tet represoru a odblokování promotoru kontrolujícího expresi sledovaného genu. Tedy, jde o indukovanou expresi, která probíhá pouze v přítomnosti tetracyklinu v médiu. Základními složkami jsou expresní plasmid, nesoucí dvě kopie sekvence tet operátoru, které slouží jako vazebná místa pro dvě molekuly Tet represoru (TetR) a regulační vektor, který exprimuje gen TetR. V nepřítomnosti tetracyklinu se represor váže ve formě homodimeru do operátorových sekvencí v promotoru sledovaného genu a blokuje jeho transkripci. Přidaný tetracyklin se váže na homodimery represoru a dochází k jejich konformační změně, která způsobí disociaci represoru z operátoru a umožní se tak exprese genu. Buněčné linie T.REx HeLa a T.REx293 již nesou regulační vektor jako stabilní linie rostoucí na selekčním antibiotiku blasticidinu. Po transfekci expresním T.REx plasmidem, nesoucím zaklonovaný studovaný gen, dojde ke kompletaci systému a exprese daného genu se může kdykoliv indukovat přidáním tetracyklinu. Pro pěstování těchto buněčných linií je proto důležité, aby sérum dodávané do média neobsahovalo tetracyklin.

### **3.3.10. Konfokální mikroskopie**

Pro pozorování lokalizace fluorescenčních proteinů v buňkách se používal konfokální invertovaný fluorescenční mikroskop Leica TSC SP2. Buňky byly nasety na sklíčkách s poly-L-lysinem a upevněné ve speciálním nosiči, umožňujícím udržovat buňky v médiu. Pro maximální rozlišení bylo použito PL APO 100×/1.4–0.7 objektivu s imerzním olejem. Pro excitaci byly užity argonový laser (pro vlnové délky 488 a 514 nm) a helium/neonový ( pro vlnovou délku 543 nm). Principem určení výskytu daného proteinu je kolokalizace fluorescenčního proteinu a organelově specifické fluorescenční barvy. K překryvu dvou signálů musí být užity dvě různé fluorescence, u kterých se nepřekrývají emisní spektra. Buňky exprimující GFP byly inkubovány 2 minuty s 0,5  $\mu$ M TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester; červená barva, která se interkaluje do mitochondriální membrány). Stejnou barvou byly barveny i buňky exprimující plasmid s Lumio tagem, které ale byly nejprve inkubovány 20-30 minut s Lumio Green reagens (rozpuští se v disperzní modři, která je součástí kitu a redukuje nežádoucí pozadí). Červený plasmid byl použit pro transfekci stabilní linie roGFP- HeLa, šlo tedy o expresi dvou fluorescenčních proteinů v jedné buňce a žádné barevné aditivum se proto nepřidávalo. Snímané obrázky byly upravovány programem Leica LCS Lite. Přehled používaných fluorescenčních barev a plasmidů je v tabulce 3.4.

<b>Barva, vektor</b>	<b>Excitace (nm)</b>	<b>Emise (nm)</b>
pDsRed- Monomer-C1	557	585
pAcGFP-C1	475	505
pcDNA-DEST53	395,478	507
Hoechst	350	461
TMRE	546	574
Lumio Red	593	608
Lumio Green	508	528

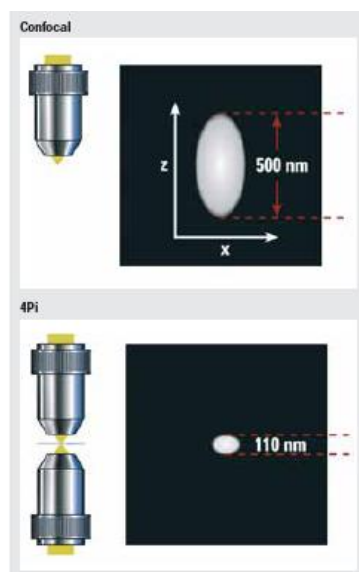
*Tab.3.4. Používané fluorescenční barvy a plasmidy*

### **3.3.11. Vizualizace mitochondriální sítě**

#### 3.3.11.1. 4pi mikroskopie

Optické rozlišení světelného mikroskopu je limitováno především rozptylem světla. Rozlišení v ose xz je horší než rozlišení laterální kvůli omezení danému aperturou ve směru optické osy, pokud se objekt snímá pouze jednoduchou čočkou. V případě 4Pi mikroskopie se užívá systém dvou protilehlých objektivů, které koherentně osvěcují vzorek, současně z obou stran a dávají větší aperturu. Výsledkem je 3-7x větší rozlišení v ose xz než u standardní konfokální nebo dvoufotonové mikroskopie a dosahuje 110 nm (obr.3.8.). Nejvyšší tj. 7x vyšší rozlišení je získáno v konstrukci

typu C, kdy interference dvou vlnových světelných front se týká jak dopadajícího paprsku, tak snímaného paprsku.



*Obr.3.8. Rozlišení konfokálního mikroskopu v ose xz je přibližně 500 nm oproti technologii 4Pi, kde je rozlišení od 110 nm.*

Navíc se jedná o šetrnou zobrazovací techniku 3D strukturám neboť zachovává přirozený tvar mitochondrií. Další metody s dobrou rozlišovací schopností jako je elektronová tomografie a elektronová mikroskopie sice poskytují kvalitní obraz, ale jsou nevýhodné kvůli komplikované přípravě vzorků, která ve výsledku může poškodit nativní strukturu buněk a navíc jsou lilitovány tloušťkou zkoumaného vzorku. Nevýhodou 4Pi mikroskopie ale je, že kvůli glycerolovému objektivu není možné pororovat živé buňky, ale pouze fixované, protože glycerol způsobuje buňkám osmotický šok a díky nerozpustnosti kyslíku znemožňuje respiraci.

Stavba mikroskopu:

Mikroskop se skládá ze standardního konfokálního mikroskopu TCS SP2 (Leica) a jednotky 4Pi. Má dva 100/1,35 NA glycerolové objektivy, obraz snímá CCD kamera pomocí titan-safírového laseru. Excitační světlo z mikroskopu je rozloženo rozdělovačem světla a cíleno na stejný bod pomocí protilehlých objektivů. Fluorescence je sbíraná oběma čočkami, zpětně složená na rozdělovači a mířená do těla mikroskopu.

V případě našich experimentů byla fluorescence buněk INS1E snímána užitím dvoufotonové excitace při 906 nm. Byly využívány dva přístroje, jednak zákaznické měření v centrále Leica

Microsystems, v Mannheimu, v SRN, a jednak přístroje ve spolupracující laboratoři Institute for Molecular Biophysics, Jackson Laboratory, Maine, USA, vedené Dr. Joergem Bewersdorfem.

#### 3.3.11.2. Příprava vzorků, fixace

Buňky stabilní linie INS1E a HEPG2 s roGFP (kultivované v 5 a 11mM, respektive v 5 a 25mM glukóze) byly pěstovány na polylyzinovaných sklíčkách pro 4Pi mikroskop 2-4 dny do konfluence asi 70%. Před fixací byly inkubovány v standardním médiu s přidaným 1 $\mu$ M FCCP (p-trifluormethoxy karbonyl kyanid fenyl hydrazon) nebo s 20 $\mu$ M rotenonem nebo s obouma najednou po dobu 20 minut v 37°C a následně fixovány s glutaraldehydem. Fixační protokol byl optimalizován, aby uchoval nativní strukturu mitochondriální sítě. Pro potvrzení byla struktura mitochondrií u fixovaných buněk srovnána s buňkami nefixovanými na konfokálním mikroskopu.

Postup fixace:

1. Sklíčka se omyla v PBS, aby se odstranily zbytky média
2. Buňky byly fixovány 0,3% glutaraldehydem (ředěný v PBS) při pokojové teplotě 10-15 minut
3. Nezaregované aldehydy byly redukovány 1mg/ml borohydrátem sodným (rozmíchaný v PBS; pH8) po dobu 15 minut; 2x opakovat. Roztok borohydrátu je nutné připravit těsně před fixací.
4. Sklíčka se 3x opláchla PBS

Sklíčka se zakápla montovacím médiem s glycerolem, přilepila k vrchním sklíčkům se zrcátkem a umístila do kovových držáků.

#### 3.3.11.3. Analýza obrazu

Průměry mitochondriálních tubulů byly vypočteny buďto z interference, která je inherentní součástí principu 4Pi mikroskopie jako poměry většího a nižšího maxima tzv. „point-spread-function“, PSF (PST metoda), nebo byly prostě změřeny z jednotlivých obrazů série xz projekcí při znalosti typu objektů, tedy po ověření, že daný objekt je v celé sérii opravdu tubulem (pravítková metoda).

Vizualizace 3D objektů a jejich povrchové vybarvení bylo prováděno s pomocí software Amira, firmy Mercury (SRN). Pro výpočet objemu mitochondriální sítě bylo využito software Paraview. Souhrn velikostí jednotlivých tubulů a objemy mitochondriální sítě jsou zaznamenány v kapitole výsledky v tabulce 4.1.

#### **3.3.12. Western blot**

Buňky byly seškrábány z povrchu kultivační lahve bez omytí PBS a tato buněčná suspenze centrifugována přímo v růstovém médiu, aby se zabránilo ztrátě buněk při odmytí. Pelet byl resuspendován v 50  $\mu$ l lyzačního pufru. Byl přidáno 50  $\mu$ l vzorkového pufru na SDS-PAGE,

povařeno 5 minut v 95°C. Každého vzorku bylo nanášeno 20-30 µg celkového proteinu na 12% SDS-PAGE a přebíráno na PVDF membránu. CIDEa byla detekována primární protilátkou vyvinutou v králíkovi o koncentraci 1µg/ml. Jako sekundární protilátka byla použita anti králičí konjugovaná s křenovou peroxidázou a pro vyvolání byl použit Luminol.

Složení gelu:

12% polyakrylamid/bis; 400mM tris-HCl; pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,04% TEMED

Složení pufrů:

Elektroforetický pufr (10x): 0,25M Tris-HCl; 1,92M glycin; 1% SDS

Blotovací pufr TBB: 20% methanol; 50mM Tris; 0,4M glycin; 0,35mM SDS

Pufr na vyvolání blotu TTBS, pH 7,5 (5x): 20mM Tris; 500mM NaCl; 0,05% Tween 20

### **3.3.13. Izolace buněčných frakcí**

Postup:

1. Buňky byly 2x omyté PBS a seškrábány z povrchu kultivační lahve do výsledného 1ml PBS.
2. Suspenze byla centrifugována- 1500xg/ 5 minut, 4°C
3. Pelet byl resuspendován v pufru A a inkubován 10 minut na ledu
4. Suspenze byla centrifugována – 5500xg/ 10 minut, 4°C
5. Byl odebrán supernatant- obsahoval cytosolickou a mitochondriální frakci
6. Pelet byl resuspendován stříkačkou s jehlou do trojnásobného objemu v pufru B a inkubován 30 minut na ledu
7. Suspenze byla centrifugována- 12000xg/ 20 minut, 4°C
8. Byl odebrán supernatant obsahující jaderný extrakt
9. Množství proteinu bylo stanoveno metodou Bradford (Bradford 1976)

PufrA: 10 mmol/l HEPES, pH 7.9; 10 mmol/l KCl; 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mmol/l DTT; 0.1% (v/v) NP-40

PufrB: 20 mmol/l HEPES, pH 7.9; 420 mmol/l NaCl; 0.2 mmol/l EDTA; 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mmol/l DTT; 0.5 mmol/l PMSF; 25% (v/v) glycerol

### **3.3.14. Indukce apoptózy**

HeLa buňky byly natransfekovány vektorem pDEST30-CIDEa a vystaveny působení tetracyklinu o koncentraci 1 µg /ml média. V časových intervalech 0, 2,4, 8, 12 a 24 hodin byly buňky sebrány pro analýzu obsahu proteinu CIDEa pomocí western blotu. V případě užití iniciátorů apoptózy byly buňky nejprve inkubovány 8 hodin s tetracyklinem a pak byly přidány do jednotlivých lahví na dvě hodiny: 2µmol/l camptothecin ( inhibitor komplexu DNA topoizomerázy

I), 2  $\mu\text{mol/l}$  CCCP (karbonyl kyanid m-chloro fenyl hydrazon., protonofor), 2  $\mu\text{mol/l}$  valinomycin (draslíkový ionofor) a vápníkový ionofor A23187 o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ . Buňky pak byly sklizeny a analyzovány metodami TUNEL a cell death essay.

#### 3.3.14.1. TUNEL

Tato rychlá a poměrně citlivá metoda slouží k detekci apoptózy pomocí fluorescenční mikroskopie. Její další výhodou je, že přednostně značí zlomy generované během apoptózy než nekrotické a než zlomy DNA vlákna indukované radiací nebo protinádorovými léky. Během apoptózy se genomová DNA štěpí na malé dvouvláknové úseky nebo vynikají jednovláknové zlomy. Princip metody spočívá ve značení volných 3-OH konců s modifikovanými nukleotidy v enzymové reakci katalyzované terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT). Dochází k polymerizaci nukleotidů značených fluoresceinem k volným 3-OH koncům. Inkorporovaný fluorescein je detekován pod fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií.

Postup:

1. Buňky byly fixovány fixačním roztokem po dobu 1 hodiny
2. Dvakrát opláchnuty PBS
3. Inkubovány v permeabilizačním roztoku 2 minuty na ledu
4. Byla připravena reakční směs z 450  $\mu\text{l}$  barvicího roztoku a 50  $\mu\text{l}$  enzymového roztoku, pro negativní kontrolu bylo před smícháním odebráno 100  $\mu\text{l}$  barvicího roztoku
5. Negativní kontrola: připravené buňky se inkubovaly s 50  $\mu\text{l}$  barvicího roztoku bez enzymové složky (terminální transferázy)
6. Buňky se 2x omyly PBS
7. Přidalo se 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi na vzorek, pro zajištění homogenního rozvrstvení směsi se buňky zakryly krycím sklíčkem a inkubovaly se 1 hodinu, při 37°C ve tmě
8. Po inkubaci se 3x omyly PBS
9. Proběhla analýza pod fluorescenčním mikroskopem, zelený filtr (excitace 488nm, emise 530)

Fixační roztok: 4% Paraformaldehyd v PBS, pH 7.4

Permeabilizační roztok: 0.1% Triton X-100 in 0.1% citrát sodný

Enzymový roztok: Terminální deoxynucleotidyl transferáza z hovězího thymu

Značící roztok: Směs nukleotidů fluorescein-dUTP

#### 3.3.14.2. Cell death assay

Bylo spočítáno celkem asi 300 buněk a 100 CIDEA pozitivních v náhodném poli pod fluorescenčním mikroskopem. Rozpoznání apoptotických buněk bylo stanoveno podle typických morfologických změn adherentních buněk podstupujících apoptózu, buňky jsou zakulacené a

kondenzované. To bylo výrazně vidět i po barvení Hoechstem 33258. Výsledná čísla sloužila k určení odhadu procenta apoptotických buněk. Pro statistickou analýzu byl užit student's t-test.

---

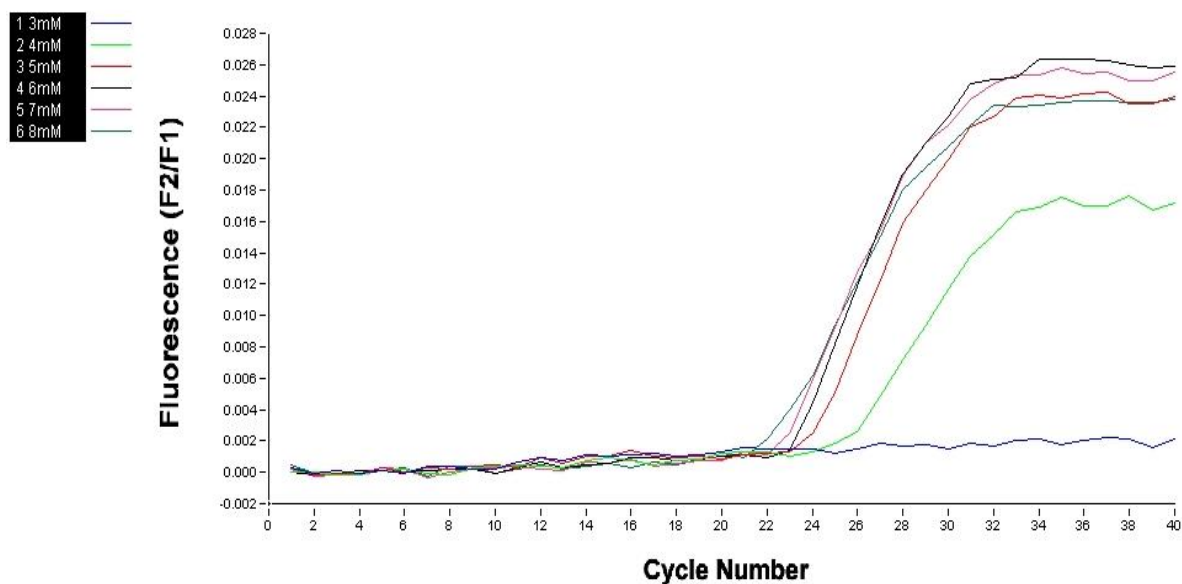
## 4. VÝSLEDKY

---

### 4.1. Stanovení hladin transkriptu CIDEa v tkáních

#### 4.1.1. Optimalizace kvantitativní PCR

Pro každou sadu primerů se stanovovala optimální koncentrace hořčíku. Koncentrace hořčíku se testovala v rozmezí 3 mM až 8 mM. Ukázka stanovení je uvedena na obrázku 4.1. Fluorescence je v tomto případě nejvyšší u vzorku s koncentrací  $\text{MgCl}_2$  6 mM.

