

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Jiří Funda

**Role PGC-1 transkripčních koaktivátorů v řízení funkce mitochondrií
v tukové tkáni**

**Role of PGC-1 coactivators in the regulation of mitochondrial function
in adipose tissue**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Petra Janovská, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze, dne 14. 8. 2017

.....
Bc. Jiří Funda

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat mé školitelce Ing. Petře Janovské, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce. Bez její obětavosti, pečlivosti a trpělivosti by tato práce nevznikla. Děkuji také RNDr. Pavlu Flachsovi, Ph.D., Mgr. Kateřině Adamcové, MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. a všem ostatním kolegům z Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR za jejich odborné rady i přátelský přístup. Dále bych chtěl poděkovat také mé rodině a blízkým, kteří mi vždy byli oporou a přinášeli podnětné připomínky.

Abstrakt

Metabolické děje probíhající v tukové tkáni ovlivňují celotělovou energetickou homeostázu. Dochází zde k *de novo* lipogenezi a k prázdnému metabolickému cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin, které reguluje hladinu mastných kyselin v krevním oběhu. Tyto procesy jsou částečně regulovány jaderným receptorem PPAR γ . Mitochondriální biogeneze a oxidativní fosforylace v adipocytech jsou řízeny prostřednictvím interakce PPAR γ s transkripčními koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β . Cílem práce bylo zjistit, zda je transkripční koaktivátor PGC-1 β zapojen do regulace prázdného cyklování a *de novo* lipogeneze v bílé tukové tkáni a jaký je vliv specifické inaktivace genu pro PGC-1 β v tukové tkáni na fenotyp myši vystavených krátkodobé chladové expozici, popřípadě expozici založené na dietě s vysokým obsahem tuku obohacené o *n*-3 polynenasycené mastné kyseliny v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí.

Výsledky práce ukazují, že inaktivace PGC-1 β v bílé tukové tkáni pravděpodobně nemá vliv na prázdné cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin. U myši s inaktivací PGC-1 β byl pozorován nárůst hmotnosti hnědé tukové tkáně a při chladové expozici i zvýšení exprese genů pro jaderné receptory PPAR, transkripční koaktivátor PGC-1 α a UCP1. Přestože je v hnědém tuku inaktivace PGC-1 β kompenzována zvýšením hladin genové exprese a také UCP1 proteinu, tkáň se nejeví jako plně funkční.

Klíčová slova

tuková tkáň, PGC-1 transkripční koaktivátor, mitochondrie, prázdné metabolické cyklování

Abstract

Metabolic pathways in adipose tissue affect the whole-body energy homeostasis. *De novo* lipogenesis and futile metabolic cycling based on lipolysis and fatty acid re-esterification which is engaged in regulation of fatty acid level in bloodstream are occurring there. These processes are partly regulated by nuclear receptor PPAR γ . Mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in adipocytes are controlled by interacting of PPAR γ with transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β . The aims of this thesis were to find out whether PGC-1 β is connected with regulation of futile cycling and *de novo* lipogenesis in white adipose tissue and also how specific inactivation of PGC-1 β gene in adipose tissue affects phenotype of mice during short-term cold exposure or treatment based on high fat diet enriched by *n*-3 polyunsaturated fatty acids in combination with mild calorie restriction.

The results show that inactivation of PGC-1 β probably does not affect futile cycling based on lipolysis and fatty acid re-esterification. In mice with PGC-1 β ablation compensation in weight of brown adipose tissue was observed as well as increase in the gene expression of nuclear receptors PPAR, transcriptional coactivator PGC-1 α and UCP1 during cold exposure. Even though the inactivation of PGC-1 β in brown adipose tissue is compensated by upregulation of gene expression and also by increase of UCP1 protein, tissue does not appear to be fully functional.

Key words

adipose tissue, PGC-1 transcriptional coactivators, mitochondrion, futile metabolic cycling

Obsah

1	Úvod	5
2	Tuková tkáň	6
2.1	Obecné vlastnosti tukové tkáně	6
2.2	Lipolýza triacylglycerolů a β -oxidace	8
2.3	Esterifikace mastných kyselin a prázdné metabolické cyklování	10
2.4	Hnědá tuková tkáň	13
3	PPAR	15
3.1	Obecné vlastnosti PPAR	15
3.2	PPAR α	16
3.3	PPAR γ	17
3.4	Transkripční koaktivátory PGC-1	19
3.5	Celotělová inaktivace PGC-1 β	21
3.6	Inaktivace PGC-1 β v tukové tkáni	22
4	Hypotézy a cíle práce	23
4.1	Hypotézy	23
4.2	Specifické cíle práce	23
5	Materiál a metody	25
5.1	Myší model s inaktivací PGC-1 β v tukové tkáni	25
5.2	Přehled experimentu - chladová expozice	25
5.3	Přehled experimentu - kalorická restrikce	27
5.4	Genotypizace experimentálních zvířat	29
5.5	Izolace RNA	31
5.6	Reverzní transkripce	32
5.7	Kvantitativní PCR	32
5.8	Izolace triacylglycerolů pro nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii	35
5.9	Měření koncentrace lipidových metabolitů	36
5.10	Western blotting	37
5.11	Statistické vyhodnocení	38

5.12	Seznam použitých chemikálií	39
5.13	Seznam použitých přístrojů	40
6	Výsledky	42
6.1	Chladová expozice	42
6.1.1	Tělesná hmotnost a spotřeba diety	42
6.1.2	Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě a akumulace lipidů v játrech a v kosterním svalu	44
6.1.3	Hmotnost tukových dep	48
6.1.4	Hladiny genové exprese v gonadálním tukovém depu	50
6.1.5	Hladiny genové exprese v hnědé tukové tkáni	51
6.1.6	Množství UCP1 proteinu v hnědé tukové tkáni	57
6.2	Kalorická restrikce	59
6.2.1	Tělesná hmotnost a spotřeba diety	59
6.2.2	Glykémie a koncentrace lipidových metabolitů v plazmě	62
6.2.3	Hmotnost tukových dep	64
6.2.4	Hladiny genové exprese v gonadálním tukovém depu	66
7	Diskuze	68
7.1	Chladová expozice	68
7.2	Kalorická restrikce	71
8	Závěr	73
	Seznam literatury	74

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
Akt	proteinkináza B
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
aP2	<i>(adipocyte protein 2)</i>
ATGL	triacylglycerolová lipáza
ATP	adenosintrifosfát
C/EBP $\alpha/\beta/\delta$	<i>(CCAAT-enhancer binding protein alpha/beta/delta)</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
CGI-58	<i>(comparative gene identification 58)</i>
CPT1	karnitin-palmitoyltransferáza I
CPT2	karnitin-palmitoyltransferáza II
CREB	<i>(cyclic AMP response element-binding protein)</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EF-1 α	elongační faktor 1 alfa
ERR α	<i>(estrogen related receptor alpha)</i>
FAD	flavinadenindinukleotid oxidovaná forma
FADH ₂	flavinadenindinukleotid redukována forma
FAS	syntáza mastných kyselin
FGF21	<i>(fibroblast growth factor 21)</i>
FSP27	<i>(Fat-specific protein 27)</i>
GLUT4	<i>(glucose transporter type 4)</i>
HSL	hormon-senzitivní lipáza
IL 1,6,12	interleukin 1, 6, 12
IRS-1	<i>(insulin receptor substrate 1)</i>
loxP	<i>(locus of X over P)</i>
LPL	lipoprotein lipáza
LXR	<i>(liver X receptor)</i>
MGL	monoacylglycerolová lipáza
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MTBE	metyl- <i>t</i> -butyl-éter
MYF5	<i>(myogenic factor 5)</i>
<i>n</i> -3 PUFA	<i>(n-3 polyunsaturated fatty acid)</i>
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma
NADH+H ⁺	nikotinamidadenindinukleotid redukována forma
NEFA	neesterifikovaná mastná kyselina
NF- κ B	<i>(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)</i>
NRF-1,2	<i>(nuclear respiratory factor 1, 2)</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEPCK	fosfoenolpyruvátcarboxykináza
PGC-1 α	<i>(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator alpha)</i>
PGC-1 β	<i>(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator beta)</i>
PKA	proteinkináza A

PPAR α	receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů alfa
PPAR γ	receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů gama
PPRE	<i>(PPAR response elements)</i>
PRC	<i>(PGC-1 related coactivator)</i>
PRDM16	<i>(PR domain containing 16)</i>
PVDF	polyvinylidenfluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RXR	<i>(retinoid X receptor)</i>
TNF α	tumor nekrotizující faktor alfa
TZD	thiazolidindiony
UCP	rozpřahovací protein
Wnt	<i>(Wingless/Int-1)</i>

1 Úvod

V současné době je dobře známo, že tuková tkáň vykonává v organismu mnoho důležitých úkolů. Od prosté tepelné izolace vnitřních orgánů, přes sekreci hormonů až po participaci ve funkcích imunitního systému. Nejpodstatnější úlohou, kterou tuková tkáň plní, je skladování přebytečné energie ve formě triacylglycerolů v lipidových kapénkách adipocytů. Díky tomu jsou živočichové včetně člověka schopni přežít celé týdny bez příjmu potravy. Ačkoli tato schopnost umožňovala našim předkům přežít období hladomorů, dnes je hlavní příčinou obezity a s ní asociovaných metabolických poruch, jako je například diabetes mellitus druhého typu nebo různá kardiovaskulární onemocnění. Tyto civilizační choroby již nejsou problémem pouze vyspělých států Evropy a Severní Ameriky, ale počet osob trpících nadváhou či obezitou dramaticky roste po celém světě.

S tím, jak se globálně zvyšuje množství obézních jedinců, zvyšuje se také význam zkoumání tukové tkáně, neboť pochopení metabolických pochodů, ke kterým v tkáni dochází, je nezbytné k tomu, abychom byli schopni tyto pochody ovlivňovat. Peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor gama (PPAR γ ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma) zastává v metabolických drahách v tukové tkáni klíčovou roli. PPAR γ reguluje syntézu triacylglycerolů, je nezbytný pro diferenciaci adipocytů, ovlivňuje inzulínovou senzitivitu a působí protizánětlivě. Vliv PPAR γ na zmíněné procesy je umožněn interakcí tohoto receptoru s řadou různých transkripčních faktorů. Patří mezi ně i transkripční koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha/beta).

V této práci shrnuji výsledky získané sérií experimentů prováděných na myším modelu, u kterého byl inaktivován gen pro PGC-1 β v bílé i ve hnědé tukové tkáni. Podstatou experimentů je chladová expozice, kdy jsou zvířata po dobu dvou či sedmi dnů vystavena teplotě 6 °C, popřípadě dietní expozice, při níž jsou myši krmeny dietou s vysokým obsahem tuku obohacenou o polynenasycené mastné kyseliny řady *n*-3 (*n*-3 PUFA; *n*-3 polyunsaturated fatty acid) v kombinaci s kalorickou restrikcí. Těmito stimuly jsou aktivovány dráhy energetického metabolismu v tukové tkáni, jejichž součástí jsou i transkripční koaktivátory PGC-1.

2 Tuková tkáň

2.1 Obecné vlastnosti tukové tkáně

Primární úlohou bílé tukové tkáně v organismu je sloužit jako energetický rezervoár pro případ, že se jedinec delší dobu nedostane ke zdroji potravy. Tuková tkáň je tvořena převážně adipocyty, což jsou specializované buňky obsahující v cytozolu kapénky s uloženými triacylglyceroly. Pokud je v organismu zvýšená poptávka po metabolické energii, je obsah lipidových kapének hydrolyzován za vzniku molekuly glycerolu a třech molekul volných mastných kyselin. Tento proces se nazývá lipolýza. Z uvolněných mastných kyselin lze následně v mitochondriích, či v peroxizomech získat značné množství metabolické energie prostřednictvím β -oxidace. V případě kdy organismus přijímá potravu, ale nemá zvýšený energetický výdej, je přebytečná energie uložena ve formě triacylglycerolů do tukových kapének adipocytů. Molekuly triacylglycerolů jsou syntetizovány během esterifikace mastných kyselin, kdy jsou mastné kyseliny pocházející z potravy, nebo vytvořené syntézou *de novo* sloučený s glycerolem (Boron & Boulpaep, 2012).

Pokud příjem energie dlouhodobě převyšuje energetický výdej, dochází k nadměrnému nárůstu tukových zásob, což může vést k překročení kapacity tukové tkáně. Neschopnost tukové tkáně pojmout další metabolickou energii je nutno kompenzovat ukládáním triacylglycerolů v jiných tkáních. Ektopické ukládání tuku probíhá především v játrech a v kosterních svalech a vede ke snížení schopnosti těchto tkání reagovat na inzulín (Kim et al., 2000). Nadměrný příjem kalorií vyžaduje zvýšení sekrece inzulínu, což po čase způsobí vyčerpání sekreční schopnosti β -buněk¹ pankreatu, a tím je snížena produkce tohoto hormonu. Snížením produkce inzulínu v kombinaci s inzulínovou rezistencí dochází k rozvoji onemocnění známého jako diabetes mellitus druhého typu. Kromě ektopického ukládání triacylglycerolů působí nadměrný kalorický příjem také zvýšení hladiny volných mastných kyselin v krevním řečišti. Mastné kyseliny jsou látky silně reaktivní a v řadě tkání působí jejich vysoká koncentrace toxicky a vede k aktivaci zánětlivých procesů (Paolisso et al., 1995). Tuková tkáň tedy kromě skladování energie slouží i jako ochrana před poškozením ostatních tkání mastnými kyselinami. Kapacita tukové tkáně se u různých jedinců značně liší. U některých velmi obézních osob nemusí vůbec docházet k ektopickému ukládání tuku a jejich zdravotní stav je zcela v pořádku, zatímco u mnohem štíhlejších jedinců tuková tkáň nedokáže pojmout více triacylglycerolů a v důsledku toho trpí inzulínovou rezistencí a dalšími zdravotními potížemi (Unger & Scherer, 2010).

Kapacita tukové tkáně je dána schopností expanze lipidových kapének adipocytů v reakci na zvýšený energetický příjem. Tento problém je v současné době podroben intenzivnímu zkoumání a k charakterizaci metabolické flexibility tukové buňky byly zavedeny termíny „zdravý“ a „nezdravý“ adipocyt. Mimo schopnosti efektivně expandovat lipidové kapénky patří mezi vlastnosti „zdravých“ adipocytů například vysoká aktivita oxidativní fosforylace v mitochondriích. Pro ukládání

¹ Buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, které produkují hormon inzulín.

triacylglycerolů v adipocytech je stěžejní protein Perilipin 1. Ten zároveň slouží jako mediátor zprostředkovávající interakce mezi proteiny během lipolýzy (Tansey et al., 2001). Dalším důležitým proteinem je FSP27 (Fat-specific protein 27; CIDEC), který se při vývoji adipocytu podílí na formaci tukové kapénky. U myši s delecí genu pro FSP27 v tukové tkáni byly pozorovány malé adipocyty, snížené množství tukové tkáně, jaterní steatóza² a inzulinová rezistence (Tanaka et al., 2015). Bylo rovněž zjištěno, že Perilipin 1 působí jako aktivátor FSP27, čímž ovlivňuje schopnost expanze kapének v adipocytu (Sun et al., 2013). Jednotlivé lipidové kapénky v buňce mohou navzájem zfúzovat a není vyloučeno, že jsou schopny i dalších dynamických dějů. V poslední době je proto na tyto organely a zejména na soubor proteinů na jejich povrchu soustředěna velká pozornost (Boström et al., 2007).

Tukové buňky lze rozlišovat podle jejich morfologie na unilokulární a multilokulární adipocyty. Unilokulární adipocyty tvoří bílou tukovou tkáň a obsahují jednu velkou lipidovou kapénku. Multilokulární adipocyty obsahují větší množství malých kapének a velké množství mitochondrií. Vytvářejí hnědou tukovou tkáň, ale mohou se vyskytovat i v bílém tuku. Jejich hnědavé zbarvení je způsobeno cytochromy, které se vyskytují v mitochondriích a slouží jako elektronové přenašeče (Lüllmann-Rauch, 2012). Bílé a hnědé tukové buňky se kromě organelové výbavy liší také svým původem. Oba typy adipocytů jsou mezodermálního³ původu, na rozdíl od bílých adipocytů však může být u hnědých tukových buněk aktivována exprese proteinu MYF5 (myogenic factor 5), což je klíčový regulátor diferenciací svalových buněk (Atit et al., 2006).

Primární funkcí bílého tuku je skladování metabolické energie, zatímco hnědý tuk slouží jako termogenní orgán. Termogeneze zprostředkovaná hnědým tukem je nezbytná pro přežití drobných savců (např. myši a netopýrů) a také pro mláďata mnoha větších savců včetně člověka. Skutečnost, že tato tkáň se vyskytuje i v těle dospělého člověka, byla ještě nedávno neznámá. Vzhledem k jejímu zanedbatelnému množství však hnědá tuková tkáň pro dospělého člověka z hlediska tvorby tepla není příliš významná (Saito et al., 2009). Metabolické pochody v obou tukových tkáních jsou stimulovány především vegetativním nervovým systémem, konkrétně prostřednictvím sympatiku přes β -adrenergní receptory⁴. Zejména u adipocytů v hnědém tuku se vyskytuje velmi hustá sympatická inervace (Bartness, Vaughan & Song, 2010). Sympatický nervový systém je stimulován v situacích, jako je chladový stres, zvýšená fyzická aktivita, nebo hladovění. Aktivací β -adrenergních receptorů proto dochází v tukových buňkách ke zvýšení lipolýzy triacylglycerolů a uvolněné mastné kyseliny mohou být následně využity jako zdroj tepla či metabolické energie (Barbe et al., 1996). V adipocytech vede signál z β -adrenergních receptorů k aktivaci proteinkinázy A (PKA), která fosforyluje enzymy

² Ztuchnění jater, dochází k němu nejčastěji u obézních jedinců, popřípadě u chronických alkoholiků.

³ Střední zárodečný list, vyskytuje se u živočichů z kmene trojlístí, mezi které patří i obratlovci. U savců jsou z mezodermy odvozeny kostra, svalová soustava, oběhová soustava, vylučovací a pohlavní soustava a mnoho dalších struktur.

⁴ Skupina receptorů spřažených s G-proteiny, vyskytují se na plazmatické membráně a jsou aktivovány katecholaminy. U β -adrenergních receptorů rozlišujeme podskupiny β_1 , β_2 a β_3 .

katalyzující proces lipolýzy. V situacích, kdy dochází ke zvýšení aktivity sympatiku, je stimulován celkový energetický metabolismus tukové tkáně, čehož lze s výhodou využít při jeho zkoumání.

Schopnost tukové tkáně syntetizovat látky hormonální povahy souhrnně označované jako adipokiny je velmi důležitá a představuje způsob komunikace mezi tukovou tkání a imunitním systémem či centrální nervovou soustavou. Tématu této práce se ovšem dotýká pouze okrajově, a proto zde nebude detailněji probírána.

2.2 Lipolýza triacylglycerolů a β -oxidace

Aby mohla být metabolická energie uložená v tukových kapénkách uvolněna a spotřebována, musí být molekuly triacylglycerolů nejprve hydrolyzovány na glycerol a volné mastné kyseliny. K tomu dochází v bílé i v hnědé tukové tkáni a také v gastrointestinálním traktu při hydrolyze lipidů přijatých v potravě (Voet & Voet, 2011).

Lipolýza triacylglycerolů je katalyzována lipázami, což je skupina enzymů s rozdílnou buněčnou lokalizací a substrátovou preferencí. Při lipolýze v tukové tkáni se uplatňují cytozolické lipázy a to zejména triacylglycerolová lipáza (ATGL; adipose tissue triglyceride lipase) spolu s proteinem CGI-58 (comparative gene identification 58), který je nezbytný pro její aktivaci, a dále hormon-senzitivní lipáza (HSL) a monoacylglycerolová lipáza (MGL). ATGL je enzym určující rychlost lipolýzy triacylglycerolů, jež jsou jejím jediným substrátem. HSL je schopna katalyzovat lipolýzu triacylglycerolů, ale primárním substrátem tohoto enzymu jsou diacylglyceroly, při jejichž štěpení vznikají monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny (Lass et al., 2006). Štěpení monoacylglycerolů nakonec katalyzuje MGL. V tukových buňkách probíhá lipolýza v malé míře neustále, což se označuje jako bazální úroveň lipolýzy. V reakci na podnět, kterým je například stimulace sympatického nervového systému, může být úroveň lipolýzy navýšena. Bazální úroveň lipolýzy měřená v kultuře lidských uniloculárních adipocytů nebyla nijak ovlivněna inaktivací HSL. To naznačuje, že za hydrolyzu triacylglycerolů v nestimulovaném stavu je zodpovědná pouze ATGL (Bezaire et al., 2009).

Stimulací β -adrenergických receptorů na plazmatické membráně tukových buněk se aktivuje enzym adenylátcykláza, což vede ke zvýšení koncentrace druhého posla⁵, kterým je cyklické AMP (cAMP). Zvýšení hladiny cAMP způsobí aktivaci PKA, která dále fosforyluje Perilipin 1 a HSL. Fosforylovaná HSL se přemístí z cytozolu na povrch lipidové kapénky, kde interaguje s fosforylovaným Perilipinem 1 a katalyzuje hydrolyzu obsahu kapénky. Současně dochází k navázání proteinu CGI-58 na ATGL, což vede ke tvorbě aktivního lipolytického komplexu na povrchu lipidové kapénky. Důležitým regulátorem lipolýzy v tukové tkáni je enzym AMP-aktivovaná proteinkináza (AMPK), který slouží jako senzor kontrolující stav energetické homeostázy na úrovni buněčné i celotělové. Úkolem AMPK je chránit buňku před energetickým vyčerpáním a oxidačním stresem. Aktivita AMPK

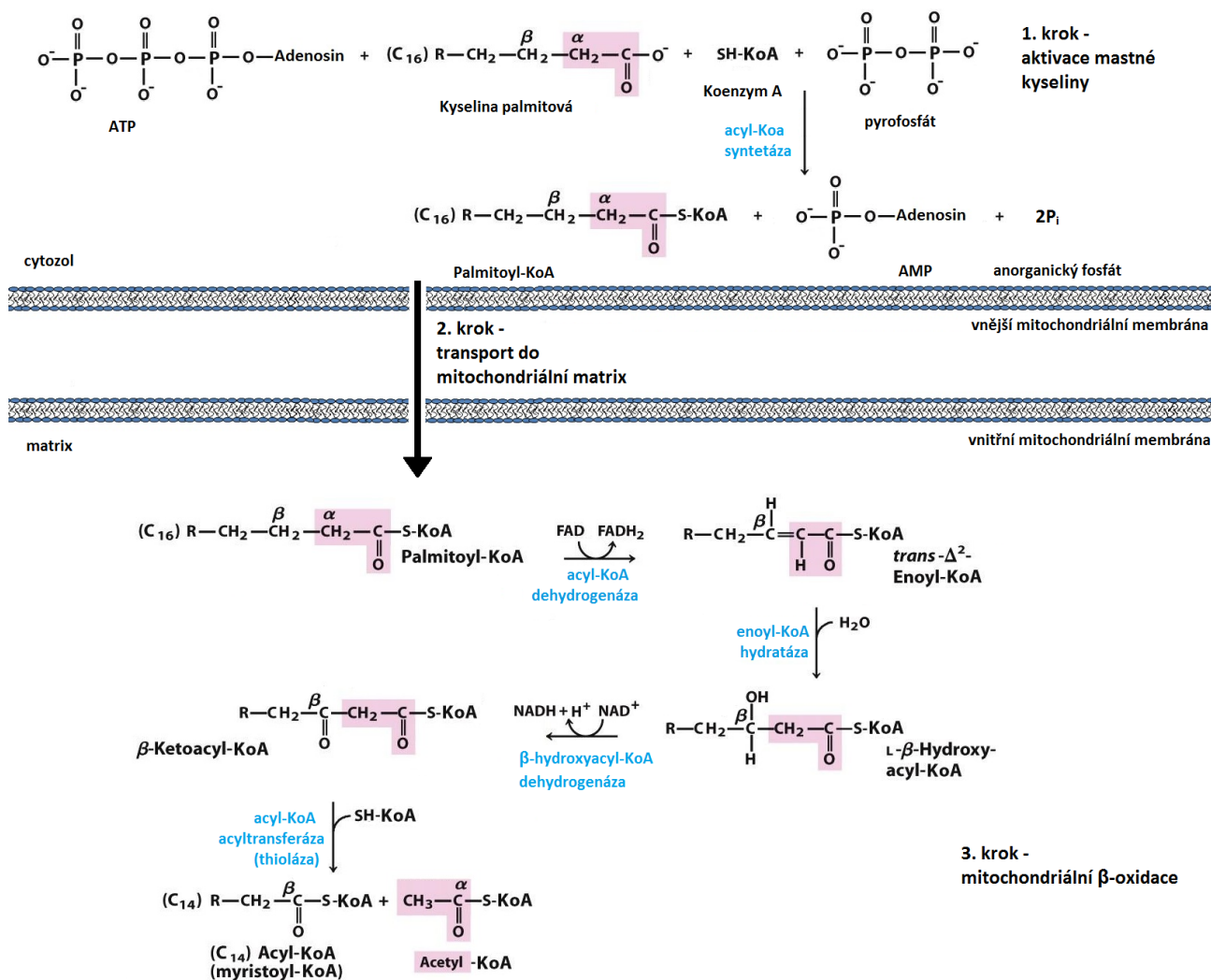
⁵ Molekula účastní se drah buněčné signalizace. Po aktivaci příslušného receptoru se koncentrace druhého posla v buňce mnohonásobně zvýší, což vede ke spuštění další fáze signální kaskády.

je v adipocytech regulována poměrem mezi AMP a ATP, kdy zvýšení koncentrace AMP enzym aktivuje. AMPK reguluje aktivitu lipolýzy fosforylací HSL i ATGL (Ahmadian et al., 2011). V bazálním stavu AMPK stimuluje aktivitu ATGL. Ve stavu stimulované lipolýzy působí AMPK na HSL inhibičně, aby chránila buňku před vyčerpáním energetických zásob (Daval et al., 2005).

Většina glycerolu vznikajícího při lipolýze je uvolněna do krevního řečiště, odkud je transportován do jater. Glycerol v játrech je následně fosforylován na glycerol-3-fosfát a přeměněn na glyceraldehyd-3-fosfát, což je důležitý glykolytický meziprodukt (Nelson, Cox & Lehninger, 2008). Mastné kyseliny uvolněné lipolýzou z tukových kapének mohou být následně v mitochondriích a v peroxizomech β -oxidací (název je odvozen od β -uhlíku⁶) přeměněny na energii. β -oxidaci předchází proces asociace mastné kyseliny s koenzymem A katalyzovaný acyl-koenzym A-syntetázou. Takto aktivovaná mastná kyselina je dále transportována přes mitochondriální, či peroxizomální membrány. U mitochondriální β -oxidace se na transportu podílí řada enzymů, z nichž klíčovou rolí hraje karnitin-palmitoyltransferáza I (CPT1), která převádí mastné kyseliny s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem na estery karnitinu. Ty jsou přepraveny dovnitř mitochondrií, kde je pomocí karnitin-palmitoyltransferázy II (CPT2) karnitin oddělen a vrací se zpět. Mastné kyseliny s krátkým uhlovodíkovým řetězcem mohou přes mitochondriální membrány prostupovat samovolně (Charney, Micic & Egnor, 1998).

β -oxidace začíná tvorbou dvojně vazby mezi α -uhlíkem a β -uhlíkem. Na dvojnou vazbu se aduje molekula vody a proces pokračuje dehydrogenací hydroxylové skupiny na β -uhlíku. Posledním krokem je odštěpení acetylkoenzymu A a navázání nového koenzymu A ke zbytku mastné kyseliny. Tímto způsobem je mastná kyselina zkracována, přičemž dochází k redukci oxidovaných koenzymů FAD a NAD^+ na FADH_2 a $\text{NADH}+\text{H}^+$ (Obr. č. 1). Peroxizomální β -oxidace se v principu od mitochondriální významně neliší a jsou při ní oxidovány zejména mastné kyseliny s velmi dlouhými uhlovodíkovými řetězci.

⁶ Druhý uhlík mastné kyseliny v pořadí od karboxylové skupiny.



Obr. č. 1. Schéma mitochondriální β -oxidace. FAD(H_2) - flavinadenindinukleotid oxidovaná (redukováná) forma, KoA - koenzym A, NAD $^+$ (H^+) - nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná (redukováná) forma. Upraveno z (Nelson, Cox & Lehninger, 2008).

2.3 Esterifikace mastných kyselin a prázdné metabolické cyklování

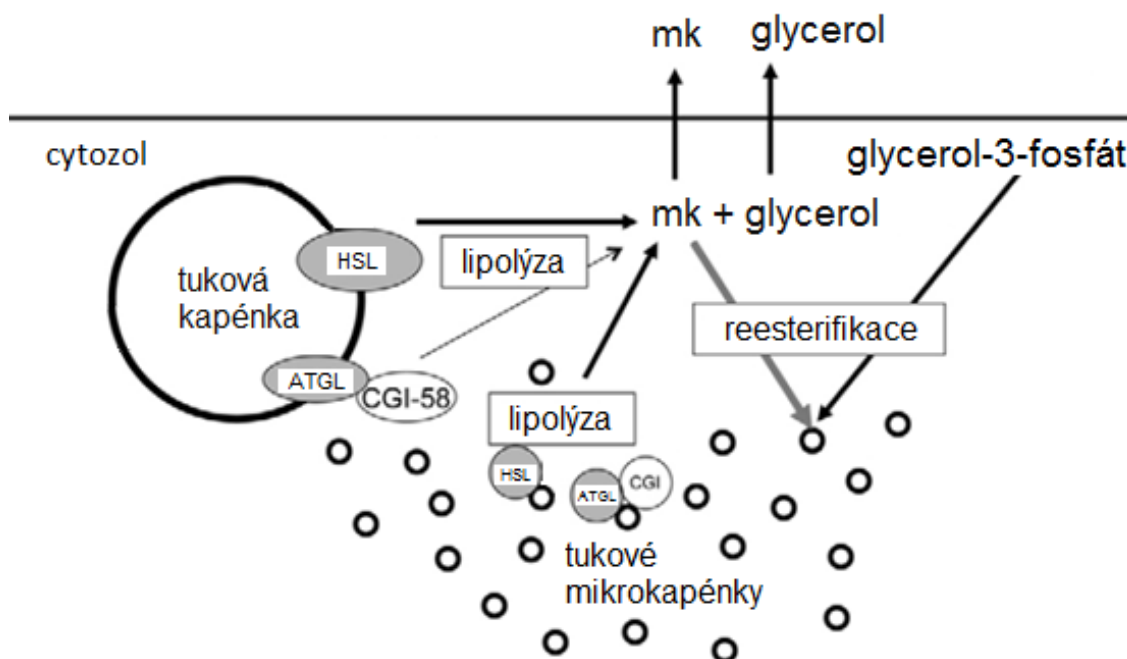
Při zvýšené poptávce po metabolické energii probíhá lipolýza za účelem zisku ATP. V případě energetického nadbytku dochází k procesu esterifikace, kdy jsou volné mastné kyseliny navázány na molekulu fosforylovaného glycerolu. Samotná esterifikace je katalyzována acyltransferázami, které však neurčují rychlost reakce, neboť ta je dána dostupností glycerol-3-fosfátu v cytozolu buňky (Nye, Hanson, & Kalhan, 2008). Fosforylovaný glycerol může být syntetizován z glykolytického meziprojektu dihydroxyacetonfosfátu, popřípadě z necukerných prekurzorů jako jsou například aminokyseliny, pyruvát a laktát prostřednictvím glyceroneogeneze. V hnědém tuku je exprimován enzym glycerolkináza, který přímo katalyzuje fosforylaci glycerolu za vzniku glycerol-3-fosfátu, zatímco v bílém tuku je glycerol vytvářen především glyceroneogenezí (Festuccia et al., 2003). Kromě fosforylovaného glycerolu jsou pro esterifikaci nezbytné mastné kyseliny vázané na koenzym A.

Mastné kyseliny pocházejí z potravy, z tukových zásob v adipocytech, kde byly již dříve uloženy, nebo mohou být vytvořeny syntézou *de novo*. Syntéza mastných kyselin je katalyzována enzymovým komplexem zvaným syntáza mastných kyselin (FAS; fatty acid synthase), (Volpe & Vagelos, 1974).

V bílé i v hnědé tukové tkáni probíhá zvláštní metabolický děj, při kterém proti sobě současně běží lipolýza i esterifikace mastných kyselin. Dochází tedy k tomu, že molekula triacylglycerolu, jež byla právě lipolyticky rozštěpena, je okamžitě znovu syntetizována. Takový děj je nazýván prázdné metabolické cyklování, a přestože se může jevit jako zbytečné plýtvání energií, zastává v tukové buňce i v celém organismu řadu podstatných úkolů, ke kterým patří například regulace hladiny mastných kyselin v krevním oběhu. Existují různé druhy prázdných metabolických cyklů. Mezi jejich společné vlastnosti patří, že protichůdné reakce jsou katalyzovány odlišnými enzymy, což umožňuje, aby probíhaly současně a byly nezávisle regulovány (Newsholme & Crabtree, 1976).

Stimulace lipolýzy, u které je rychlost určujícím enzymem ATGL, zvyšuje obrat prázdného cyklu mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin, neboť je zvýšeno štěpení obsahu lipidových kapének. Pro navýšení kapacity prázdného cyklování je nezbytné stimulovat také esterifikaci mastných kyselin (Kalderon et al., 2000). Rychlost esterifikace mastných kyselin je závislá na dostupnosti glycerol-3-fosfátu v cytozolu. Cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin probíhá zejména ve stavu, kdy je energetická rovnováha organismu nakloněna ke katabolizmu. V tomto stavu je snížena glykolýza, takže glycerol-3-fosfát nutný pro esterifikaci je vytvářen glyceroneogenezí. Enzymem určujícím rychlost této dráhy je fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK). Exprese PEPCK je regulována jadernými receptory PPAR γ , které tak ovlivňují obrat prázdného metabolického cyklu prostřednictvím regulace koncentrace glycerol-3-fosfátu v cytozolu (Vidal-Puig et al., 1997).

Během prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin dochází na úrovni unilokulárního adipocytu především k remodelaci tukových kapének. V bílé tukové buňce je jedna velká lipidová kapénka, na jejímž povrchu probíhá lipolýza. Triacylglyceroly vytvořené reesterifikací se nezačlení zpět do původní kapénky, ale místo toho vytvářejí v cytozolu velké množství mikrokapének, které mají mnohem větší celkový povrch, což značně zefektivňuje proces lipolýzy (Obr. č. 2). Takové uspořádání tukových kapének připomíná multilokulární adipocyty v hnědé tukové tkáni (Hashimoto et al., 2012).



Obr. č. 2. Schéma remodelace lipidových kapének. ATGL - triacylglycerolová lipáza, CGI-58 - comparative gene identification 58, HSL - hormon-senzitivní lipáza, mk - mastné kyseliny. Upraveno z (Hashimoto et al., 2012).

Stimulací reesterifikace se mastné kyseliny zabudovávají zpět do molekul triacylglycerolů, a tím je zabráněno jejich uvolňování z adipocytu. Již bylo zmíněno, že mastné kyseliny jsou látky silně reaktivní a jejich vysoká koncentrace působí toxicky v mnoha tkáních včetně samotné tukové tkáně. Cyklus mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin tak slouží jako pufrovací mechanismus chránící před výkyvy v koncentraci mastných kyselin na úrovni tukové tkáně i celého organismu (Campbell et al., 1992).

Prázdné metabolické cyklování vede ke zvýšení energetického výdeje, neboť současně probíhající protichůdné reakce spotřebovávají energii ve formě ATP. Proto je tomuto ději věnována pozornost ve snaze využít jej při léčbě obezity. U cyklu mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin však zatím nebyl nalezen způsob stimulace dostatečně účinný na to, aby ovlivnil celkový energetický výdej.

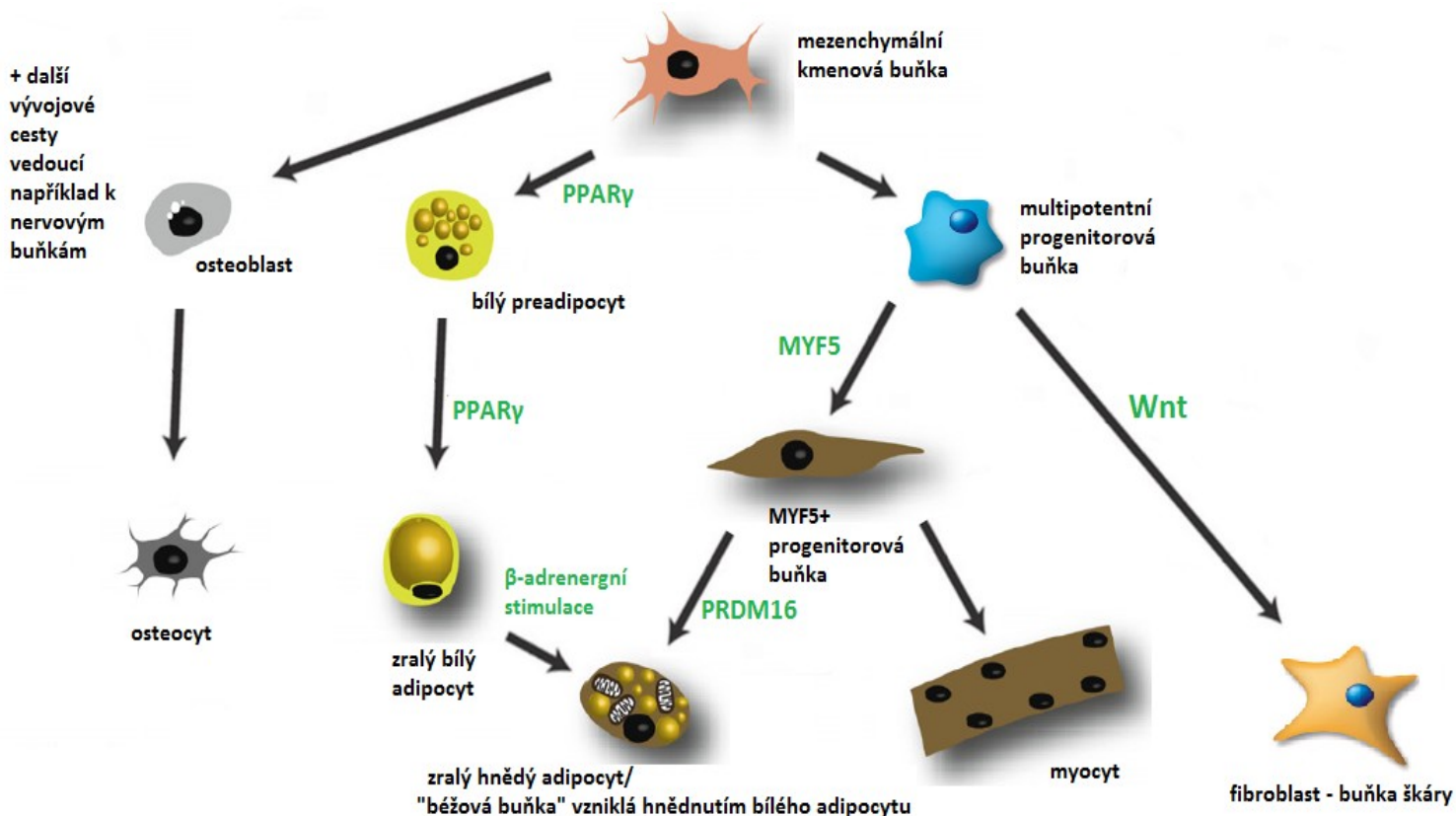
2.4 Hnědá tuková tkáň

I přes částečnou morfologickou podobnost se bílá a hnědá tuková tkáň navzájem liší svým původem a zejména funkcí. V hnědém tuku dochází k transformaci metabolické energie ve formě triacylglycerolů na teplo. Tato schopnost dovoluje některým živočichům žít v oblastech, kde by jinak zemřeli chladem, a jiným živočichům včetně člověka pomáhá regulovat tělesnou teplotu během prvních pár měsíců života. Hnědý tuk je tvořen multilokulárními adipocyty a hustou sítí vlásečnic a nervových vláken. Nervová vlákna zajišťují spojení tkáně se sympatickým nervovým systémem, zatímco kapiláry slouží k přívodu živin, kyslíku a k distribuci tepla do zbytku těla (Cannon et al., 1986).

Bílé i hnědé adipocyty vznikají z mezenchymálních kmenových buněk stejně jako myocyty, osteocyty, či například nervové buňky. V určitém stádiu embryogeneze část těchto kmenových buněk vytváří v dorzální části embrya neurální lištu, jejíž buňky mají schopnost migrovat po těle a diferenciovat v adipocyty (Billon et al., 2007). Tímto způsobem lokálně vznikají jednotlivá tuková depa, která lze v případě bílého tuku dělit na viscerální (útrobní) a subkutánní (podkožní). U myši je z viscerálního tuku nejvýznamnější gonadální tukové depo a ze subkutánního tuku dorzolumbální depo. Není zcela přesně známo, kdy dochází k rozdělení vývojových cest směřujících k unilokulárním a multilokulárním adipocytům. Je však známo, že u bílé tukové buňky je již od počátečního stádia vývoje exprimován PPAR γ (viz kapitola 3.3). Hnědé tukové buňky sdílejí stejnou vývojovou linii s myocyty a buňkami škáry⁷. Aktivací signální dráhy Wnt⁸ (Wingless/Int-1) jsou tyto multipotentní buňky přeměněny na buňky škáry, zatímco pro diferenciaci zbylých dvou druhů buněk je nutná aktivace exprese MYF5. Pro diferenciaci multilokulárních adipocytů je stěžejní protein PRDM16 (PR domain containing 16), který působí jako transkripční regulátor a jeho exprese inhibuje přeměnu kmenové buňky v myocyt (Obr. č. 3), (Seale et al., 2007).

⁷ Vrstva kůže tvořená pojivovou tkání. Ve škáře se vyskytují potní a mazové žlázy, vlasové folikuly a velké množství nervových zakončení umožňujících vnímat hmat a teplo.

⁸ Signální kaskáda sloužící zejména k buněčné diferenciaci při procesu embryogeneze. Podílí se však i na regeneraci diferenciováných tkání jako je například kostní dřev.



Obr. č. 3. Schéma vývoje bílých a hnědých adipocytů z mezenchymální kmenové buňky.

MYF5 - myogenic factor 5, PPAR γ - peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor gama, PRDM16 - PR domain containing 16, Wnt - Wingless/Int-1. Upraveno z (Koppen & Kalkhoven, 2010).

U savců se vyskytují dva různé typy tukové tkáně obsahující multilokulární adipocyty. První typ je hnědá tuková tkáň vznikající během embryogeneze, jak je popsáno výše. Druhý typ vzniká přeměnou z bílé tukové tkáně v reakci na stimulaci β -adrenergických receptorů. Z hlediska vývojové biologie se tato tkáň nedá označit jako pravý hnědý tuk. Je tvořena adipocyty, jež se v angličtině nazývají „beige cells“ (běžové buňky), popřípadě „brite cells“ (brite - brown in white - hnědý tuk v bílém tuku). Pokud jsou stimulovány, podobají se mitochondriím těchto buněk funkcí i proteinovou výbavou mitochondriím hnědých tukových buněk, které však tyto vlastnosti mají už v bazálním stavu (Petrovic et al., 2010). Hnědnutí bílého tuku vede ke zvýšení energetického výdeje díky schopnosti multilokulárních adipocytů transformovat energii získanou oxidací mastných kyselin na teplo, což staví „běžové buňky“ do středu pozornosti mnoha výzkumných týmů zabývajících se léčbou obezity.

Ve vnitřní mitochondriální membráně hnědých a „běžových“ adipocytů se vyskytují speciální proteinové kanály. Proteiny vytvářející tyto kanály se nazývají rozpřahovací proteiny (UCP; uncoupling proteins) a v různých organizmech jich bylo popsáno několik druhů. U hlodavců je za termogenezi v hnědém tuku zodpovědný protein UCP1. V prostoru mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou dochází k hromadění protonů, které sem aktivně transportují proteinové komplexy dýchacího řetězce a vytváří tak protonový gradient. Ten je následně využit k roztočení

intermembránové části proteinového komplexu ATP-syntázy, neboť protony se skrze komplex samovolně vracejí zpět do mitochondriální matrix. Rozpohybování této proteinové struktury je spřaženo s tvorbou ATP z ADP a anorganického fosfátu v další části ATP-syntázy umístěné uvnitř matrix (Boron & Boulpaep, 2012). UCP1 umožňuje návrat protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix, a tím dochází ke zkratování protonového gradientu. Vzniklá energie je tak místo tvorby ATP pouze uvolněna ve formě tepla. V hnědém tuku se vyskytuje velmi málo proteinových komplexů ATP-syntázy a primárním úkolem mitochondrií v této tkáni je tedy tvorba tepla a nikoliv ATP, jak je tomu ve všech ostatních tkáních (Houšťek et al., 1995).

3 PPAR

3.1 Obecné vlastnosti PPAR

PPAR patří do rodiny jaderných receptorů, které fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory regulující expresi řady genů. Tyto receptory jsou nezbytné pro buněčnou diferenciaci, vývoj a zejména pro regulaci metabolických drah v mnoha různých tkáních. PPAR byly identifikovány sérií experimentů, při kterých byly potkanům podávány různé chemikálie (léčiva, ftaláty, herbicidy), což mělo za následek jednak silné nádorové bujení, a také nárůst velikosti a množství peroxizomů v jaterních buňkách pokusných zvířat. Zároveň bylo objeveno, že užívané substance stimulují peroxizomální i mitochondriální β -oxidaci. Tento efekt je zprostředkován přes PPAR, které byly proto nazvány receptory aktivované proliferátory peroxizomů (Issemann & Green, 1990). Kromě zmiňovaných substancí mohou být PPAR aktivovány řadou endogenních ligandů. Patří mezi ně například polynenasycené mastné kyseliny, nebo leukotrieny a prostaglandiny, což jsou látky odvozené od mastných kyselin. Aktivace prostřednictvím mastných kyselin je mezi jadernými receptory značně neobvyklá a představuje přímé spojení mezi přijatými živinami a regulací genové exprese (Forman, Chen & Evans, 1997). PPAR se od ostatních jaderných receptorů liší také tím, že mohou být aktivovány množstvím různých nízkofinitních ligandů, zatímco například ke glukokortikoidnímu jadernému receptoru⁹ se váže pouze několik málo vysokoafinitních ligandů. Vazebné místo pro ligandy je proto u PPAR větší než u ostatních jaderných receptorů (Varga, Czimmerer & Nagy 2011).

PPAR regulují genovou expresi mechanismem zahrnujícím jaderný receptor RXR (retinoid X receptor). Poté co je PPAR aktivován ligandem, vytváří s RXR heterodimer, který následně interaguje s velkým komplexem koaktivátorů (např. PGC-1 α , PGC-1 β) a adaptorových proteinů umožňujících nasednutí heterodimeru na specifické úseky DNA zvané PPRE (PPAR response elements). Nasednutím heterodimeru PPAR/RXR na PPRE je aktivována transkripce cílových genů (Kliwer et al., 1992). U obratlovců se vyskytují tři typy PPAR: PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . Ty

⁹ Jaderný receptor vyskytující se téměř v každé buňce lidského těla, reguluje expresi genů, jejichž produkty ovlivňují metabolismus sacharidů, tuků i bílkovin a mají vliv na centrální nervovou soustavu a imunitní systém.

mohou být aktivovány stejnými ligandy, které se na receptory vážou s různou afinitou. Jednotlivé typy PPAR zastávají v organismu odlišné funkce a jejich exprese se v různých tkáních liší.

3.2 PPAR α

PPAR α je exprimován především v játrech a dále v ledvinách, v hnědém tuku, ve všech typech myocytů a v buňkách imunitního systému. Význam PPAR α spočívá především v jeho schopnosti regulovat peroxizomální a mitochondriální β -oxidaci. Je také nezbytný pro proces ketogeneze¹⁰, který slouží k zajištění přísunu energie do mozku během hladovění, díky čemuž je PPAR α považován za klíčový transkripční faktor. Některé studie naznačují, že tento jaderný receptor má také schopnost působit proti rozvoji zánětu (Delayre-Orthez et al., 2005).

Během hladovění dochází k aktivaci PPAR α jednak zvýšením hladiny mRNA tohoto receptoru a také prostřednictvím přirozených ligandů PPAR α , což jsou mastné kyseliny. Za nejúčinnější nesyntetické ligandy jsou považovány kyseliny dokosahexaenová a linolenová (Sanderson et al., 2008). Vyšší hladina mRNA pro PPAR α je způsobena zvýšením hladiny glukokortikoidů, ke kterému dochází při stresových situacích, jako je právě hladovění. Mimo to je hladina mRNA ovlivněna cirkadiálním rytmem ustanovujícím se v závislosti na stravovacích návycích jedince. U hlodavců, kteří konzumují potravu převážně v noci, je hladina mRNA pro PPAR α vyšší během dne, zatímco u lidí je hladina zvýšena v noci (Lemberger et al., 1996).

Aktivovaný PPAR α reguluje expresi genů spojených s transportem a oxidací mastných kyselin. Jeden z nejvýznamnějších enzymů, jehož exprese je takto ovlivňována je CPT1. Stimulací exprese CPT1 je zvýšen transport mastných kyselin přes mitochondriální membrány a tím je zvýšena i mitochondriální β -oxidace. Zároveň je stimulována ketogeneze, neboť při β -oxidaci vznikající acetylkoenzym A může být přeměněn na ketolátky, které jsou následně uvolněny do krevního řečiště a dopraveny do mozku. PPAR α v játrech stimuluje expresi genu pro FGF21 (fibroblast growth factor 21). Ten aktivuje lipolýzu v bílé tukové tkáni a tím uvolňuje mastné kyseliny jako zdroj energie pro ostatní orgány. Mezi další důležité geny, jejichž exprese je stimulována PPAR α patří rodina faktorů zajišťujících biogenezi peroxizomů (Pex1, Pex3, Pex5, Pex19, Pex26), (Rakhshandehroo et al., 2009). Stimulací jejich genové exprese dochází ke zvýšení obratu peroxizomální β -oxidace.

PPAR α je klíčový regulátor jaterního lipidového metabolismu a má tedy značný vliv na celotělovou energetickou homeostázu.

¹⁰ Proces, při kterém jsou v játrech vytvářeny produkty rozkladu mastných kyselin neboli ketolátky. Ketogeneze probíhá v případě, že organismus nemá dostatek glukózy a je nucen čerpat energii výhradně z lipidů.

3.3 PPAR γ

Dalším důležitým transkripčním faktorem z rodiny PPAR je PPAR γ . Syntetickým ligandem tohoto receptoru jsou léčiva thiazolidindiony (TZD), jež jsou užívána k léčbě inzulinové rezistence a diabetu mellitu druhého typu. PPAR γ je tedy přímo zodpovědný za regulaci hladin glukózy a mastných kyselin v krevním oběhu.

U savců existují dvě izoformy proteinu PPAR γ . Isoforma PPAR γ_1 se vyskytuje například v játrech, v hladkých a příčně pruhovaných svalech, či v buňkách sítnice. Isoforma PPAR γ_2 je exprimována téměř výhradně v tukové tkáni a u člověka je o 28 aminokyselin delší než PPAR γ_1 (Zhu et al., 1995). Tato práce se zabývá metabolickými pochody v tukové tkáni, proto zde bude dále probírána pouze izoforma PPAR γ_2 (Obr. č. 4).

PPAR γ v tukové tkáni zodpovídá za diferenciaci adipocytů. Zralé adipocyty vznikají z preadipocytů, což jsou nediferenciované fibroblasty tvořící základ vazivové tkáně. Diferenciace adipocytu se nazývá adipogeneze a vyžaduje přítomnost adipogenních transkripčních faktorů. Mezi nejdůležitější patří PPAR γ a C/EBP $\alpha/\beta/\delta$ (CCAAT-enhancer binding proteins alpha/beta/delta). PPAR γ nejvíce spolupracuje s C/EBP α a tyto faktory navzájem stimulují svoji expresi. Ani jeden z členů C/EBP rodiny však není pro adipogenezi zcela nezbytný (Wu et al., 1999). Myši s kompletní inaktivací genu pro PPAR γ vykazovaly naprostou ztrátu bílé i hnědé tukové tkáně, což bylo kompenzováno ukládáním triacylglycerolů v játrech. Tento experiment potvrdil, že exprese PPAR γ je nutná pro vznik zralé tukové buňky (Barak et al., 1999).

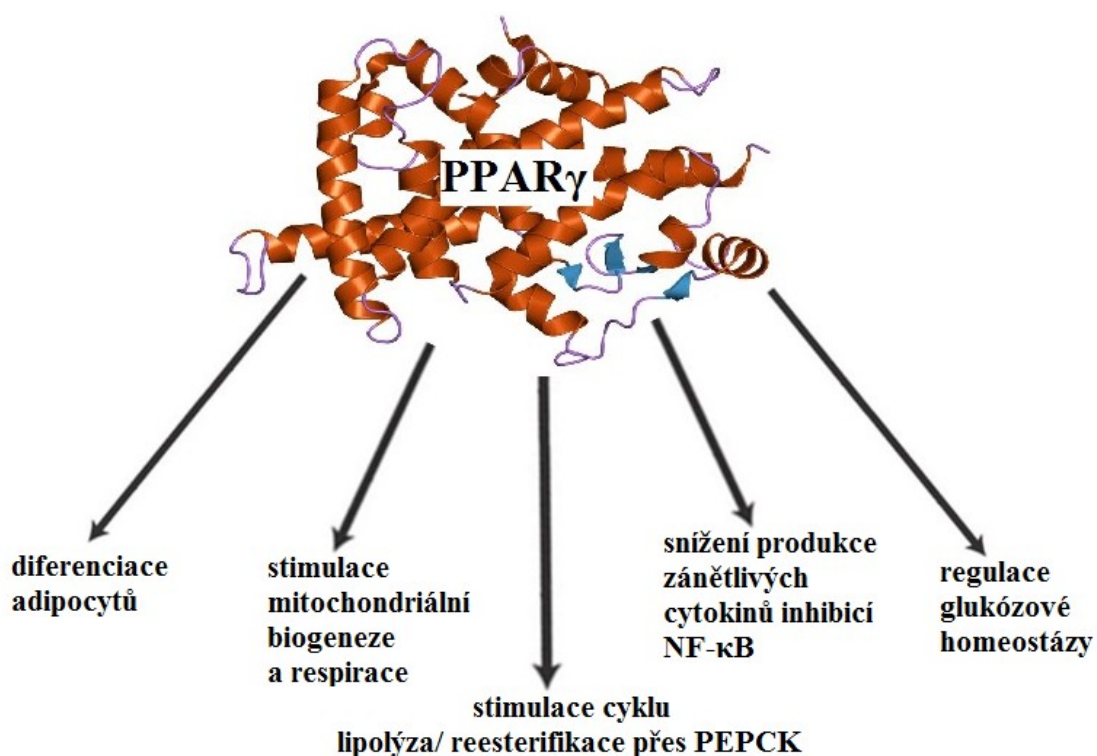
PPAR γ je exprimován v buňkách imunitního systému, kde má schopnost ovlivňovat zánětlivé procesy. Transkripční faktor NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) je zodpovědný za stimulaci genové exprese zánětlivých cytokinů, mezi které patří tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), nebo interleukiny 1, 6 a 12 (IL1, IL6, IL12). Zánětlivé cytokiny jsou sekretovány zejména makrofágy a jejich nadměrná produkce může vést k poškození tkání, k narušení metabolických procesů ve svalech a v tukové tkáni, či k rozvoji onemocnění jako je například ateroskleróza¹¹. Aktivovaný PPAR γ zvyšuje aktivitu enzymového komplexu působícího jako transkripční represor genů, jejichž exprese je pod kontrolou NF- κ B. PPAR γ tímto způsobem snižuje produkci zánětlivých cytokinů v buňkách imunitního systému (Pascual et al., 2005). V makrofázích navíc PPAR γ stimuluje sekreci protizánětlivých cytokinů, jako je například interleukin 10 (IL10) a také aktivitu jaderného receptoru LXR¹² (liver X receptor), (Odegaard et al., 2007). V endoteliálních buňkách a v buňkách hladké svaloviny byl popsán mechanismus, kterým PPAR γ inhibuje fosforylaci NF- κ B a tím znemožňuje jeho aktivaci. Díky tomu lze PPAR γ považovat za účinný regulátor rozvoje aterosklerózy (Takata et al., 2002).

¹¹ Chronický zánět, při kterém dochází k ukládání lipidů do stěny tepen, což vede k zhoršené průchodnosti cévy a ke snížení její elasticity.

¹² Jaderný receptor blíže příbuzný PPAR a RXR. Ovlivňuje metabolismus mastných kyselin a cholesterolu.

Aktivace PPAR γ prostřednictvím TZD v bílém tuku působí celotělové zvýšení inzulínové senzitivity. V buněčných kulturách adipocytů a v tukové tkáni myši, kterým bylo podáváno TZD došlo ke zvýšení exprese glukózového přenašeče GLUT4¹³(glucose transporter type 4), (Sugii et al., 2009). Vyšší exprese GLUT4 vypovídá o zvýšení množství inzulínových receptorů, což vede k usnadnění transportu glukózy do tukových buněk. V adipocytech těchto myši bylo navíc naměřeno výrazné zvýšení exprese IRS-1 (insulin receptor substrate 1) a zvýšená aktivita proteinkinázy B (Akt). Akt a IRS-1 jsou další z členů inzulínové signální kaskády. Akt je nezbytná pro translokaci glukózového přenašeče na plazmatickou membránu buňky a IRS-1 slouží jako adaptorový protein zprostředkovávající interakci mezi inzulínovým receptorem a dalšími enzymy, které s ním interagují. Snížená exprese genů pro tyto proteiny je jedním ze znaků inzulínové rezistence (Rondinone et al., 1997).

Aktivace PPAR γ reguluje genovou expresi mnoha genů, mezi které patří i UCP1. Tímto způsobem PPAR γ ovlivňuje funkci mitochondrií v tukové tkáni, což má značný vliv na metabolismus mastných kyselin (Laplante et al., 2003).



Obr. č. 4. Schéma funkcí PPAR γ v tukové tkáni a buňkách imunitního systému.

NF- κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,

PEPCK - fosfoenolpyruvátcarboxykináza, PPAR γ - peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor gama.

¹³ Glukózový transportér exprimován převážně v tukové tkáni a v příčně pruhované svalovině. Jedná se o mezimembránový proteinový kanál, jehož propustnost je regulována inzulínem.

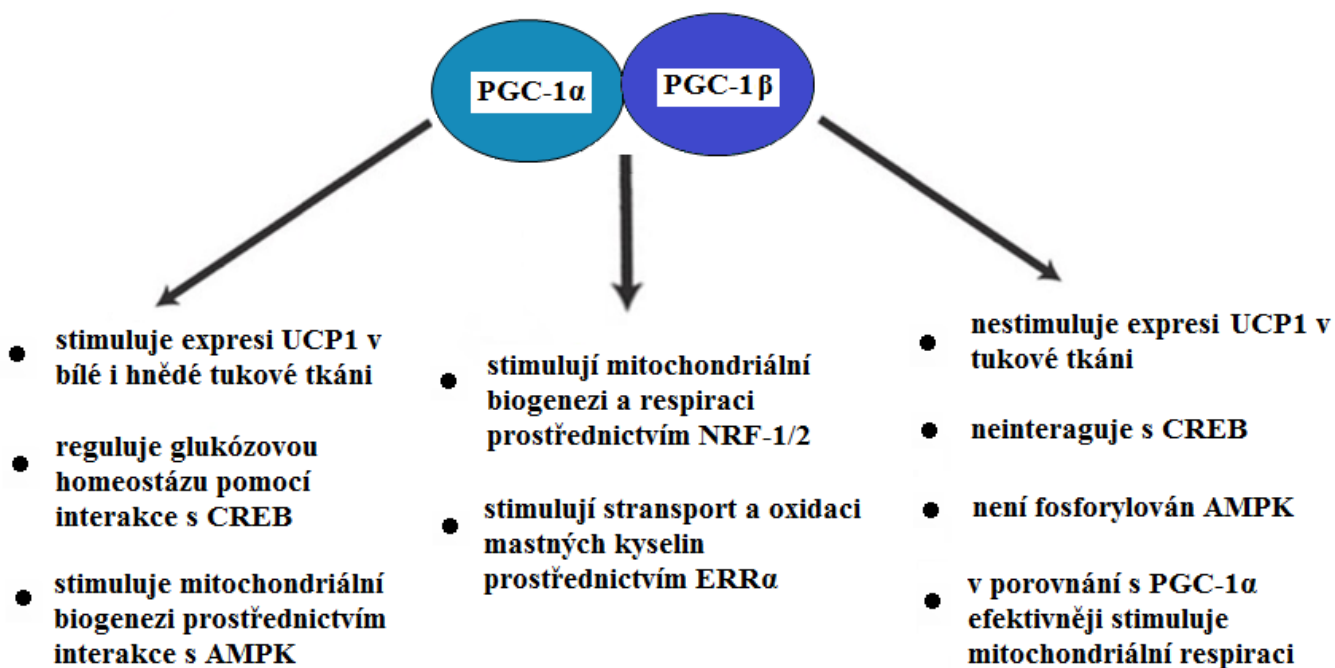
3.4 Transkripční koaktivátory PGC-1

Transkripční aktivace genů regulovaných PPAR vyžaduje přítomnost koaktivátorů. V případě PPAR γ jsou klíčové koaktivátory PGC-1, které jsou z velké části zodpovědné za regulaci mitochondriálních respiračních funkcí a za řízení procesu mitochondriální biogeneze v metabolicky aktivních tkáních. Do této skupiny patří PGC-1 α , PGC-1 β a náleží sem i protein PRC (PGC-1 related coactivator). PRC interaguje se stejnými transkripčními faktory jako PGC-1, jeho afinita se však v některých případech značně liší. Tento rozdíl je patrný zejména v případě interakce s PPAR γ (Vercauteren, Gleyzer, & Scarpulla, 2008). U PRC je hladina mRNA zvýšená v proliferačních buňkách zatímco u buněk, kde byl růst zastaven, dochází k jejímu snížení, což svědčí o interakci PRC s růstovými faktory (Vercauteren et al., 2006). U PGC-1 se hladina mRNA mění v reakci na fyziologické podněty, jako je například β -adrenergní stimulace a představují tak spojovací článek mezi vlivy vnějšího prostředí a regulací genové exprese.