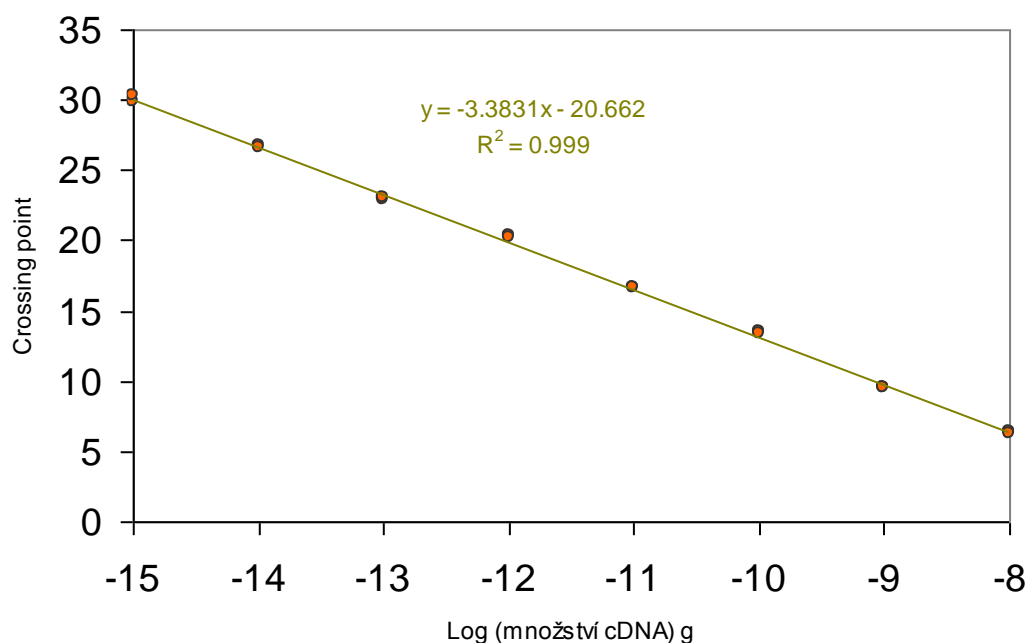


Obr.4.1. CIDEa-optimalizace koncentrace  $\text{MgCl}_2$  (výstup z přístroje LightCycler). Optimální hodnoty jsou pro koncentrace 6mM a 7mM.

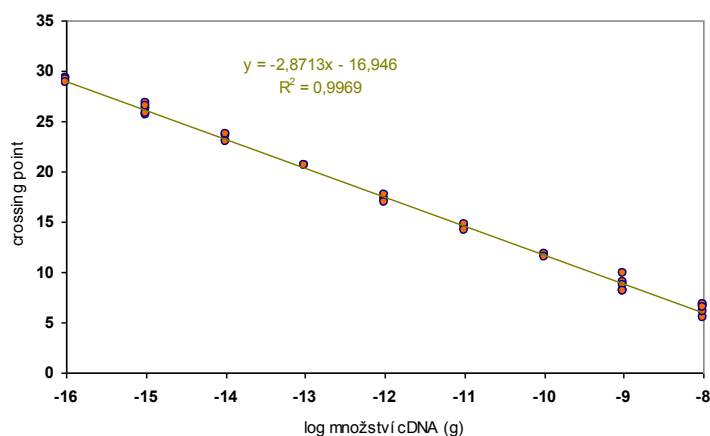


#### 4.1.2. Konstrukce kalibračních přímek

Zvolená metoda absolutní kvantifikace vyžaduje sestrojení kalibrační přímky pro každý gen zvlášť, s dodržением všech běžně používaných experimentálních podmínek. Sestrojovaly se kalibrační přímky pro geny krysí CIDEa a housekeeping gen GAPDH. Kalibrace se prováděla sérií ředění v rozsahu osmi řádů, vždy minimálně v duplikátech. Kalibrační rovnice jsou uvedeny v následujících grafech 1 a 2.



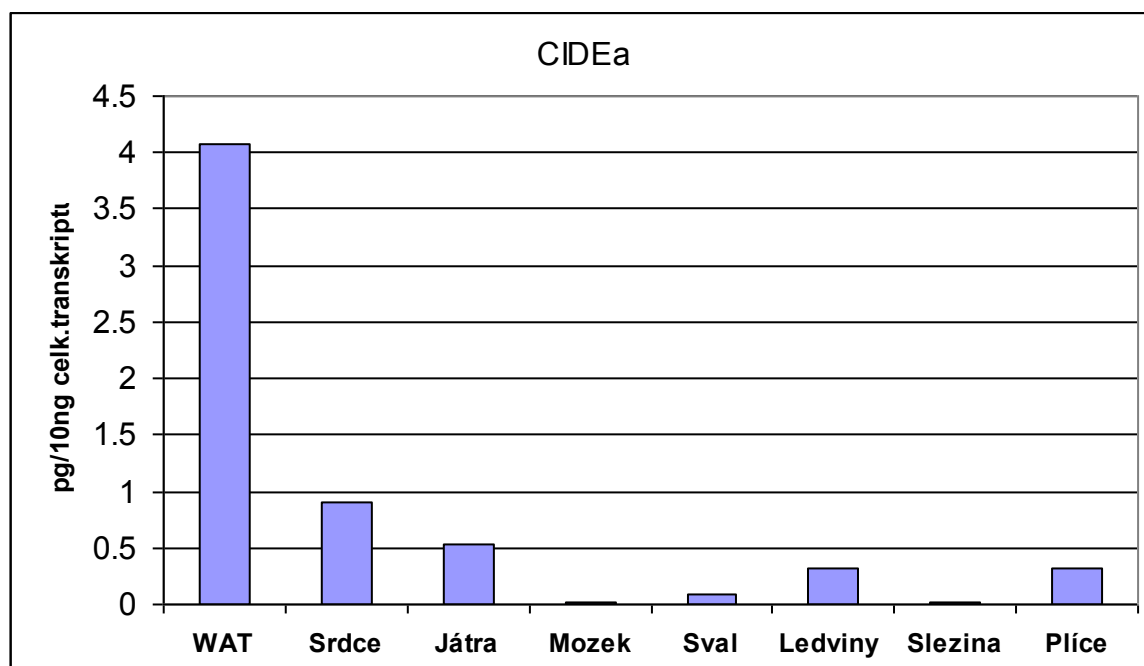
Graf 1. Kalibrační přímka pro CIDEa mRNA potkana



Graf 2. Kalibrační přímka pro GAPDH mRNA potkana

#### 4.1.3. Stanovení základních hladin mRNA CIDEa

Dosud publikované kvantifikace proteinu CIDEa nebo její hladiny RNA byly v převážné většině provedené metodou Northern-blot nebo klasickou PCR. V našem měření byly základní hladiny detekovány prostřednictvím kvantifikace mRNA izolované z tkání laboratorních potkanů a amplifikovány na LightCycleru. I přes existenci regulace translace, jež může snížit proporcionalitu mezi syntetizovaným proteinem a jeho transkriptem, je základní obraz množství transkriptu sledovaného proteinu vodítkem pro posouzení jeho fyziologické úlohy v dané tkáni. V našem případě jsme testovali bílou tukovou tkáň (WAT), srdce, mozek, ledviny, slezinu, játra, kosterní sval a plíce. Množství CIDEa v hnědé tukové tkáni (BAT) jsme bohužel neprověřovali a tedy nemohli potvrdit již dříve publikované údaje, vyjadřující BAT jako tkáň s nejvyšší expresí tohoto proteinu (Zhou et al., 2003, Inohara et al., 1998).

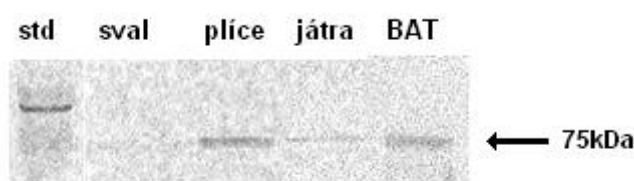


Obr.4.2. Hladiny mRNA proteinu CIDEa v tkáních laboratorního potkana. Hodnoty jsou uvedeny jako množství transkriptu CIDEa (v pikogramech, zaokrouhleno na dvě desetinná místa) v 10 ng celkového transkriptu. WAT (bílá tuková tkáň)- 4,07pg; srdce- 0,91pg; játra-0,53pg; mozek-0,02pg; sval-0,09pg; ledviny-0,33pg; slezina-0,01pg; plíce-0,33pg

Množství mRNA je vyjádřeno v pg, vzhledem k celkovému množství mRNA vložené do reakce, a to v jednotkách pg na 10 ng mRNA, vyzolované z dané tkáně. Tato jednotka v podstatě vyjadřuje průměrnou četnost transkripce v případě, když se 10 000 genů transkribuje zároveň se stejnou četností. Shodou okolností transkripce GAPDH probíhala v různých tkáních s četností 1 až 10 těchto jednotek. Transkripce CIDEa dosahovala řádu této jednotky pouze v případě WAT. Množství transkriptu u ostatních tkání se u potkana snižovalo v pořadí srdce > játra > ledviny > plíce > kosterní sval > mozek > slezina, přičemž rozdíl mezi maximem u WAT a minimem u sleziny byl až 400 násobný. Nejhojněji se tedy CIDEa mRNA vyskytuje ve WAT, potom v srdci a játrech. Nejnižší detekovaná hladiny byla zjištěné v mozku a slezině (přibližně 0,02 pg / 10 ng celkového transkriptu).

#### 4.1.4. Stanovení proteinu CIDEa

Testovali přítomnost proteinu CIDEa v různých tkáních laboratorního potkana pomocí western blotu (obr.4.3.). Použili jsme protilátku anti-CIDEa (ProSci). Překvapivě jsme detekovali protein o velikosti 75kDa, samotná CIDEa má velikost 25 kDa.

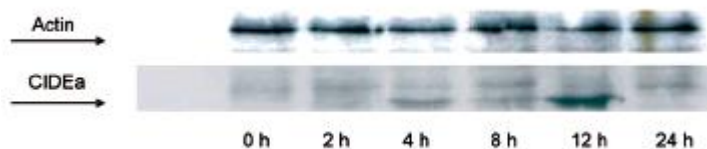


Obr.4.3. Western blot zobrazující protein CIDEa z potkaního svalu, plic a jater a myší hnědé tukové tkáně (BAT). Protein představuje molekulární hmotnost 75kDa. Std- hmotnostní marker; šipka ukazuje velikost 75kDa.

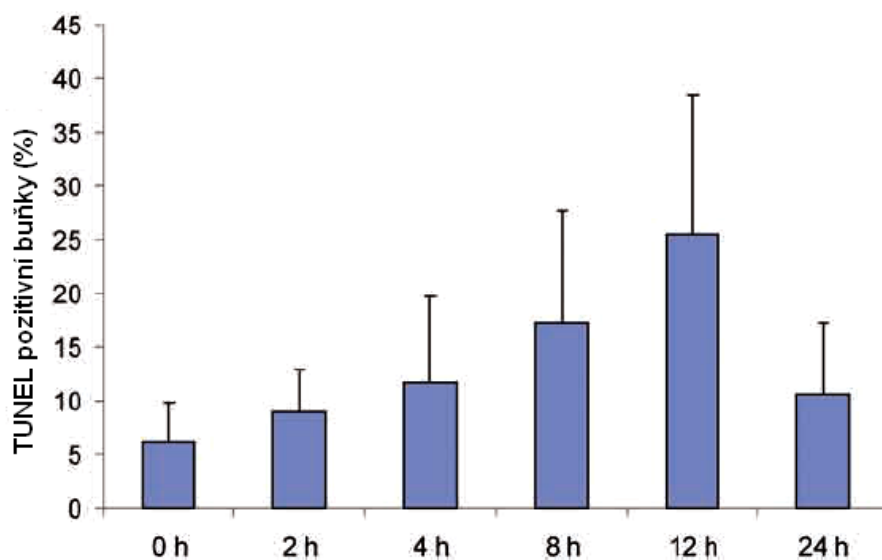
#### 4.2. Zvýšená exprese proteinu CIDEa vedla k apoptóze

Již některé dřívější studie CIDE proteinů uvádí, že artifičně zvýšená exprese proteinu vede k apoptóze (Inohara et al., 1998). V našem případě jsme zkoumali vliv indukované exprese CIDEa na buňky T.REx-HeLa, které stabilně exprimují tetracyklinový represor. Buňky jsme natransfekovali plasmidem T.REx-pDEST30-CIDEa, který umožní kontrolovatelnou expresi proteinu v závislosti na přidání tetracyklinu. Nejprve jsme vyzkoušeli funkčnost metody tím, že 24 hodin po transfekci buňky bez přidání tetracyklinu CIDEu neexprimují. Potom jsme udělali časovou řadu indukce tetracyklinem a zjistili, že maximální exprese proteinu probíhá po 12 hodinách po přidání tetracyklinu a potom exprese klesá (obr.4.4.). To může také značit, že transfekované buňky umírají, zatímco netransfekované dále rostou. Procento buněk, pozitivních na metodu TUNEL, ukázalo, že maximum apoptózy je mezi 8 a 12 hodinami. Ve srovnání s počátkem experimentu jsou obě hodnoty

výrazně vyšší (obr.4.5.). Proto se všechny následující pokusy prováděly s osmihodinovou indukcí tetracyklinem a následně dvě hodiny s induktory apoptózy.



Obr.4.4. Expese proteinu CIDEa v T.REx HeLa. Westernblot s časovou řadou po indukci tetracyklinem. Jako kontrola množství proteinu byl použit aktin.



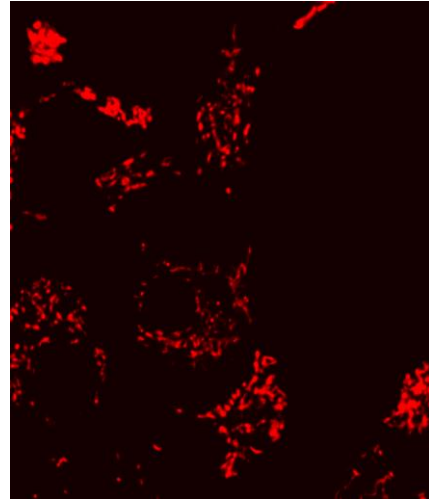
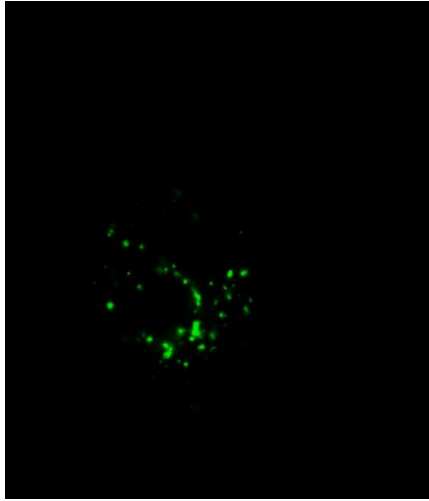
Obr.4.5. Počet TUNEL pozitivních buněk v poměru k celkovému počtu buněk. Chybové úsečky představují standardní odchylku určenou ze tří různých experimentů;  $p < 0,05$

### **4.3. Lokalizace proteinu CIDEa v buňkách**

Lokalizace proteinu CIDEa v mitochondriích byla již dříve zjištěna v hnědé tukové tkáni křečka (Zhou et al., 2003). Oproti tomu některé práce přítomnost proteinu CIDEa v mitochondriích nepotvrdily (Puri et al., 2008, Qi et al., 2008). V našem případě jsme zjišťovali distribuci proteinu CIDEa pomocí fluorescenční mikroskopie. Testovali jsme různé fluorescenční konstrukty v kombinaci s fluorescenčním barvivem TMRE nebo v kombinaci dvou různých fluorescenčních konstruktů dohromady. Šlo o určení lokalizace: pomocí exprese fúzního proteinu Lumio-CIDEa v buňkách 293T barvených Lumio green reagens či pomocí exprese fúzního proteinu GFP-CIDEa v buňkách 293T v kombinaci s barvením potenciálově senzitivní fluorescenční próbou TMRE a nebo kolokalizaci roGFP s dsRed-CIDEa v HeLa buňkách. Ve všech případech jsme našli protein CIDEa lokalizovaný v mitochondriích (obr.4.7.- 4.9.). Jako kontrolu případné toxicity transfekční metody či vlivu samotného GFP nebo RFP proteinu, exprimovaného v buňkách, na jejich na kondici jsme buňky natransfekovali také samotnými vektory pDsRed-Monomer-C1 a pcDNA-DEST53 (obr.4.10.).

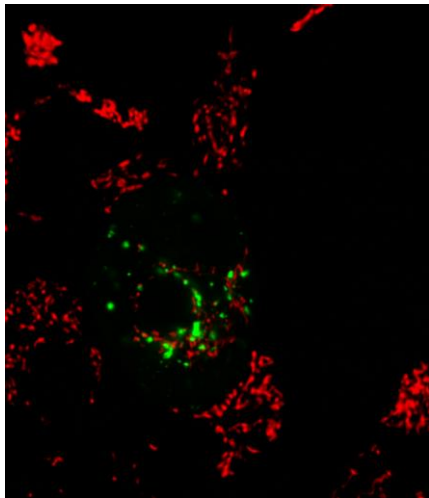
#### **4.3.1. Deleční mutanty CIDE-N a CIDE-C**

Jak již bylo uvedeno, deleční analýzy u proteinu CIDEb ukázaly, že signál pro lokalizaci v mitochondriích a oblast potřebná pro dimerizaci se překrývají a nachází se v C koncové oblasti proteinu (Chen et al., 2000). V našich experimentech výsledky z konfokální mikroskopie potvrdily tento fakt i u proteinu CIDEa. Zatímco mutant CIDE-N, který postrádá N doménu, prokázal lokalizaci proteinu v mitochondriích, mutantní protein CIDE-C bez C domény vykazoval distribuci mimo mitochondrie. To by značilo důležitost C domény pro mitochondriální lokalizaci, stejně jako u CIDEb proteinu (obr.4.5.-4.6.).



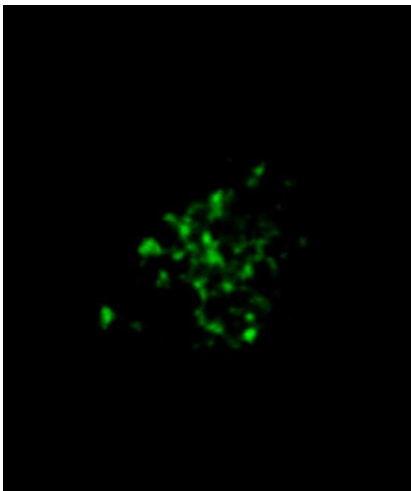
GFP-CIDEa-C

TMRE

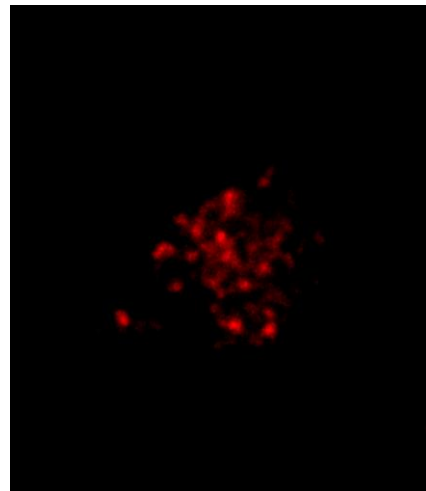


Překryv

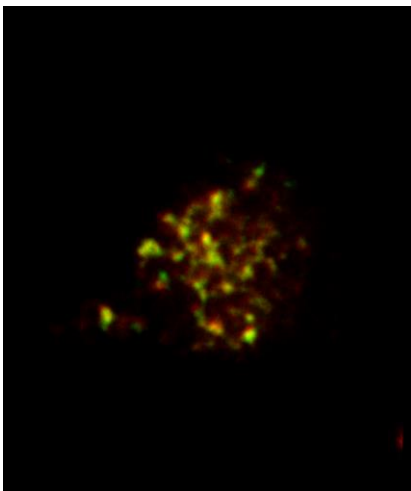
Obr.4.5. Lokalizace CIDEa-C v buňkách 293T; měřítko: 1cm= 10 $\mu$ m



GFP-CIDEa-N

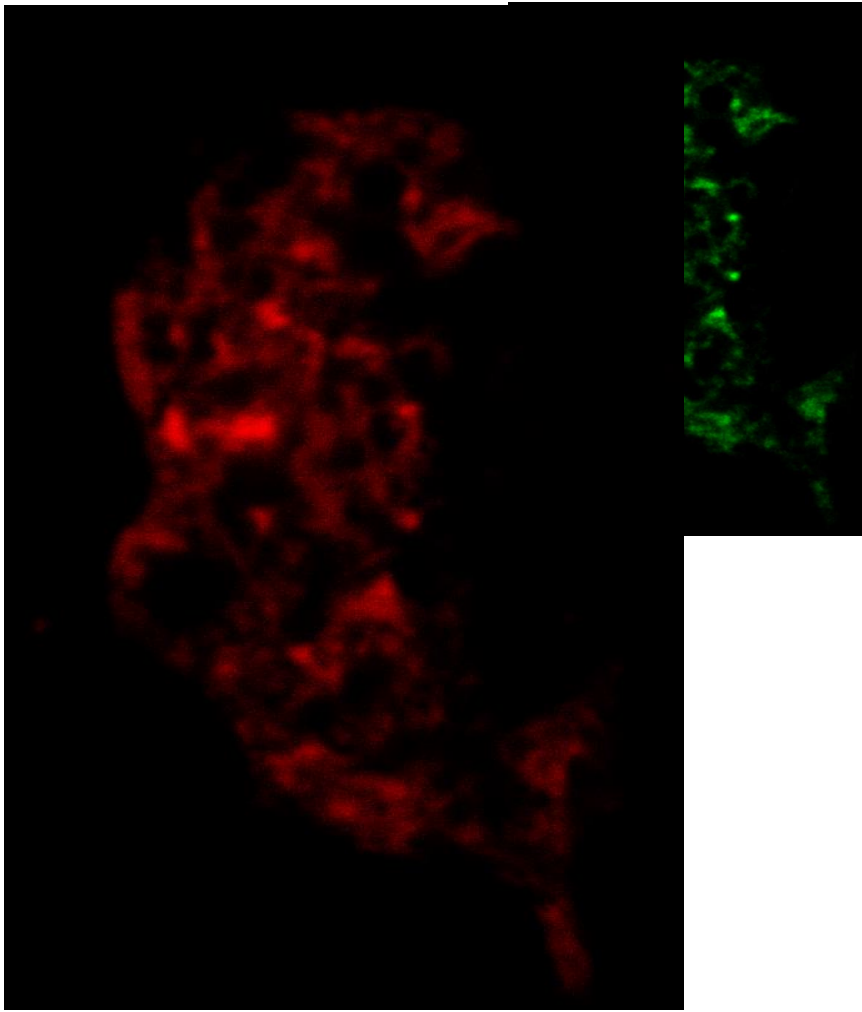


TMRE



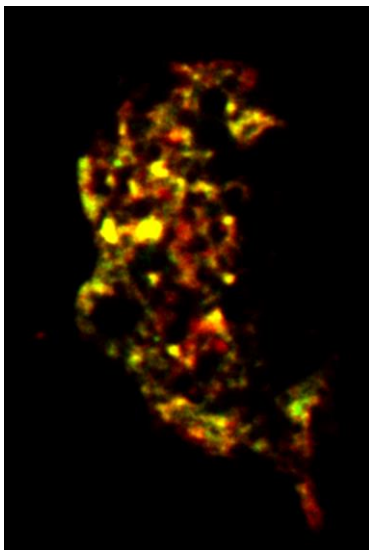
Překryv

*Obr.4.6. Lokalizace CIDEa-N v buňkách 293T; měřítko: 1cm=5 $\mu$ m*



TMRE

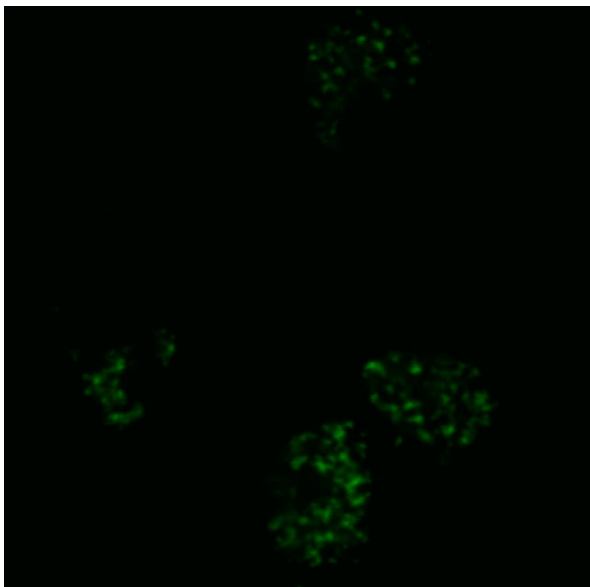
Lumio-CIDEa



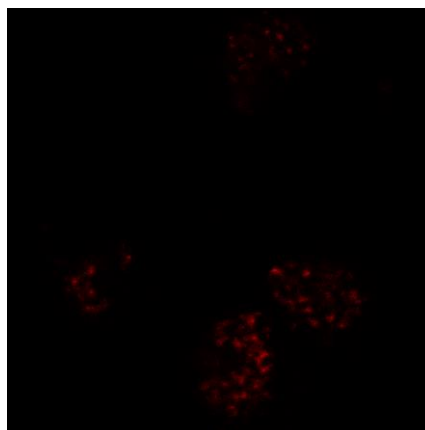


Překryv

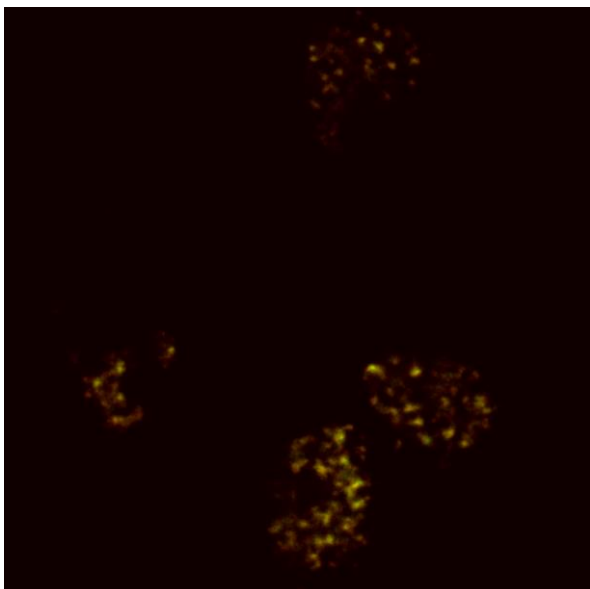
Obr.4.7. Určení lokalizace proteinu CIDEa pomocí Lumio reagens v buňkách 293T; 1cm=2 $\mu$ m



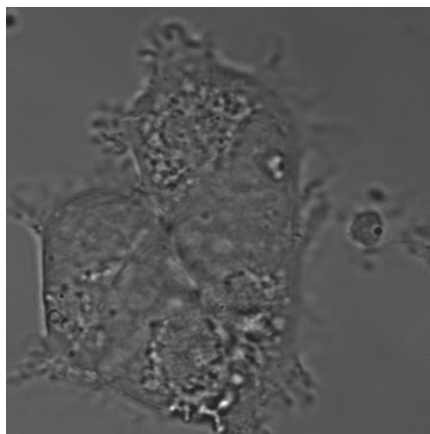
GFP-CIDEa



TMRE

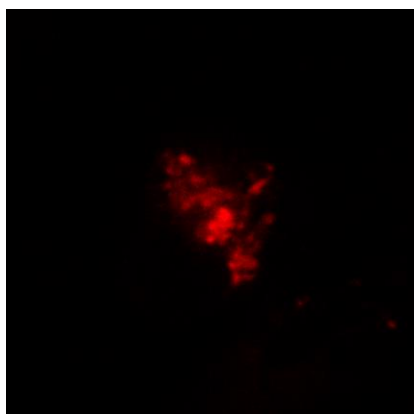


Překryv

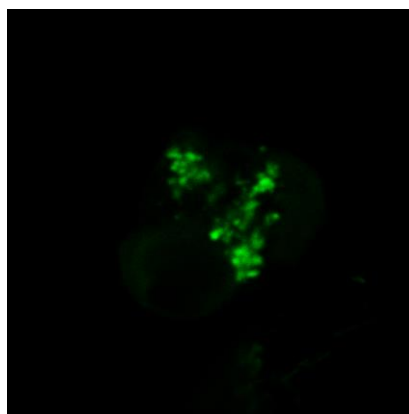


Průchozí světlo

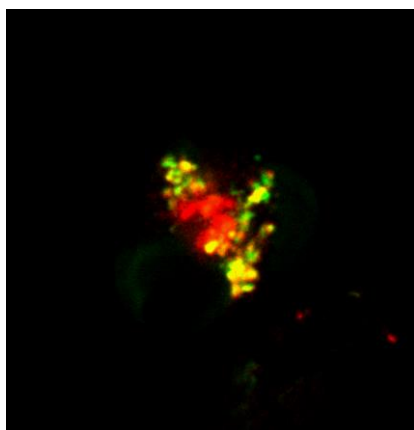
Obr.4.8. Určení lokalizace proteinu CIDEa pomocí GFP v buňkách 293T; 1cm= 10 $\mu$ m



dsRed-CIDEa



roGFP

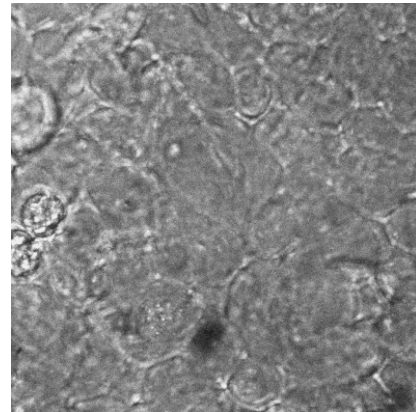


Překryv

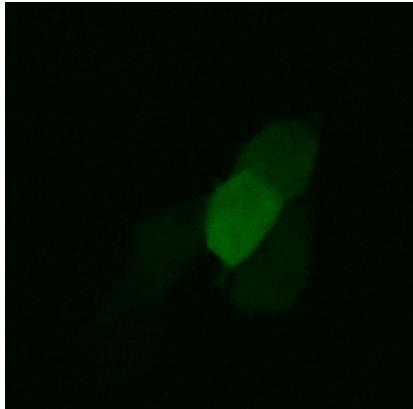
*Obr.4.9. Kolokalizace roGFP s Red-CIDEa v HeLa buňkách; 1cm=10 $\mu$ m*



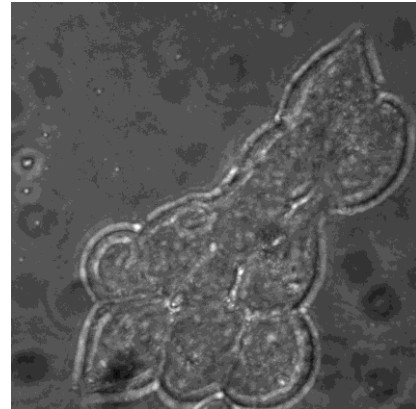
nDcRed



Průchozí  
světlo



pcDNA-  
DFST53



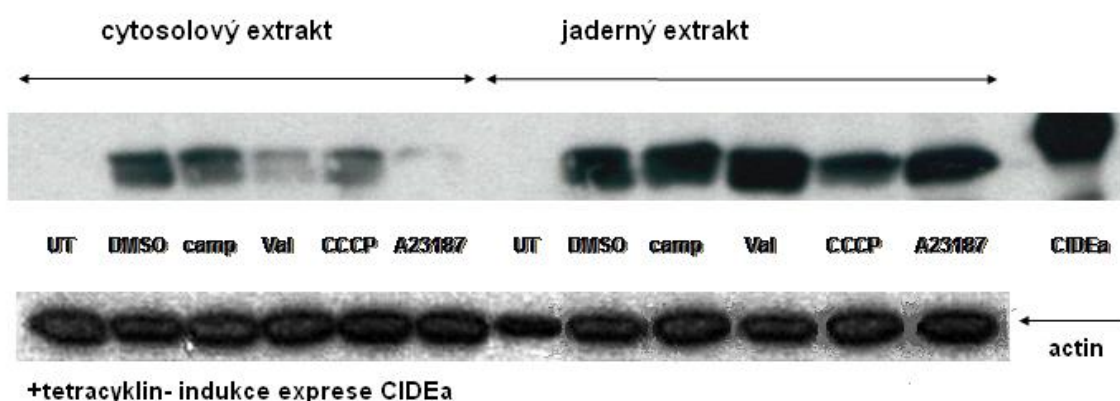
Průchozí  
světlo

Obr. 4.10. Kontrola samotné exprese RFP a GFP proteinu v buňkách 293T; 1cm= 15 $\mu$ m

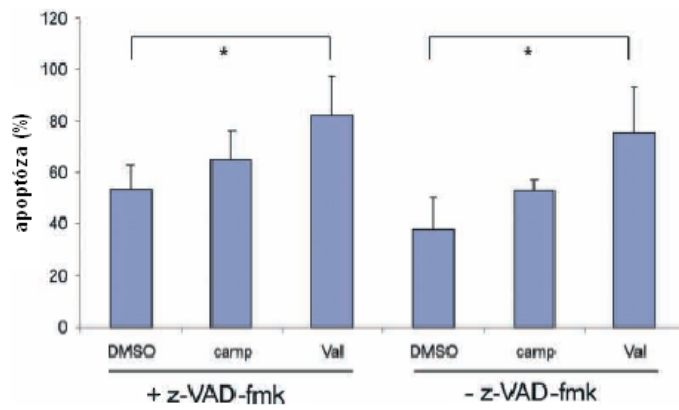
### **4.3.2. Redistribuce proteinu CIDEa po inkubaci s induktory apoptózy**

Pro zjištění lokalizace proteinu CIDEa jsme v tomto případě použili metody imunodetekce v subcelulárních frakcích buněk T-REx HeLa exprimujících po transfekci plasmidem T.REx-DEST30-CIDEa a indukci tetracyklinem vysoké hladiny CIDEa proteinu. Byla zjištěna lokalizace jak v mitochondriální, tak v jaderné frakci. Po indukci valinomycinem a camptothecinem došlo k redistribuci proteinu CIDEa do jádra (obr.4.11.).

Buňky byly také preinkubovány s 50 $\mu$ mol/l kaspázovým inhibitorem z-VAD-fmk po dobu 30 minut a dále pak 2 hodiny s induktory apoptózy camptothecinem a valinomycinem. Tato preinkubace výrazně nezvýšila procento CIDEa pozitivních buněk vykazujících morfologické znaky apoptózy, jako je sesychání nebo fragmentace jaderné DNA, což naznačuje, že jde o proces nezávislý na kaspázách (obr.4.12.). Naproti tomu bylo procento CIDEa apoptotických buněk po indukci valinomycinem vyšší než u kontrolních buněk inkubovaných se samotným DMSO (78% ku 40%), což podporuje teorii o spojení mezi redistribucí CIDEa a apoptózou.