PGC-1 α a PGC-1 β sdílejí řadu sekvenčních motivů a mohou tedy regulovat expresi stejných genů. Oba koaktivátory jsou silně exprimovány v tkáních, které obsahují velké množství mitochondrií a to zejména v hnědé tukové tkáni a v srdečním a příčně pruhovaném svalu. PGC-1 stimuluje expresi transkripčních faktorů NRF-1 a NRF-2 (nuclear respiratory factor 1, 2). NRF ovlivňují geny stimulující buněčný růst a replikaci mitochondriální DNA. NRF také přímo regulují expresi genů, jejichž produkty hrají důležitou roli v procesu mitochondriální respirace, z nichž nejvýznamnější jsou podjednotky cytochrom c oxidázy. Transkripční faktor ERR α (estrogen related receptor alpha) je rovněž pod kontrolou PGC-1. ERR α reguluje expresi genů, které se účastní transportu a metabolismu mastných kyselin, či mitochondriální respirace (Huss et al., 2004).

I přes značnou sekvenční podobnost a schopnost regulovat expresi stejných genů se PGC-1 α od PGC-1 β z funkčního hlediska mírně liší (Obr. č. 5). PGC-1 α byl identifikován jako transkripční faktor účastnící se procesu chladové adaptace. Zvýšení exprese PGC-1 α pozitivně koreluje se zvýšením exprese genu pro UCP1, který hraje při chladové adaptaci u hlodavců zcela klíčovou roli (Puigserver et al., 1998). Ke zvýšení exprese UCP1 vlivem PGC-1 α při chladové adaptaci navíc dochází v hnědé i v bílé tukové tkáni. β -adrenergní stimulace v důsledku chladové expozice vede u PGC-1 α v hnědém tuku ke zvýšení genové exprese i množství proteinu, zatímco v případě PGC-1 β nebyl zaznamenán žádný signifikantní nárůst (Lin et al., 2002). PGC-1 α významně ovlivňuje celotělovou glukózovou homeostázu prostřednictvím interakce s transkripčním faktorem CREB (cyclic AMP response element-binding protein) v játrech. Při hladovění dochází v játrech k nárůstu hladiny PGC-1 α , což stimuluje zvýšení exprese genů spojených s procesem glukoneogeneze¹⁴. U myši s celotělovou deficiencí CREB, která způsobuje poruchu glukoneogeneze, byla zvýšením exprese PGC-1 α obnovena schopnost regulovat

¹⁴ Proces, ke kterému dochází při dlouhodobém hladovění. V játrech se vytváří glukóza z necukerných prekurzorů, jako je například laktát a glukogenní aminokyseliny za účelem udržení stabilní hladiny glukózy v krvi.



Obr. č. 5. Schéma společných funkcí a vzájemných rozdílů mezi koaktivátory PGC-1α a PGC-1β. AMPK - AMP-aktivovaná proteinkináza, CREB - cyclic AMP response element-binding protein, ERRα - estrogen related receptor alpha, NRF-1/2 - nuclear respiratory factor 1/2, PGC-1α/β - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha/beta, UCP1 - rozpráhovací protein 1.

glukózovou homeostázu (Herzig et al., 2001). Vliv PGC-1β na glukoneogenezi je však zanedbatelný, neboť zde nedochází k asociaci s transkripčními faktory interagujícími s CREB (Lin et al., 2003).

Experiment, při kterém byla měřena spotřeba kyslíku a membránový potenciál v kulturách myoblastů exprimujících buď PGC-1α, PGC-1β, nebo žádný z koaktivátorů, ukázal, že PGC-1α i PGC-1β stimulují mitochondriální respiraci. V kulturách s expresí jednoho z koaktivátorů, byl naměřen vyšší průtok protonů z mezimembránového prostoru zpátky do mitochondriální matrix (proton leak). U buněk s expresí PGC-1α docházelo k návratu protonů podstatně více než v případě PGC-1β, což poukazuje na rozdíl efektivity jednotlivých koaktivátorů při stimulaci respirace (St-Pierre et al., 2003). K rozdílům mezi oběma koaktivátory patří i způsob jejich aktivace. Například AMPK v příčně pruhovaném svalu efektivně stimuluje nárůst množství mitochondrií prostřednictvím PGC-1α, ale ne přes PGC-1β (Jäger et al., 2007).

Při studiu funkčních rozdílů a vzájemných vztahů mezi PGC-1α a PGC-1β lze s výhodou využít buněčné a zvířecí modely, u kterých je jeden z koaktivátorů deaktivován.

3.5 Celotělová inaktivace PGC-1 β

Kvůli sekvenční a funkční podobnosti byly PGC-1 α a PGC-1 β značnou dobu považovány za tentýž transkripční koaktivátor nazývaný PGC-1. Po identifikování PGC-1 β se objevila řada studií zabývajících se rozdíly mezi oběma transkripčními faktory. Celotělová inaktivace PGC-1 α i PGC-1 β vede u myši k tvorbě defektů v metabolicky aktivních tkáních. Navzdory tomu jsou však takto postižení jedinci životaschopní a mohou se rozmnožovat. V případě inaktivace PGC-1 β bylo v kosterním a srdečním svalu pozorováno snížení množství mitochondrií, zatímco v hnědém tuku nedošlo k žádné signifikantní změně (Lelliott et al., 2006). Měření spotřeby kyslíku u myocytů z lýtkového svalu (*musculus soleus*) ukázalo, že u jedinců s celotělovou inaktivací PGC-1 β dochází kromě snížení množství organel také k redukci mitochondriální respirace. U zvířat s inaktivací PGC-1 β byla v bílé i v hnědé tukové tkáni naměřena zvýšená exprese PGC-1 α , což svědčí o kompenzačním efektu koaktivátorů. V hnědé tukové tkáni byla naměřena snížená exprese genů spojených s elektronovým transportním řetězcem. Mezi tyto geny patří například cytochrom c a 5b podjednotka cytochrom c oxidázy. Zvýšením exprese PGC-1 α tedy nelze zcela kompenzovat ablací PGC-1 β , ačkoliv tento efekt může přispívat k udržení standardního množství mitochondrií v hnědém tuku.

Ve studii pracující s kulturami lidských adipocytů byla vyšší exprese PGC-1 α asociována s hnědnutím bílých tukových buněk v důsledku zvýšení exprese UCP1 (Tiraby et al., 2003). V experimentech prováděných na myším modelu s celotělovou inaktivací PGC-1 β však kompenzační zvýšení PGC-1 α nebylo dostačující k vyvolání obdobného fenotypu. V jiné studii byla zvířata krmena dietou s vysokým obsahem tuku (Sonoda et al., 2007). Konzumace diety s vysokým obsahem tuku vedla u PGC-1 β deficientních jedinců k ukládání triacylglycerolů v játrech v podstatně větší míře než u kontrolních myši, přestože spotřeba potravy i tělesná hmotnost se téměř nelišily. Další studie prováděná na myším modelu s celotělovou ablací PGC-1 β se soustředila na vliv diety s vysokým obsahem tuku na inzulínovou citlivost. Přestože glukózový toleranční test¹⁵ neodhalil žádné signifikantní rozdíly mezi dvěma genotypy, inzulínová citlivost v játrech byla u myši s inaktivací PGC-1 β výrazně snížena a docházelo u nich k ukládání triacylglycerolů v játrech ve větší míře než u kontrolních jedinců (Vianna et al., 2007). U kosterního svalu bylo sníženo množství mitochondrií a také exprese genů, jejichž produkty se účastní mitochondriální respirace. K ektopickému ukládání triacylglycerolů ve svalech nedocházelo a inzulínová senzitivita této tkáně nebyla nijak ovlivněna.

Při akutní chladové expozici byla u myši s celotělovou inaktivací PGC-1 β již po několika hodinách naměřena výrazně nižší tělesná teplota ve srovnání s jedinci bez tohoto defektu. Hladiny genové exprese UCP1 se však mezi genotypy signifikantně nelišily. Výrazné rozdíly nebyly pozorovány v tělesné hmotnosti, v příjmu potravy ani v množství hnědé tukové tkáně. Analýza

¹⁵ Metoda sloužící ke stanovení míry glukózové tolerance. Provádí se zpravidla nalačno a porovnávají se při ní hodnoty glykémie před a po pozření určitého množství glukózy.

spotřeby kyslíku v kosterním svalu rovněž nepotvrdila žádné signifikantní rozdíly mezi dvěma genotypy a podstata zvýšené citlivosti k chladovému stresu tak nebyla objasněna (Sonoda et al., 2007). Podobnou reakci na chladovou expozici lze pozorovat u myši s inaktivací UCP1, u kterých klesá význam hnědého tuku jako hlavního orgánu netřesové termogeneze. V bílém tuku těchto zvířat byla detekována vyšší spotřeba kyslíku a vyšší úroveň oxidace mastných kyselin, zatímco v kosterním svalu byly rozdíly nepatrné (Ukropec et al., 2006).

Zmíněné studie odhalily, že PGC-1 β hraje klíčovou roli v procesu mitochondriální biogeneze, respirace a významně ovlivňuje metabolismus mastných kyselin v játrech. Kompenzační zvýšení exprese PGC-1 α není dostačující k plné náhradě těchto funkcí.

3.6. Inaktivace PGC-1 β v tukové tkáni

Inaktivace PGC-1 β pouze v tukové tkáni umožňuje zaměřit se na funkce, které koaktivátor v tkáni zastává, zatímco genová výbava v ostatních tkáních zůstává kompletní. Ve studiích zabývajících se celotělovou inaktivací bylo zjištěno, že absence PGC-1 β snižuje efektivitu mitochondriální respirace v bílé i ve hnědé tukové tkáni.

Ve studii pracující s myším modelem bylo inaktivace genu pro PGC-1 β v bílé a hnědé tukové tkáni dosaženo prostřednictvím enzymu Cre rekombinázy exprimované pod promotorem aP2 (adipocyte protein 2), který je specifický pro tukovou tkáň, ale je exprimován i v makrofázích (viz kapitola 5.1). Tato studie byla zaměřena na zkoumání vlivu PGC-1 β na mitochondriální respiraci a biogenezi v adipocytech a dále na charakterizaci vztahu tohoto koaktivátoru k inzulinové citlivosti a k mechanismu působení léčiv TZD (Enguix et al., 2013). Výsledky ukázaly, že inaktivace PGC-1 β v tukové tkáni vede ke snížení účinnosti mitochondriální respirace v důsledku snížení množství enzymů, jako je například citrát syntáza a cytochrom c oxidáza. Na systémové úrovni však nebyly pozorovány žádné metabolické defekty kromě zvýšeného množství hnědé tukové tkáně, které bylo u zvířat se specifickou delecí o 30% více v porovnání s kontrolními jedinci.

4 Hypotézy a cíle práce

Experimenty popisované v této diplomové práci byly prováděny na myším modelu se specifickou inaktivací genu pro PGC-1 β v bílém a hnědém tuku. Primárním cílem bylo zjistit jaká je úloha mitochondriální biogeneze v aktivaci prázdného metabolického cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin v gonadálním tukovém depu. Pro aktivaci prázdného cyklování byla použita chladová expozice nebo stimulace pomocí diety s vysokým obsahem tuku obohacené o *n*-3 PUFA.

4.1. Hypotézy

Vliv chladové expozice na myši s celotělovou inaktivací genu pro PGC-1 β byl zkoumán několika výzkumnými týmy (Lelliott et al., 2006; Sonoda et al., 2007). Výsledky chladové expozice prováděné na myším modelu s inaktivací PGC-1 β pouze v tukové tkáni však dosud nebyly publikovány. V chladu dochází u dorzolumbálního tukového depa k hnědnutí bílé tukové tkáně, což je provázeno zvýšením genové exprese i množství proteinu UCP1 (Wu et al., 2013). Studie prováděná v naší laboratoři prokázala, že během chladové expozice je u myši v gonadálním tukovém depu indukováno prázdné metabolické cyklování mezi lipolýzou triacylglycerolů a reesterifikací mastných kyselin (Flachs et al., 2017). Chladová expozice obecně stimuluje mitochondriální biogenezi v hnědém tuku a v kosterním svalu a také proces mitochondriální respirace v bílém tuku i v dalších metabolicky aktivních tkáních.

Výsledky experimentů prováděných v naší laboratoři ukazují, že vlivem kombinace *n*-3 PUFA a kalorické restrikce dochází u myši krmených dietou s vysokým obsahem tuku ke snížení hmotnostního přírůstku, adipozity a množství lipidových metabolitů v plazmě (Flachs et al., 2011). Kalorická restrikce stimuluje sympatický nervový systém, čímž aktivuje β -adrenergní receptory v tukové tkáni a *n*-3 PUFA fungují jako ligand PPAR γ .

4.2 Specifické cíle práce

- 1) Popsat vliv chladové expozice na fenotyp myši se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v bílé a hnědé tukové tkáni.
- 2) Na úrovni genové exprese popsát účinek delece PGC-1 β na indukci prázdného metabolického cyklování v gonadálním tukovém depu v termoneutrálním prostředí a během chladové expozice.
- 3) Zjistit zda dochází v hnědé tukové tkáni ke kompenzaci delece PGC-1 β na úrovni genové exprese, popřípadě na úrovni proteinu.

- 4) Popsat účinek diety s vysokým obsahem tuku obohacené o *n*-3 PUFA v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí na celotělový metabolismus a na indukci prázdného metabolického cyklování v gonadálním tukovém depu u myši s delecí PGC-1 β .

5 Materiál a metody

5.1 Myší model s inaktivací PGC-1 β v tukové tkáni

Ve všech experimentech zmiňovaných v této práci byly použity myši z kmene C57BL/6J, u kterých byl gen pro PGC-1 β deaktivován pomocí Cre/loxP rekombinázového systému (Orban, Chui, & Marth, 1992). C57BL/6J je inbrední myší kmen často používaný ve studiích zaměřených na energetický metabolismus, neboť tato zvířata mají sklon k rozvoji dietou indukované obezity a inzulínové rezistence (Black et al., 1998). Pro inaktivaci genu pro PGC-1 β je nutno kódující úsek DNA ohraničit dvěma loxP (locus of X-over P1), což jsou sekvence o velikosti 34 párů bází, na kterých dochází k vazbě Cre rekombinázy. Tento enzym inaktivuje gen pro PGC-1 β prostřednictvím homologní rekombinace úseku DNA v oblasti mezi loxP, čímž dojde k vystřížení kódující sekvence. Do myšího genomu jsou loxP zaneseny procesem rekombinace mezi cílovým úsekem DNA a genovým vektorem zkonstruovaným ze sekvencí bakteriální DNA. Výsledkem této rekombinace je ohraničení sekvence kódující gen pro PGC-1 β . Pro inaktivaci genu pouze v tukové tkáni je nutné, aby Cre rekombináza byla exprimována pod promotorem specifickým pouze pro tukovou tkáň. U zvířat užitých v této práci byl enzym exprimován pod adiponektinovým¹⁶ promotorem, který je narozdíl od promotoru aP2 specifický pouze pro tukovou tkáň.

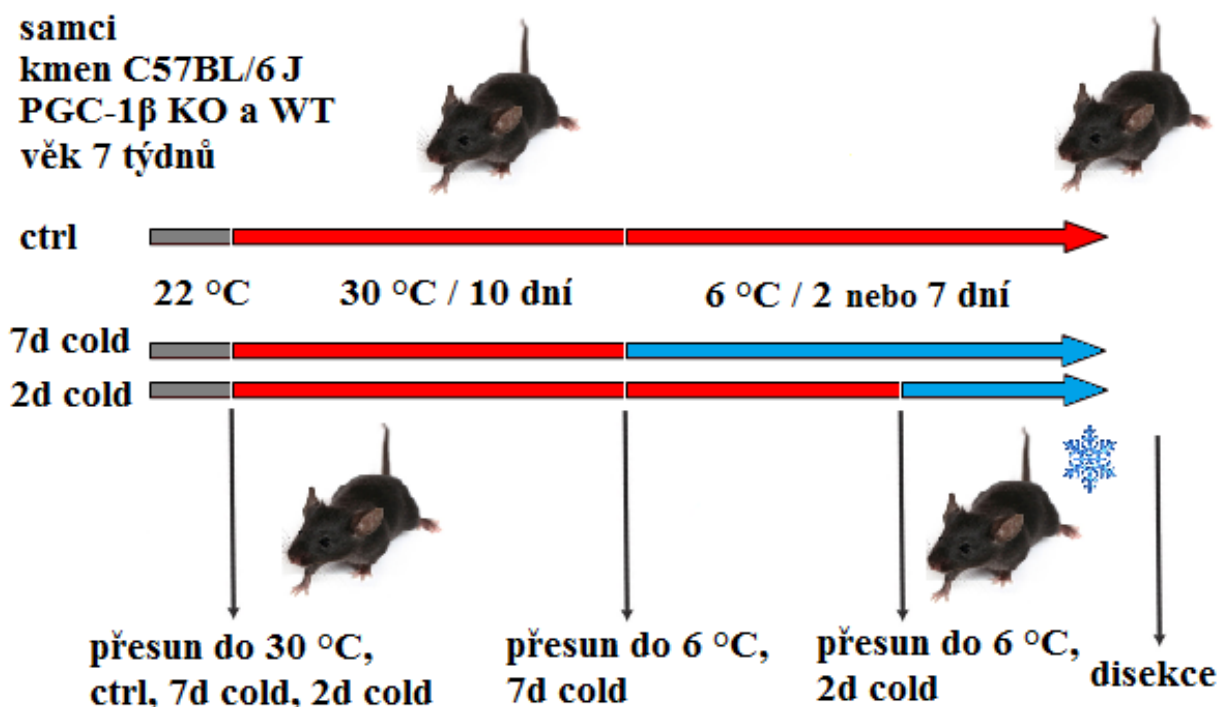
Pro vytvoření heterogenní populace byli samci, u kterých je exprimována Cre rekombináza a loxP zaneseny do genomu, připuštěni k samicím, u kterých k expresi rekombinázy nedochází, ale gen pro PGC-1 β je ohraničen loxP. Tímto způsobem je vytvořena populace, v níž se se stejnou pravděpodobností vyskytují jedinci s expresí rekombinázy, u nichž je PGC-1 β inaktivován (KO), a bez exprese rekombinázy, u nichž se genový produkt vytváří (WT).

5.2. Přehled experimentů - chladová expozice

Experiment zabývající se chladovou expozicí byl v rámci této studie celkem třikrát zopakován a pro jednotlivé pokusy byly vytvořeny pracovní názvy CE K1, CE K2 a CE K3. V experimentech byli použiti samci z kmene C57BL/6J, v jejichž bílé a hnědé tukové tkáni je, popřípadě není inaktivován gen pro PGC-1 β . Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, inaktivace genu je závislá na tom, zdali v tkáních je (KO), či není (WT) exprimována Cre rekombináza. Všechna zvířata byla krmena standardní dietou (Ssniff Spezialdiäten, Německo), měla neustále neomezený přístup k vodě a k potravě a po celou dobu experimentu měla dvanáctihodinový světelný režim. Po odstavení byly myši umístěny ve skupinách po třech do jedné klece, a dokud nedosáhly stáří sedmi týdnů, zůstaly v místnosti s teplotou 22 °C. Následně byla všechna zvířata přemístěna do místnosti s teplotou 30 °C, což u myši odpovídá termoneutrální zóně, a v této teplotě zůstala po dobu deseti dnů. V prvních dvou

¹⁶ Adiponektin je proteinový hormon produkovaný v adipocytech. Stimuluje oxidaci mastných kyselin v kosterním svalu, snižuje produkci reaktivních forem kyslíku, zvyšuje sekreci protizánětlivých interleukinů a ovlivňuje řadu dalších procesů.

experimentech (CE K1, CE K2) byly myši rozděleny na tři skupiny, z nichž jedna zůstala ve 30 °C po celou dobu experimentu (ctrl), druhá skupina byla umístěna na 48 hodin do místnosti s teplotou 6 °C (2d cold) a třetí skupina byla do chladové místnosti umístěna na 7 dní (7d cold), (Obr. č. 6). Zvířata byla rozdělena do skupin podle tělesné hmotnosti na počátku pokusu tak, aby se průměrné hmotnosti ve skupinách nelišily. V každé skupině byla polovina myši s inaktivací genu pro PGC-1 β a polovina bez inaktivace. Celkem tak bylo vytvořeno 6 podskupin (ctrl KO, ctrl WT, 2d cold KO, 2d cold WT, 7d cold KO, 7d cold WT). V experimentu CE K1 bylo použito 31 zvířat, což odpovídá množství 4-6 myši na jednu podskupinu. V CE K2 bylo použito 61 zvířat, což odpovídá množství 8-12 myši v jedné podskupině. V experimentu CE K3 byla zvířata rozdělena pouze na dvě skupiny, z čehož první zůstala ve 30 °C (ctrl) a druhá skupina byla umístěna do chladu na 7 dní (7d cold). V pokusu se tak pracovalo se čtyřmi podskupinami (ctrl KO, ctrl WT, 7d cold KO, 7d cold WT) a celkem bylo použito 36 myši, což odpovídá množství 9 myši v jedné podskupině. V CE K3 byla zvířata během experimentu každý den vážena a byla jim denně měřena spotřeba potravy. U vzorků z tohoto pokusu se plánuje měřit obrat cyklování triacylglycerolů a mastných kyselin v tukové tkáni pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie (viz kapitola 5.8). 48 hodin před ukončením experimentu byl proto myším injikován fyziologický roztok obsahující deuterium (^2H) a pitná voda jim do konce experimentu byla vyměněna za 5% roztok těžké vody (oxid deuteria; $^2\text{H}_2\text{O}$).



Obr. č. 6. Obecné schéma experimentu - chladová expozice.

V chladové místnosti byly myši chovány v klecích po třech, což je standardní počet používaný v naší laboratoři u experimentů zaměřených na chladovou expozici (Flachs et al., 2017). Myši

chované po jednom jsou kromě chladového stresu zbytečně vystaveny také stresu sociálnímu a více než tři zvířata společně vytvářejí příliš mnoho tepla. Experiment byl ukončen usmrcením pokusných zvířat prostřížením hrdla v éterové narkóze. Všechny myši byly usmrceny v dopoledních hodinách. U všech experimentů byly odebírány vzorky krve, gonadálního a dorzolumbálního tukového depa a hnědé tukové tkáně. V experimentu CE K3 byly navíc odebrány vzorky jater a kosterního svalu (*musculus quadriceps*). Hmotnosti myši, jednotlivých orgánů a tkání byly zaznamenány a vyhodnoceny. Všechny odebrané tkáně vyjma vzorků krve byly okamžitě uloženy do tekutého dusíku a následně skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky krve byly po odebrání uchovány na ledu v mikrokumavkách s $5\mu\text{l}$ $0,5\text{ M}$ roztoku EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová), který zabraňuje srážení krve. Krev byla poté centrifugována při 4492 g po dobu 10 minut ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně byla ze vzorků odebrána krevní plazma a uložena při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

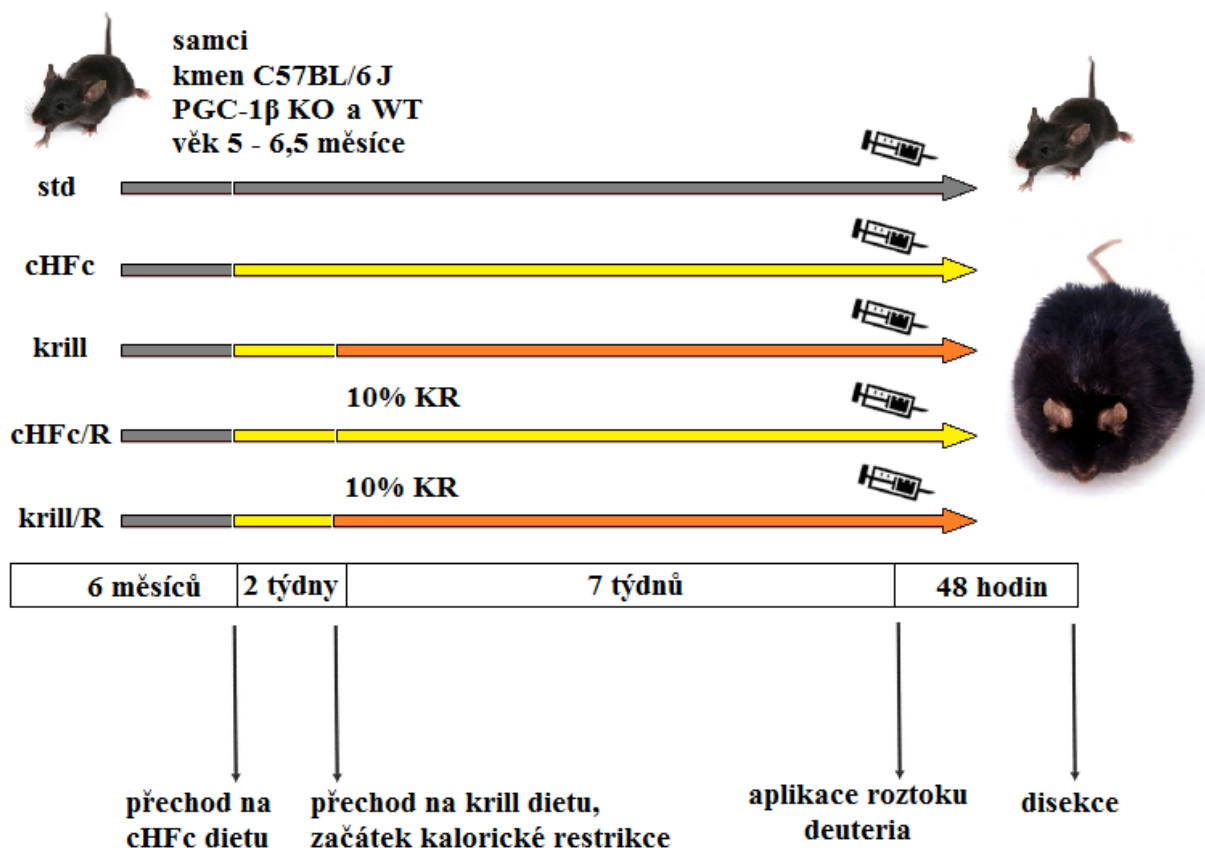
5.3. Přehled experimentu - kalorická restrikce

Experiment zaměřený na účinky kalorické restrikce a diety s obsahem *n*-3 PUFA byl v této studii proveden jednou s pracovním názvem R K1. Myši na začátku tohoto pokusu byly ve věku od pěti do šesti a půl měsíců, a byly rozděleny podle tělesné hmotnosti rovnoměrně do pěti skupin, ve kterých byl vždy stejný počet jedinců od obou genotypů (KO a WT). První skupina (std) byla krmena standardní dietou (Ssniff Spezialdiäten, Německo), druhá skupina (cHFc) byla krmena dietou s vysokým obsahem tuku a třetí skupina (krill) byla krmena dietou s vysokým obsahem tuku obohacenou o *n*-3 PUFA ve formě triacylglycerolů původem z drobných antarktických korýšů (Olympic Seafood, Norsko), (Tab. č. 1). Zvířata ve čtvrté (cHFc/R) a páté (krill/R) skupině byla krmena stejnými dietami jako druhá a třetí skupina, ale množství potravy, které jim bylo podáváno bylo o 10% menší. Celkem se tedy pracovalo s deseti podskupinami zvířat (std KO, std WT, cHFc KO, cHFc WT, krill KO, krill WT, cHFc/R KO, cHFc/R WT, krill/R KO, krill/R WT) a bylo zde použito 104 myších samců, což odpovídá množství 9-12 myši v jedné podskupině. Celý dietní experiment trval sedm týdnů, během kterých byly chovány v teplotě $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při dvanáctihodinovém světelném režimu.

druh diety	std	cHFc	krill (cHFc + <i>n</i> -3 PUFA)
charakteristika diety	standardní dieta	dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje	dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje a s přidavkem <i>n</i> -3 PUFA
hrubá energetická hodnota [kJ/100g]	1660	2060	2060
proteiny [%]	20	21	21
lipidy [%]	6	32	32
z toho <i>n</i> -3 PUFA [% z celkových lipidů]	0	0	16
sacharidy [%]	42	33	33
vláknina [%]	32	14	14
složení diety [1000 g]	R/M-H V1536-000 (Ssniff Spezialdiäten)	370,8 g standardní diety R/M-H, 315,2 g Sunaru, 9,3 g kukuřičného škrobu (Maizena), 231,8 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 73 g kaseinu	370,8 g standardní diety R/M-H, 315,2 g Sunaru, 9,3 g kukuřičného škrobu (Maizena), 159 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 73 g kaseinu, 72,8 g extraktu z koryšů (Olympic Seafood)

Tab. č. 1. Složení diet a procentuální zastoupení jednotlivých živin v celkovém energetickém obsahu.

Po dobu dvou týdnů před začátkem experimentu byla zvířatům ve skupinách cHFc, krill, cHFc/R a krill/R podávána dieta s vysokým obsahem tuku. Skupina cHFc na této dietě zůstala, zatímco třem ostatním skupinám byla v prvním týdnu experimentu dieta změněna nebo jim byla zavedena desetiprocentní kalorická restrikce. Množství potravy pro myši ve skupinách cHFc/R a krill/R bylo každý týden upravováno tak, aby odpovídalo množství potravy zkonsumované zvířaty ve skupinách bez restrikce. Z důvodu přesného měření spotřeby potravy byly myši umístěny do klecí po jednom. Hmotnost myši byla zaznamenávána jednou týdně ve stejný čas po dobu sedmi týdnů. 48 hodin před ukončením experimentu byl stejně jako v pokusu CE K3 zvířatům injikován fyziologický roztok obsahující deuterium a jejich pitná voda byla nahrazena 5% roztokem těžké vody (viz kapitola 5.8).