Obr.4.11. Redistribuce proteinu CIDEa z cytosolu do jádra po apoptotickém stimulu u T.RExHeLa buněk. Jako kontrola množství naneseného proteinu byl použit aktin. UT- negativní kontrola, transfekce prázdným pT-REx-DEST30 vektorem, bez další inkubace; DMSO- transfekce pT-REx-DEST30-CIDEa vektorem a inkubováno v DMSO (dimethyl sulfoxid), jako negativním rozpouštědlem; camp- 2 $\mu$ mol/l camptothecin; Val- 2 $\mu$ mol/l valinomycin; A23187- 2 $\mu$ mol/l vápníkový ionofor; CIDEa- rekombinantní lidský protein CIDEa připravený z inkluzních tělísek, jako hmotnostní kontrola

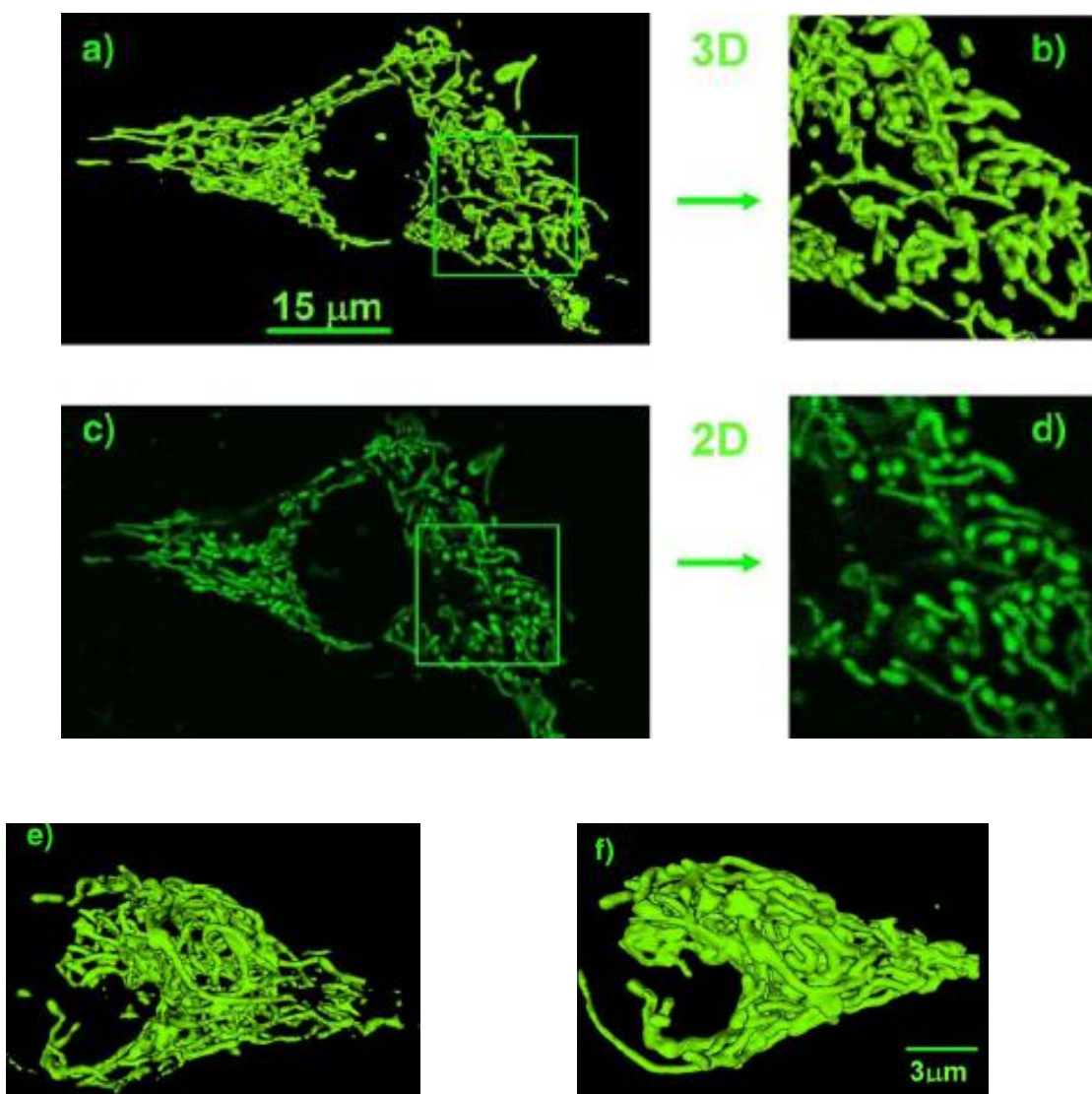


Obr.4.12. Vliv kaspázového inhibitoru z-VAD-fmk na apoptózu indukovanou zvýšenou expresí proteinu CIDEa v TRExHeLa buňkách. Chybové úsečky jsou standardní odchylky určené z minimálně tří experimentů; \*  $p < 0.05$

#### 4.4. Zobrazení mitochondriální sítě metodou 4Pi

##### 4.4.1. Srovnání 4Pi a standardní konfokální mikroskopie

Výsledky srovnání obrázků pořízených 4Pi a standardní konfokální technikou ukázaly výrazný rozdíl ve kvalitě rozlišení. Jelikož 4Pi technika dosahuje rozlišení z-osy 100 nm oproti zobrazení standardním konfokálním mikroskopem, který má rozlišení 500- 800 nm, lze dobře zmapovat ve trojrozměrném zobrazení i tenké buněčné struktury, jako je mitochondriální síť. Navíc jsou pozorované INS1E buňky velmi malé s hustou mitochondriální sítí, která je standardní mikroskopii těžko rozlišitelná. Porovnání obou technik ukázalo, že tubuly mitochondriální sítě jsou ve zobrazení standardní konfokální mikroskopii 2-4x silnější než při zobrazení pomocí 4Pi (Obr. 4.13.).



Obr.4.13. a-d- porovnání zobrazení 2D a 3D techniky; e,f- obrázek pořízený stejným mikroskopem, e- snímáný 4Pi technologií, f- snímáný standardní konfokální technologií.

#### 4.4.2. **Morfologie mitochondriální sítě v závislosti na kultivačních podmínkách**

##### 4.2.2.1. **Linie INS1E**

Mitochondrie INS1E buněk za normálních kultivačních podmínek, tedy v médiu s 11 mM glukózou, sekretují inzulin a probíhá u nich maximálně oxidativní fosforylace (Merglen et al., 2004). Pozorovali jsme hustou mitochondriální síť vyplňující celou buňku s tenkými hodně větvenými tubuly, které jsou vzájemně propojené. Jde tedy o jeden celek. Objem typické buňky činil 0,1 pl (většina buněk byla v rozmezí 0,03 do 0,1 pl). Bylo detekováno většinou 65 až 85 mitochondriálních větvení a více než 50 ohybů (někdy i více než 100). Na přibližně 20 místech každé buňky byly pozorovány ploché objekty, cisterny o velikosti přibližně 200x 400-600nm. Průměrná tloušťka tubulů byla stanovena na  $270 \pm 28$  nm. To je na hranici rozlišovací schopnosti 4Pi mikroskopie, tedy skutečný průměr může být ještě nižší (obr.4.14.).

U buněk kultivovaných na nízké 5mM glukóze buňky změnil svůj tvar z typického protáhlého na spíše oválný a jejich tubuly byly silnější, asi o 40 nm v průměru. Počet cisteren vzrostl ze 20 na 40-60 a některých buněk ještě s více jak 100 malých cisteren. Stejně jako u buněk pěstovaných za standardních podmínek, i zde bylo skoro u všech buněk vidět jedno propojené mitochondriální retikulum, ale počet větvení poklesl na 40 až 60 (obr. 4.15.).

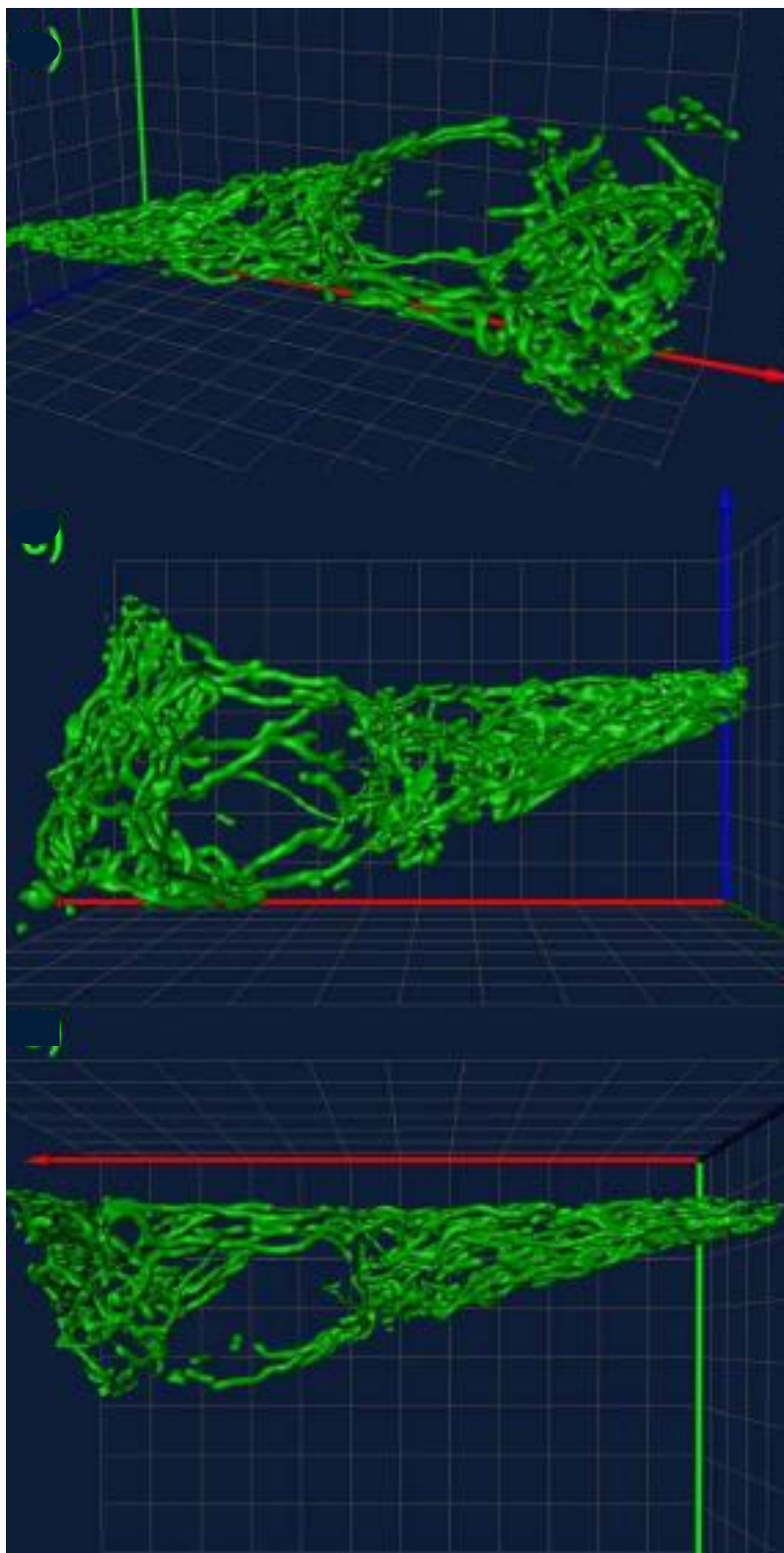
##### 4.2.2.2. **Linie HEPG2**

Buňky HEPG2 jsou 3 až 4x větší než buňky INS1E, pro svou velikost nebylo možné skenovat celé buňky, ale pouze 30-50%. Při kultivaci v médiu s nízkou 5mM koncentrací glukózy měly buňky hustou málo větvenou síť. V případě kultivace v 25mM glukóze, která imituje chronickou hyperglykémii, měly tubuly o 100nm větší průměr než za normálních podmínek. To koresponduje s nízkou rychlostí mitochondriální oxidativní fosforylace a přechodem na cytoplasmatickou glykolýzu (obr.4.16.)

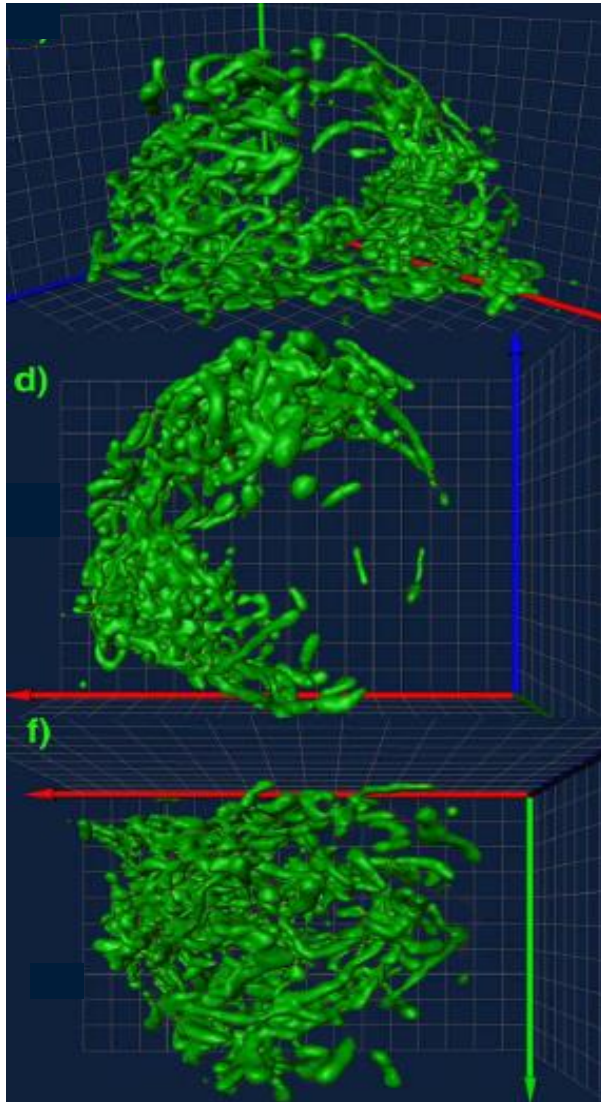
Kultivace INS1E	Průměr (PST metoda)	Průměr (pravítková m.)	Objem (pl)
11 mM glukóza, přístroj 1	$262 \pm 26$ nm (5)	$245 \pm 42$ nm (5)	0.09; 0.034
přístroj 2	$280 \pm 27$ nm (5)	$270 \pm 38$ nm (5)	
Celkově	$270 \pm 28$ nm (10)	$266 \pm 39$ nm (10)	0.028
25 mM glukóza, přístroj 1	$277 \pm 27$ nm (4)	$269 \pm 40$ nm (4)	
přístroj 2	$295 \pm 34$ nm (6)	$261 \pm 37$ nm (6)	
Celkově	$287 \pm 32$ nm (10)	$259 \pm 41$ nm (10)	0.037; 0.038; 0.049
5 mM glukóza, přístroj 1	$311 \pm 36$ nm (4)	$313 \pm 43$ nm (4)	
11 mM glukóza, rotenon	$330 \pm 34$ nm (4)	$308 \pm 50$ nm (4)	
11 mM glukóza, FCCP	$289 \pm 25$ nm (3)	$283 \pm 45$ nm (3)	
11 mM glukóza, rotenon a FCCP	$303 \pm 30$ nm (3)	$287 \pm 47$ nm (3)	
<b>Kultivace HEPG2</b>	<b>Průměr (PST metoda)</b>	<b>Průměr (pravítková metoda)</b>	<b>Objem (pl)</b>
5 mM glukóza	$284 \pm 38$ nm (4)	$265 \pm 50$ nm (4)	0.035
25 mM glukóza	$417 \pm 107$ nm (5)	$338 \pm 68$ nm (5)	

*Tabulka 4.1. Průměrná tloušťka tubulů a jiných útvarů a objemy celé mitochondriální sítě buněk INS1E a HEPG2. Přístroj 1 je v The Jackson Laboratory; přístroj 2 v Leica Microsystems, Mannheim, Germany). V závorkách je uveden počet zobrazených buněk.*

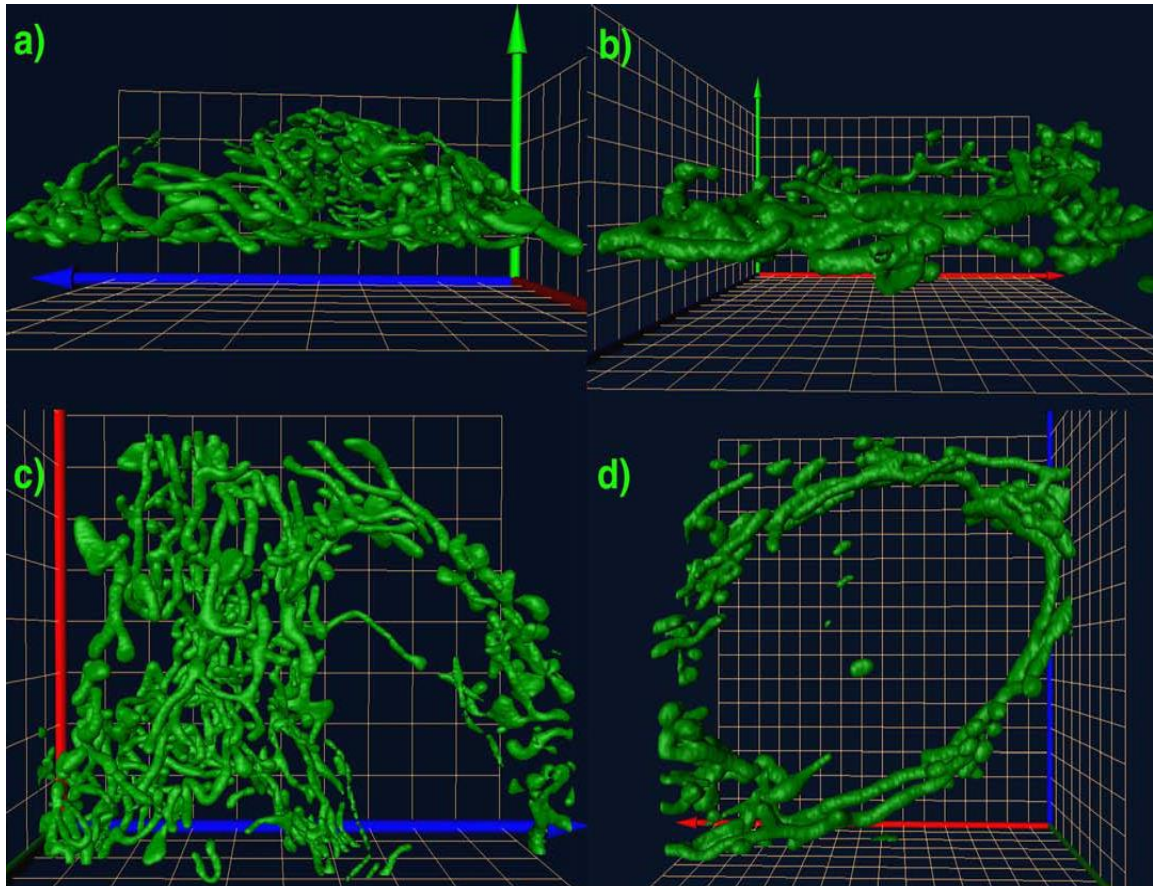




Obr.4.14. Buňka INS1E kultivovaná v 11mM glukóze, představující optimální růstové podmínky. Retikulum představuje jednu morfologickou jednotku o objemu 0,1pl. Zobrazeno v rovinách XZY; zelená-osa Z , červená- osa X, modrá- osa Y, čtverce v mřížce na pozadí mají velikost 1 $\mu$ m



Obr.4.15. Buňka INS1E kultivovaná na 5mM glukóze, postrádající autokrinní inzulín a tedy představující patologický stav. Síť je opět tvořena jednou hlavní morfologickou jednotkou plus menšími vmezeřenými trubicemi na opačné straně buňky



Obr.4.16. Zobrazení mitochondriální sítě buněk HEPG2; obrázky a) a c) buňka pěstovaná v 5mM glukóze, což představuje optimální růstové podmínky; obrázky b) a d) buňka pěstovaná v 25mM glukóze, tedy v hyperglykemických podmínkách s převažující glykolýzou.

Mitochondriální síť buňky kultivované za optimálních podmínek představuje jednu hlavní morfologickou jednotku, tři menší fragmenty a dalších devět malých částí tvaru koulí a krátkých tubulů. Počet větvení je 35 a více než 50 ohybů. Průměrná šířka tubulů je  $302 \pm 40$  nm (PST metoda) nebo  $277 \pm 53$  nm (pravítková metoda). Naproti tomu mitochondrie hyperglykemické buňky představuje síť s menším počtem větvení i ohybů (22 a 20) a tlustší tubuly o průměru  $445 \pm 128$  nm (PST metoda) nebo  $355 \pm 100$  nm (pravítková metoda).

#### **4.4.3. Morfologie mitochondriální sítě při inhibované respiraci**

Dále jsme zjišťovali, zda snížená oxidativní fosforylace při podstatně snížené respiraci (na 10-20%) účinkem inhibitoru komplexu I dýchacího řetězce rotenonu bude mít vliv na morfologii mitochondrií. Došlo k rozpadu mitochondriální sítě na několik hlavních částí nebo jedno hlavní retikulum se 2-7 menšími a dalších 15 až 40 malých objektů. Byly vidět dva typy útvarů, které se oddělily od hlavního retikula, 7 až 19 kulovitých útvarů přibližně 300 nm v průměru a 8 až 21 kratších segmentů tubulů stejného průměru. Počet větvení klesl o 10, případně zůstal konstantní. Průměr tubulů vzrostl o 60 nm (obr.4.17.).

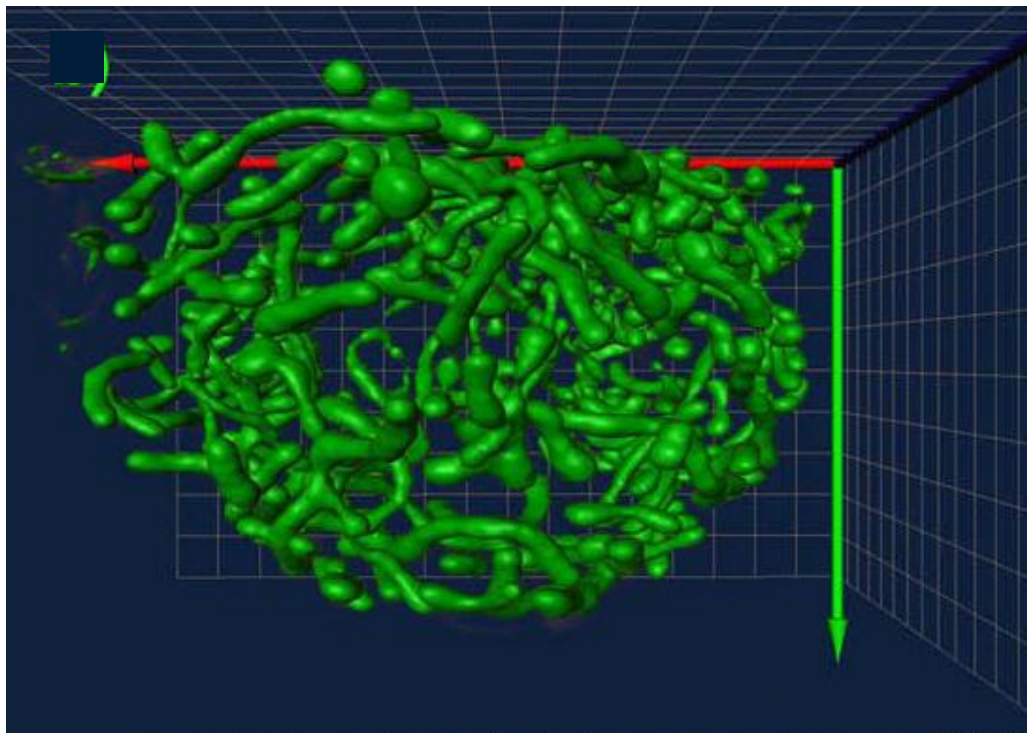
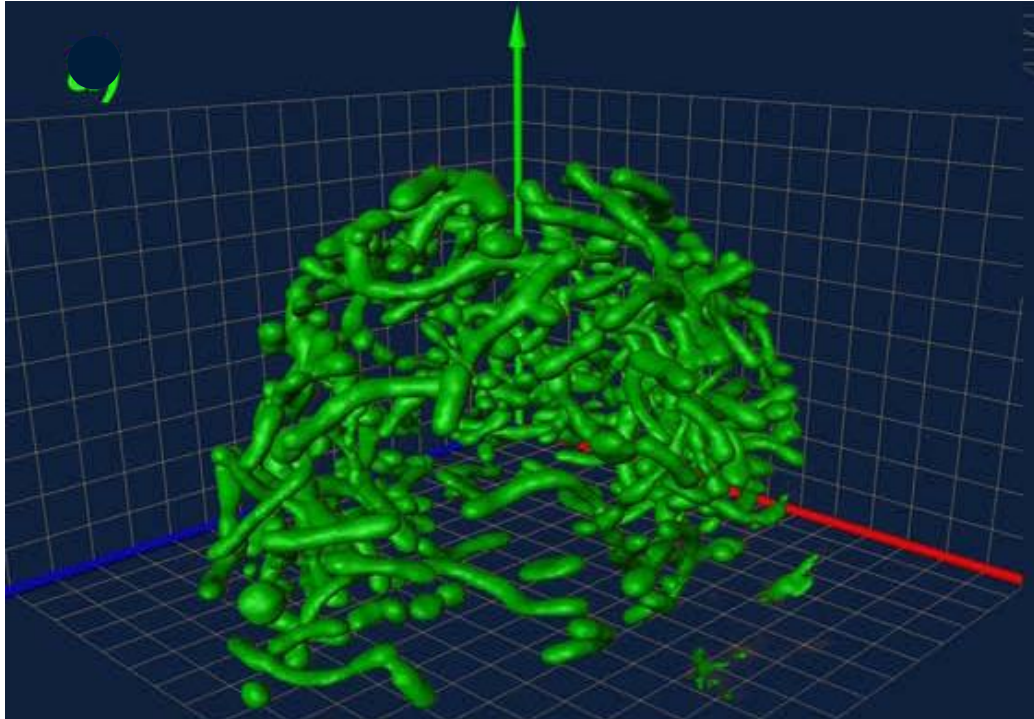
#### **4.4.4. Morfologie mitochondriální sítě při odpřažení**

Dalším zobrazeným stavem buněk bylo odpřažení indukované FCCP, kdy membránový potenciál a oxidativní fosforylace dosahují nulové hodnoty. Naopak na rozdíl od inhibice rotenonem se respirace pohybuje na maximální úrovni, a tedy je na maximální úrovni i Krebsův cyklus a matrixová tvorba GTP, nutného pro mitodynaminy. Tento stav ve vztahu k mitochondriální morfologii byl již dříve popsán pomocí 2D konfokální mikroskopie, kdy byl pozorován rozpad mitochondriální sítě na menší objekty a malé kruhové útvary (De Vos et al., 2005, Pletjushkina et al., 2006, Ishihara et al., 2006, Song et al., 2007). Stejně morfologické změny jsme pozorovali a popsali s mnohem přesnějším rozlišením pomocí 4Pi mikroskopie. Mitochondriální síť byla rozdělena na 2 až 6 hlavních větších částí a 20 až 40 malých jednotek. Hlavním znakem byly prstencové útvary o průměru 700 až 2000 nm. Jejich tloušťka byla přibližně stejná jako běžné mitochondriální trubice, což by naznačovalo, že jsou formovány fúzí krátkých segmentů. Byly napojené jako součást retikula nebo separátní v počtu kolem 10 v každé buňce. Dále se vyskytovaly malé koule o velikosti přibližně 300 nm, kulaté nebo ploché cisterny velikosti 1  $\mu\text{m}$ . Počet větvení poklesl na 15 až 20 (obr.4.18.).

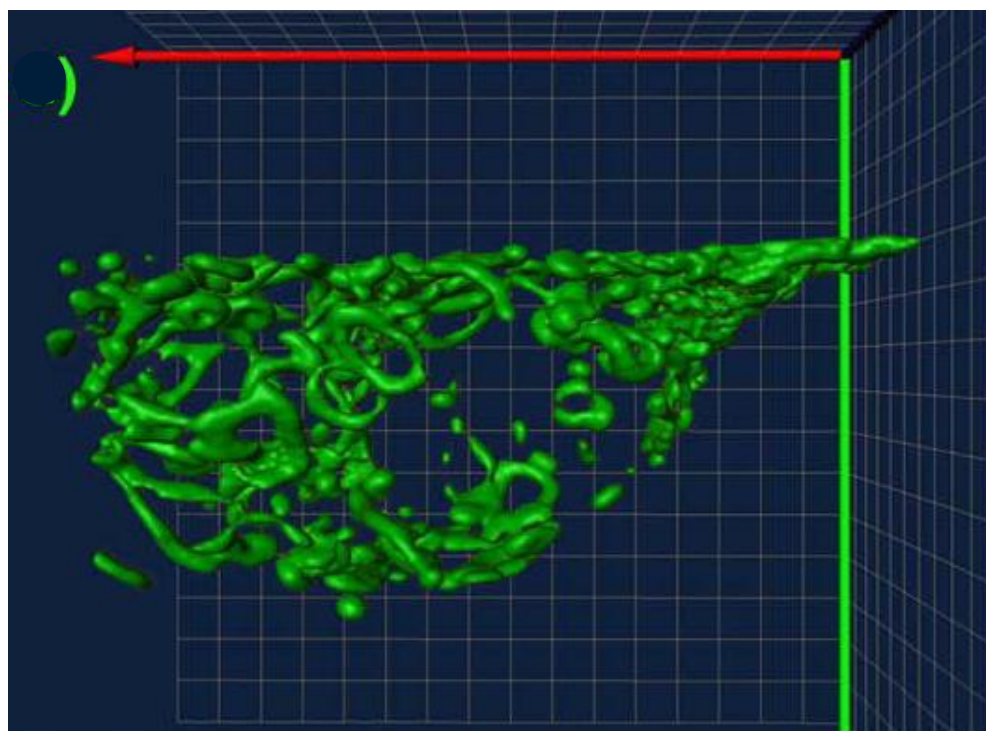
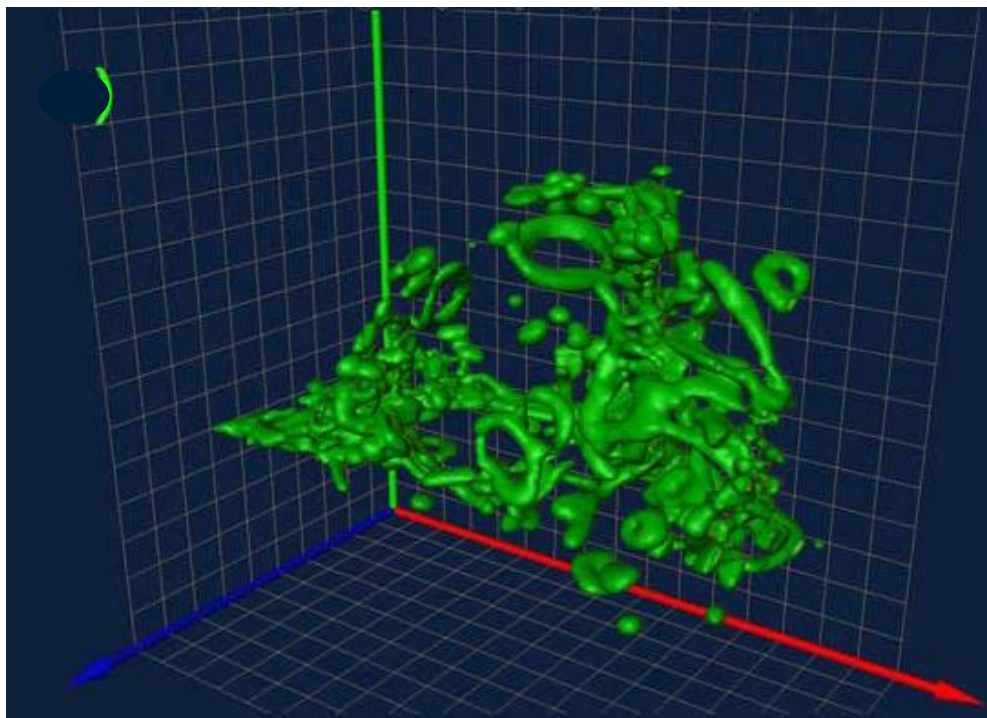
#### **4.4.5. Morfologie mitochondriální sítě po inkubaci s odpřahovačem i rotenonem**

Působením rotenonu i FCCP dochází u buněk k skutečnému patologickému stavu, jelikož stejně jako v předchozím případě dochází vlivem odpřažení k poklesu membránového potenciálu a oxidativní fosforylace a zároveň působením rotenonu i k inhibici respirace. Oxidativní stres by neměl mít na tento stav vliv, jelikož je vzniklý superoxid eliminovaný odpřahovačem. Mitochondriální síť se opět rozpadla na 3 nebo 4 hlavní části a více než 40 různých menších útvarů, což byly malé koule, krátké tubuly a 3 až 9 miskovitých útvarů o velikosti 0,7 až 2  $\mu\text{m}$ , což bylo hlavním znakem tohoto vzorku. Opět byly některé separátně a některé připojené na retikulum. Počet plochých cisteren klesl na 15 až 20 a počet větvicích míst na 10 až 25. U některých buněk se objevily také prstence. Průměr tubulů vzrostl o 30 nm (obr.4.19.).



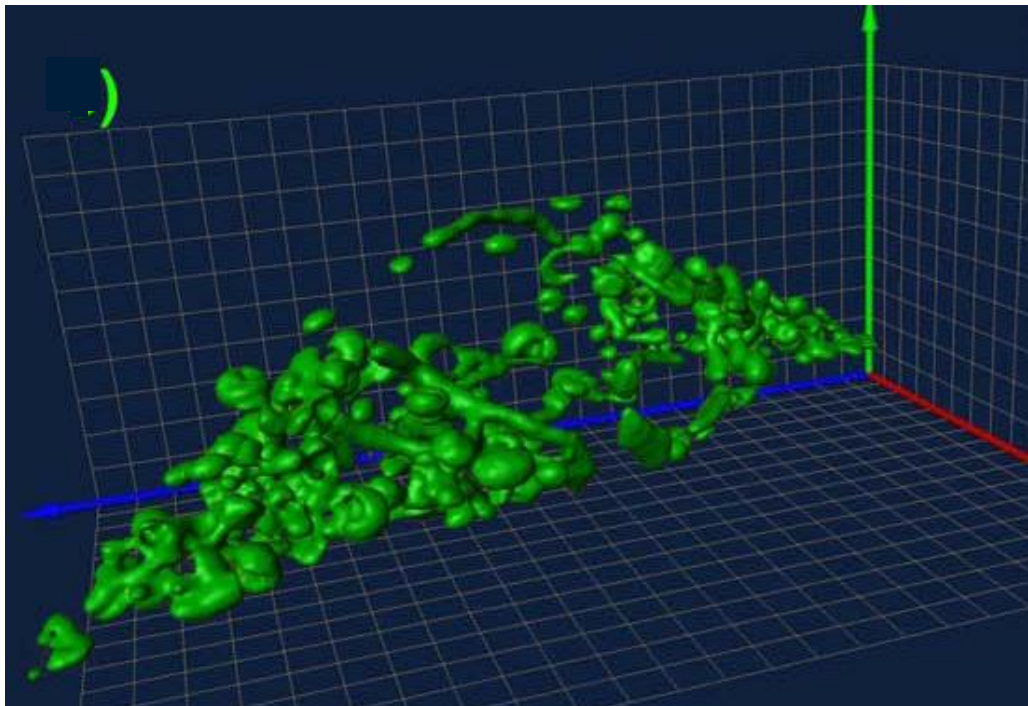
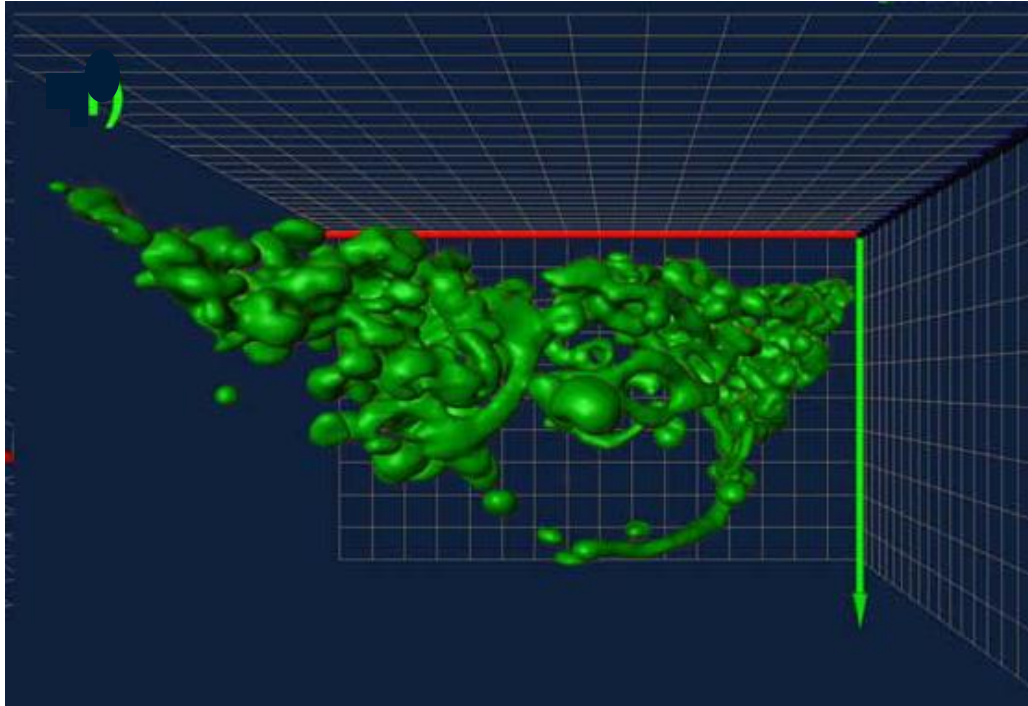


Obr.4.17. Buňka inkubovaná v 20 mM rotenonu. Síť je fragmentovaná do přibližně 40 oddělených částí, zajímavých objem 0,5pl.