Obr. č. 7. Obecné schéma experimentu - kalorická restrikce. KR - kalorická restrikce.

Experiment byl ukončen usmrcením myši prostřížením hrdla v éterové narkóze (Obr. č. 7). Všechna zvířata byla usmrcena v ranních hodinách a měla až do konce experimentu přístup k potravě (myši ve skupinách cHFc/R a krill/R před usmrcením dostaly svůj denní příděl potravy). Myším byly odebrány vzorky krve, gonadálního a dorzolumbálního tukového depa a hnědé tukové tkáně. Ihned po usmrcení byla myším pomocí glukometru (Lifescan, USA) změřena glykémie z krve odebrané z krčních cév po prostřížení hrdla. Vzorky tkání byly okamžitě uloženy do tekutého dusíku a následně skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky krve byly zpracovány stejným způsobem jako při experimentech s chladovou expozicí a byla z nich odebrána krevní plazma, která byla uložena při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 Genotypizace experimentálních zvířat

Genotyp myši použitých v experimentech byl určen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR; polymerase chain reaction), kde byl specifický úsek DNA namnožen a následně detekován pomocí elektroforetické separace. Prvním krokem byla izolace DNA ze vzorku tkáně. Zvířatům byl odstřížen malý kousek ušního boltce, ke kterému bylo v mikrozkušavce přidáno $300\text{ }\mu\text{l}$ 50mM NaOH a směs byla inkubována v termobloku 10 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno $25\text{ }\mu\text{l}$ 1 M

Tris-HCl (trishydroxymethylaminometan, pH 8, upraveno HCl). Následně bylo 0,5 μ l z každého vzorku odebráno do reakční směsi (Tab. č. 2).

složka reakční směsi	objem na jeden vzorek [μ l]
redestilovaná voda	7,3
10x pufr	1,25
dNTP mix	0,25
Adipo Q 5' primer	0,65
Adipo Q 3' primer	0,65
PERC 5' primer	0,65
PERC 3' primer	0,65
TAG polymeráza	0,25
DNA	0,5
celkový objem	11,65

Tab. č. 2. Složení reakční směsi pro PCR používané při určování genotypu ze vzorku tkáně.

Reakce probíhala na přístroji TGradient (Biometra, Německo). Jednotlivé fáze reakce jsou zde vypsány (Tab. č. 3).

fáze reakce	teplota [$^{\circ}$ C]	doba udržování teploty [s]
počáteční denaturace	94	120
amplifikace (30 cyklů)		
denaturace	94	30
annealing (nasedání primerů)	58	30
elongace	72	90
konečná elongace		
elongace	72	420

Tab. č. 3. Fáze PCR na přístroji TGradient při určování genotypu ze vzorku tkáně.

Po PCR následovala elektroforetická separace na 1,2 % agarózovém gelu. Součástí gelu jsou 1x TBE pufr (Tris/kyselina boritá/EDTA), agaróza a 5 μ l interkalačního barviva GelRed (Biotum, USA). TBE pufr se používá také k zalití gelu během elektroforézy. Do mikroskopických obsahujících PCR produkt

bylo přidáno 3 μ l vkladacího pufru (loading buffer). Pro určení molekulové hmotnosti PCR produktu po separaci bylo do jedné jamky místo vzorku napipetováno 9,6 μ l DNA markeru. Elektroforéza probíhala po dobu přibližně 2 hodin při napětí 60 V. Po ukončení elektroforézy byly na gelu detekovány proužky odpovídající DNA fragmentům, které se stanou viditelné po ozáření gelu UV lampou. Dva proužky jsou patrné u jedinců s expresí Cre rekombinázy (KO) a jeden proužek je patrný ve vzorcích jedinců bez exprese enzymu (WT).

5.5 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita metoda Guanidium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce (Chomczynski & Sacchi, 1987). Všechny kroky probíhaly za pokojové teploty s výjimkou centrifugací, které probíhají při teplotě 4 °C. Z důvodu ochrany RNA před ribonukleázami byl celý postup prováděn v části laboratoře vyhrazené pro tuto metodu a s užitím pipet určených pouze pro práci s RNA. Vzorky pro izolaci byly uchovávány v tekutém dusíku, nebo při teplotě -70 °C. Zmrzlou tkáň je nutné ihned po vyjmutí z dusíku ponořit do mikrozkušavky s Trizolem (roztok obsahující guanidium thiokyanát a fenol), aby se zabránilo degradaci RNA. Doporučené množství Trizolu je 1 ml na 100 mg tkáně.

Prvním krokem byla homogenizace tkáně v mikrozkušavkách s Trizolem, do kterých byla vložena keramická kulička. Homogenizace byla provedena pomocí oscilačního mlýnu MM400 (Retsch, Německo) a probíhala podle druhu tkáně 3 až 5 minut. Následovala centrifugace (10 minut, 12000 g, 4 °C), po které se do nové mikrozkušavky odebrala mezifáze obsahující RNA. K odebrané mezifázi bylo přidáno 0,2 ml chloroformu na 1ml Trizolu, směs byla důkladně promíchána a nechala se 10 minut inkubovat. Další centrifugací (15 minut, 14000 g, 4 °C) se směs rozdělila na horní vodnou fázi, která obsahovala RNA a spodní organickou fázi. Vodná fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky, přičemž bylo třeba vyvarovat se kontaminace proteiny z fázového rozhraní. Do nové mikrozkušavky bylo přidáno také 0,5 ml izopropanolu na 1ml Trizolu. RNA se nechala v izopropanolu 10 minut vysrážet. Následovala další centrifugace (10 minut, 12000 g, 4 °C), po které zůstal na dně mikrozkušavky vysrážený pelet RNA. Supernatant byl odebrán, k peletu bylo přidáno 1ml 70% etanolu na 1ml Trizolu a obsah mikrozkušavky se promíchal a nechal znovu centrifugovat (5 minut, 12000 g, 4 °C). Supernatant se nechal odsát a zbylý pelet se vysušil na vakuové odparce. Vysušený pelet se rozpouštěl 20 minut v redestilované vodě při 60 °C za občasného promíchávání.

Čistota a koncentrace naizolované RNA se ověřila pomocí spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop, USA). Koncentrace RNA ve vzorku byla vypočtena z hodnoty absorbance při 260 nm. Informace o čistotě RNA byla získána z poměrů absorbance při různých vlnových délkách. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm vypovídá o kontaminaci proteiny a poměr absorbancí při 260 a 230 nm vypovídá o pozůstatku organických rozpouštědel. Naizolovaná RNA byla dále uchována při -70 °C.

5.6 Reverzní transkripce

Při měření genové exprese se sledují hladiny mRNA. Tento typ ribonukleové kyseliny byl přepsán do cDNA metodou reverzní transkripce. Vzorky vyizolované RNA se nejprve naředily redestilovanou vodou na stejnou koncentraci. Následně se v UV dekontaminačním boxu připravily zásobní roztoky A a B (Tab. č. 4).

Roztok A obsahoval redestilovanou vodu a polyT oligonukleotidy, které jsou komplementární k polyA konci mRNA. Při reverzní transkripci byly polyT oligonukleotidy použity jako primery, čímž se zajistilo, že do cDNA byla přepsána pouze mRNA. Do mikrozkušavek, ve kterých reakce probíhala, byl napipetován roztok A společně s roztokem naředěné RNA tak, aby v každém vzorku byl 1 µg RNA a celkový reakční objem v mikrozkušavce činil 12 µl. Tato směs byla nejprve denaturována zahřátím na teplotu 65 °C a následně rychle zchlazena. Poté bylo ke směsi přidáno 8 µl roztoku B, jehož součástí byl enzym reverzní transkriptáza, který katalyzuje přepis RNA na cDNA. Po přidání roztoku B reakce probíhala 50 minut při teplotě 37 °C. Na závěr byla teplota na 10 minut zvýšena na 72 °C a následně byly vzorky zchlazeny na 4 °C. Reakce probíhala na přístroji TGradient (Biometra, Německo). Vzorky cDNA byly dále skladovány při teplotě -20 °C.

mix A	objem na jeden vzorek [µl]
oligo T primery	0,5
redestilovaná voda	10,5
mix B	objem na jeden vzorek [µl]
5 x pufr	4
DTT	2
dNTP mix	1
M-MLV RT (reverzní transkriptáza)	1

Tab. č. 4. Složení roztoků A a B pro reverzní transkripci.

5.7 Kvantitativní PCR

Metoda kvantitativní PCR (qPCR) je založená na amplifikaci (zmnožení) cílového úseku cDNA, přičemž umožňuje měřit množství vzniklého PCR produktu po každém cyklu reakce. V průběhu reakce množství cDNA exponenciálně narůstá a je měřeno pomocí fluorescenční sondy, která vytváří signály podle toho, jak vzniká nový PCR produkt. Jako fluorescenční sonda bylo použito interkalační barvivo SYBR Green. K navržení primerů byl použit software Lasergene 7.1 (DNA Star, USA) a primery byly navrženy tak, aby nasedaly na DNA při teplotě přibližně 60 °C. Aby při reakci nedocházelo ke kontaminaci genomickou DNA, nasedají použité primery do dvou různých exonů, mezi kterými se vyskytuje intron. Seznam primerů je zde uveden (Tab. č. 5).

gen	kód GenBank	sekvence primeru	délka produktu [bp]	teplota nasedání [°C]
EF-1 α	13627	5'TGACAGCAAAAACGACCCACCA 5'GGGCCATCTTCCAGCTTCTTACCA	192	58,6
β -aktin	11461	5'GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 5'ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	434	60,2
Cyklofilin- β	19035	5'ACTACGGGCCTGGCTGGGTGAG 5'TGCCGGAGTCGACAATGATGA	216	59,4
UCP1	22227	5'GACGGGGACCTACAATGCTTACAG 5'GGCCGTCGGTCCTTCCTT	337	57,7
PPAR γ	19016	5'GCCTTGCAGTGGGGATGTCTCA 5'GATGCGGATGGCCACCTCTTG	338	59,3
PPAR α	19013	5'CCGGGTCATACTCGCAGGAAAGA 5'ATAGCAGCCACAAAAGGGAAATG	471	60,6
PGC-1 α	19017	5'TGCGGTGTCTGTAGTGGCTTGATT 5'CCCAAAGGATGCGCTCTCGTT	150	57,2
PGC-1 β	170826	5'CGAGCGAGCGAGCGAGCGAGTG 5'GTCTGTCCGTCCGTCCGTCC	165	59,1
ATGL	66853	5'GGCAATCAGCAGGCAGGGTCTTTA 5'GCCAACGCCACTCACATCTACG	248	60,6
FAS	14104	5'TGG GTG TGG AAG TTC GTC AG 5'GTC GTG TCA GTA GCC GAG TC	130	60
COX IV	12857	5'AGAAGGCGCTGAAGGAGAAGGA 5'CCAGCATGCCGAGGGAGTGA	386	60,5

Tab. č. 5. Seznam použitých primerů.

Reakce probíhala na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Švýcarsko) a vzorky byly měřeny na 96-jamkových destičkách. Do jamek byla napipetována reakční směs, jejíž součástí je 2x koncentrovaný kit The LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Tab. č. 6). Vzorky cDNA byly před přidáním do reakční směsi 20x naředěny redestilovanou vodou v PCR kvalitě.

složka reakční směsi	objem na jeden vzorek [μ l]
2 x koncentrovaný master mix kit	5
redestilovaná voda	3
5' primer	0,5
3' primer	0,5
cDNA (20x naředěná)	1

Tab. č. 6. Složení reakční směsi pro qPCR reakci.

Prvním krokem qPCR byla počáteční denaturace, při které se reakční směs zahřála na teplotu 95 °C. Následovalo 45 cyklů, ve kterých se opakovala denaturace, nasednutí primerů na DNA a elongace. Na konci každé elongační fáze byla měřena fluorescence, neboť v této fázi byl syntetizován PCR produkt. Nakonec byla reakční směs postupně zahřívána až na teplotu 98 °C, což

vedlo k rozpadu struktury dvouvláknové DNA, uvolnění interkalačního barviva SYBR Green a tím k poklesu fluorescence. Tato závěrečná fáze reakce se nazývá denaturační analýza a lze pomocí ní ověřit specifitu vzniklého produktu, a zdali nebyl vzorek kontaminován genomickou DNA (Tab. č. 7). V případě, že produkt je specifický a vzorky nejsou kontaminované, je v grafu závislosti fluorescence na teplotě tání DNA pouze jediné fluorescenční maximum. V takovém případě všechny vzorky obsahují identický produkt.

fáze reakce	teplota [°C]	doba udržování teploty [s]
počáteční denaturace	95	300
amplifikace (45 cyklů)		
denaturace	95	10
nasednutí primerů	60	20
elongace	72	20
denaturační analýza		
denaturace	95	5
renaturace	65	60
postupná denaturace	98	-
zchlazení	40	10

Tab. č. 7. Fáze qPCR na přístroji LightCycler® 480 System.

Každý vzorek byl změřen paralelně v duplikátu a ve výsledku byl použit průměr dvou hodnot. Ze všech použitých vzorků byl vytvořen směsný vzorek, ze kterého byla následně vytvořena ředící řada, která obsahovala čtyři různé koncentrace (1x, 2x, 4x, 8x). Přesné množství PCR produktu bylo stanoveno podle takto vytvořené kalibrační křivky. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs bez přidání vzorku. Výsledky genové exprese cílových genů byly vztaženy na výsledky měření referenčních genů, u nichž by se genová exprese neměla v rámci skupin pokusných zvířat nijak lišit. Jako referenční geny při měření genové exprese v této práci byly použity EF-1 α (elongační faktor 1 α), β -aktin a cyklofilin- β .

5.8 Izolace triacylglycerolů pro nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii

Jedním ze způsobů měření obratu triacylglycerolů a mastných kyselin v tukové tkáni je inkorporace deutéria do molekul triacylglycerolů a následná analýza výstupu z nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. Analýza spekter ani naměřené výsledky nejsou součástí této práce, neboť v době sepisování dosud nebyly k dispozici.

Myším v experimentech CE K3 a R K1 byl 48 hodin před usmrčením intraperitoneálně¹⁷ injikován fyziologický roztok těžké vody. Množství injikovaného roztoku je odvozeno od hmotnosti zvířat a odpovídá 5% z celkové hmotnosti vody v těle, jejíž obsah byl určen jako 70%. Po injikování byla myším pitná voda nahrazena 5% roztokem těžké vody z důvodu udržení hladiny deutéria v organismu.

U vzorků gonadálního tukového depa z experimentu R K1 (přibližně 70 mg tkáně) a hnědé tukové tkáně z experimentu CE K3 (přibližně 40 mg tkáně) byla po rozmrazení nejprve provedena izolace lipidů pomocí Folchovy extrakce. Při této metodě byl vzorek homogenizován v metanolu a poté smíchán s KCl ve skleněné zkumavce (2 ml metanolu a 750 μ l KCl na 70 mg tkáně). Dále byl přidán 1 ml dichlormetanu, směs byla 10 minut sonikována¹⁸ a následně 20 minut promíchávána na třepačce. K zamezení odparu rozpouštědel byly zkumavky obaleny alobalem. Poté bylo ke směsi přidáno dalších 700 μ l KCl a 3 ml dichlormetanu a vše bylo znovu 10 minut sonikováno. Na závěr byla směs centrifugována při pokojové teplotě (10 minut, 2500 g), spodní fáze byla odebrána do nové zkumavky a nechala se odpařovat v digestoři do druhého dne.

Po Folchově extrakci je nutné separovat triacylglyceroly od mastných kyselin a esterů cholesterolu, k čemuž se používá kolonová chromatografie. Kolony Discovery DSC-Si (Sigma, USA) se nejprve dvakrát promyjí směsí hexanu a MTBE (metyl-*t*-butyl-éter) v poměru 96:4 a poté dvakrát pouze čistým hexanem. Lipidy extrahované v předchozím kroku se nechaly rozpustit v 500 μ l směsi hexanu a MTBE v poměru 200:3 a byly aplikovány na kolonu. Po aplikaci vzorku na kolonu byla zkumavka ještě jednou promyta 2 ml směsí hexan:MTBE (200:3) a tento objem byl také aplikován na kolonu. Následně byla kolona postupně promývána směsí hexan:MTBE (200:3), (3x 2,5 ml) a hexan:MTBE (96:4), (4x2,5 ml). První směs slouží k vymytí esterů cholesterolu a druhá směs k vymytí triacylglycerolů. Jednotlivé frakce byly zachyceny do skleněných zkumavek a frakce s triacylglyceroly se nechala odpařit do sucha v digestoři. Vzorky triacylglycerolů ze zde popsaných experimentů jsou měřeny v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

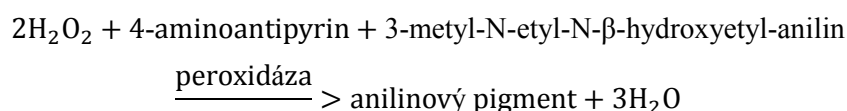
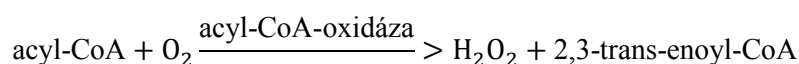
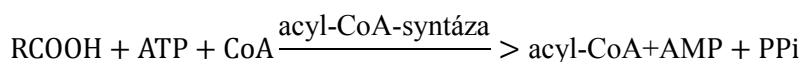
¹⁷ Injikace roztoku do vnitřku dutiny břišní, přičemž je nutné penetrovat kůži, svalovou vrstvu a parietální peritoneum (blána vystylající vnitřek dutiny břišní).

¹⁸ Metoda, při které je použito energie směrovaných zvukových vln k rozrušení povrchu buněk, či dalších částic ve vzorku.

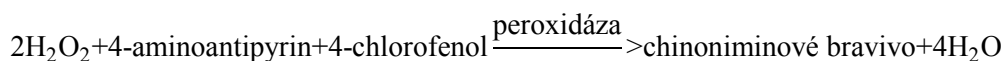
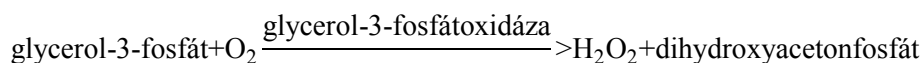
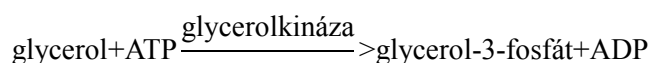
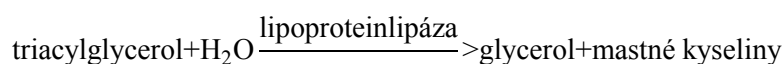
5.9 Měření koncentrace lipidových metabolitů

Koncentrace lipidových metabolitů byla stanovena ve vzorcích plazmy a v homogenátech jaterní tkáně a kosterního svalu (*musculus quadriceps*). Metabolity měřené v plazmě byly neesterifikované mastné kyseliny (NEFA; non-esterified fatty acids) a triacylglyceroly. Ve vzorcích tkání byly stanoveny pouze koncentrace triacylglycerolů. K měření lipidových metabolitů byly použity komerční diagnostické soupravy (NEFA - Wako Chemicals GmbH, Německo; triacylglyceroly - Erba Lachema, ČR). Reakce (tvorba barevného produktu) probíhala na 96-jamkových destičkách a výsledek byl vyhodnocen pomocí spektrofotometru Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko).

Princip metody stanovení koncentrace NEFA.



Princip metody stanovení koncentrace triacylglycerolů.



Vzorky plazmy či tkáňových homogenátů byly dle doporučeného postupu smíchány s reakčním činidlem ze specifických kitů. Koncentrace metabolitů ve vzorcích byla určena pomocí průměrné absorbance standardních vzorků dodaných v soupravě a od naměřené absorbance vzorků byla odečtena průměrná hodnota blanku. Každý vzorek byl měřen paralelně ve dvou jamkách a jako výsledek byl použit průměr dvou hodnot.

Pro stanovení koncentrace triacylglycerolů ve vzorcích jater a kosterního svalu byl vytvořen homogenát přibližně z 50 mg tkáně. Tkáň byla nejprve inkubována ve 150 μl 3 M KOH rozpuštěného v 65 % etanolu po dobu 2 hodin při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$. Po inkubaci byl jaterní homogenát naředěn redestilovanou vodou 10x a svalový homogenát byl naředěn 5x. Naředěné vzorky byly poté použity k měření koncentrace triacylglycerolů a výsledek byl přepočten na množství tkáně. Vzorky plazmy byly měřeny bez předchozího ředění.

5.10 Western blotting

Stanovení množství UCP1 na úrovni proteinu bylo ve vzorcích hnědé tukové tkáně provedeno pomocí western blottingu. Vzorky tkáně byly skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmrzlá tkáň byla přenesena do STE média (Tris, EDTA, sacharóza) s přidavkem inhibitorů proteáz (fenylmethansulfonylfluorid, aprotinin, leupeptin, pepstatin) tak, aby byl vytvořen 10% tkáňový homogenát (přibližně 45 mg tkáně bylo homogenizováno ve 450 μl STE média). Homogenizace byla provedena na ledu za použití ručního homogenizátoru Ultra-Turrax T8.01 (IKA, Německo). Z homogenátu byl odebrán alikvot pro stanovení celkového množství proteinu metodou BCA (stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové) a zbytek byl dále uchováván při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Metoda BCA je zvláště vhodná pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích tukové tkáně, neboť není citlivá ke zvýšené koncentraci mastných kyselin. Principem je interakce proteinů s měďnatými ionty, což vede k jejich redukcí na měďné ionty a ke tvorbě barevného produktu, jehož množství je určeno porovnáním absorbancí vzorků s hodnotami kalibrační křivky. Jako standard byl použit vzorek hovězího sérového albuminu (BSA; bovine serum albumin) naředěný v pěti různých koncentracích (kalibrační křivka). Absorbance byla měřena na 96-jamkové destičce spektrofotometrem Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko) při absorbanci 562 nm. Tkáňový homogenát byl měřen ve dvou různých koncentracích a doplněn vodou do objemu 15 μl společně s 225 μl reakčního činidla z předem připraveného kitu. Před měřením na spektrofotometru byla směs inkubována 30 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tkáňové homogenáty byly po rozmrazení naředěny redestilovanou vodou na stejnou koncentraci proteinu (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a zároveň byl k vzorkům v poměru 1:1 napipetován vzorkový pufr (2x Laemli buffer, Bio-Rad, USA) s přidavkem 5% merkaptotanolu. Následně byla směs denaturována v termobloku při $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 minut. Po vyjmutí z termobloku byly vzorky pipetovány do jamek 10% polyakrilamidového gelu s Tris-glycinovým pufrem (25 mM Tris, 192 mM glycin, 10% SDS, pH 8,3). Pro vizualizaci molekulové hmotnosti separovaných proteinů byl do gelu napipetován také Protein Ladder (Thermo Scientific, USA). Elektroforéza probíhala přibližně po dobu 3 hodin, počáteční napětí je 60 V, poté 90 V a nakonec 110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury, inkubován v blotovacím pufru III (20 mM Tris, 5 mM glycin, 10% methanol) po dobu 15 minut a vložen do sloupce tvořeného z filtračních papírů namočených v pufrech I (150 mM Trizma base, 10% methanol), II (12 mM M Trizma base, 10% methanol) a III a polyvinylidenfluoridové (PVDF) membrány, která byla aktivována namočením do metanolu, vody a pufru II. Sloupec byl umístěn do aparatury pro blotování polosuchou metodou a přenos proteinů z gelu na membránu probíhal po dobu jedné hodiny při elektrickém proudu 60 mA na jednu membránu. Po ukončení byla membrána vyjmuta z aparatury, opláchnuta v TBS pufru (50 mM Tris, 150 mM NaCl) a poté ve směsi blokovacího pufru Odyssey (Li-cor, USA) a TBS pufru v poměru 1:1. Z membrány byl vystřižen proužek v oblasti, kde dochází k separaci proteinů o molekulové hmotnosti 25 až 40 kDa.

Následně byla membrána inkubována přes noc při teplotě 6 °C ve směsi TBS s 0,1 % Tweenem, Odyssey pufru a primární protilátky (anti-H/M-UCP1-mouse-MAB6158, RD systems, 1:1000, USA). Druhý den byla membrána 5x opláchnuta směsí TBS s Tweenem a poté byla inkubována ve tmě po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Inkubační směs byla stejná jako u primární protilátky, do směsi však byla přidána sekundární protilátka (AlexaFluor goat-anti-mouse 680, 1:5000, Invitrogen, Německo). Následovalo dalších pět opláchnutí směsí TBS s Tweenem kvůli omytí nenavázané sekundární protilátky a na závěr byla membrána opláchnuta pouze v TBS pufru. UCP1 na membráně byl detekován skenováním na přístroji Odyssey IR Imager (Li-cor, USA) a kvantifikace množství proteinu byla provedena pomocí softwaru AIDA (Raytest, Německo).

5.11 Statistické vyhodnocení

Pro statistické porovnání dat byl použit software Sigma Stat (Systat, USA). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Pro porovnání získaných dat byla použita dvoucestná ANOVA. Data, která neprošla testem normality, byla transformována pomocí nástrojů programu Sigma Stat. Výsledky jsou prezentovány jako výběrové průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru.

5.12 Seznam použitých chemikálií

$^2\text{H}_2\text{O}$ (těžká voda)	CortecNet, Francie
10x pufr pro PCR	Roche, Německo
5x pufr pro RT	Invitrogen, Německo
adeninové nukleotidy (AMP, ATP)	Sigma, USA
agaróza	Serva, Německo
akrylamid	Serva, Německo
amonium persulfát (APS)	Sigma, USA
aprotinin	Sigma, USA
BCA kit	Sigma, USA
blokovací pufr Odyssey	Li-cor, USA
diethyléter	Penta, ČR
dichlormetan	Sigma, USA
dithiotreitol (DTT)	Sigma, USA
DNA marker	Roche, Německo
dNTP	Invitrogen, Německo
DTT	Invitrogen, Německo
EDTA	Serva, Německo
etanol	Penta, ČR
fenylmetansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, USA
GelRed	Biotum, USA
glycin	Serva, Německo
HCl	Penta, ČR
hexan	Sigma, USA
chloroform	Penta, ČR
Cholesterol liquid 250 S kit	Erba Lachema, ČR
izopropanol	Serva, Německo
KCl	Penta, ČR
KOH	Penta, ČR
Laemmli buffer	Bio-Rad, USA
leupeptin	Sigma, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Německo
loading buffer	Roche, Německo
merkaptioetanol	Serva, Německo
metanol	Penta, ČR
metyl-t-butyl-éter (MTBE)	Sigma, USA

M-MLV reverzní transkriptáza	Invitrogen, Německo
NaOH	Penta, ČR
NEFA liquid 250 S kit	Wako Chemicals, Německo
oligothymidin	Generi Biotech, ČR
PCR primery	Generi Biotech, ČR
pepstatin	Sigma, USA
primární protilátka anti-H/M-UCP1-mouse-MAB6158	RD systems, USA
Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
PVDF membrány	Millipore, USA
sacharóza	Penta, ČR
sekundární protilátka AlexaFluor goat-anti-mouse 680	Invitrogen, Německo
sodium dodecyl sulfát (SDS)	Bio-Rad, USA
TAG polymeráza	Roche, Německo
tetrametyletylendiamid (TEMED)	Bio-Rad, USA
Triacylglycerol liquid 250 S kit	Erba Lachema, ČR
trishydroxymethylaminometan	Sigma, USA
Trizma base	Fluka, USA
Trizol	Sigma, USA
Tween 20	Serva, Německo

5.13 Seznam použitých přístrojů

AIDA software	Raytest, Německo
aparát na elektroforézu	Bio-Rad, USA
aparát na semi-dry blotting	Omni-Bio, ČR
automatické pipety (rozsah 0,2 - 1000 µl)	Gilson, Francie
centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
glukometr One Touch Ultra	Lifescan, USA
kolony Discovery DSC-Si	Sigma, USA
Lasergene software	DNA Star, USA
LightCycler® 480 RT PCR System	Roche, Německo
magnetické míchadlo	IKA, USA
mini centrifuga	Labnet, USA
Odyssey IR Imager	Li-cor, USA
oscilační mlýn MM400	Retsch, Německo
PCR přístroj Tgradient	Biometra, Německo

pH meter	WTW, Německo
Sigma Stat software	Systat, USA
sonikátor	Hielscher, Německo
spektrofotometr NanoDrop	NanoDrop, USA
spektrofotometr Sunrise basic	Tecan, Švýcarsko
termoblok	Biometra, Německo
Ultra-Turrax T8.01 homogenizátor	IKA, USA
váhy ADAM	ADAM eqp., Velká Británie
vakuová sušička VR-1 Heto	Thermo Scientific, USA
vortex	Scientific Industries, USA

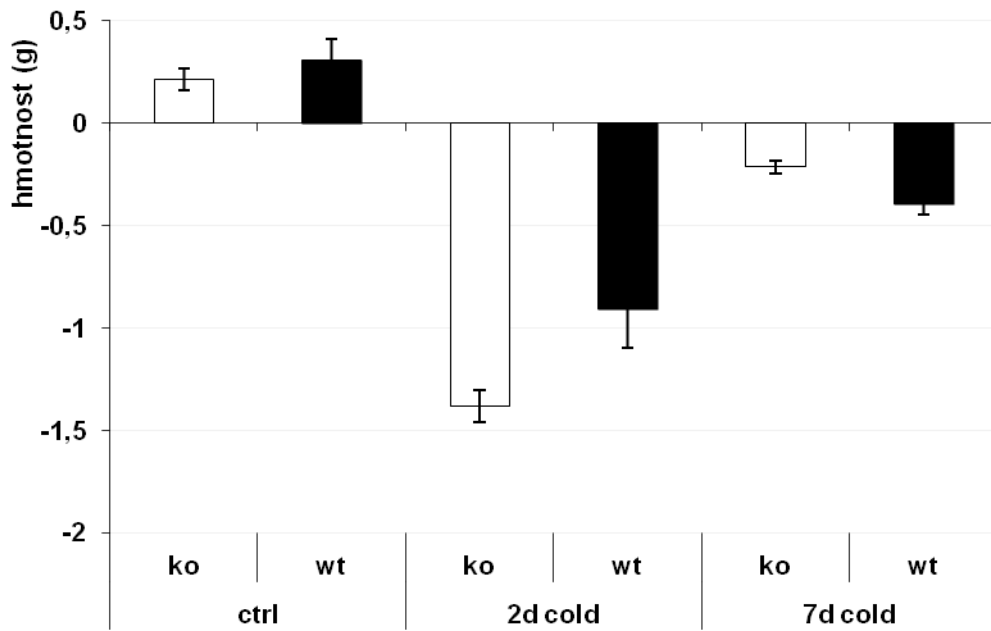
6 Výsledky

6.1 Chladová expozice

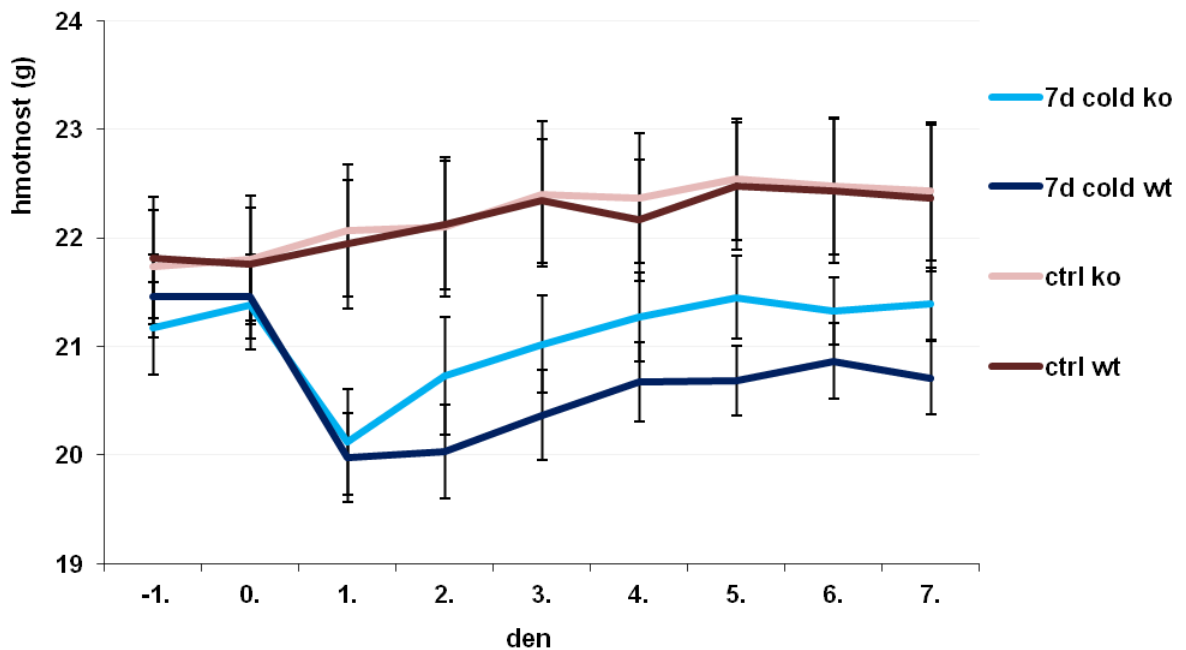
Experiment chladové expozice zaměřený na zkoumání funkce koaktivátoru PGC-1 β a na charakterizaci fenotypu myši se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v tukové tkáni byl celkem třikrát zopakován (CE K1, CE K2 a CE K3). Na konci experimentu byly vyhodnoceny rozdíly hmotností jednotlivých dep tukové tkáně, jater a kosterního svalu, hladiny NEFA a triacylglycerolů v plazmě, obsah triacylglycerolů v játrech a v kosterním svalu a hladiny vybraných enzymů a transkripčních faktorů na úrovni genové exprese. Množství proteinu UCP1 v hnědé tukové tkáni bylo stanoveno pomocí metody Western Blotting.

6.1.1 Tělesná hmotnost a spotřeba diety

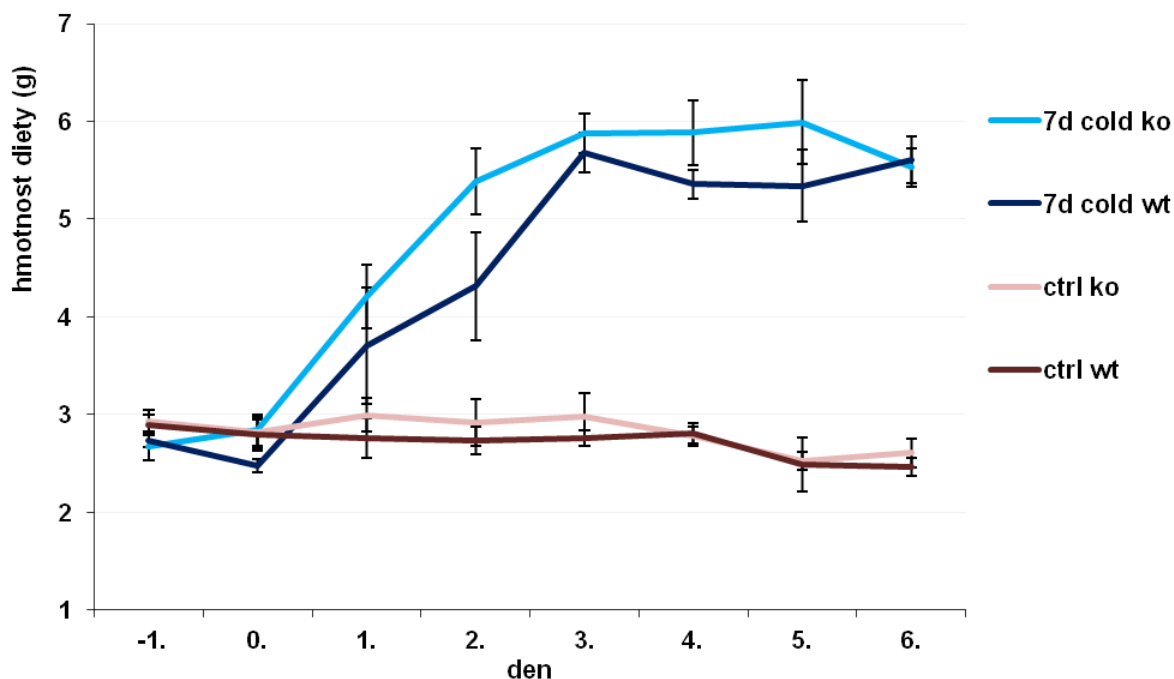
Tělesná hmotnost myši byla měřena několikrát před začátkem experimentu (při rozdělování zvířat do skupin, při přesunu do termoneutrální teploty), na začátku experimentu (tj. na začátku chladové expozice) a na konci každého experimentu. U pokusu CE K3 byla měřena spotřeba potravy a tělesná hmotnost každý den během trvání experimentu. Hmotnostní přírůstek zvířat je zobrazen jako průměr rozdílů hmotností po a před experimentem. Kromě dvoudenní chladové expozice, která byla provedena pouze u CE K1 a CE K2, jsou zde hodnoty ze všech tří pokusů dohromady (Obr. č. 8). Po dvoudenní chladové expozici byl u zvířat patrný signifikantní úbytek tělesné hmotnosti, který byl po dalších pěti dnech v chladu snížen, ale nedosáhl hodnoty stejné jako na začátku experimentu. Nebyly zde zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy. Rozdíl ve změnách tělesné hmotnosti během experimentu popisuje graf hodnot naměřených v pokusu CE K3 (Obr. č. 9), kde byla měřena i denní spotřeba potravy. Mezi genotypy nebyly ve spotřebě diety naměřeny žádné signifikantní rozdíly (Obr. č. 10). Vzhledem k vyššímu energetickému výdeji nezbytnému k udržení tělesné teploty, došlo k nárůstu spotřeby potravy již od prvního dne chladové expozice. Od třetího dne experimentu konzumovaly myši chované v chladu signifikantně (dvojnásobně) více potravy ve srovnání se zvířaty v termoneutrální teplotě a spotřeba potravy se již do konce experimentu nezvyšovala.



Obr. č. 8. Přírůstek tělesné hmotnosti. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2) vypočítané jako rozdíl tělesné hmotnosti po a před experimentem. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi všemi skupinami (ctrl; 2d cold; 7d cold).



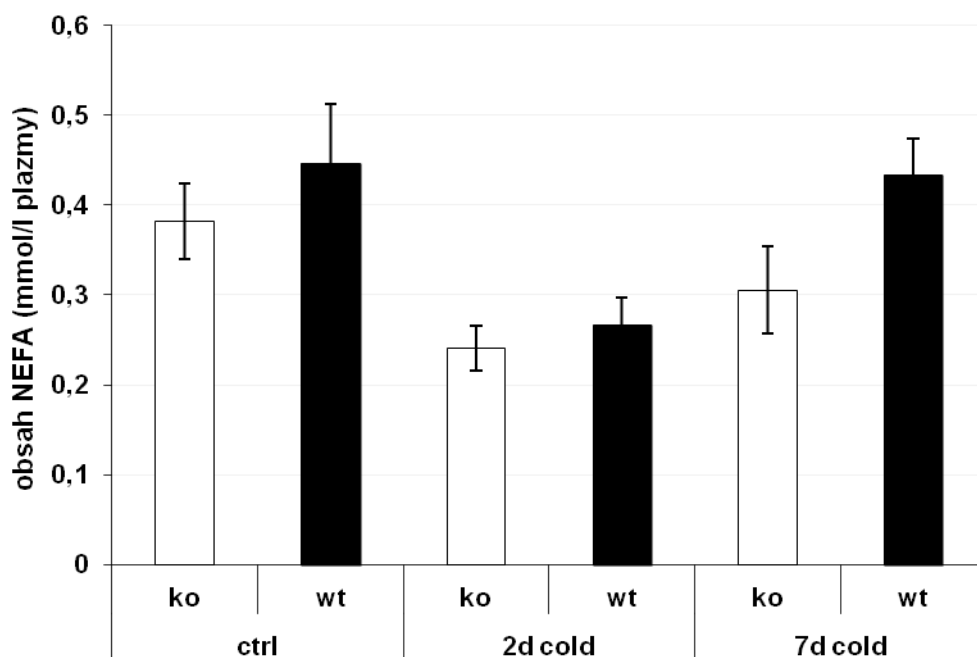
Obr. č. 9. Tělesná hmotnost v průběhu experimentu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold).



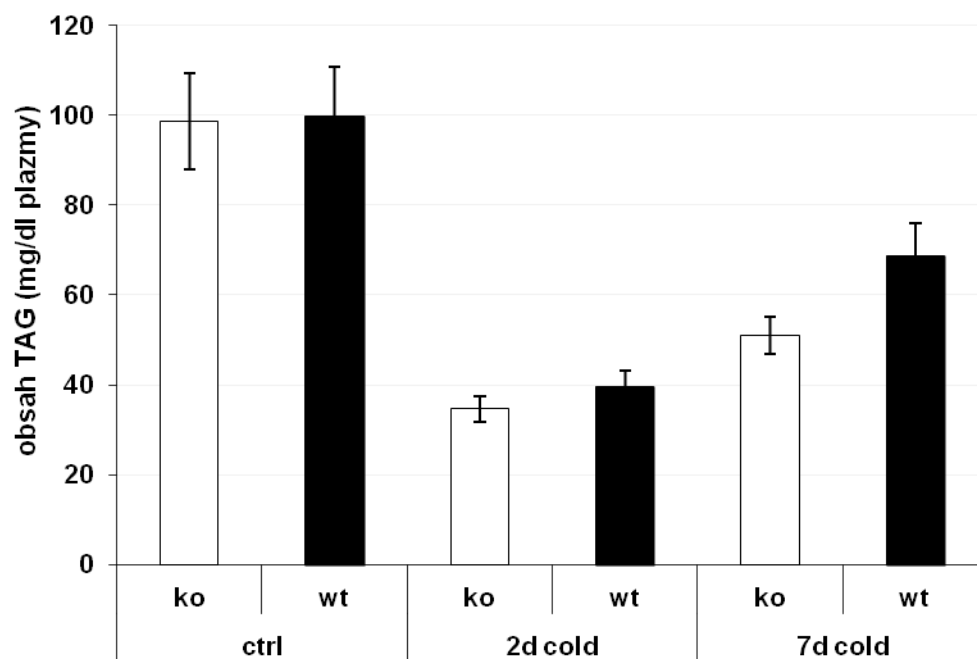
Obr. č. 10. Spotřeba potravy v průběhu experimentu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold).

6.1.2 Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě a akumulace lipidů v játrech a v kosterním svalu

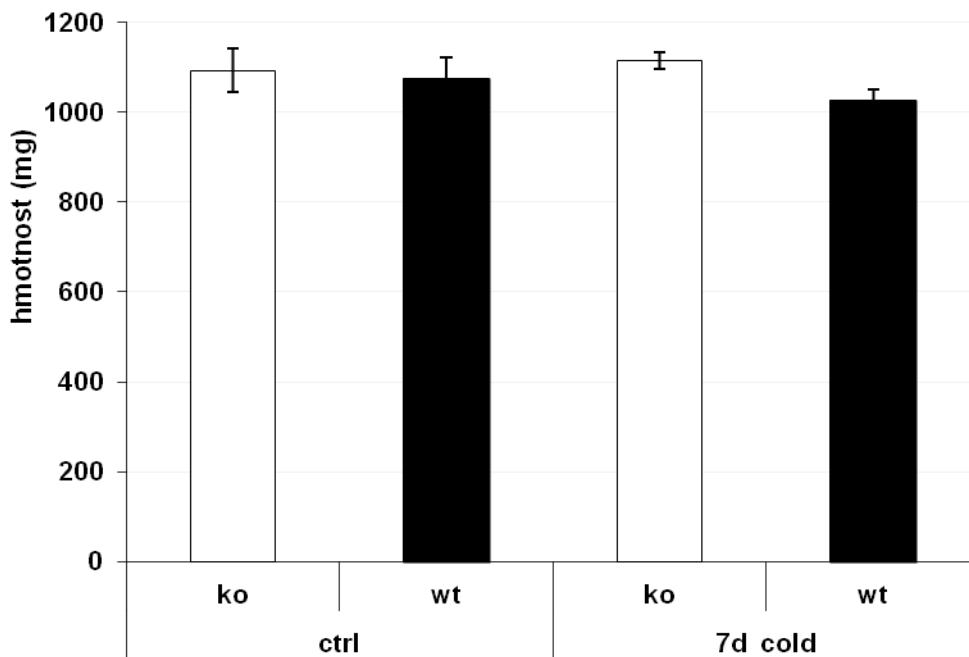
Koncentrace NEFA a triacylglycerolů byly měřeny v plazmě na konci všech tří experimentů. Hladiny NEFA v plazmě byly po dvou dnech chladové expozice signifikantně sníženy u obou genotypů. U skupiny 7d cold došlo ke zvýšení koncentrace NEFA v plazmě a to zejména u genotypu wt, kde se hladiny NEFA přiblížily hodnotám naměřeným u myši v termoneutrálním prostředí. Rozdíl mezi genotypy nebyl signifikantní u žádné ze skupin (Obr. č. 11). Obsah triacylglycerolů v plazmě byl signifikantně snížen u skupin 2d cold i 7d cold ve srovnání se skupinou ctrl. U skupiny 7d cold je však patrný mírný nárůst hladiny triacylglycerolů, který je vyšší u genotypu wt. Neobjevily se zde žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy (Obr. č. 12). Ve vzorcích jater a kosterního svalu (*musculus quadriceps*) byla měřena koncentrace triacylglycerolů v experimentu CE K3 a zároveň byla v tomto pokusu měřena hmotnost těchto tkání. Hmotnost jater se vlivem chladové expozice nezměnila (Obr. č. 13) a obsah triacylglycerolů v této tkáni byl u skupiny 7d cold jen nesignifikantně zvýšen (Obr. č. 14). U hmotnosti kosterního svalu došlo vlivem chladové expozice k nepatrnému snížení (Obr. č. 15). Stejně jako u parametrů měřených v játrech se zde neobjevily žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy. V obsahu triacylglycerolů ve svalu nebyl rozdíl mezi skupinami. Objevil se zde však rozdíl mezi genotypy, který je u skupiny 7d cold signifikantní (Obr. č. 16). Nižší obsah triacylglycerolů v kosterním svalu naznačuje funkční změnu v této tkáni patrně způsobenou vznikem defektu v tukové tkáni.



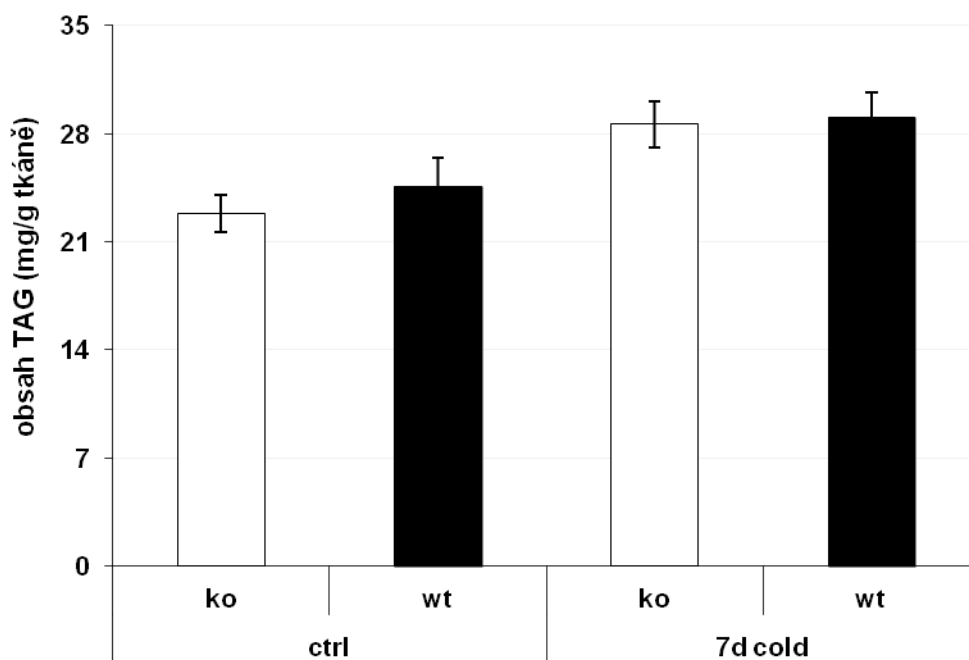
Obr. č. 11. Obsah NEFA v plazmě. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2). Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold). NEFA - neesterifikované mastné kyseliny.



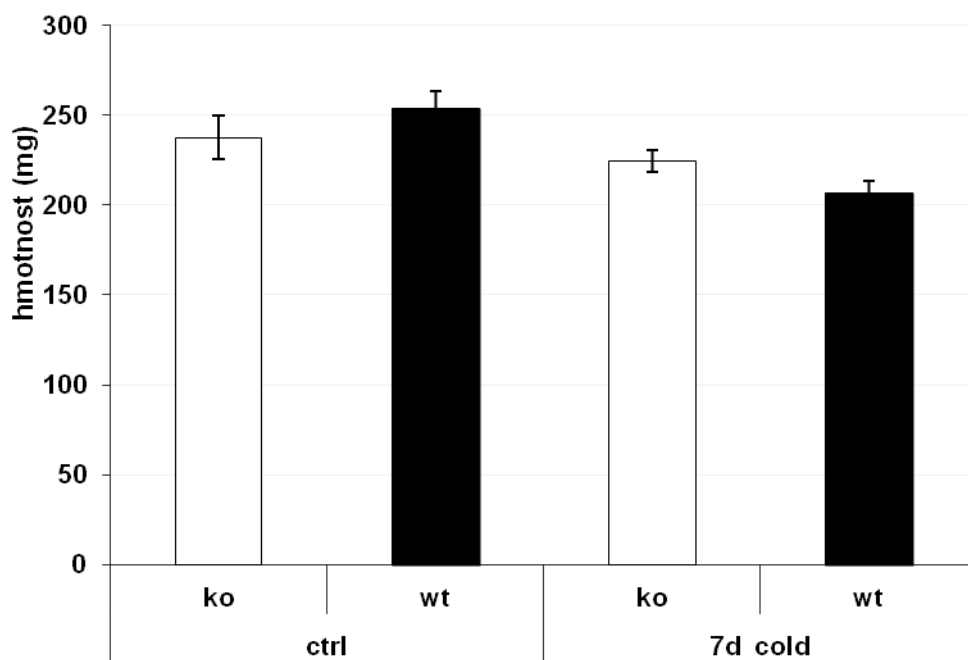
Obr. č. 12. Obsah triacylglycerolů v plazmě. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2). Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold) a (ctrl; 7d cold - u genotypu ko). TAG - triacylglyceroly.



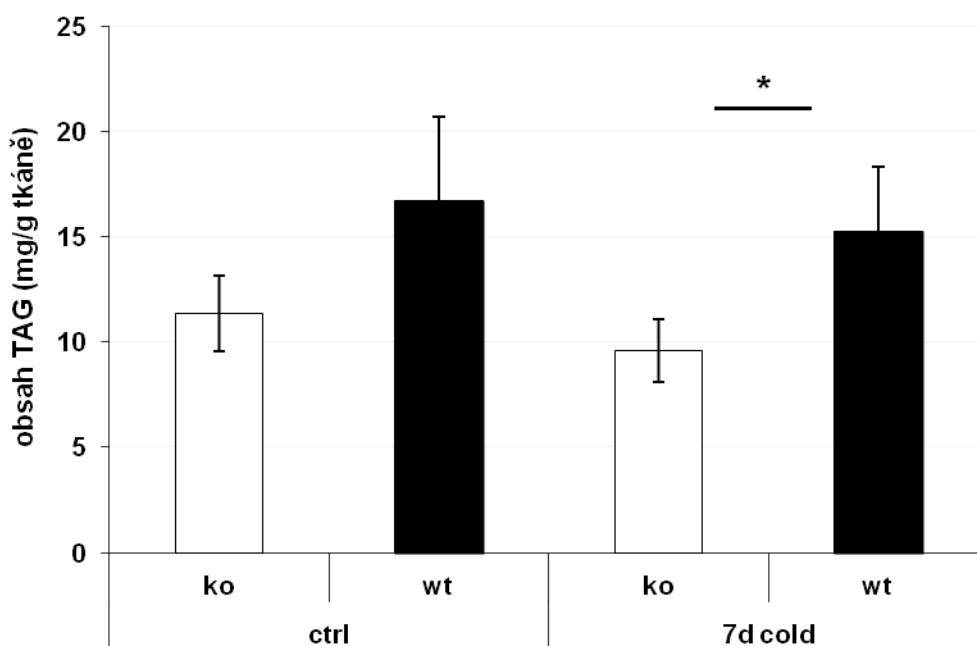
Obr. č. 13. Hmotnost jater. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Žádné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) nebyly naměřeny.



Obr. č. 14. Obsah triacylglycerolů v játrech. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Žádné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) nebyly naměřeny. TAG - triacylglyceroly.



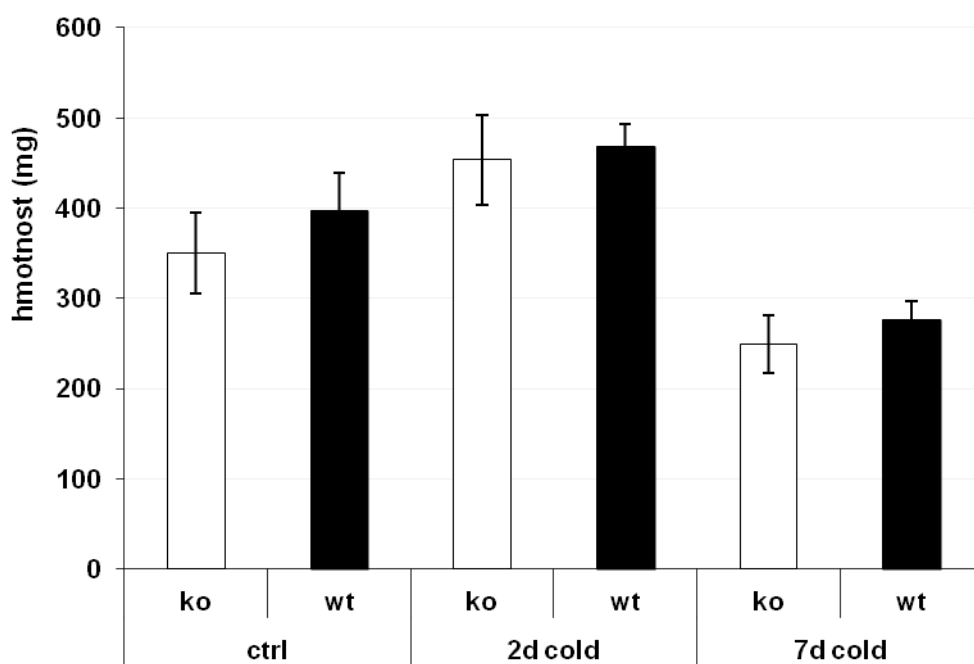
Obr. č. 15. Hmotnost svalu (*musculus quadriceps*). Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Žádné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) nebyly naměřeny.



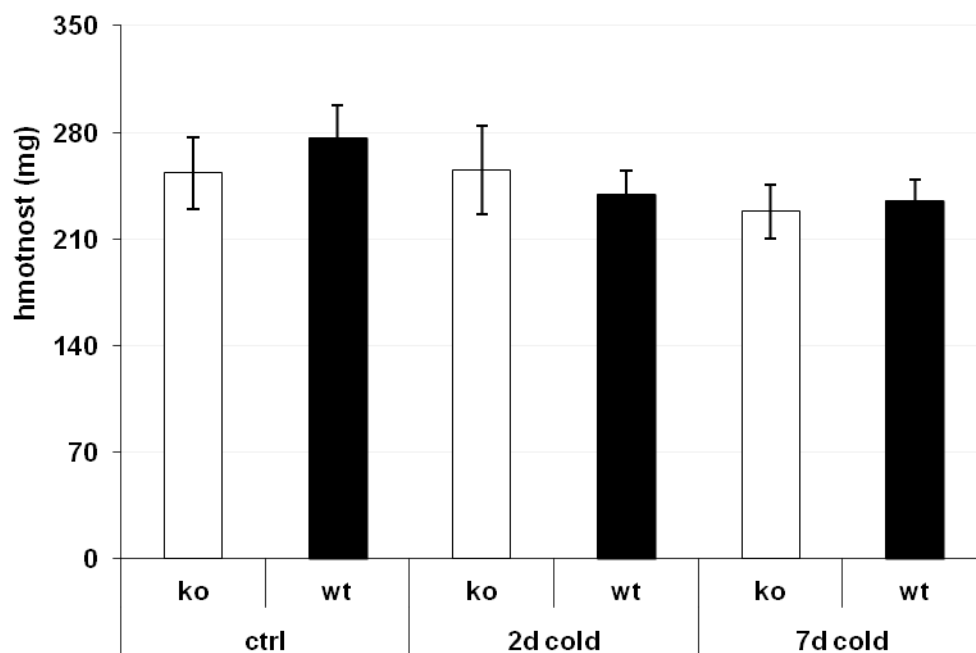
Obr. č. 16. Obsah triacylglycerolů ve svalu (*musculus quadriceps*). Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. *Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi genotypy (ko; wt) ve skupině 7d cold. TAG - triacylglyceroly.

6.1.3 Hmotnost tukových dep

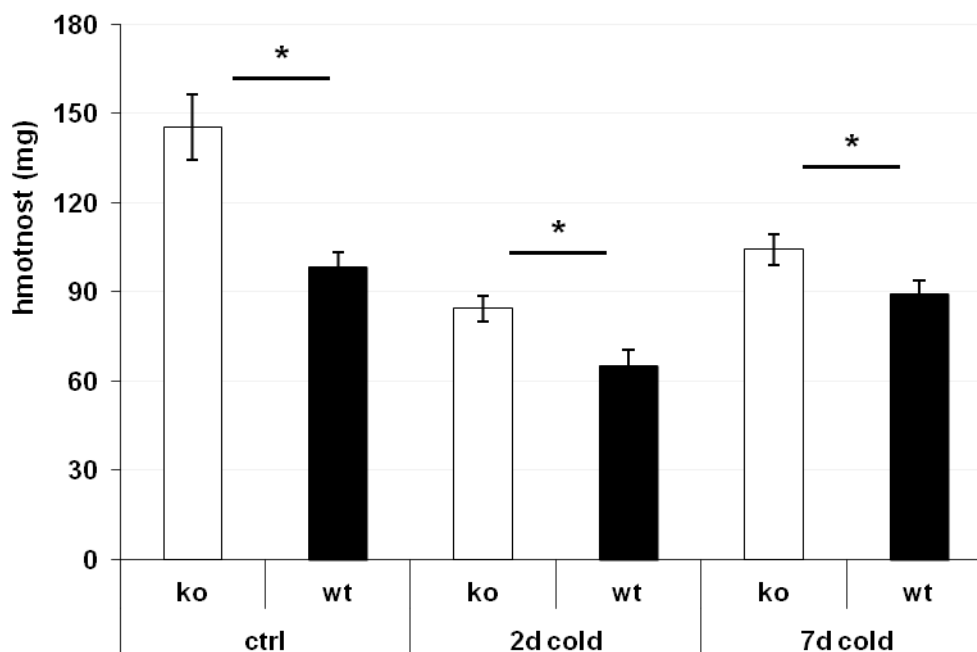
Hmotnost gonadálního tukového depa byla po dvoudenní chladové expozici mírně zvýšena. U skupiny 7d cold došlo k signifikantnímu snížení hmotnosti gonadálního tuku ve srovnání s ostatními skupinami. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy se neobjevily u žádné ze skupin (Obr. č. 17). Hmotnost dorzolumbálního tukového depa se po dvoudenní chladové expozici nezměnila a po dalších pěti dnech v chladu došlo jen k nepatrnému úbytku hmotnosti. Ani u tohoto depa nejsou mezi genotypy žádné signifikantní rozdíly (Obr. č. 18). Hmotnost hnědé tukové tkáně byla u skupiny 2d cold signifikantně nižší ve srovnání se skupinou ctrl. U skupiny 7d cold byla hmotnost hnědého tuku u genotypu ko nesignifikantně nižší ve srovnání se skupinou ctrl, zatímco u genotypu wt dosáhla hmotnost tkáně téměř stejné hodnoty jako u skupiny ctrl. Ve všech skupinách jsou patrné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy, přičemž hmotnost tkáně je vyšší u genotypu ko (Obr. č. 19). Hmotnost hnědého tuku představuje největší fenotypový rozdíl mezi genotypy a vypovídá o vzniku funkčního defektu v tkáni.



Obr. č. 17. Hmotnost gonadálního tukového depa. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2). Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold) a (2d cold; 7d cold).