Obr.4.18. Buňka INS1E inkubovaná v FCCP. Retikulum se rozpadlo na mnoho malých jednotek, typický znak pro tento stav jsou prstencové útvary velikosti přibližně  $1\mu\text{m}$ , celkový objem je  $0,04\text{pl}$ .





Obr.4.19. Buňka INS1E po inkubaci s rotenonem a FCCP. Retikulum je rozděleno na mnoho jednotek, představujících několik dlouhých tubulů a mnoho malých útvarů, jako jsou koule, krátké tubuly, prstence a miskovité struktury

---

## 5. DISKUZE

---

### 5.1. Kvantifikace bazálních hladin CIDEa mRNA

Bazální hladiny proteinu CIDEa byly již dříve publikovány v několika pracích. Kvantifikace byla v těchto případech prováděna z celkové RNA metodou Northern blot nebo metodou klasické PCR a to u člověka nebo myši. V této disertační práci jsem se pokusila o přesnější kvantifikaci metodou real time RT-PCR ve tkáních laboratorního potkana, tedy porovnat hladiny CIDEa v jednotlivých tkáních s již publikovanými výsledky u myši a člověka. Bazální hladiny jsem stanovovala v osmi tkáních: bílá tuková tkáň, kosterní sval, srdce, slezina, ledviny, plíce, mozek a játra. V tomto případě jde navíc o kvantifikaci absolutní v kalibrovaných hmotnostních jednotkách. Zjistili jsme, že hladiny v různých tkáních se mohou lišit o dva řády v relativním obsahu transkriptu vůči všem v dané fyziologické situaci transkribovaným mRNA.

Naměřené hladiny mRNA jsou uvedeny na obr.4.2. Podle článku (Inohara et al., 1998), ve kterém byla hladina transkriptů stanovována prostřednictvím Northern-blotu, je nejvyšší množství CIDEa mRNA u člověka v srdci, malá množství byla detekována v kosterním svalu, mozku, lymfatických uzlinách, kostní dřeni ledvinách plicích a thymu. Obdobná publikace (Gong et al., 1997), ve které byla RNA kvantifikována opět Northern-blotem, uvádí vysoké hladiny CIDEa v hnědé tukové tkáni. Pomocí RT-PCR pak detekovali malá množství v srdci, svalu, lymfatických uzlinách, mozku a thymu myši, přičemž hladina v bílé tukové tkáni je 50- 100x vyšší než v srdci. Naproti tomu v játrech ani v bílém tuku nebyla RNA detekována. Množství ve slezině nebylo vůbec měřeno. V publikaci (Kelder et al., 2007a) se naopak uvádí výskyt RNA CIDEa v bílé tukové tkáni myši. Jelikož kvantifikací CIDEa u laboratorního potkana se žádná předchozí práce nezabývala, nabízelo se srovnání s uvedenými daty. Ve všech osmi výše uvedených tkáních bylo detekováno přesné množství transkriptu CIDEa v pořadí srdce > játra > ledviny > plíce > kosterní sval > mozek > slezina. Rozdíl mezi hladinou mRNA v bílé tukové tkáni a hladinou ve slezině byl 400 násobný.

### 5.2. Distribuce proteinu CIDEa ve vztahu k apoptóze

Nejprve můžeme zhodnotit získaná data četnosti transkriptu CIDEa vzhledem k možné indukci apoptózy nezávislé na kaspázách v dané tkáni. Významný by mohl být vysoký obsah transkriptu v srdci, jelikož by mohl mít protein CIDEa spoluúčast na apoptotickém poškození při srdeční ischemii. Stejně tak u patogenezí jater spojených s oxidačním stresem, jako je alkoholická nemoc jater či jaterní steatóza, by obdobným způsobem při překonání prahové hodnoty oxidačního stresu mohla CIDEa migrací do cytosolu či jádra indukovat apoptózu. Naše diskuze by se mohla analogicky rozšířit na jiné tkáně, s tím, že je třeba vzít v úvahu celkovou skladbu různých izoform CIDE v dané tkáni. Proč jedna izoforma převládá v jisté tkáni a jiná v dalších, není dnes známo.



Mohly by zde hrát úlohu rozdílné regulace. Další možný pohled je z hlediska možných vazebných partnerů proteinu CIDEa, které ho vyvazují při jeho lokalizaci v mitochondriích. Jak již bylo uvedeno, CIDEa je pravděpodobně distribuována v mitochondriích a hypoteticky tvoří komplex s proteinem specifickým pro hnědý tuk, s mitochondriálním odpřahujícím proteinem UCP. Koexprese těchto dvou proteinů v kvasinkách snižuje odpřahující schopnost UCP1 (Li, 2004). Průkaznost experimentu v kvasinkách však nemusí souviset s reálnou fyziologickou situací v savčích buňkách. Např. v srdci, kde byl zjištěn vysoký obsah transkriptu CIDEa a kde kolegové rovněž zjistili vysoký relativní obsah transkriptu UCP2, by teoreticky mohl vzniknout komplex UCP2-CIDEa. Jeho existence však dosud nebyla prokázána. Na druhou stranu extramitochondriální lokalizace CIDEa v buňkách bílé tukové tkáně (Puri et al., 2008) nemusí být v rozporu s její lokalizací v mitochondriích u jiných buněčných typů. Malé množství objemu buňky, zaujímané mitochondriální sítí u bílé tukové tkáně, může zcela zřejmě způsobit nedostatečný import CIDEa do jejich kompartmentů a tedy asociování s lipidy v cytosolu. Proto i musíme považovat za neprokázanou původně vyslovenou hypotézu, předpokládající, že by protein CIDEa mohl indukovat apoptózu i u buněk bílé tukové tkáně, a tedy spuštění apoptózy jeho stimulem by mohlo vykazovat antiobezitní účinek. Je možné, že další studie s vysokým rozlišením konfokální mikroskopie a konstrukty specificky upravenými pro bílou tukovou tkáň prokáží přítomnost CIDE i v mitochondriích bílého tuku.

Nicméně pro jiné modely buněk a tkání jsme v této práci potvrdili již zmíněný fakt, že protein CIDEa je lokalizován v mitochondriích (Li, 2004) a dále jsme prokázali, že doména CIDE-C je potřebná pro lokalizaci v mitochondriích, stejně jako u příbuzného proteinu CIDEb (Chen et al., 2000). Přesto samotná potvrzení existence proteinů CIDEa, CIDEb, a CIDE-3 v mitochondriích, ať už touto prací nebo jinými laboratořemi (Li, 2004, Chen et al., 2000, Liang et al., 2003), zasluhuje revizi a případně řádné prokázání lokalizace např. v matrixovém prostoru či v kompartmentech periferního mezimembránového, respektive intrakristálního prostoru. Je třeba poznamenat, že publikované konfokálně mikroskopické snímky nemusí dostatečně prokázat lokalizaci CIDEa-GFP fúzních produktů v mitochondriích. Navíc současná rozlišující schopnost konfokální mikroskopie ~250 až 400 nm stěží rozliší a od sebe odliší případy, zda je fluorescenčně konjugovaný protein přítomen v periferním mezimembránovém prostoru nebo v matrix (podle našich vlastních výsledků je průměrný průměr mitochondriálních tubulů ohraničený matrixovým prostorem cca 260 nm, tedy stejně velký jako jediný skutečný obrazový bod rozlišený konfokálním mikroskopem).

V dalším oddílu jsme se zabývali redistribucí proteinu CIDEa v souvislosti s apoptózou. Označení proteinu CIDEa jako apoptotický vychází ze sekvenční podobnosti jeho N koncové domény s podjednotkami DNA fragmentačního faktoru (Inohara et al., 1998). Důkaz, že CIDEa vyvazuje inhibiční podjednotku DFF45 a tím umožní nukleáze DFF40 štěpit DNA (obr.1.1.), však chybí. Zjistili jsme, že se CIDEa během procesu apoptózy, vyvolané její zvýšenou expresí nebo v součinnosti s dalšími induktory apoptózy redistribuuje. To nabízí model, kde inaktivní komplex

DFF45/DFF40 po vstupu do jádra disociuje a interaguje s proteinem CIDEa, který po apoptotickém stimulu také vstoupil do jádra. Podporuje to fakt, že se celý komplex DFF importuje do jádra snáze než jednotlivé podjednotky (Zhou et al., 2003). Kdyby tedy CIDEa rozrušila komplex DFF již v cytosolu, pak by samotná podjednotka DFF40 do jádra migrovala s menší efektivitou. Zjistili jsme, že migrace proteinu CIDEa do jádra je výraznější po iniciaci apoptózy camptothecinem nebo valinomycinem a je nezávislá na kaspázách. Může tedy představovat jinou mitochondriálně zprostředkovanou apoptotickou dráhu než již známé mechanismy, jako je například uvolnění cytochromu c (Garrido et al., 2006). Přesné dráhy způsobující redistribuci nejsou známy. Camptothecin působí na topoizomerázu I, která se nachází v jádře. Výsledkem jsou zlomy na DNA, které mohou vést k uvolnění signálních proteinů a jejich migraci respektive přenosu signálu do mitochondrií. Na druhou stranu valinomycin, který je draslíkový uniportní přenašeč způsobující kolaps potenciálu na mitochondriální membráně a jeho celkovou přeměnu do  $\Delta pH$  (Dlaskova et al., 2008), může pravděpodobně spouštět uvolnění mitochondriálních proteinů jako výsledek transformace mitochondriální sítě. Proapoptotické proteiny Bax a Bak byly označeny jako účastníci v normální i apoptotické morfogeneze mitochondrií (Karbowski et al., 2006). Zdá se ale, že role CIDEa v apoptóze je odlišná od výlevu cytochromu c kanály tvořenými hexamery Bax/Bak, už také proto, že CIDEa je příliš velká na průchod hexamery Bak-Bad.

Dřívější práce ukázala to, že vysoké hladiny exprese proteinu CIDEb v COS-1 buňkách vede k apoptóze (Chen et al., 2000). Naše pokusy potvrdily stejný výsledek pro CIDEa protein v HeLa buňkách, kde se přirozeně CIDEa neexprimuje. Oproti tomu jiné další práce souvislost apoptózy a zvýšené exprese CIDEa nepotvrdily (Viswakarma et al., 2007, Zhou et al., 2003, Liang et al., 2003). To by se mohlo vysvětlit tím, že pravděpodobně existuje nějaký kofaktor mitochondriálního původu, který je buněčně specifický a který brání navození apoptózy indukované proteinem CIDEa, tím že jí zamezí přesun z mitochondrií, možná vzájemnou vazbou. Byla uvedena interakce s proteinem UCPI v hnědé tukové tkáni, nasvědčoval by tomu i fakt, že oba proteiny jsou zde hojně exprimovány (Inohara et al., 1998, Li, 2004). Nicméně tento fakt se v naší laboratoři nepodařilo ověřit. To, že existuje interakce s neznámým mitochondriálním kofaktorem by mohl naznačit fakt, že CIDE proteiny byly detekovány převážně v mitochondriích (Li, 2004, Chen et al., 2000, Liang et al., 2003), a je možné, že je zde CIDEa v jakési klidové fázi. Přesun CIDEa do jádra může mít významnou roli, kdy může být důležitým prostředníkem pro přenos signálu, vedoucímu k modulaci nebo přímo k navození apoptózy. Na druhou stranu buňky exprimující fluorescenční verze proteinu CIDEa i přes lokalizaci v mitochondriích vykazovaly morfologické znaky apoptózy, jako je srašťování (obr.4.8.), v porovnání s kontrolními buňkami, které byly natransfekovány pouze vektorem exprimujícím samotný GFP nebo RFP (obr.4.10.). Je tedy otázkou, zda už samotná nadexprese nevede k indukci apoptózy.

V neposlední řadě se ukázalo i několik prací, které proteiny CIDEa, CIDEb a CIDE-3 spojují spíše s metabolismem lipidů (viz. kapitoly 2.3.4. a 2.3.5.2.1. v teoretickém úvodu), což by naznačovalo multifunkčnost proteinů CIDE a jejich napojení na další dráhy v buňce.

Naše výsledky přesto poukazují na přijatelnost hypotézy, očekávající jakousi klidovou pozici či úlohu CIDEa lokalizovanou v mitochondriích a její relokizaci do cytosolu případně do jádra při indukci apoptózy. I když znalost detailů signálních drah, vedoucích k exportu CIDEa z mitochondrií (tedy alespoň předpokládaného transportu přes vnější mitochondriální membránu), nejsou známy, je možné přepokládat, že zmíněná klidová pozice by mohla být dána i jen prostou přítomností CIDEa v mitochondriích např. v periferním mezimembránovém prostoru. Nejnovější poznatky ukazují, že periferní mezimembránový prostor je místem s redoxním potenciálem posunutým na oxidační stranu, protože mnohé proteiny, které jsou do něj transportovány pomocí TOM40, jsou spojovány do multimerů či heteromultimerů S-S můstky, vytvářenými sulfhydryl oxidázou ARL (MIA v kvasinkách *Sacharomyces cerevisiae*) (Hell, 2008). Protože v našich výsledcích jsme na Western blotech detegovali pouze pravděpodobné komplexy CIDEa o vyšší molekulové hmotnosti (obr.4.3.), a tedy buďto pravděpodobné trimery CIDEa či multimery obsahující alespoň jednu podjednotku CIDEa, je dosti pravděpodobné, že i CIDEa po importu do periferního mezimembránového prostoru vytváří S-S můstky s dalšími molekulami CIDEa či jinými proteiny. Stejně jako v případech ostatních proteinů importovaných do tohoto kompartmentu, by za jejich tvorbu mohl být zodpovědný systém TOM40 & ARL/MIA.

### 5.3. Morfologie mitochondriální sítě

V poslední dekádě, zejména s rozvojem technik konfokální mikroskopie, byly získávány nové poznatky o dynamice mitochondriální sítě a o proteinech zodpovědných za dynamiku i tvar sítě a rovněž tak i proteinů zodpovědných za tvar krist uvnitř mitochondrií. Tyto poznatky se neustále rozšiřují a počet známých proteinů, účastnících se na morfologii mitochondrií roste. Stejně tak jsou objevovány signální dráhy, iniciující např. dezintegraci mitochondriální sítě při apoptóze či při fyziologických procesech jako je například dělení buňky v G2 fázi a mitóze. Přestože tyto poznatky jsou velmi důležité a k nim vedoucí studie používají veškerou škálu metodik molekulární biologie, jako je využití transgenních myší, silencing, tkáňově podmíněnou expresi a další, zobrazovací techniky často využívají pouze konvenční konfokální mikroskopii. V případě struktur, jakými jsou mitochondrie, rozlišení konvenční konfokální mikroskopie ve 2D provedení stěží odliší propojenou a dezintegrovanou mitochondriální síť. Proto jsme se snažili získat přístup k mikroskopům vykazujícím vyšší rozlišení a umožňujícím automatické snímání trojrozměrných obrázků. V naší práci jsme prokázali, že pomocí dvojrozměrného zobrazení nerozlišíme tvary jednotlivých objektů, především kvůli jejich prostorové orientaci. Zdánlivě kulovité útvary mohou být tubuly otočené ve třetí ose. Trojrozměrně složený obraz, byť ze složených skanování v ose z série nízkorozlišitelných

xy řezů dává stále více informací než jednotlivý 2D xy řez. U těchto 2D řezů jsou zpravidla ztraceny oblasti, které jsou na 3D obrázcích i ve skutečnosti kontinuální. Jinými slovy, na 2D obrazech se tato oblast jeví jako diskontinuální, a tedy pozorováním pouhých 2D obrazů zdánlivě představuje dezintegrovanou mitochondriální síť.

V případě malých buněk, jako byly naše INS1E, s hustou mitochondriální sítí a tubuly, které se ukázaly být o průměru menším než 300 nm, nezískáme standardní konfokální mikroskopii dostatečné rozlišení jednotlivých objektů, zvláště zasahujících do některých kompartmentů, jako je u těchto buněk koncová špička. Mikroskopie 4Pi oproti tomu umožnila poprvé na světě podrobně zobrazit složitou bohatě větvenou strukturu mitochondrií, a to díky své až sedmkrát větší rozlišovací schopnosti v ose z (nejméně čtyřikrát vyšší po 3D rekonstrukcích v osách xy - přesněji tubuly se u stejného vzorku při využití 4Pi mikroskopie jeví až čtyřikrát tenčí ve srovnání s případem, kdy je vypnut mód 4Pi, tedy je vyřazen jeden ze dvou objektivů) a poprvé ukázala pravděpodobnou skutečnou velikost mitochondriálních tubulů okolo 260 nm (jak u INS1E tak u HEPG2 buněk, tedy modelu pankreatických beta buněk a modelu hepatocytů).

Buňky INS1E vyžadují přísun glukózy a autokrinní inzulín pro optimální růst. Za normálních podmínek 11mM glukózy v médiu (tedy za střední intenzity oxidativní fosforylace) je síť hustě rozložená po celém objemu buňky a propojená do jednoho celku. Takto zůstává i při maximální hodnotě oxidativní fosforylace, tedy po přidání 25 mM glukózy k těmto buňkám. Naopak při kultivaci na nízké glukóze, kdy je nedostatek autokrinního inzulínu, rostou INS1E buňky pomaleji, jejich poločas zdvojnásobení se třikrát prodlouží a sekrece inzulínu je narušená (Merglen et al., 2004, Spacek et al., 2008). Mitochondriální síť není v tomto případě tak bohatá a buňky vykazují kromě tubulů i útvary mající jiný zakulacený tvar.