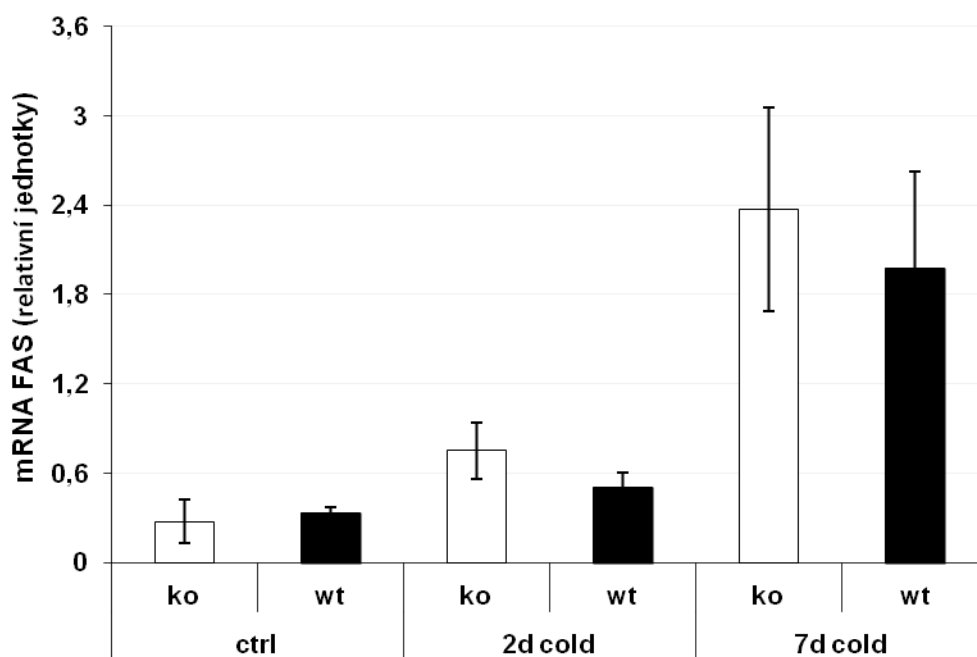
Obr. č. 18. Hmotnost dorzolumbálního tukového depa. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2). Žádné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) nebyly naměřeny.



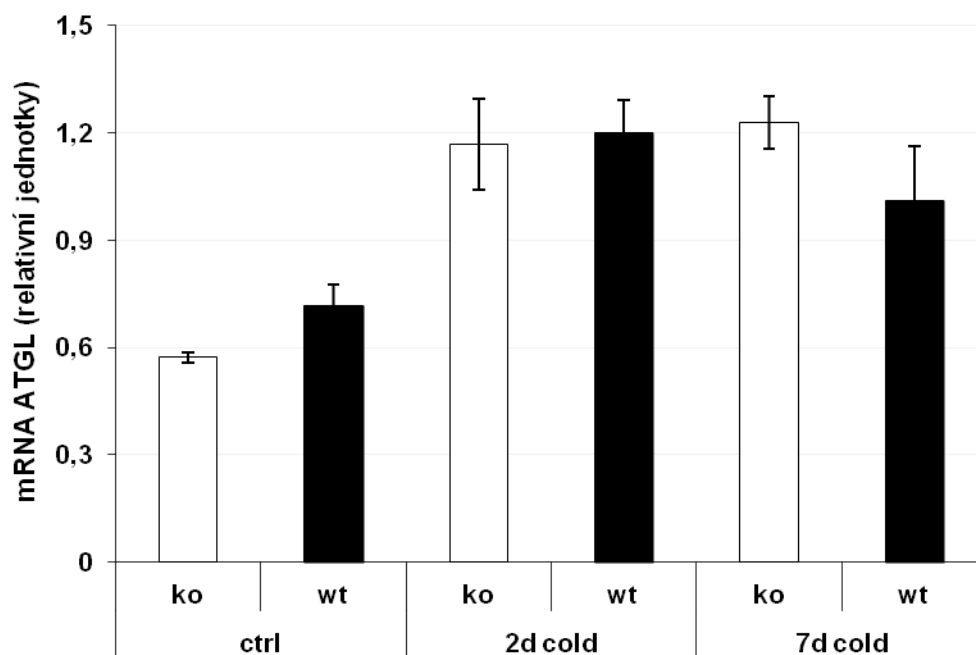
Obr. č. 19. Hmotnost hnědé tukové tkáně. Graf znázorňuje průměrné hodnoty ze všech tří pokusů (2d cold pouze data z CE K1, 2). Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold) a *mezi genotypy (ko; wt) ve všech skupinách (ctrl; 2d cold; 7d cold).

6.1.4 Hladiny genové exprese v gonadálním tukovém depu

FAS je klíčový enzym procesu lipogeneze a ATGL v tukové tkáni určuje rychlost lipolýzy a částečně i prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin. V experimentu CE K1 byla v gonadálním tukovém depu změřena hladina genové exprese pro oba enzymy, FAS (Obr. č. 20) a ATGL (Obr. č. 21). Grafy ukazují hladiny exprese zmíněných genů vztažené na hladinu genové exprese referenčního genu EF-1 α . U obou genů byla exprese zvýšena ve skupině 7d cold a u ATGL došlo ke zvýšení i u skupiny 2d cold. Ani u jednoho genu se neobjevily signifikantní rozdíly mezi genotypy.



Obr. č. 20. Hladina genové exprese pro FAS v gonadálním tukovém depu. Hladiny genové exprese pro FAS jsou vztaženy na hladiny genové exprese pro referenční gen EF-1 α . Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold) a (2d cold; 7d cold - u genotypu wt). FAS - syntáza mastných kyselin, EF-1 α - elongační faktor 1 α .

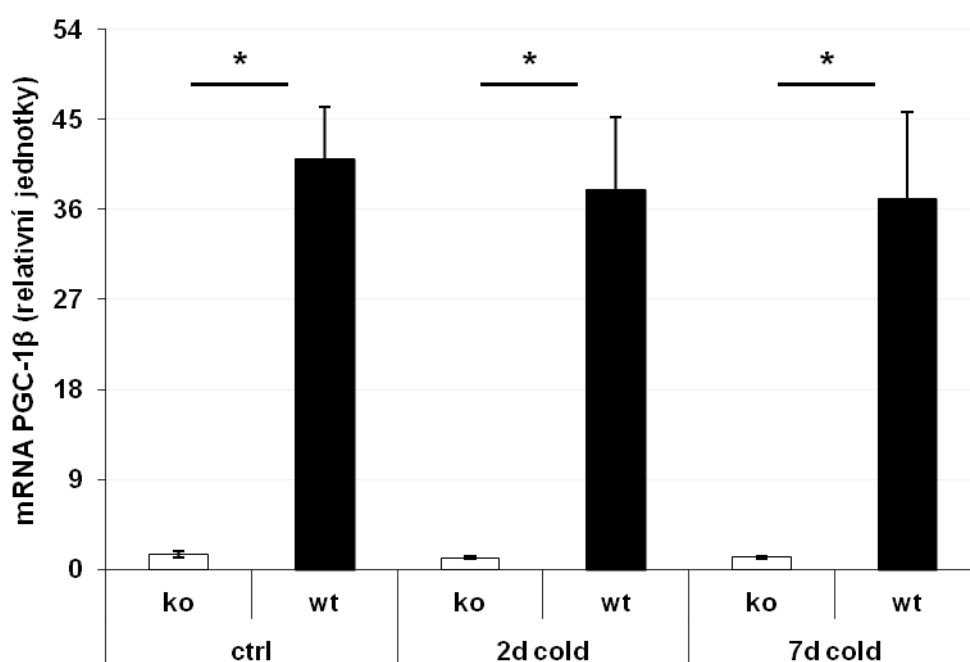


Obr. č. 21. Hladina genové exprese pro ATGL v gonadálním tukovém depu. Hladiny genové exprese pro ATGL jsou vztaženy na hladiny genové exprese pro referenční gen EF-1 α . Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold) a (ctrl; 7d cold - u genotypu ko). ATGL - triacylglycerolová lipáza, EF-1 α - elongační faktor 1 α .

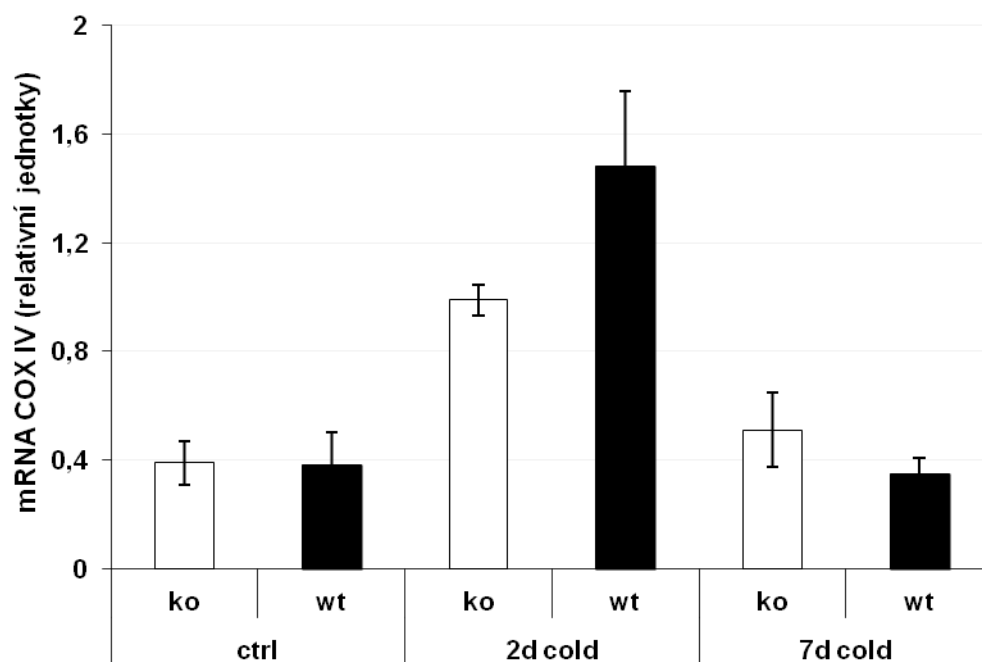
6.1.5 Hladiny genové exprese v hnědé tukové tkáni

Z důvodu kontroly inaktivace genu pro PGC-1 β byly změřeny hladiny genové exprese tohoto koaktivátoru v hnědé tukové tkáni u experimentu CE K2. Mezi skupinami se neobjevily žádné signifikantní rozdíly a podle očekávání byla hladina exprese genu pro PGC-1 β u ko myši zanedbatelná ve srovnání s genotypem wt (Obr. č. 22). PGC-1 β se podílí na regulaci exprese mitochondriálních genů, proto byla v experimentu CE K1 měřena genová exprese pro čtvrtou podjednotku cytochrom c oxidázy (COX IV). Po dvou dnech chladové expozice došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese pro COX IV, zatímco u skupiny 7d cold byly naměřené hodnoty téměř stejné jako u skupiny ctrl. U tohoto genu nebyly naměřeny žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy (Obr. č. 23). Dalšími geny, jejichž exprese byla měřena v pokusu CE K2 jsou geny pro jaderné receptory PPAR α , PPAR γ , transkripční koaktivátor PGC-1 α a UCP1. U všech těchto genů byla hladina genové exprese u obou skupin vystavených chladu signifikantně vyšší u zvířat s genotypem ko. V hnědém tuku tak pravděpodobně dochází ke vzniku funkčního defektu, který je během chladové expozice nutné kompenzovat. Hladiny genové exprese pro PPAR γ a PGC-1 α byly navíc signifikantně vyšší u genotypu ko také v termoneutralní teplotě. Expres PPAR α se během chladové expozice u genotypu wt snížila, zatímco u ko myši zůstala přibližně stejná (Obr. č. 24). U PPAR γ byla u obou genotypů

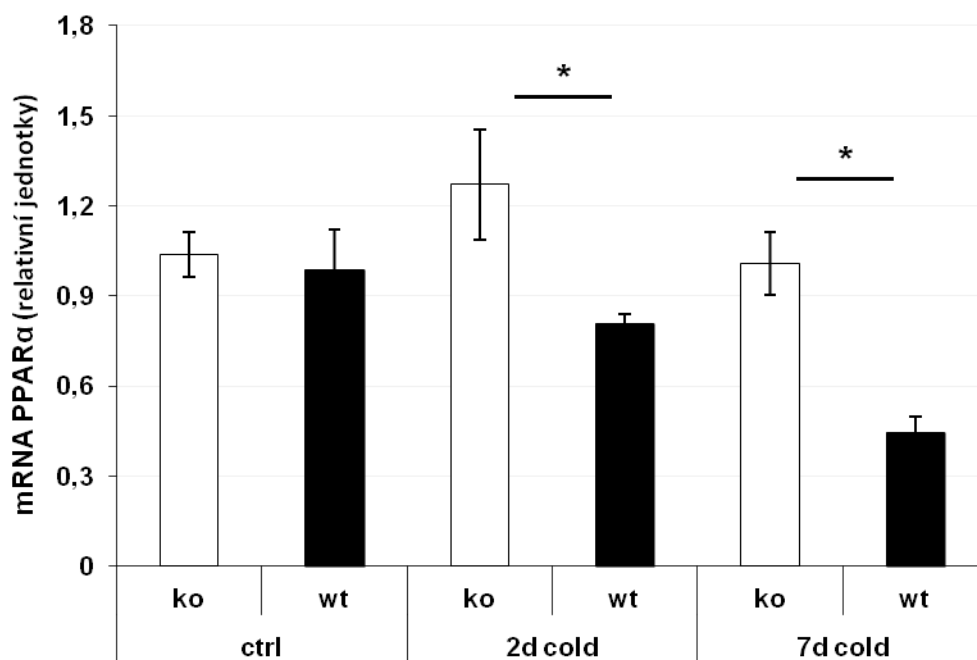
nejnižší hladina genové exprese u skupiny ctrl a nejvyšší u skupiny 2d cold. U genotypu wt došlo u skupiny 7d cold k nesignifikantnímu snížení hladiny genové exprese ve srovnání se skupinou 2d cold. U genotypu ko byl rozdíl v genové expresi mezi skupinami 2d cold a 7d cold zanedbatelný (Obr. č. 25). Genová exprese pro PGC-1 α byla rovněž nejnižší u skupiny ctrl a nejvyšší u skupiny 2d cold. U skupiny 7d cold došlo u obou genotypů ve srovnání se skupinou 2d cold k signifikantnímu snížení hladin genové exprese (Obr. č. 26). Exprese genu pro UCP1 kopírovala genovou expresi pro PGC-1 α a u skupiny 2d cold byla tedy signifikantně zvýšena ve srovnání s ostatními skupinami. U skupiny 7d cold byla hladina genové exprese signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou ctrl a signifikantně nižší než u skupiny 2d cold (Obr. č. 27). U obou genotypů byla ve skupině 7d cold zjištěna pozitivní korelace s hladinami genové exprese pro PGC-1 α (wt - $r = 0,683$; $P = 0,036$; ko - $r = 0,833$; $P = 0,005$).



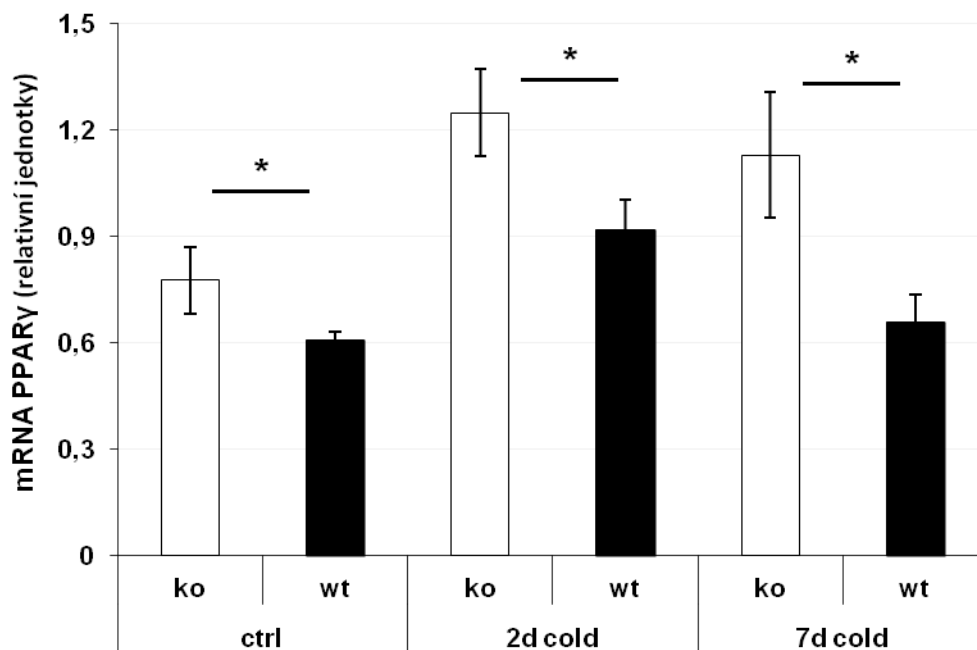
Obr. č. 22. Hladina genové exprese pro PGC-1 β v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro PGC-1 β jsou vztaženy na geometrický průměr hladin genové exprese referenčních genů EF-1 α , cyklofilin β a β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K2. *Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi genotypy (ko; wt) ve všech skupinách (ctrl; 2d cold; 7d cold). PGC-1 β - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta, EF-1 α - elongační faktor 1 α .



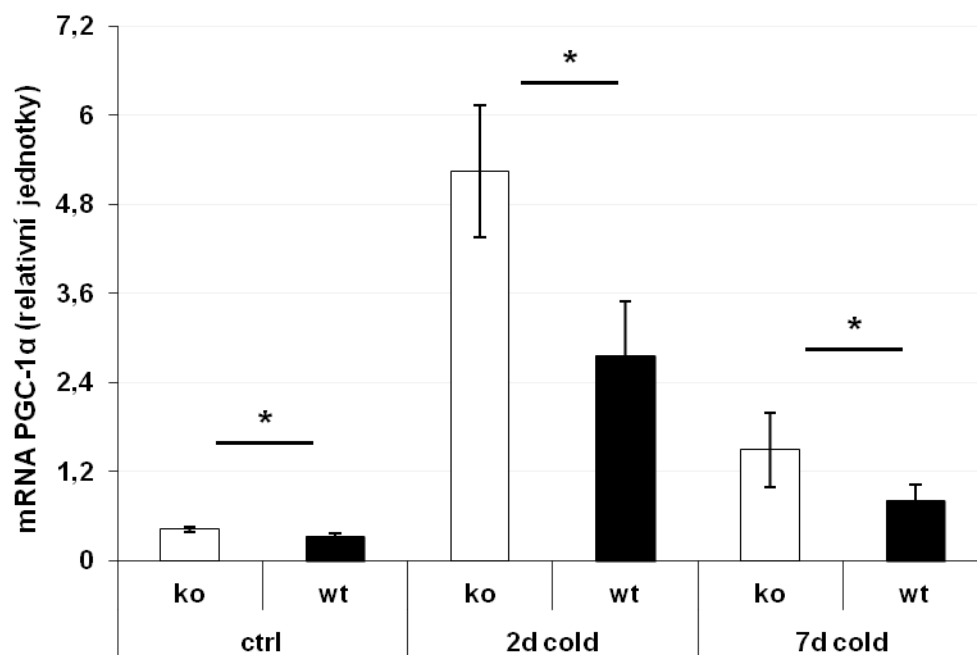
Obr. č. 23. Hladina genové exprese pro COX IV v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro COX IV jsou vztaženy na hladiny genové exprese pro referenční gen β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold) a (2d cold; 7d cold - u genotypu wt). COX IV - čtvrtá podjednotka cytochrom c oxidázy.



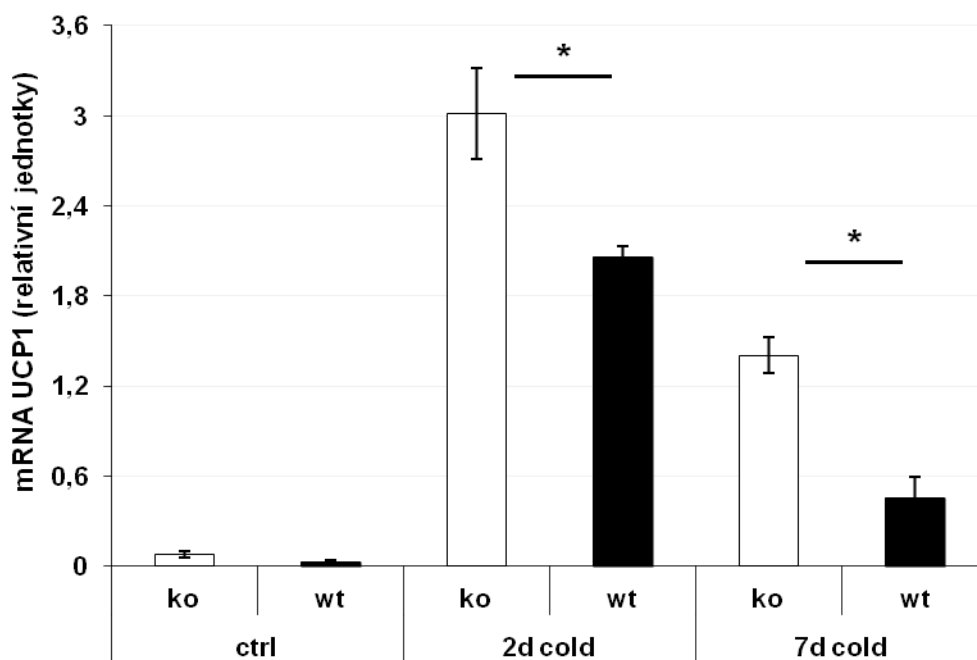
Obr. č. 24. Hladina genové exprese pro PPAR α v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro PPAR α jsou vztaženy na geometrický průměr hladin genové exprese referenčních genů EF-1 α , cyklofilin β a β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K2. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold - u genotypu wt) a (2d cold; 7d cold - u genotypu wt), a *mezi genotypy (ko; wt) ve skupinách 2d cold a 7d cold. PPAR α - peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor alfa, EF-1 α - elongační faktor 1 α .



Obr. č. 25. Hladina genové exprese pro PPAR γ v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro PPAR γ jsou vztaženy na geometrický průměr hladin genové exprese referenčních genů EF-1 α , cyklofilin β a β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K2. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold - u genotypu wt), a *mezi genotypy (ko; wt) ve všech skupinách (ctrl; 2d cold; 7d cold). PPAR γ - peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor gama, EF-1 α - elongační faktor 1 α .



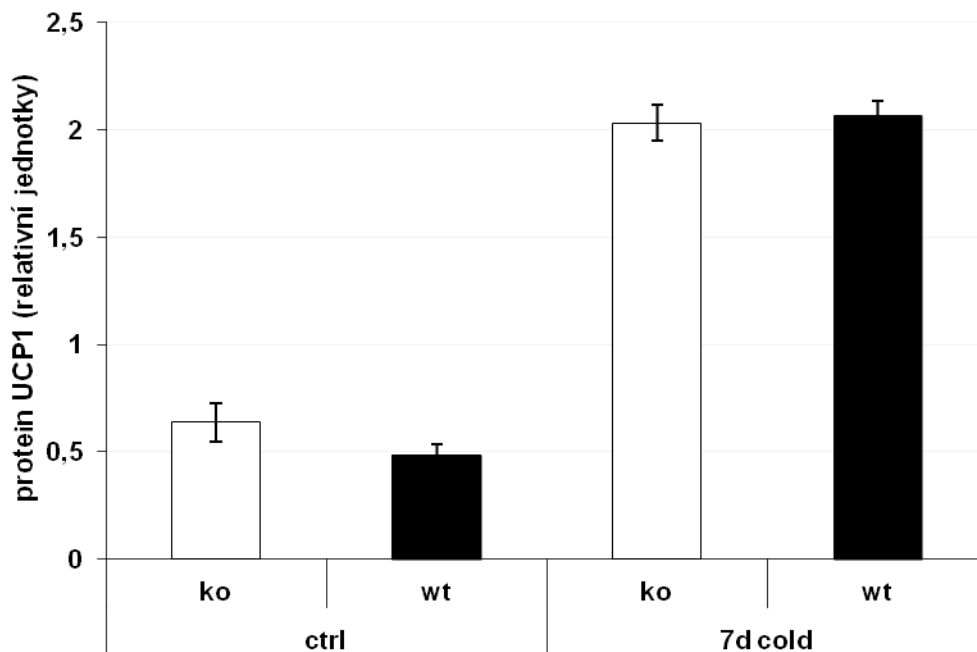
Obr. č. 26. Hladina genové exprese pro PGC-1 α v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro PGC-1 α jsou vztaženy na geometrický průměr hladin genové exprese referenčních genů EF-1 α , cyklofilin β a β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K2. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 2d cold) a (2d cold; 7d cold - u genotypu ko), a *mezi genotypy (ko; wt) ve všech skupinách (ctrl; 2d cold; 7d cold). PGC-1 α - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, EF-1 α - elongační faktor 1 α .



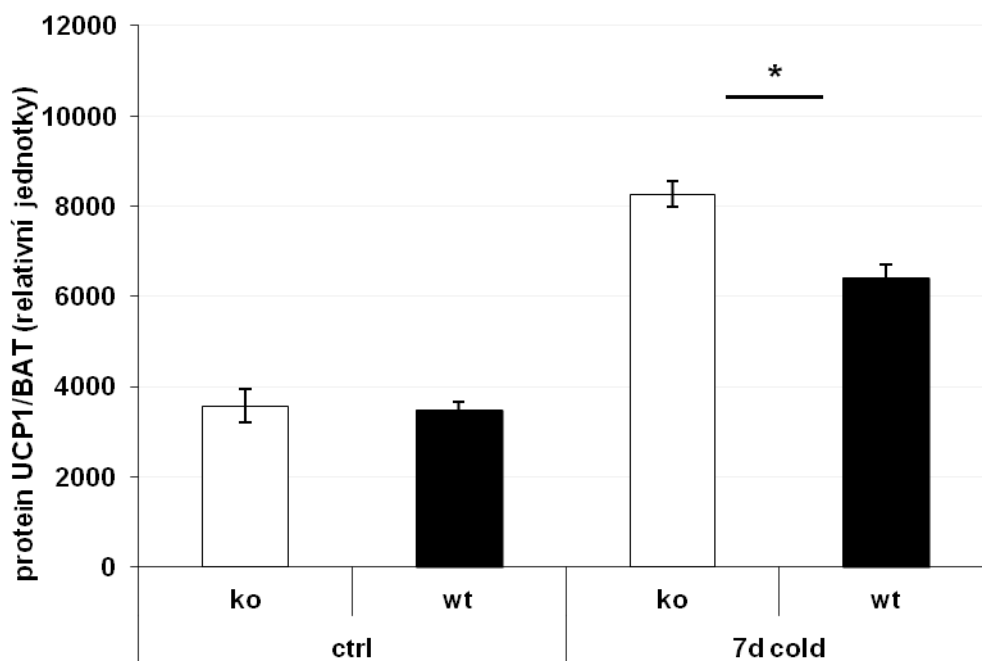
Obr. č. 27. Hladina genové exprese pro UCP1 v hnědé tukové tkáni. Hladiny genové exprese pro UCP1 jsou vztaženy na geometrický průměr hladin genové exprese referenčních genů EF-1 α , cyklofilin β a β -aktin. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K2. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi všemi skupinami (ctrl; 2d cold; 7d cold), a *mezi genotypy (ko; wt) ve skupinách 2d cold a 7d cold. UCP1 - rozpřahovací protein 1, EF-1 α - elongační faktor 1 α .

6.1.6 Množství UCP1 proteinu v hnědé tukové tkáni

Vzhledem k signifikantním rozdílům v hladinách genové exprese pro UCP1 mezi skupinami i jednotlivými genotypy, byl v hnědé tukové tkáni v experimentu CE K3 změřen obsah proteinu UCP1. U skupiny 7d cold došlo k signifikantnímu zvýšení množství UCP1 proteinu (vztaženého na 2 μ g celkového proteinu) ve srovnání se skupinou ctrl. Žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy se zde neobjevily (Obr. č. 28). Obsah UCP1 byl následně přepočten na celkové množství UCP1 proteinu v celé hnědé tukové tkáni. Data získaná tímto přepočtem ukázala signifikantně vyšší množství UCP1 proteinu u genotypu ko ve skupině 7d cold (Obr. č. 29).



Obr. č. 28. Množství UCP1 proteinu vztáženého na 2 µg celkového proteinu v hnědé tukové tkáni. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold). UCP1 - rozpřahovací protein 1.



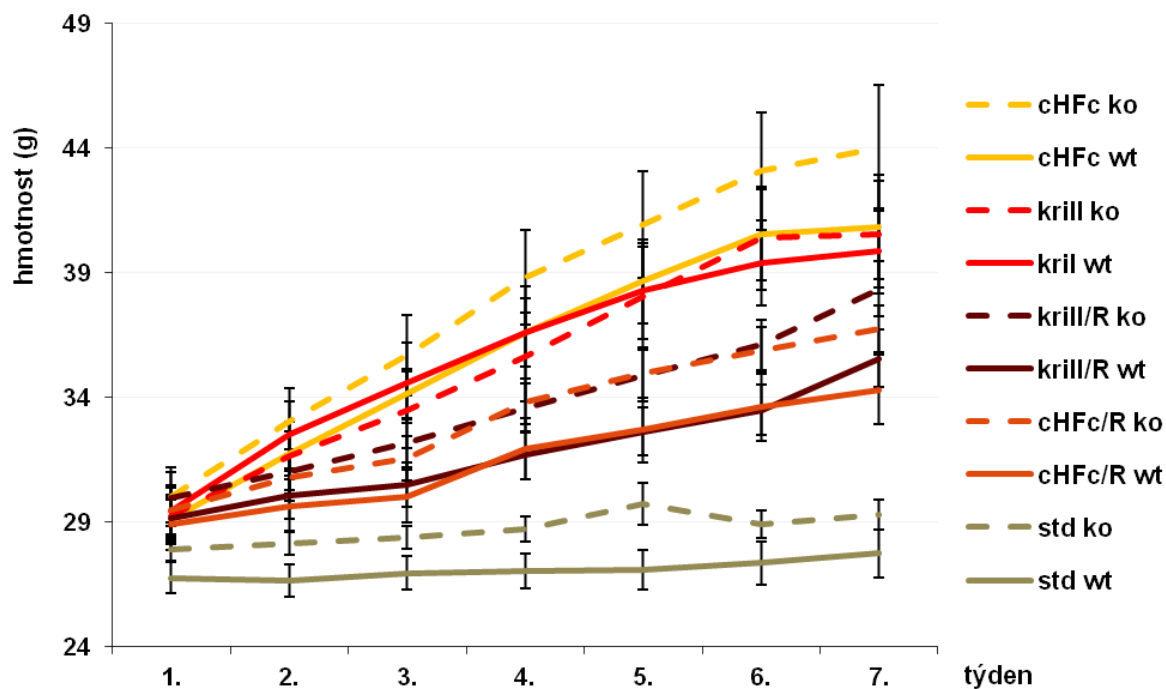
Obr. č. 29. Množství UCP1 proteinu v celé hnědé tukové tkáni. Množství UCP1 proteinu bylo přepočteno na hmotnost interskapulární hnědé tukové tkáně. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu CE K3. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (ctrl; 7d cold), a *mezi genotypy (ko; wt) ve skupině 7d cold. UCP1 - rozpřahovací protein 1.