U buněk HEP2G, představujících modelové jaterní buňky jsme pozorovali stejné vysoce propojené tubulární retikulum, tedy předpokládanou jedinou mitochondrii, jako u buněk INS1E. V případě těchto buněk na toto tvrzení nemáme důkaz, neboť mají daleko větší velikost a díky nestabilitě záznamu 4Pi po několika hodinách jsme nemohli nasnímat celou buňku. HEPG2 buňky jsme na rozdíl od INS1E kultivovali v základním stavu při 5 mM glukóze, kdy jeví i jistý nejvyšší stupeň oxidativní fosforylace. Naopak u buněk kultivovaných v hyperglykemickém prostředí, tedy při 25 mM glukóze, bylo zaznamenáno podstatné ztlustění tubulů mitochondriálního retikula (tabulka 4.1.). Tento výsledek představuje jakousi simulaci patologických stavů a nabízí do budoucna hypotézu, že by se prostřednictvím morfologie 3D obrazů mitochondriální sítě dala vypracovat morfologická diagnostika některých onemocnění, například v případě INS1E diabetu.

V další části našich studií jsme simulovali patologické stavy vyvolané již známými induktory dezintegrace mitochondriální sítě. Je třeba říct, že přestože některé případy byly popsány již dříve (případ odprahačce přibližně dekádu a případ ~80% inhibice respirace rotenonem viz. Koopman et

al., 2005), žádný z nich nebyl dosud vysvětlen na molekulární úrovni. Počet známých proteinů, které se účastní těchto procesů stále vzrůstá, například v nedávné době byl vedle DRP1 objeven *mitochondrial fission factor* Mff, účastníci se rovněž dezintegrace způsobené odpřahovačem (Gandre-Babbe and van der Blik, 2008).

Nejprve jsme tedy studovali případ snížené respirace, resp. vyřazení její hlavní větve inhibicí komplexu I dýchacího řetězce rotenonem, a tedy ponecháním respirace pouze díky nevyřazené činnosti komplexu II, sukcinátdehydrogenázy. Zbylá respirace se pohybovala podle typu buněk asi na 10 až 20%. Po inkubaci inhibitorem dýchacího řetězce rotenonem byl pozorován rozpad mitochondriální sítě, což odpovídalo předchozím výsledkům u jiných typů buněk Bernard et.al. (Benard et al., 2007), s tím rozdílem, že jsme nepozorovali po této inkubaci vznik kulových tvarů se sníženým středem. V našem případě vysokého rozlišení a 3D zobrazení jsme jak u INS1E buněk, tak u HEPG2 zjistili pouhou dezintegraci jediného mitochondriálního retikula na několik menších plus na krátké úseky tubulů, případně kulovité útvary. Nicméně u INS1E buněk byl průměr všech těchto útvarů téměř shodný s původním průměrem tubulů před jejich dezintegrací. Tento případ tedy můžeme považovat za čistou dezintegraci bez nutnosti zapojení profúzních proteinů jako jsou mitofuziny či OPA1. V další práci (Koopman et al., 2005) bylo po 72 hodinové indukci pozorováno zvýšení počtu větvičích míst, což jsme v našem experimentu nezaznamenali. Pokusy však nelze jednoduše srovnat, jelikož se jednalo jiné typy buněk a jiné experimentální podmínky. Rozdíly mohou být také díky lepšímu rozlišení 4Pi mikroskopu ve srovnání se standardním konfokálním mikroskopem, jak jsme v našem případě ukázali (obr.4.13.). Inhibice komplexu I dýchacího řetězce značně snižuje oxidativní fosforylaci a tím export ATP do cytosolu. Rovnováha mezi procesy fúze a rozpadu je nejspíš posunuta k rozpadu, pravděpodobně aktivací proteinu DRP1. Na tento stav pravděpodobně nemá vliv oxidační stres, neboť pokusy s antioxidantem MitoQ (mitochondriálně adresovaný chinon, inhibitor oxidačního stresu vyvolaného rotenonem) ukázaly na konfokálním mikroskopu stejné změny morfologie (Plecitá-Hlavatá et.al., nepublikováno). Příčinou rozpadu je tedy spíš než oxidační stres inhibice respirace.

Dalším zkoumaným případem byl stav náhlého úplného odpřažení mitochondrií. Ten byl dáván do souvislosti především se štěpením aktivních isoformů proteinu OPA1 při kolapsu membránového potenciálu odpřažením, a tedy přesněji tím, že naštěpené krátké formy OPA1 již nejsou schopny vykazovat profúzní aktivitu. Rovnováha je tedy automaticky posunuta ve prospěch dezintegrace i bez aktivace DRP1 či jiných dezintegračních proteinů. Ve všech dosud popsáných případech zobrazených na 2D či 3D obrázcích byla pozorována dezintegrace na zdánlivě kulovité útvary, respektive útvary ze zeslabeným středem. Jednalo se ovšem pouze o metodu konvenční konfokální mikroskopie.

V našich pozorováních 3D vyskorožlišující 4Pi mikroskopii v případě inkubace s FCCP tento odpřahovač oxidativní fosforylace indukoval změnu morfologie mitochondriální sítě, kdy se jednotné propojené retikulum rozpadlo na čtyři typy jednotek. Vedle zbytku původního retikula se objevily krátké trubice a koule a především prstence. Prokázali jsme tedy, že přes iniciaci dezintegrace musela zároveň působit pro-fúzní aktivita, alespoň na spojení konců segmentů původních tubulů do prstenců či na zfúzování do větších objektů než byly původní průřezy tubulů před dezintegrací. Přestože je jasně patrný proces dělení, vznik prstenců by mohl být vysvětlen nerovnováhou mezi procesy fúze a dělení, kdy pravděpodobně po odpřažení dochází k rychlejší respiraci a tím k zvýšené tvorbě GTP v Krebsově cyklu a zároveň nedostatku ATP v matrix. To může vést k exportu GTP pře ADP/ATP přenašeč a zvýšení hladiny GTP k následné aktivaci mitodynaminů, například Mfn1 a Mfn2, a tím naklonění ve prospěch procesu fúze. Pokud bychom mohli spekulovat, který z mitodynaminů by mohl být za tuto pro-fúzní aktivitu zodpovědný, zvolili bychom Mfn2, neboť jeho mechano-chemická aktivita je nižší, tedy postačující na fúzování konců tubulů (jejich přiblížení je pravděpodobně mediováno cytoskeletem). Zobrazení pomocí 4Pi mikroskopie je nezpochybnitelné, proto upřednostňujeme tuto výše uvedenou interpretaci, přestože bylo publikováno, že při odpřažení dochází ke zvýšenému štěpení a inaktivaci některých variant profúzního proteinu OPA1 (Song et al., 2007, Ishihara et al., 2006, Duvezin-Caubet et al., 2006, Griparic et al., 2007, Malka et al., 2005), a tedy že štěpení OPA1 bylo dosud uváděno jako jediná interpretace. My tedy činíme závěr, že na vzniku prstenců se mohou podílet i jiné izoformy OPA1 proteinu nebo další mitodynaminu jako například Mfn2. Podíl na procesu fúze bude mít i součinnost s pohyby cytoskeletu.

Poslední případ spolupůsobení rotenonu a odpřahovače byl původně zamýšlen jako odstínění složky oxidačního stresu. Oxidační stres, daný zvýšenou produkcí superoxidu na komplexu I, je totiž odpřahovačem eliminován (Dlasková et al. 2008). Nicméně, zejména u INS1E buněk jsme získali ještě složitější vzniklé útvarů po dezintegraci mitochondriálního retikula. Působením rotenonu i FCCP dohromady dochází vlivem odpřažení k poklesu membránového potenciálu a oxidativní fosforylace a zároveň i k inhibici respirace působením rotenonu. Pravděpodobně zde došlo k smíšenému modulu rozpadu a fúze. Přičemž v tomto případě byl proces fúze s výraznějším projevem než u samotného FCCP a způsobilo skládání membrán do prstenců, které vyústilo ve vznik miskových útvarů. Navzdory tomu byl i zde jasně patrný proces dělení, jelikož se mitochondriální síť rozpadla na menší retikula, když proces fúze byl zachován.

## 6. SOUHRN

Byly stanoveny bazální hladiny transkriptů proteinu CIDEa v osmi tkáních laboratorního potkana: bílý tuk, kosterní sval, srdce, slezina, ledviny, plíce, mozek a játra. Ve všech těchto tkáních byl transkript detekován. Mezi nejvyšší hladinou CIDEa mRNA v bílém tuku a nejnižší ve slezině byl kvantifikován rozdíl 2 řády.

Prokázala se přítomnost proteinu CIDEa v mitochondriích pomocí konstruktů s fluorescenčními proteiny GFP a RFP a dále důležitost CIDE-C domény pro tuto lokalizaci v mitochondriích pomocí delečních mutantů bez CIDE-N a CIDE-C domény metodou fluorescenční mikroskopie.

Ukázalo se, že zvýšená exprese proteinu CIDEa vedla k apoptóze. Po indukci valinomycinem a camptothecinem došlo k redistribuci proteinu CIDEa do jádra. Tento proces byl nezávislý na kaspázách a bylo naznačeno možné spojení mezi redistribucí CIDEa a apoptózou.

Bylo provedeno srovnání technik 4Pi a standardní konfokální mikroskopie u zobrazení mitochondriální sítě buněk INS1E a ukázalo, že tubuly mitochondriální sítě jsou ve zobrazení standardní konfokální mikroskopii 2-4x silnější než při zobrazení pomocí 4Pi.

Metodou mikroskopie 4Pi byla detailně popsána morfologie mitochondriální sítě buněk INS1E a HEPG2 v závislosti na kultivačních podmínkách a po stimulech vedoucích k inhibici respirace, odpřažení oxidativní fosforylace a kombinaci obou.

Mitochondrie INS1E buněk za normálních kultivačních podmínek, tedy v médiu s 11 mM glukózou měly hustou mitochondriální síť s tenkými větvenými tubuly, které byly vzájemně propojené do jednoho celku. U buněk kultivovaných v nízké 5mM glukóze buňky změnil svůj tvar z typického protáhlého na spíše oválný a jejich tubuly byly silnější.

Mitochondrie buněk HEPG2, rostoucích v optimálním médiu s glukózou o koncentraci 5mM, měly průměr tubulů o 100nm menší než buňky v médiu s 25mM glukózou.

Při inhibované respiraci indukované rotenonem došlo k rozpadu mitochondriální sítě na několik hlavních částí nebo jedno hlavní retikulum.

Po odpřažení indukovaném FCCP se mitochondriální síť rozdělila na několik hlavních větších částí a až 40 malých jednotek. Hlavním znakem byly prstencové útvary o průměru 700 až 2000 nm.

Po inkubaci s odpřahovačem i rotenonem se mitochondriální síť opět rozpadla na 3 nebo 4 hlavní části a více než 40 různých menších útvarů, což byly malé koule, krátké tubuly a miskovité útvary o velikosti 0,7 až 2  $\mu\text{m}$ , což bylo hlavním znakem tohoto stavu.

---

## 7. PŘEHLED LITRATURY

---

- Ashe, P. C. & Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27, 199-214.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. & Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*, 120, 838-848.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-193.
- Cervený, K. L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R. E. & Sesaki, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*, 17, 563-569.
- Da, L., Li, D., Yokoyama, K. K., Li, T. & Zhao, M. (2006). Dual promoters control the cell-specific expression of the human cell death-inducing DFF45-like effector B gene. *Biochem J*, 393, 779-788.
- Dahlman, I., Kaaman, M., Jiao, H., Kere, J., Laakso, M. & Arner, P. (2005). The CIDEA gene V115F polymorphism is associated with obesity in Swedish subjects. *Diabetes*, 54, 3032-3034.
- De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J. & Sheetz, M. P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol*, 15, 678-683.
- Dlaskova, A., Hlavata, L. & Jezek, P. (2008). Oxidative stress caused by blocking of mitochondrial Complex I H(+) pumping as a link in aging/disease vicious cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1792-1805.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N. G., Neupert, W. & Reichert, A. S. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 281, 37972-37979.
- Fortin, A., Cregan, S. P., MacLaurin, J. G., Kushwaha, N., Hickman, E. S., Thompson, C. S., Hakim, A., Albert, P. R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D. S. & Slack, R. S. (2001). APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol*, 155, 207-216.
- Gandre-Babbe, S. & van der Blik, A. M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 19, 2402-2412.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13, 1423-1433.
- Gong, D.-W., He, Y., Karas, M. & Reitman, M. (1997). Uncoupling Protein-3 Is a Mediator of Thermogenesis Regulated by Thyroid Hormone, beta 3-Adrenergic Agonists, and Leptin. *J. Biol. Chem.*, 272, 24129-24132.
- Griparic, L., Kanazawa, T. & van der Blik, A. M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol*, 178, 757-764.
- Gummesson, A., Jernas, M., Svensson, P. A., Larsson, I., Glad, C. A., Schele, E., Gripeteg, L., Sjöholm, K., Lystig, T. C., Sjöström, L., Carlsson, B., Fagerberg, B. & Carlsson, L. M. (2007). Relations of adipose tissue CIDEA gene expression to basal metabolic rate, energy restriction, and obesity: population-based and dietary intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 4759-4765.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem*, 277, 13430-13437.
- Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H. & Takeda, K. (2000). Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem*, 275, 26576-26581.
- Hell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 601-609.



- Chang, H. Y. & Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, *64*, 821-846.
- Chen, Z., Guo, K., Toh, S. Y., Zhou, Z. & Li, P. (2000). Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis. *J Biol Chem*, *275*, 22619-22622.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*, 156-159.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M. A. & Nunez, G. (1999). Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem*, *274*, 270-274.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J*, *17*, 2526-2533.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. & Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J*, *25*, 2966-2977.
- Iwahana, H., Yakymovych, I., Dubrovska, A., Hellman, U. & Souchelnytskyi, S. (2006). Glycoproteome profiling of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: nonglycosylated cell death-inducing DFF-like effector A inhibits TGFbeta1-dependent apoptosis. *Proteomics*, *6*, 6168-6180.
- Jeong, S. Y. & Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*, *41*, 11-22.
- Jezek, P. & Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*, 2478-2503.
- Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Swigart, L. B., Korsmeyer, S. & Evan, G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, *22*, 6158-6169.
- Jung, D. J., Bong, J. J. & Baik, M. (2004). Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, *292*, 115-122.
- Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. Y. & Youle, R. J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, *443*, 658-662.
- Kelder, B., Berryman, D. E., Clark, R., Li, A., List, E. O. & Kopchick, J. J. (2007a). CIDE-A gene expression is decreased in white adipose tissue of growth hormone receptor/binding protein gene disrupted mice and with high-fat feeding of normal mice. *Growth Horm IGF Res*, *17*, 346-351.
- Kelder, B., Boyce, K., Kriete, A., Clark, R., Berryman, D. E., Nagatomi, S., List, E. O., Braugher, M. & Kopchick, J. J. (2007b). CIDE-A is expressed in liver of old mice and in type 2 diabetic mouse liver exhibiting steatosis. *Comp Hepatol*, *6*, 4.
- Keller, P., Petrie, J. T., De Rose, P., Gerin, I., Wright, W. S., Chiang, S. H., Nielsen, A. R., Fischer, C. P., Pedersen, B. K. & MacDougald, O. A. (2008). Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol. *J Biol Chem*, *283*, 14355-14365.
- Kim, J. Y., Liu, K., Zhou, S., Tillison, K., Wu, Y. & Smas, C. M. (2008). Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *294*, E654-667.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. & Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, *12*, 611-620.
- Koopman, W. J., Verkaart, S., Visch, H. J., van der Westhuizen, F. H., Murphy, M. P., van den Heuvel, L. W., Smeitink, J. A. & Willems, P. H. (2005). Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O<sub>2</sub><sup>-</sup>-mediated mitochondrial outgrowth. *Am J Physiol Cell Physiol*, *288*, C1440-1450.
- Li, D., Da, L., Tang, H., Li, T. & Zhao, M. (2008). CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector A gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding. *Nucleic Acids Res*, *36*, 330-341.
- Li, J. Z. & Li, P. (2007). Cide proteins and the development of obesity. *Novartis Found Symp*, *286*, 155-159; discussion 159-163, 196-203.

- Li, J. Z., Ye, J., Xue, B., Qi, J., Zhang, J., Zhou, Z., Li, Q., Wen, Z. & Li, P. (2007). Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes*, *56*, 2523-2532.
- Li, P. (2004). Cidea, brown fat and obesity. *Mech Ageing Dev*, *125*, 337-338.
- Li, X. & Stark, G. R. (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol*, *30*, 285-296.
- Liang, L., Zhao, M., Xu, Z., Yokoyama, K. K. & Li, T. (2003). Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family. *Biochem J*, *370*, 195-203.
- Lin, S. C. & Li, P. (2004). CIDE-A, a novel link between brown adipose tissue and obesity. *Trends Mol Med*, *10*, 434-439.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, *6*, 1389-1399.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. & Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep*, *6*, 853-859.
- Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S. & Gonzalez, F. J. (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab*, *7*, 302-311.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B. & Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, *145*, 667-678.
- Merkwirth, C. & Langer, T. (2008). Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A. & Saikumar, P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, *276*, 18361-18374.
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R. J., Shirasaki, Y. & Greenberg, M. E. (2001). Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*, *21*, 7551-7560.
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J. C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. & Reisdorf, P. (2000). Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem*, *275*, 3867-3872.
- Nakano, K. & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, *7*, 683-694.
- Nordstrom, E. A., Ryden, M., Backlund, E. C., Dahlman, I., Kaaman, M., Blomqvist, L., Cannon, B., Nedergaard, J. & Arner, P. (2005). A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes*, *54*, 1726-1734.
- Novikova, S. I., He, F., Bai, J., Badan, I., Lidow, I. A. & Lidow, M. S. (2005). Cocaine-induced changes in the expression of apoptosis-related genes in the fetal mouse cerebral wall. *Neurotoxicol Teratol*, *27*, 3-14.
- Olichon, A., Guillou, E., Delettre, C., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L. J., Mills, V., Daloyau, M., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G. & Belenguer, P. (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta*, *1763*, 500-509.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*, 552-565.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R. & Dixit, V. M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, *277*, 815-818.