6.2 Kalorická restrikce

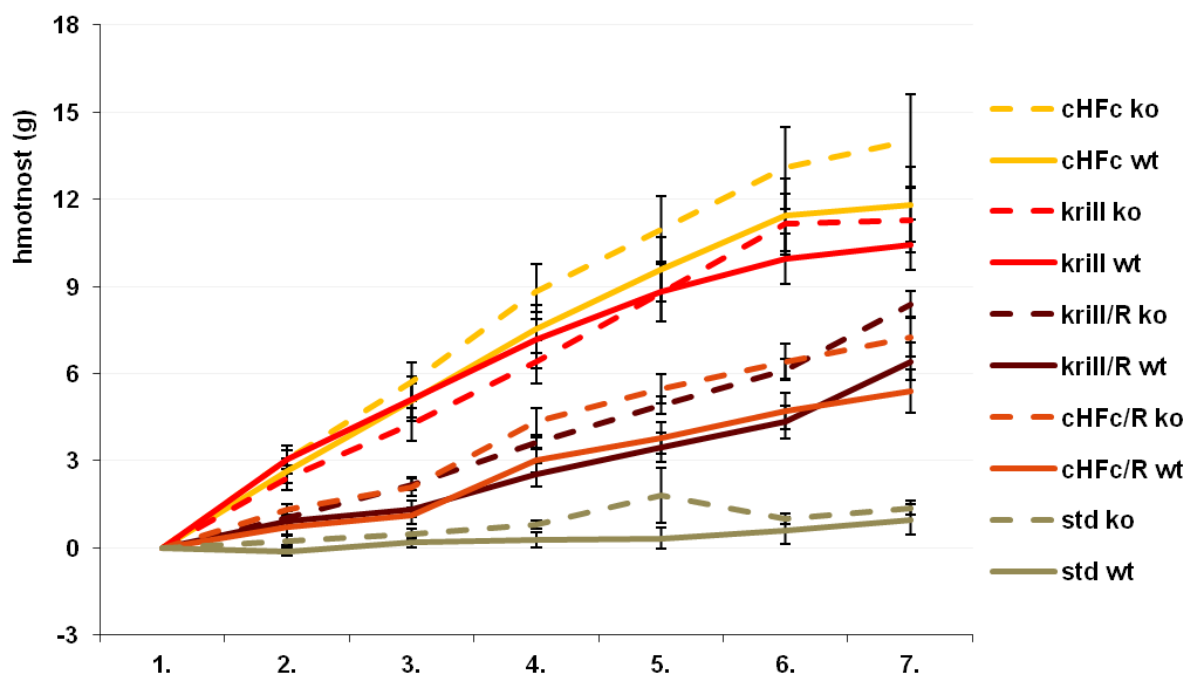
Cílem experimentu bylo popsat vliv diety s vysokým obsahem tuku s přidavkem *n*-3 PUFA, případně v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí na fenotyp zvířat se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v tukové tkáni. Tělesná hmotnost myši byla měřena jednou týdně po celou dobu experimentu stejně jako spotřeba potravy. Z hodnot tělesných hmotností byl vypočten průměrný hmotnostní přírůstek zvířat v jednotlivých skupinách (rozdíl hmotností v daném týdnu a na začátku experimentu). Na konci experimentu byly vyhodnoceny rozdíly hmotností jednotlivých dep tukové tkáně, hladina glykémie, obsah lipidových metabolitů v plazmě a hladiny vybraných enzymů na úrovni genové exprese ve vzorcích gonadálního tukového depa.

6.2.1 Tělesná hmotnost a spotřeba diety

Tělesná hmotnost byla u skupiny std od 2. týdne experimentu signifikantně nižší ve srovnání se skupinami cHFc a krill a od 4. týdne experimentu také signifikantně nižší ve srovnání se skupinami cHFc/R a krill/R. Hmotnost zvířat krmených dietami s vysokým obsahem tuku se během experimentu zvyšovala. Na konci experimentu měly nejvyšší tělesnou hmotnost myši ze skupiny cHFc a krill. Myši ve skupinách na kalorické restrikci (cHFc/R, krill/R) vážily od 5. týdne signifikantně méně ve srovnání se skupinami cHFc a krill. Ve všech skupinách (kromě skupiny krill) měla zvířata s genotypem ko tendenci přibývat na hmotnosti více než wt myši. V žádné skupině však tento rozdíl nebyl signifikantní (Obr. č. 30). Při porovnání hmotnostního přírůstku během experimentu byly od 2. týdne naměřeny signifikantní rozdíly mezi skupinou std ve srovnání se skupinami cHFc a krill. Od 4. týdne byl naměřen signifikantně nižší hmotnostní přírůstek u skupiny std také ve srovnání se skupinami cHFc/R a krill/R. Od 5. týdne byl signifikantní rozdíl i mezi skupinami cHFc/R a krill/R ve srovnání se skupinami cHFc a krill. U žádné ze skupin nebyl rozdíl v hmotnostním přírůstku mezi jednotlivými genotypy signifikantní. Snížení hmotnostního přírůstku bylo zaznamenáno pouze u skupin na kalorické restrikci. Očekávaný účinek *n*-3 PUFA na snížení hmotnostního přírůstku nebyl pozorován ani v jedné skupině (krill, krill/R), (Obr. č. 31). Spotřeba potravy byla u skupiny std signifikantně vyšší ve srovnání se skupinami na dietě s vysokým obsahem tuku, u kterých byla spotřeba přibližně stejná (Obr. č. 32). Standardní dieta obsahuje o 24% méně kalorií ve srovnání s dietami s vysokým obsahem tuku. (Tab. č. 1), myši ve skupině std tak v potravě přijímaly nepatrně více energie než myši v ostatních skupinách.

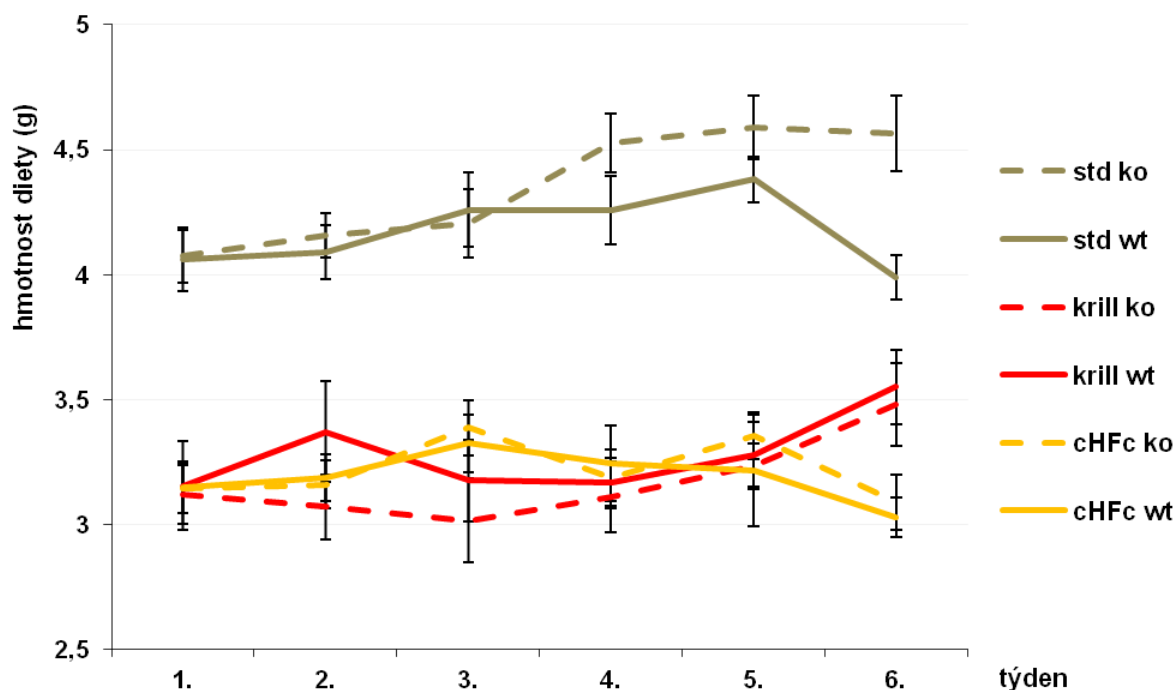


Obr. č. 30. Tělesná hmotnost v průběhu experimentu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) byly naměřeny mezi skupinou std a skupinami bez restriktce (cHFc; krill) od 2. týdne experimentu, mezi skupinou std a skupinami s restrikcí (cHFc/R; krill/R) od 4. týdne experimentu a mezi skupinami s restrikcí (cHFc/R; krill/R) a bez restriktce (cHFc; krill) od 5. týdne experimentu.



Obr. č. 31. Rozdíly v tělesné hmotnosti před začátkem a po ukončení experimentu.

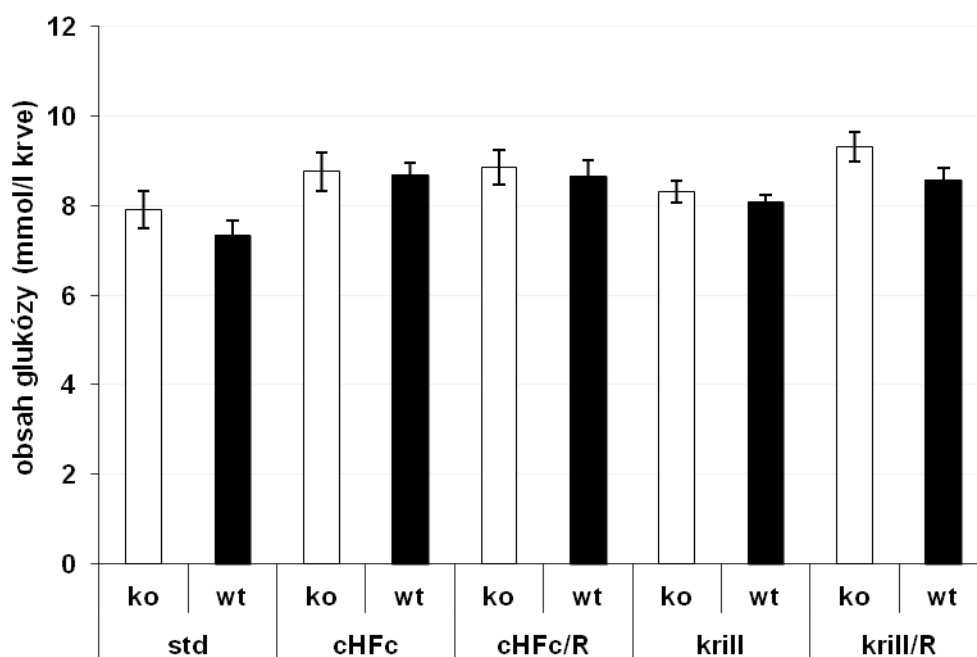
Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) byly naměřeny mezi skupinou std a skupinami bez restriktce (cHFc; krill) od 2. týdne experimentu, mezi skupinou std a skupinami s restriktcí (cHFc/R; krill/R) od 4. týdne experimentu a mezi skupinami s restriktcí (cHFc/R; krill/R) a bez restriktce (cHFc; krill) od 5. týdne experimentu.



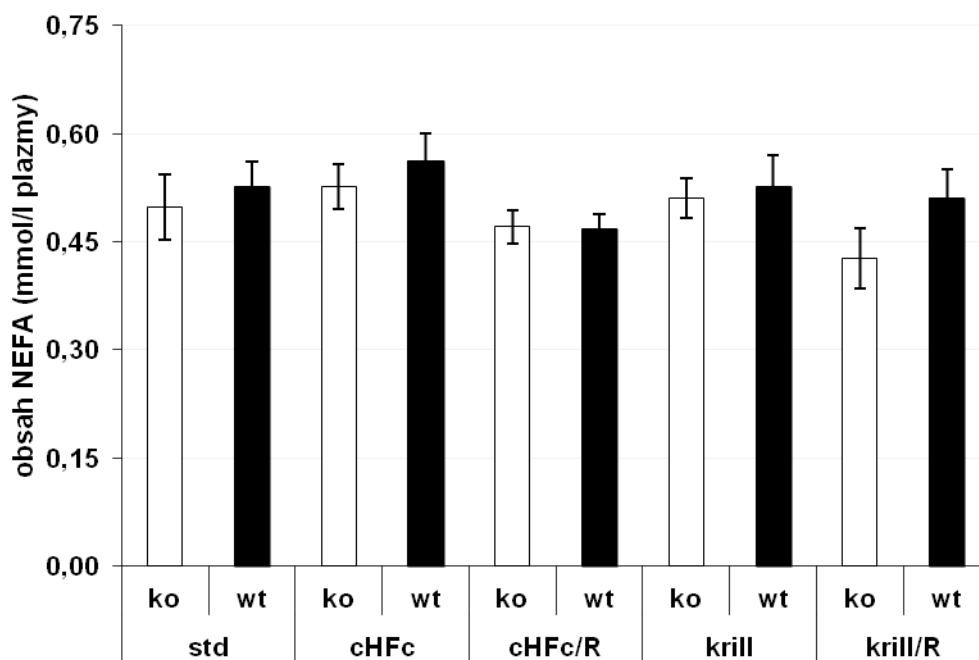
Obr. č. 32. Spotřeba potravy v průběhu experimentu. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) byly naměřeny mezi skupinou std a skupinami bez restriktce (cHFc; krill) od 1. týdne experimentu

6.2.2 Glykémie a koncentrace lipidových metabolitů v plazmě

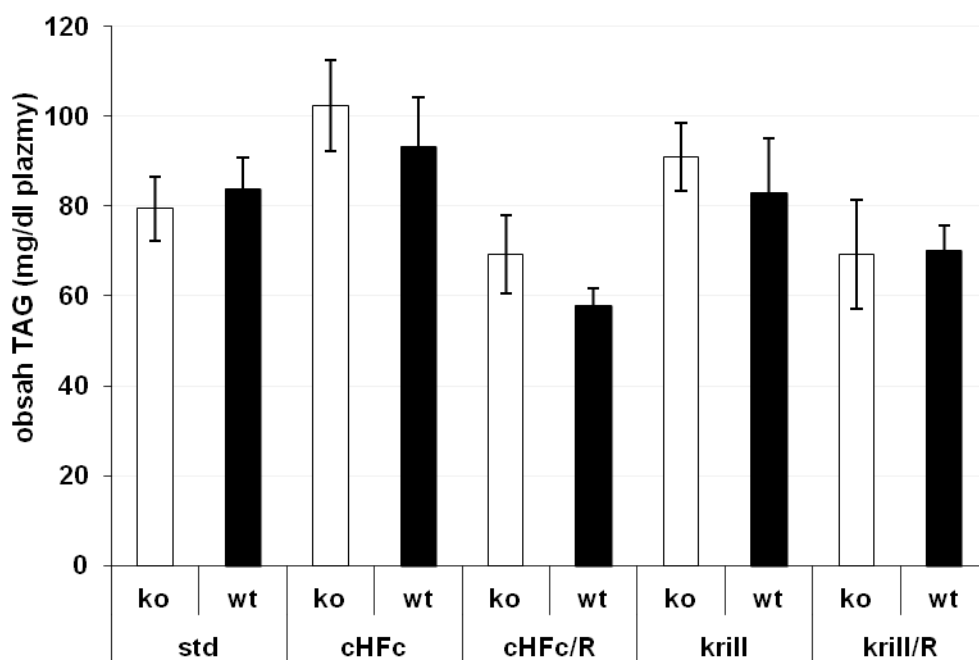
Hladina glykémie byla u experimentálních zvířat měřena pomocí glukometru z krve odebrané z krčních cév ihned po usmrcení. V době ukončení experimentu byly myši v sytém stavu. Hladina glykémie byl u skupiny std signifikantně nižší ve srovnání se skupinami cHFc, cHFc/R a krill/R. Mezi jednotlivými genotypy se v žádné ze skupin signifikantní rozdíly neobjevily (Obr. č. 33). Koncentrace NEFA a triacylglycerolů byla změřena v plazmě. V koncentraci NEFA se neobjevily žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami ani mezi genotypy (Obr. č. 34). Koncentrace triacylglycerolů v plazmě byla ve skupinách cHFc/R a krill/R signifikantně nižší ve srovnání se skupinou cHFc. Signifikantní rozdíly mezi genotypy se nevyskytovaly u žádné ze skupin (Obr. č. 35).



Obr. č. 33. Hladina glykémie. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinou std a skupinami cHFc, cHFc/R a krill/R.



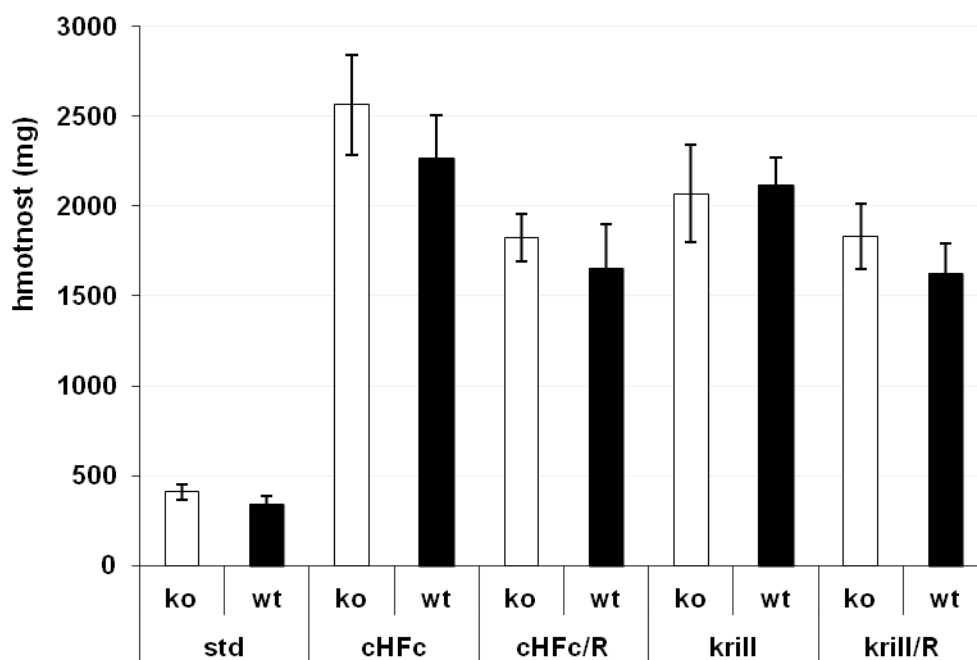
Obr. č. 34. Obsah NEFA v plazmě. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Žádné signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) nebyly naměřeny. NEFA - neesterifikované mastné kyseliny.



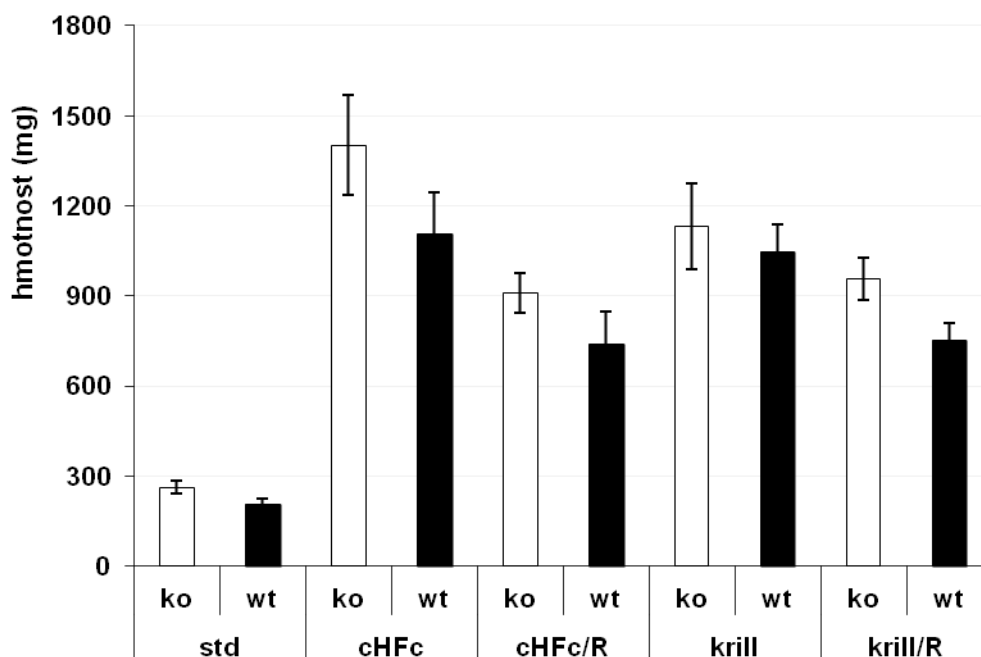
Obr. č. 35. Obsah triacylglycerolů v plazmě. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinou cHFc a skupinami s restrikcí (cHFc/R; krill/R). TAG - triacylglyceroly.

6.2.3 Hmotnost tukových dep

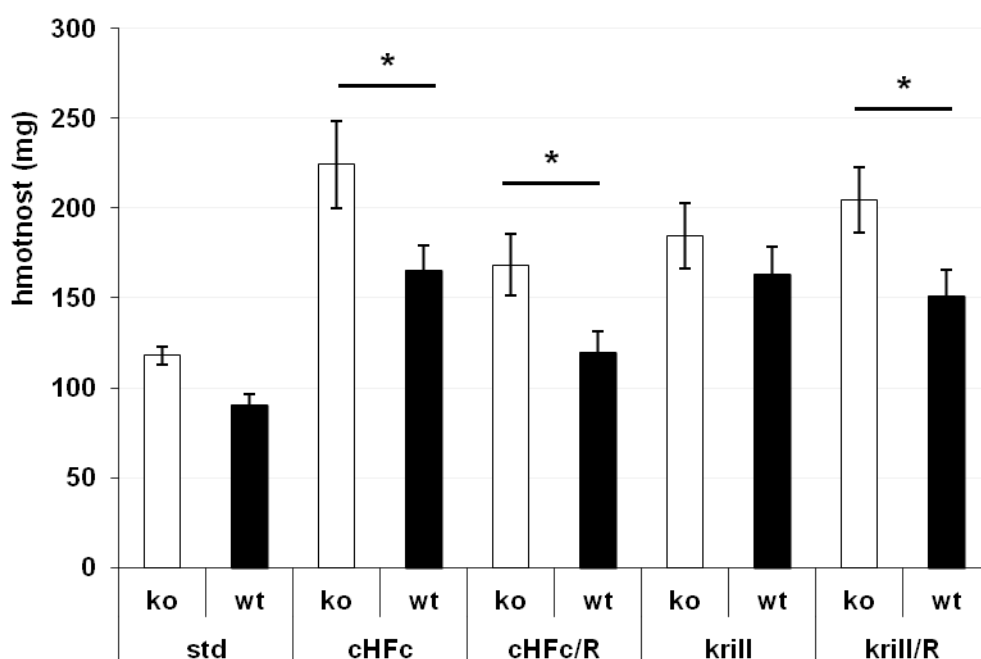
Hmotnosti gonadálního (Obr. č. 36) a dorzolumbálního (Obr. č 37) tukového depa byly u skupiny std signifikantně nižší ve srovnání se všemi ostatními skupinami. Kalorická restrikce signifikantně snížila hmotnost dep bílé tukové tkáně u obou skupin (cHFc/R, krill/R) ve srovnání se skupinou cHFc. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy se neobjevily u žádné ze skupin. Hmotnost hnědé tukové tkáně byla signifikantně vyšší u genotypu ko ve srovnání s genotypem wt u skupin cHFc a cHFc/R a krill/R. Objevily se zde zároveň rozdíly mezi skupinami. Hmotnost hnědého tuku byla signifikantně nižší u skupiny std ve srovnání se skupinami cHFc, krill a krill/R (Obr. č. 38).



Obr. č. 36. Hmotnost gonadálního tukového depa. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinou std a ostatními skupinami (cHFc; cHFc/R; krill; krill/R) a mezi skupinou cHFc a skupinami s restrikcí (cHFc/R; krill/R).



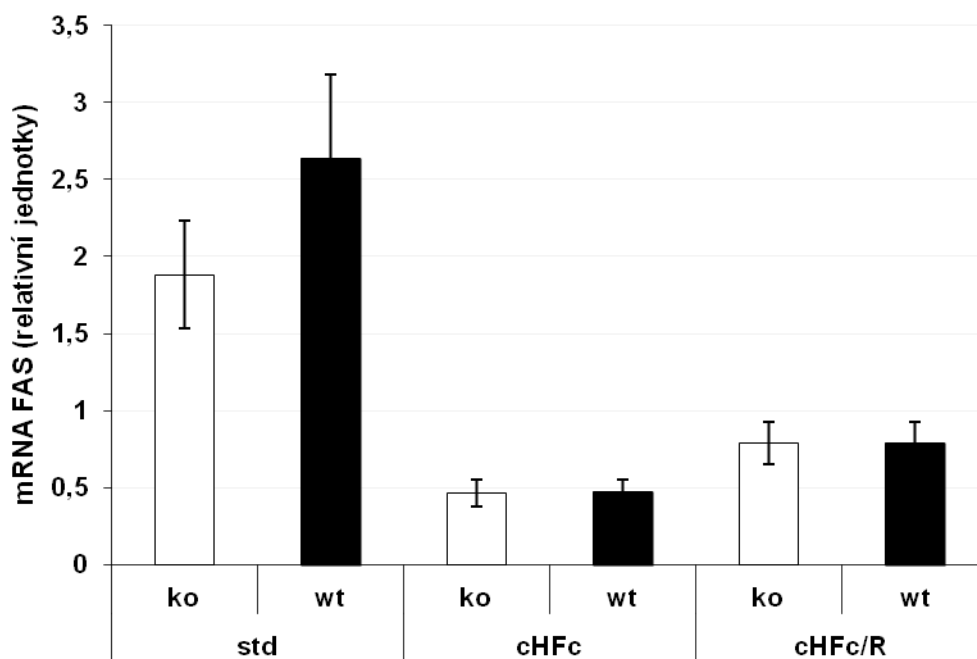
Obr. č. 37. Hmotnost dorzolumbálního tukového depa. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinou std a ostatními skupinami (cHFc; cHFc/R; krill; krill/R) a mezi skupinou cHFc a skupinami s restrikcí (cHFc/R; krill/R).



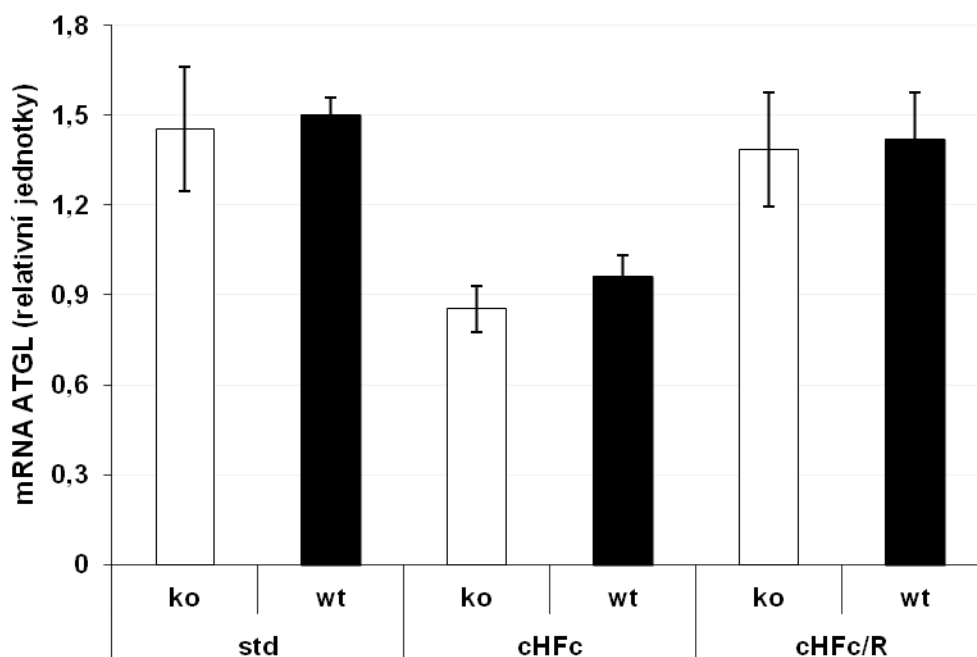
Obr. č. 38. Hmotnost hnědé tukové tkáně. Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinou std a skupinami cHFc, krill a krill/R a *mezi genotypy (ko; wt) ve skupinách cHFc, cHFc/R a krill/R.

6.2.4 Hladiny genové exprese v gonadálním tukovém depu

V gonadálním tukovém depu byly měřeny hladiny genové exprese pro FAS a ATGL. Grafy ukazují hladiny exprese zmíněných genů vztažené na genovou expresi referenčního genu EF-1 α . Vzhledem k tomu, že ve skupinách krill a krill/R se očekávaný účinek *n*-3 PUFA na tělesnou hmotnost a hmotnost tukových dep neobjevil, genová exprese byla měřena pouze u vzorků ze skupin std, cHFc a cHFc/R. Hladina genové exprese pro FAS byla u skupiny std signifikantně vyšší ve srovnání s ostatními skupinami. U skupiny cHFc/R došlo k signifikantnímu nárůstu hladiny genové exprese ve srovnání se skupinou cHFc. Žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy se neobjevily (Obr. č. 39). Hladiny genové exprese pro ATGL byly u skupiny cHFc signifikantně nižší ve srovnání se skupinami std a cHFc/R. Žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy se zde neobjevily (Obr. č. 40). Kalorická restrikce zvýšila genovou expresi klíčových enzymů prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin, žádný vztah k PGC-1 β zde však nebyl nalezen.



Obr. č. 39. Hladina genové exprese pro FAS v gonadálním tukovém depu. Hladiny genové exprese pro FAS jsou vztaženy na hladiny genové exprese pro referenční gen EF-1 α . Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (std; cHFc), (std; cHFc/R) a (cHFc; cHFc/R). FAS - syntáza mastných kyselin, EF-1 α - elongační faktor 1 α .



Obr. č. 40. Hladina genové exprese pro ATGL v gonadálním tukovém depu. Hladiny genové exprese pro ATGL jsou vztaženy na hladiny genové exprese pro referenční gen EF-1 α . Graf znázorňuje průměrné hodnoty z experimentu R K1. Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) jsou mezi skupinami (cHFc; std) a (cHFc; cHFc/R). ATGL - triacylglycerolová lipáza, EF-1 α - elongační faktor 1 α .