- Pettersson, A. T., Laurencikiene, J., Nordstrom, E. A., Stenson, B. M., van Harmelen, V., Murphy, C., Dahlman, I. & Ryden, M. (2008). Characterization of the human CIDEA promoter in fat cells. *Int J Obes (Lond)*, *32*, 1380-1387.
- Pletjushkina, O. Y., Lyamzaev, K. G., Popova, E. N., Nepryakhina, O. K., Ivanova, O. Y., Domnina, L. V., Chernyak, B. V. & Skulachev, V. P. (2006). Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta*, *1757*, 518-524.
- Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S. M., Straubhaar, J., Chawla, A., Chouinard, M., Lin, C., Burkart, A., Corvera, S., Perugini, R. A. & Czech, M. P. (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*, 7833-7838.
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J. Z., Wu, J., Zhou, H. M. & Li, P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J*, *27*, 1537-1548.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*, *178*, 749-755.
- Spacek, T., Santorova, J., Zacharovova, K., Berkova, Z., Hlavata, L., Saudek, F. & Jezek, P. (2008). Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*, 1522-1535.
- Sun, X. M., Bratton, S. B., Butterworth, M., MacFarlane, M. & Cohen, G. M. (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem*, *277*, 11345-11351.
- Tan, Z., Levid, J. & Schreiber, S. S. (2001). Increased expression of Fas (CD95/APO-1) in adult rat brain after kainate-induced seizures. *Neuroreport*, *12*, 1979-1982.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M. & Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, *414*, 313-317.
- Turpaev, K., Bouton, C., Diet, A., Glatigny, A. & Drapier, J. C. (2005). Analysis of differentially expressed genes in nitric oxide-exposed human monocytic cells. *Free Radic Biol Med*, *38*, 1392-1400.
- Viswakarma, N., Yu, S., Naik, S., Kashireddy, P., Matsumoto, K., Sarkar, J., Surapureddi, S., Jia, Y., Rao, M. S. & Reddy, J. K. (2007). Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *J Biol Chem*, *282*, 18613-18624.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem*, *283*, 13501-13505.
- Wu, C., Zhang, Y., Sun, Z. & Li, P. (2008). Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol Biol*, *8*, 159.
- Xiong, H., Hou, J., Gao, W. R. & Chen, Q. B. (2005). [Investigation of the effect of 2-methoxyestradiol and arsenic trioxide on the apoptosis-associated gene expression profile of myeloma cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, *26*, 200-204.
- Yim, E. K., Lee, K. H., Bae, J. S., Namkoong, S. E., Um, S. J. & Park, J. S. (2004). Proteomic analysis of antiproliferative effects by treatment of 5-fluorouracil in cervical cancer cells. *DNA Cell Biol*, *23*, 769-776.
- Youle, R. J. & Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*, 657-663.
- Zhang, L., Miyaki, K., Nakayama, T. & Muramatsu, M. (2008). Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G->T) polymorphism is associated with phenotypes of metabolic syndrome in Japanese men. *Metabolism*, *57*, 502-505.
- Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Ng, C. P., Ponniah, S., Lin, S. C., Hong, W. & Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*, *35*, 49-56.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274, 11549-11556.

## Přílohy:

### Příloha 1- návrh primerů a hybridizačních prób pro gen CIDEa

ATGACCGAGCCTGGAACACAGGAAGCCCTGGCACCTCCGAGAACCCGAAGTGCTGAGGGTACGCGTGTCCCAGA  
TACTGGCTCGGACCTTGTGTCCTTCGGGACCGTGGAGGCTCTTGGGCTTCACGACTCCCATGCGCACAGGGGTCT

AACTTCTCTGTCCCCTAGGAACCTCGCTGGCCAGCCGCCAGCCCTGGTCCGGGCTTTGGAGACTCCAGCAGCA  
TTGAAGGAGGACAGGGGATCCTTGAGCGACCGGTTCGGCGGGTTCGGGACCAGGCCCGAAACCTCTGAGGTCTGCT

GACAGCCTGTTTCGGACACTGCTCGCCCCACGCGCACCTGCTTTTCTACTGCCAAGCGATACCCCTGGCACTGGT  
CTGTCCGACAAGCCTGTGACGAGCGGGGTGCGCGTGGACGAAAAGATGACGGTTTCGCTATGGGGACCGTGACCAC

ATTCACCAGTGTCCCAGCCCCAGAAAGAGAAAAACAATACTGACAATAGCCACCAACACCACCAAATCTGGGGT  
TAAGTGGTTCACAGGGGTTCGGGGGTCTTCTCTTTTTTGTATGACTGTTATCGGTGGTTGTGGTGGTTTAGACCCCA

CCTGGGGCCCTCTGTACCGTTTGTCCACGAAGGGCGTGGCCCCGGGACCAGGCGTGGGAGCCGGAACCTACTCG  
GGACCCCGGAGACATGGCAAACAGGTGCTTCCCCGCACCGGGGCCCTGGGTCCGCACCCTCGGCCTTGATGAGC

CTGCTCGCAGAAGCGCAGCCTGTCCGAAGATCTGGGCTCGATCGGGTCAAGTCATCGCGGGGCGGGGCGGACAG  
GACGAGCGTCTTCGCGTTCGGACAGCGGTCTTAGACCCGAGCTAGCCAGTTCAGTAGCGCCCCGCCCGCCTGTCT

GGCAGTGATTTAAGAGGCGCGGCCTTGGGACCCGAGGACCCACACCAATGGAGACCGCCAGGGACTACGCGGGAG  
CCGTACTAAATTCCTCCGCGCCGGAACCCTGGGCTCTGGGTGTGGTTACCTCTGGCGGTCCCTGATGCGCCCTC

CCCTCATCAGGCGAGTGTGCCCGTGTACCCTGCGCGCGGTACCCCTTCTTTCCGAACGGCTATAGTCCCCCTG  
GGGAGTAGTCCGCTCAGCAGGGCACATGGGGACGCGCGCCAGTGGGAAGAAAGGCTTGCCGATATCAGGGGAC

CCAGTCCGCACAGCCAGGCCTGTTCCCGCCAGCAGCCCAAGGTTCCTCCGAAAAGGGCTACAGCTGCCAGTG  
GGTCAGGCGTGTTCGGTCCGGACAAGGGCGGGTCTGCGGTTCGAAGGAGGCTTTTCCCGATGTCGACGGGTAC

GTGCGCTCTCGAGGTGCGTGGGAGTCCGCAAGTGGCAGTGGTGAACGTGGGGGTAGCCTCATTCTGTTGCACCTC  
CACGCGAGAGCTCCACGCACCCTCAGGCGTTCACCGTACCCTTGCACCCCATCGGAGTAAGACAACGTGGAG

TTGCAGGAGATGAGGAACTCGGGAGTCCCCCTGACATTCATGGGGTTGCAGACGAAAAGGTCTGCTTACCCCC  
AACGTCTTACTCCTTGAGCCCTCAGGGGACTGTAAGTACCCCAACGTCTGCTTTTTCCAGGACGAATGGGGG

CTCATAACCCCTGCTCGTCCTTTCCGGGTTTCAAACCATGACCGAAGCAGCCGGCGTGGGGTATGGCCAGCAGC  
GAGTATGTGGGACGAGCAGGAAAGGCCCAAAGTTTGGTACTGGCTTCGTCGGCCGCACCCCACTACCGGTCTGTCG

CTGCGGAACTTATCAGCAAGACTCTGGATGCTTTGGTCATCACAACCTGGCCTGGTACGCTGGTGTGGAGGAG  
GACGCCCTTGAAATAGTCGTTCTGAGACCTACAGAACCAGTAGTGTGACCCGACAGTGCAGCCACGACCTCCTC

GATGGTACCGTGGTGGACACAGAGGAGTCTTTTCAGACCCTAAGAGACAACACACACTTCATGATCTTGAAAAG  
CTACCATGGCACCACCTGTGTCTCCTCAAGAAAGTCTGGGATTCTCTGTTGTGTGTGAAGTACTAGAACCTTTTC

GGACAGAAATGGACACCGGGCAATAAGTATGTCTGCACACAACAAGAAGTCCAGGAATAGCCAAGAGTACCTTC  
CCTGTCTTTACCTGTGGCCGTTATTCATACAGACGTGTGTTTGTTCCTCAGTCCTTATCGGTCTCAGTGGAAAG

GACCTATACAGGCTGAATCCCAAGGACTTCCTCGGCTGTCTCAATGTCAAAGCCACCATGTATGAGATGTACTCA  
CTGGATATGTCCGACTTAGGGTTCCGAAGGAGCCGACAGAGTTACAGTTTCGGTGGTACATACTCTACATGAGT

GTGTCGTATGATATCCGCATGCACAAGCTTCAAGGCCCTTGTAAAGGAGTCTGCTGCGGTTCCGATCCTATGCTGCC  
CACAGCATACTATAGGCGACGTGTTTCGAAGTTCCGGAAACAATTCCTCAGACGACGCCAAGCGTAGGATACGACGG

CAGGTGACCGGACAGTTCCTGGTTTTATGCGGGCGCTTATGTGCTCCGAGCACTGGGTGACACAGAAGAGCAGCCA  
GTCCACTGGCCTGTCAAGGACCAAATACGCCCGCAATACACGAGGCTCGTGACCCACTGTGTCTTCTCGTCGGT

TCCCCAAGGCTAGCGCCAAAGGCTGGTTCATGTAA  
AGGGGGTTCGGATCGCGGTTTCCGACCAAGTACATT

## Příloha 2- deleční mutanty CIDEa

CIDEA - modrá JE CIDE<sub>n</sub> doména, žlutá je CIDE<sub>c</sub> doména

```
1 ATGCGAGGGGACCGGGCTTCTGGGGTCTGAAATCACAACGGGAGCTGGGCGCGGGAGGGGCCAGGCTT
  M R G D R A S G G P G N H N G S W A R E G P R L
73 GGCCCTCCTGGAAGCGGGCTCTGGTCTCCGAGGGGAGGCCCAACCGTCCGGCGGAGCCCTCCAGGCC
  G P S W K R G L W S P R G G P N R P A E P S R P
145 CTGACATTTATGGGATCACAGACTAAGCGAGTCTGTTCACCCCGCTCATGCATCCAGCTCGCCCTTCCGG
  L T F M G S Q T K R V L F T P L M H P A R P F R
217 GTCTCCAACCATGACAGGAGCAGCCGGCGTGGGGTGTGGCAAGCAGCCTGCAGGAGCTCATCAGCAAGACT
  V S N H D R S S R R G V M A S S L Q E L I S K T
289 CTGGATGCCCTCGTCATCGCTACCGGACTGGTCACTCTGGTGTGGAGGAAGATGGCACCGTGGTGGACACA
  L D A L V I A T G L V T L V L E E D G T V V D T
361 GAAGAGTTCTTTAGACCTTGGGAGACAACACGCATTTTCATGATCTTGGAAAAAGGACAGAAGTGGATGCCG
  E E F F Q T L G D N T H F M I L E K G Q K W M P
433 GGCAGCAGCACGTCCCCTGCTCGCCGCCGAAGAGTCCGGGAATAGCGAGAGTACCTTCCGACTTGTAC
  G S Q H V P T C S S P P K R S G I A R V T F D L Y
505 AAGCTGAACCCCAAGGACTTTCATCGGCTGCCTTAACGTGAAGGCCACCATGTATGAGATGTACTCCGTGTCC
  R L N P K D F I G C L N V K A T M Y E M Y S V S
577 TACGACATCCGGTGCACGGGACTCAAGGGCCTGCTGAGGAGTCTGCTGCGGTTCTGCTCCTACTCCGCCAG
  Y D I R C T G L K G L L R S L L R F L S Y S A Q
649 GTGACGGGAAGTTCATCTATCTGGGCACATACATGCTCCGGGTGCTGGATGACAAGGAAGAGCGGCCA
  V T G Q F L I Y L G T Y M L R V L D D K E E R P
721 TCCCTCCGGTACAAGCCAAGGGCAGGTTACGTGTGGATAG 763
  S L R S Q A K G R F T C G @
```

### CIDEA-N (bez N domény)

```
ATGCGAGGGGACCGGGCTTCTGGGGTCTGAAATCACAACGGGAGCTGGGCGCGGGAGGGGCCAGGCTT
GGCCCTCCTGGAAGCGGGCTCTGGTCTCCGAGGGGAGGCCCAACCGTCCGGCGGAGCCCTCCAGGCC
CTGACATTTATGGGATCACAGACTAAGCGAGTCTGTTCACCCCGCTCATGCATCCAGCTCAGCACGTCCCC
ACTTGTCTCGCCGCCGAAGAGTCCGGGAATAGCGAGAGTACCTTCCGACTTGTACAGGCTGAACCCCAAGGAC
TTCATCGGCTGCCTTAACGTGAAGGCCACCATGTATGAGATGTACTCCGTGTCTACGACATCCGGTGCACG
GGACTCAAGGGCCTGCTGAGGAGTCTGCTGCGGTTCTGCTCCTACTCCGCCAGGTGACGGGAAGTTCCTC
ATCTATCTGGGCACATACATGCTCCGGGTGCTGGATGACAAGGAAGAGCGGCCATCCCTCCGGTACAAGCC
AAGGGCAGGTTACGTGTGGATAG
```

### CIDEA-C (bez C domény)

```
ATGCGAGGGGACCGGGCTTCTGGGGTCTGAAATCACAACGGGAGCTGGGCGCGGGAGGGGCCAGGCTT
GGCCCTCCTGGAAGCGGGCTCTGGTCTCCGAGGGGAGGCCCAACCGTCCGGCGGAGCCCTCCAGGCC
CTGACATTTATGGGATCACAGACTAAGCGAGTCTGTTCACCCCGCTCATGCATCCAGCTCGCCCTTCCGG
GTCTCCAACCATGACAGGAGCAGCCGGCGTGGGGTGTGGCAAGCAGCCTGCAGGAGCTCATCAGCAAGACT
CTGGATGCCCTCGTCATCGCTACCGGACTGGTCACTCTGGTGTGGAGGAAGATGGCACCGTGGTGGACACA
GAAGAGTTCTTTAGACCTTGGGAGACAACACGCATTTTCATGATCTTGGAAAAAGGACAGAAGTGGATGCCG
GGCAGCAGCACGTCCCCTTGGCTCGCCGCCGAAGAGTCCGAGTTTCTCATCTATCTGGGCACATACATG
CTCCGGGTGCTGGATGACAAGGAAGAGCGGCCATCCCTCCGGTACAAGCCAAGGGCAGGTTACGTGTGGATAG
```

## Seznam zkratek:

ADOA	autosomal dominant optic atrophy
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
Apo3, DR3	death receptor 3
Ask1	apoptosis signal-regulating kinase
ATAD3	ATPase family, AAA domain containing 3
ATP	adenosintrifosfát
Bak	Bcl antagonist killer
BAT	brown adipose tissue
Bcl2	B -cell CLL/lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
CARD	caspase recruitment domains
CIDE	Cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-a)-like effector
CLARP	caspase-like protein
CMT2A	Charcot- Marie- Tooth neuropathy 2A
DcR3	decoy receptor 3
DD	death domains
DED	death effector domains
DFF	DNA fragmentation factor
DFF40,CAD	podjednotka DFF
DFF45, ICAD	podjednotka DFF
DIABLO	direct IAP-binding protein of low isoelectric point
DISC	death- inducing signaling komplex
DR	death receptors
DRP1	dynamín related protein 1
FADD, MORT1	Fas-asociated death domain protein
Fas	TNF receptor superfamily, member 6
FIS1	fission 1 homolog
FLIP	FLICE inhibitory protein
FSP27, CIDE-3	Cell death-inducing DFFA-like effector 3
GH	growth hormone
GTP	guanosintrifosfát
HDL	high density lipoprotein
IAF	apoptosis-inducing factor

IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICM	vnitřní mitochondriální membrány
ICS	intrakristální prostor
IM	vnitřní membrána; inner membrane
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAPKKK	mitogen activated protein kinase kinase kinase
Mfn1,2	mitofusin 1,2
MIS	mitochondriální cílová sekvence
MPT	mitochondrial permeability transition
mtDNA	mitochondriální DNA
OM	vnější membrána
PHB1,PHB2	prohibitin1,2
PIM	periferální vnitřní membrána
PIMS	periferní mezimembránový prostor
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PTP	permeability transition pore
PUMA, BBC3	Bcl2 binding component 3
RIP	receptor interacting protein
Smac	second mitochondrial activator of caspases
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TFAM	transcriptional factor A, mitochondrial
TIM	translocase of inner membrane
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TOM	translocase of outer membrane
TRADD	TNF receptor associated DD
TRAF2	TNF receptor- associated factor 2
UCP1	uncoupling protein 1
WAT	white adipose tissue



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala hlavně mému školiteli dr.Petru Ježkovi za to, že mě přijal do svého oddělení a umožnil mi vypracovat tuto práci, za jeho odborné vedení a podporu. Dále dr. Lydii Plecité- Hlavaté za podnětné rady a pomoc při řešení naší problematiky a spolu s ní i kolegům z Olomouce doc. Martinu Modrianskému a Mgr. Evě Valouškové za spolupráci na publikacích, popsaných v této disertaci. Děkuji pracovníkům M. Lessardovi a dalším, kteří pro nás dělali měření na přístrojích 4Pi, a to ve spolupracující laboratoři Institute for Molecular Biophysics, Jackson Laboratory, Maine, USA, vedené Dr. Joergem Bewersdorfem a v centrále Leica Microsystems, v Mannheimu, v SRN. Za věrnou spolupráci děkuji i mým kolegům a přátelům Mgr. Kataríně Smolkové a Ing. Tomášovi Špačkovi, se kterými jsem strávila nekonečně mnoho hodin v naší laboratoři i mimo ní a spolu s nimi také dr. Martinu Jabůrkovi, za konstruktivní debaty při doplňování potřebných vitaminů. Poděkování patří i Jitce Smikové a celému kolektivu našeho oddělení za příjemnou atmosféru a přátelské prostředí, které mi simulovalo jakousi druhou rodinu. V neposlední řadě děkuji své biologické rodině v Říčanech, hlavně rodičům Danušce a Houšovi, kteří mě vychovali a doteď ve všech ohledech podporovali, bratrovi Danovi, Kláře, Anděle, Evelíně, Lauře a Růženě. Dík patří i všem přátelům, které jsem poznala při své práci na fyziologickém ústavu a kamarádům v Praze i v Říčanech.