7 Diskuze

Prázdné metabolické cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin a mitochondriální respirace v tukové tkáni mají vliv na koncentraci lipidových metabolitů v plazmě, celkovou adipozitu organismu a hmotnost metabolicky aktivních tkání i celého těla (Campbell et al., 1992; Böttcher & Fürst, 1997). Krátkodobá chladová expozice v tukové tkáni vede k indukci prázdného cyklování a zároveň ve všech metabolicky aktivních tkáních stimuluje procesy, mezi které patří mitochondriální biogeneze, respirace a oxidativní fosforylace (Vallerand et al., 1999). Transkripční koaktivátor PGC-1 β hraje klíčovou roli v procesu mitochondriální biogeneze a je zodpovědný za regulaci mitochondriálních respiračních funkcí. Cílem práce bylo popsat vliv specifické delece genu pro PGC-1 β v tukové tkáni na dráhy energetického metabolismu a zejména na prázdné cyklování u myší vystavených chladové či dietní expozici.

7.1 Chladová expozice

Krátkodobá chladová expozice vedla u myší již po prvních dvou dnech k signifikantnímu úbytku tělesné hmotnosti, kdy ztratily průměrně více než jeden gram hmotnosti. Po dalších pěti dnech chladové expozice se hmotnost myší opět přiblížila hmotnosti před začátkem experimentu. Úbytek hmotnosti lze vysvětlit zvýšením energetického výdeje z důvodu potřeby udržení tělesné teploty při chladové expozici. Spotřeba potravy se během prvních dvou dnů chladové expozice zvyšovala zhruba o jeden gram diety denně. Třetí den dosáhla spotřeba u myší vystavených chladu přibližně dvojnásobku spotřeby u myší v termoneutralitě a na této úrovni zůstala do konce experimentu. Nárůst hmotnosti lze částečně vysvětlit tím, že od třetího dne dosáhla spotřeba potravy hodnoty dostatečné pro pokrytí energetického výdeje. Podobné změny v tělesné hmotnosti a spotřebě potravy po krátkodobém vystavení chladu byly pozorovány i v experimentu, ve kterém se porovnávaly myší kmeny A/J a C57BL/6J (Flachs et al., 2017). Specifická delece genu pro PGC-1 β v tukové tkáni neměla vliv na ani jeden sledovaný parametr.

Hladiny NEFA a triacylglycerolů v plazmě byly u zvířat v chladu signifikantně nižší ve srovnání se skupinou ctrl a to zejména po dvoudenní chladové expozici. Během chladové expozice je vylučování lipidových metabolitů z krevního řečiště zvýšeno (Khedoe et al., 2015). NEFA jsou vylučovány játry a následně užity k syntéze triacylglycerolů, které jsou poté uvolněny do krve a znovu hydrolyzovány v kosterních svalech a v hnědé tukové tkáni, což jsou u hlodavců hlavní orgány třesové a netřesové termogeneze. Snížení hladiny těchto lipidových metabolitů v plazmě po dvou dnech chladové expozice a následný nárůst může být způsoben zvýšením potřeby metabolické energie u ostatních tkání a postupným zvyšováním lipolýzy, reesterifikace a *de novo* lipogeneze v bílé tukové tkáni. Zvýšení hladiny plazmatických triacylglycerolů u skupiny 7d cold ve srovnání se skupinou 2d cold může být způsobeno i zvýšením příjmu potravy. Mezi jednotlivými genotypy nebyly

v hladinách lipidových metabolitů v plazmě žádné signifikantní rozdíly a absence PGC-1 β tak patrně nemá vliv na jejich uvolňování a vychytávání v krevním oběhu.

V hmotnosti dorzolumbálního tukového depa nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi genotypy a u skupiny 7d cold je pouze mírné snížení hmotnosti depa ve srovnání s ostatními skupinami, což je patrně způsobené zvýšením katabolizmu tukových zásob z důvodu vyšší poptávky po metabolické energii. Hmotnost gonadálního tukového depa byla u myši ve skupině 2d cold ve srovnání se skupinou ctrl mírně zvýšena. U skupiny 7d cold však došlo k signifikantnímu snížení ve srovnání s ostatními skupinami. Na úrovni genové exprese byla v gonadálním tuku u skupin 2d cold a 7d cold naměřena vyšší hladina genové exprese pro ATGL a u skupiny 7d cold vyšší hladina exprese genu pro FAS. Tyto výsledky naznačují, že během vystavení chladu dochází ke zvyšování lipolýzy a postupně i k nárůstu lipogeneze v tukové tkáni a pravděpodobně i ke zvýšení prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin. Nižší hmotnost gonadálního tukového depa u skupiny 7d cold naznačuje, že katabolizmus tukových zásob zde probíhá rychleji než proces lipogeneze. Zmíněné výsledky jsou v souladu s prací, která byla naší laboratoří publikována v letošním roce (Flachs et al., 2017). Inaktivace genu pro PGC-1 β v tukové tkáni však neměla vliv na žádný z těchto metabolických dějů.

Hmotnost jater se mezi jednotlivými skupinami ani genotypy nelišila, ale mírně vyšší obsah triacylglycerolů byl detekován u skupiny 7d cold. Z důvodu pokrytí zvýšené poptávky po triacylglycerolech ve svalech a hnědém tuku může v játrech docházet ke zvýšení syntézy triacylglycerolů a mastných kyselin *de novo*. Tento efekt byl popsán ve studii zabývající se chladovou expozicí u potkanů (Trayhurn, 1979).

Rozdíly v hmotnosti kosterního svalu byly mezi skupinami i mezi genotypy zanedbatelné. Obsah triacylglycerolů ve svalu byl ve skupině 7d cold u myši s genotypem ko signifikantně nižší ve srovnání s genotypem wt. Důvodem mohou být vyšší nároky na třesovou termogenezi jako kompenzace snížení netřesové termogeneze v hnědém tuku, u kterého lze vzhledem k absenci genu pro transkripční faktor regulující mitochondriální respirační funkce očekávat vznik defektu. Nesignifikantní rozdíl v obsahu triacylglycerolů ve svalu se objevil u myši v termoneutralní teplotě, kde zvířata termogenezi zprostředkovanou hnědým tukem nepotřebují.

Hmotnost hnědé tukové tkáně byla signifikantně vyšší u zvířat ve skupině ctrl ve srovnání se skupinou 2d cold. Během prvních dvou dnů chladové expozice kvůli zvýšení termogeneze v hnědém tuku patrně dochází k vyčerpání zásob triacylglycerolů v hnědých adipocytech. Ve skupině 7d cold došlo k nárůstu hmotnosti tkáně ve srovnání se skupinou 2d cold a u genotypu wt se hmotnost hnědého tuku znovu přiblížila hodnotě u skupiny ctrl. Od třetího dne chladové expozice tak zřejmě dochází ke zvýšení lipogeneze v hnědých adipocytech. K tomuto efektu může přispívat jednak zvýšení příjmu mastných kyselin z triacylglycerolů adipocytem, zvýšení esterifikace mastných kyselin a jejich ukládání do tukových kapének, nebo lipogeneze *de novo* stimulovaná zvýšeným příjmem glukózy hnědou tukovou tkání. Dalším důvodem pro nárůst množství hnědého tuku během chladové expozice

může být zvýšení syntézy proteinů nezbytných pro plnění termogenních funkcí tkáně (Flachs et al., 2017). Konkrétní důvod bude třeba objasnit měřením genové exprese a dalšími experimenty. U zvířat s delecí genu pro PGC-1 β byla ve všech skupinách hmotnost hnědého tuku signifikantně vyšší ve srovnání s genotypem wt. Na rozdíl od wt zvířat však u myši s genotypem ko po sedmi dnech chladové expozice množství hnědého tuku nebylo stejné jako u zvířat ve skupině ctrl. Tento fakt poukazuje na defekt v procesu lipogeneze, popřípadě v syntéze proteinů a mitochondriální biogenezi v této tkáni. U skupin 2d cold a 7d cold byl rozdíl v hmotnosti hnědého tuku mezi genotypy přibližně 25% a 15%. Ve skupině ctrl byl rozdíl v hmotnosti hnědého tuku mezi genotypy více než 50%. Stejný efekt byl pozorován ve studii zkoumající myši se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v tukové tkáni pod aP2 promotorem (Enguix et al., 2013). V této studii byl v hnědém tuku na úrovni genové exprese u zvířat s delecí genu pro PGC-1 β naměřen nižší obsah enzymů účastnících se mitochondriální respirace. Snížená schopnost mitochondrií oxidovat substráty vede ke snížení tvorby protonového gradientu, který je nezbytný pro termogenezi zprostředkovanou UCP1.

Po dvou dnech chladové expozice vzrostla signifikantně hladina genové exprese pro UCP1 ve srovnání s ostatními skupinami. U skupiny 7d cold byla genová exprese pro UCP1 značně nižší než u 2d cold, přesto zde však byl signifikantní rozdíl ve srovnání se skupinou ctrl. Myši s genotypem ko měly ve skupinách 2d cold a 7d cold hladiny mRNA pro UCP1 signifikantně vyšší ve srovnání s genotypem wt. Ve skupině 7d cold bylo naměřeno větší množství UCP1 proteinu ve srovnání se skupinou ctrl. Rozdíl mezi genotypy nebyl zaznamenán. Po přepočtení celkového množství UCP1 na celou interskapulární hnědou tukovou tkáň bylo ve skupině 7d cold u genotypu ko signifikantně více proteinu ve srovnání s wt. Defekt mitochondriálních funkcí v důsledku delece PGC-1 β vedoucí ke snížení oxidativní fosforylace a tvorby protonového gradientu tak může být kompenzován zvýšením hladiny genové exprese a množství proteinu UCP1.

Genová exprese a funkce obou PGC-1 koaktivátorů v metabolicky aktivních tkáních je podobná (Lin et al., 2002). Exprese genu pro PGC-1 α je v tukové tkáni indukována během chladové expozice a stimuluje expresi UCP1 (Puigserver et al., 1998). Vliv chladové expozice na hladiny genové exprese byl v případě PGC-1 α podobný jako u UCP1 a to jak u jednotlivých skupin, tak i u genotypů. Ve skupině 7d cold genová exprese pro PGC-1 α pozitivně korelovala s expresí genu pro UCP1 u obou genotypů. Vyšší expresi pro UCP1 tak lze vysvětlit zvýšením genové exprese PGC-1 α . Zvýšení obsahu PGC-1 α na úrovni genové exprese slouží u genotypu ko pravděpodobně jako kompenzace delece PGC-1 β (Lelliott et al., 2006). U skupin 2d cold a 7d cold byly u zvířat s genotypem ko naměřeny i vyšší hladiny genové exprese pro PPAR α a PPAR γ . Vyšší obsah PPAR α a PPAR γ tak může souviset se zvýšením exprese PGC-1 α a přispívat ke kompenzaci absence PGC-1 β . Aktivace PPAR γ agonistou vede k indukci UCP1 a ke zvýšení aktivity lipoprotein lipázy (LPL), která hraje klíčovou roli při příjmu mastných kyselin v hnědém tuku (Laplante et al., 2003). V případě PPAR γ tak může vyšší hladina genové exprese sloužit ke kompenzaci defektů mitochondriálních funkcí a v příjmu mastných kyselin adipocyty v hnědém tuku.

V bílém tuku nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Vzhledem k tomu, že úroveň mitochondriální respirace je v bílé tukové tkáni podstatně nižší než v hnědém tuku, lze předpokládat, že k tvorbě funkčního defektu zde nedošlo. Zda je absence PGC-1 β v této tkáni rovněž kompenzována zvýšením exprese PPAR α , PPAR γ a PGC-1 α , či jiným způsobem, je nutné ověřit měřením genové exprese.

7.2 Kalorická restrikce

Podávání diety s obsahem *n*-3 PUFA aktivuje PPAR γ . Aktivace tohoto receptoru pomocí syntetického agonisty rosiglitazonu vedlo v tukové tkáni k nárůstu množství mitochondrií, zvýšení oxidace mastných kyselin a ke snížení celkové adipozity organismu (Wilson-Fritch et al., 2004). V případě *n*-3 PUFA jsou zmíněné efekty slabší a k jejich zesílení lze využít mírné kalorické restrikce (Flachs et al., 2011).

Cílem tohoto experimentu bylo popsat efekt diety s vysokým obsahem tuku s přidavkem *n*-3 PUFA, případně v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí na fenotyp zvířat se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v tukové tkáni. Vliv této dietní expozice byl sledován zejména ve vztahu k indukci prázdného metabolického cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin a k funkci mitochondrií v tukové tkáni experimentálních zvířat.

Hmotnostní přírůstek myši ve skupině krill se od skupiny cHFc nelišil. U skupin na kalorické restrikci (cHFc/R, krill/R) byl hmotnostní přírůstek nižší ve srovnání se skupinami bez restrikce. Nebyl zde však pozorován efekt *n*-3 PUFA na snížení hmotnosti, který se objevil v předchozích experimentech v naší laboratoři (Flachs et al., 2011). Odlišný účinek v tomto experimentu mohl být způsoben použitím jiného zdroje *n*-3 PUFA (krill místo EPAX 1050 TG) případně odlišné dávky a poměru mastných kyselin. U zvířat s genotypem ko byl ve všech skupinách hmotnostní přírůstek mírně vyšší ve srovnání s genotypem wt, žádné signifikantní rozdíly se však neobjevily.

Hmotnost gonadálního a dorzolumbálního tukového depa byla u všech skupin na dietě s vysokým obsahem tuku signifikantně vyšší než u skupiny std. V obou případech byla hmotnost tukových dep nejvyšší u skupin cHFc a krill. Kalorická restrikce snížila hmotnost tukových dep v obou skupinách, větší efekt *n*-3 PUFA se však neobjevil. U obou tukových dep nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl mezi genotypy.

Hmotnost hnědé tukové tkáně byla signifikantně vyšší u genotypu ko ve všech skupinách kromě skupin krill a std, kde byl pozorován pouze trend. Stejný efekt se objevil i u experimentů zabývajících se chladovou expozicí a je tedy zřejmé, že v hnědém tuku dochází vlivem delece genu pro PGC-1 β k tvorbě funkčního defektu, který způsobuje zvětšení tkáně.

Hladiny NEFA v plazmě se nelišily mezi skupinami ani mezi genotypy. U hladin triacylglycerolů nebyly žádné rozdíly mezi genotypy a jediný signifikantní rozdíl byl mezi skupinami cHFc a cHFc/R, kde byly hladiny nižší u skupiny na kalorické restrikci zřejmě v důsledku vyšší poptávky po metabolické energii.

Vzhledem k tomu, že u skupin krill a krill/R se očekávaný efekt *n*-3 PUFA neobjevil a zmírnění hmotnostního přírůstku bylo pozorováno pouze u skupin na kalorické restrikci, měření genové exprese bylo provedeno pouze u skupin std, cHFc a cHFc/R. Hladina genové exprese pro FAS ve vzorcích gonadálního tukového depa byla signifikantně vyšší u skupiny std ve srovnání s ostatními skupinami. U zvířat krmených dietou s vysokým obsahem tuku tak v gonadálním depu dochází ke snížení lipogeneze. Kalorická restrikce však vede k signifikantnímu zvýšení exprese tohoto genu. Genová exprese ATGL dosahovala přibližně stejných hodnot u skupin std a cHFc/R, zatímco u skupiny cHFc byla signifikantně nižší. Příjem diety s vysokým obsahem tuku tak snižuje lipolýzu a lipogenezi. Mírná kalorická restrikce byla dostatečným stimulem k navýšení procesu lipolýzy a lipogeneze *de novo*, případně reesterifikace mastných kyselin. U FAS ani u ATGL nebyly naměřeny žádné signifikantní rozdíly mezi genotypy a delece genu pro PGC-1 β tak stejně jako u chladové expozice v gonadálním tuku neovlivnila prázdňové cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací.

8 Závěr

U myší se specifickou delecí genu pro PGC-1 β v tukové tkáni, které byly vystaveny krátkodobé chladové expozici, se ve srovnání s kontrolními zvířaty neobjevily žádné signifikantní rozdíly v tělesné hmotnosti, příjmu potravy, koncentraci lipidových metabolitů v plazmě ani v hmotnosti metabolicky aktivních tkání s výjimkou hnědé tukové tkáně. Hmotnost hnědého tuku představuje největší fenotypový rozdíl a vypovídá o defektu mitochondriálních respiračních funkcí v této tkáni. Snížení mitochondriální respirace a oxidativní fosforylace vede ke zmenšení protonového gradientu, který je nezbytný pro netřesovou termogenezi zprostředkovanou UCP1. U myší s absencí PGC-1 β vystavených chladu proto dochází ke kompenzaci zvýšením obsahu UCP1 na úrovni genové exprese i proteinu. Další kompenzací absence PGC-1 β v hnědém tuku zvířat vystavených chladu je zvýšení hladin genové exprese pro PPAR α , PPAR γ a PGC-1 α . PGC-1 α během chladové expozice stimuluje expresi UCP1 a má tak přímý vliv na zvýšení obsahu UCP1. Tyto závěry podporuje i pozitivní korelace hladin genové exprese pro UCP1 s genovou expresí pro PGC-1 α naměřená v hnědé tukové tkáni chladově exponovaných myší. Dalším fenotypovým rozdílem je nižší obsah triacylglycerolů v kosterním svalu myší s absencí PGC-1 β . Tento efekt může být způsoben vyšší spotřebou mastných kyselin ve svalu v důsledku vyššího požadavku na třesovou termogenezi, která kompenzuje defekt hnědé tukové tkáně.

Experiment zabývající se dietní expozicí neukázal žádné signifikantní fenotypové rozdíly mezi jednotlivými genotypy s výjimkou hmotnosti hnědého tuku. Podle měření hladin genové exprese pro ATGL a FAS způsobila mírná kalorická restrikce zvýšení lipolýzy, lipogeneze a pravděpodobně i aktivaci prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin v gonadálním tukovém depu u zvířat krmených dietou s vysokým obsahem tuku. Kombinovaný efekt *n*-3 PUFA a kalorické restrikce se zde však neprojevil. Vliv delece genu pro PGC-1 β na indukci prázdného cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací mastných kyselin v gonadálním tukovém depu nebyl prokázán ani v tomto pokusu ani u experimentů zaměřených na chladovou expozici.

Seznam literatury

- Ahmadian, M., Abbott, M. J., Tang, T., Hudak, C. S. S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M. K., Lee, H., Samuel, V. T., Gerald, I., Wang, Y., Duncan, R. E., Kang, C., & Sul, H. S. **2011**. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metabolism*, 13(6): 739–748.
- Atit, R., Sgaier, S. K., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D., Joyner, A. L., Niswander, L., Conlon, R. A. **2006**. Beta-Catenin Activation Is Necessary and Sufficient To Specify the Dorsal Dermal Fate in the Mouse. *Developmental Biology*, 296(1): 164–176.
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., Evans, R. M. **1999**. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*, 4(10): 585–595.
- Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M., & Berlan, M. **1996**. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *British journal of pharmacology*, 117(5): 907–913.
- Bartness, T., Vaughan, C., Song, C. **2010**. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 34(1): S36-S42.
- Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Grousse A., Jocke, J., Laurencikienė, J., Anesia, R., Rodriguez, A., Ryden, M., Stenson, B., Dani, C., Ailhaud, G., Arner, P., Langin, D. **2009**. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *Journal of biological chemistry*, 284(27): 18282-18291.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W. D., Kessar, N., Dani, C., Dupin, E. **2007**. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development (Cambridge, England)*, 134(12): 2283–92.
- Black, B., Croom, J., Eisen, E., Petro, A., Edwards, C., Surwit, R. **1998**. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A / J and C57BL / 6 mice . *Metabolism*, 47(11): 1354–1359.

Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Borén, J., Olofsson, S. **2007**. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature cell biology*, 9(11): 1286-1293.

Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. **2012**. *Medical physiology: a cellular and molecular approach* (updated 2nd edition).

Böttcher, H., & Fürst, P. **1997**. Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 21(6): 439–444.

Campbell, P. J., Carlson, M. G., Hill, J. O., & Nurjhan, N. **1992**. Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *The American journal of physiology*, 263(6):E1063–E1069.

Cannon B, Nedergaard J, Lundberg JM, Hökfelt T, Terenius L, Goldstein M. **1986**. 'Neuropeptide tyrosine' (NPY) is co-stored with noradrenaline in vascular but not in parenchymal sympathetic nerves of brown adipose tissue. *Experimental Cell Research*, 164(2): 546-550.

Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajdouch, E., Ferré, P., Foufelle, F. **2005**. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26): 25250–25257.

Delayre-Orthez, C., Becker, J., Guenon, I., Lagente, V., Auwerx, J., Frossard, N., Pons, F. **2005**. PPAR α downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. *Respiratory Research*, 9(6): 91-99.

Enguix, N., Pardo, R., González, A., Lopez, V. M., Simo, R., Kralli, A., Villena, J. A. **2013**. Mice lacking PGC-1 β in adipose tissues reveal a dissociation between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Molecular Metabolism*, 2(3), 215–226.

Festuccia, W. T. L., Guerra-Sá, R., Kawashita, N. H., Garófalo, M. a R., Evangelista, E. A., Rodrigues, V., Kettelhut, I. C., Migliorini, R. H. **2003**. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology*, 284(6): 1536–1541.

Flachs, P., Adamcova, K., Zouhar, P., Marques, C., Janovska, P., Viegas, I., Jones, J., Bardova, K., Svobodova, M., Hansikova, J., Kuda, O., Rossmeisl, M., Liisberg, U., Borkowska, A., Kristiansen, K., Madsen, L., Kopecky, J. **2017**. Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice : link to lean phenotype. *International Journal of Obesity*, 41(3): 372–380.

Flachs, P., Rühl, R., Hensler, M., Janovska, P., Zouhar, P., Kus, V., Macek Jilkova, Z., Papp, E., Kuda, O., Svobodova, M., Rossmeisl, M., Tsenov, G., Mohamed-Ali, V., Kopecky, J. **2011**. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia*, 54(10): 2626–2638.

Forman, B. M., Chen, J., & Evans, R. M. **1997**. Hypolipidemic drugs , polyunsaturated fatty acids , and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4): 4312–4317.

Hashimoto, T., Segawa, H., Okuno, M., Kano, H., Hamaguchi, H. -o., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Hasui, S., Yamaguchi, T., Hirose, F., & Osumi, T. **2012**. Active involvement of micro-lipid droplets and lipid droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *Journal of Cell Science*, 125(4): 6127–6136.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M. **2001**. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852): 179–183.

Houšťek, J., Andersson, U., Tvrdík, P., Nedergaard, J., Cannon, B. **1995**. The expression of subunit c correlates with and thus may limit the biosynthesis of the mitochondrial FOF1-ATPase in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13): 7689–7694.

Huss, J. M., Gigue, V., Torra I. P., Kelly, D. P. **2004**. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20): 9079–9091.

Charney, A. N., Micic, L., & Egnor, R. W. **1998**. Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *The American journal of physiology*, 274(3): G518-G524.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1): 156–159.

Issemann, I., & Green, S. **1990**. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294): 645-650.

Jäger, S. S., Handschin, C. C., St-Pierre, J. J., Spiegelman, B. M. B. M. **2007**. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29): 12017–12022.

Kalderon, B., Mayorek, N., Berry, E., Zevit, N., Bar-Tana, J. **2000**. Fatty acid cycling in the fasting rat. *American Journal of Physiology*, 279(1): E221–E227.

Khedoe, P. P., Hoeke, G., Kooijman, S., Dijk, W., Buijs, J. T., Kersten, S., Havekes, L., Hiemstra, P., Berbée, J., Boon, M., Rensen, P. **2015**. Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 56(1), 51–59.

Kim, J., Gavrilova, O., Chen, Y., Reitman, M., Shulman, G. **2000**. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *Journal of biological chemistry*, 275(12): 8456-8460.

Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., Evans, R. M., **1992**. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 358(6389): 771-774.

Koppen, A., & Kalkhoven, E. **2010**. Brown vs white adipocytes : The PPAR γ coregulator story. *FEBS Letters*, 584(15): 3250–3259.

Laplante, M., Sell, H., Macnaul, K. L., Richard, D., Berger, J. P., & Deshaies, Y. **2003**. PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity. *Diabetes*, 52(2): 291–299.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., & Zechner, R. **2006**. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chananin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3(5): 309–319.

Lelliott, C. J., Medina-Gomez, G., Petrovic, N., Kis, A., Feldmann, H. M., Bjursell, M., Parker, N., Curtis, K., Campbell, M., Hu, P., Zhang, D., Litwin, S. E., Zaha, V. G., Fountain, K. T., Boudina, S., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Lopez, M., Meirhaeghe, A., Bohlooly-Y, M., Storlien, L., Strömstedt, M., Snaith, M., Orešič, M., Abel, E. D., Cannon, B., Vidal-Puig, A. **2006**. Ablation of PGC-1 β results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biology*, 4(11): 2042–2056.

Lemberger, T., Saladin, R., Vázquez, M., Assimacopoulos, F., Staels, B., Desvergne, B., Wahli, W., Auwerx, J. **1996**. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(3): 1764–1769.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., & Spiegelman, B. M. **2002**. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3): 1645–1648.

Lin, J., Tarr, P. T., Yang, R., Rhee, J., Puigserver, P., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M. **2003**. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33): 30843–30848.

Lüllmann-Rauch, R. **2012**. *Histologie* (3rd ed.). Grada Publishing a.s.

Nelson, D. L., Cox M. M., Lehninger, A. L. **2008**. *Lehninger principles of biochemistry* (5th edition).

Newsholme, E. A., & Crabtree, B. **1976**. Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation. *Biochemical Society symposium*, (41): 61–109.

Nye, C. K., Hanson, R. W., & Kalhan, S. C. **2008**. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41): 27565–27574.

Odegaard, J., Ricardo-Gonzalez, R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Eagle, A. R., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., Chawla, A. **2007**. Macrophage-specific PPAR γ ; controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148): 1116–1120.

Orban, P. C., Chui, D., & Marth, J. D. **1992**. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8): 6861–6865.

Paolisso, G., Tataranni, P. A., Foley, J. E., Bogardus, C., Howard, B. V., & Ravussin, E. **1995**. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*, 38(10): 1213–1217.

Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Wilson, T., Rosenfeld, M. G., Glass, C. K. **2005**. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*, 437(7059): 759–763.

Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. **2010**. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10): 7153–7164.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B. M. **1998**. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6): 829–839.

Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., Kersten, S. **2009**. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLoS ONE*, 4(8): e6796.

Rondinone, C. M., Wang, L. M., Lonroth, P., Wesslau, C., Pierce, J. H., Smith, U. **1997**. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8): 4171–4175.

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobavashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., Tsujisaki, M. **2009**. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58(7): 1526–1531.

Sanderson, L. M., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J. E. J., Koppen, A., Kalkhoven, E., Müller, M., Kersten, S. **2008**. Effect of synthetic dietary triglycerides: A novel research paradigm for nutrigenomics. *PLoS ONE*, 3(2): e1681.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L., Tavernier, G., Langin, D., Spiegelman, B. M. **2007**. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metabolism*, 6(1): 38–54.

Sonoda, J., Mehl, I. R., Chong, L., Nofsinger, R. R., Evans, R. M. **2007**. PGC-1 beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12): 5223–5228.

Sugii, S., Olson, P., Sears, D. D., Saberi, M., Atkins, A. R., Barish, G. D., Hong, S., Castro, G. L., Yin, Y., Nelson, M. C., Hsiao, G., Greaves, D., Downes, M., Yu, R. T., Olefsky, J. M., Evans, R. M. **2009**. PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52): 22504–22509.

Sun, Z., Gong, J., Wu, H., Xu, W., Wu, L., Xu, D., Gao, J., Wu, J., Yang, H., Yang, M., Li, P. **2013**. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nature Communications*, 4(1594): 2538-54.

St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P. T., Yang, R., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M. **2003**. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29): 26597–26603.

Takata, Y., Kitami, Y., Yang, Z.-H., Nakamura, M., Okura, T., Hiwada, K. **2002**. Vascular Inflammation Is Negatively Autoregulated by Interaction Between CCAAT/Enhancer-Binding Protein-delta and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma. *Circulation Research*, 91(5): 427-433.

Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V, Gavrilova, O., Londos, C. **2001**. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98(11): 6494–6499.

Tanaka, N., Takahashi, S., Matsubara, T., Jiang, C., Sakamoto, W., Chanturiya, T., Gonzalez, F. J. **2015**. Adipocyte-specific disruption of fat-specific protein 27 causes hepatosteatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5): 3092–3105.

Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., Langin, D. **2003**. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35): 33370–33376.

Trayhurn, P. **1979**. Fatty acid synthesis in vivo in brown adipose tissue, liver and white adipose tissue of the cold-acclimated rat. *FEBS Letters*, 104 (1):13-16.

Ukropec, J., Anunciado, R. P., Ravussin, Y., Hulver, M. W., Kozak, L. P. **2006**. UCP1 independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1^{-/-} mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42): 31894–31908.

Unger, R. H., & Scherer, P. E. **2010**. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(6): 345–352.

Vallerand, A. L., Zamecnik, J., Jones, P., Jacobs, I. **1999**. Cold stress increases lipolysis, FFA Ra and TG/FFA cycling in humans. *Aviat, Space and Environmental Medicine*, 70 (1): 42-50.

Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. **2011**. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(8): 1007–1022.

Vercauteren, K., Gleyzer, N., Scarpulla, R. C. **2008**. PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18): 12102–12111.

Vercauteren, K., Pasko, R. A., Gleyzer, N., Marino, V. M., Scarpulla, R. C. **2006**. PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20): 7409–7419.

Volpe, J. J., & Vagelos, P. R. **1974**. Regulation of mammalian fatty-acid synthetase. The roles of carbohydrate and insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(3): 889–893.

Vianna, C. R., Huntgeburth, M., Coppari, R., Choi, C. S., Lin, J., Krauss, S., Barbatelli, G., Tzamelis, I., Kim, Y., Cinti, S., Shulman, G. I., Spiegelman B. M., Lowell, B. B. **2007**. Hypomorphic Mutation in PGC1 β causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metabolism*, 4(6): 453–464.

Vidal-Puig, A. J., Considine, R. V, Jimenez-Liñan, M., Werman, A., Pories, W. J., Caro, J. F., & Flier, J. S. **1997**. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *The Journal of clinical investigation*, 99(10): 2416–2422.

Voet, D., & Voet, J. G. **2011**. *Biochemistry 4th Edition* (4th ed.).

Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P., Corvera, S. **2004**. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9): 1281–1289.

Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Hyun Choi, J., Giang, A., Khandekar, M., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., Lichtenbelt, W., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B. M. **2013**. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376.

Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J., Spiegelman, B. M. **1999**. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell*, 3(2): 151–158.

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Rao, M. S., & Reddy, J. K. **1995**. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17): 7921–7925.