

## **Erratum**

Str. 27 Také kardiomyocyty myší, u kterých byl streptomycinem.. opraveno na: Také kardiomyocyty myší, u kterých byl streptozotocinem...

Kapitola 3.2.3 (str. 38) je totožná s kapitolou 3.2.5 (str. 39)

#### 4.1 Měření koncentrace RNA

Tabulka č. 4 shrnuje naměřené koncentrace a čistoty RNA izolované z lymfocytů periferní krve pomocí TriReagentu a po ošetření RNA DNasou. Vzorky jsou zobrazeny v pořadí, v jakém byly zpracovány. Celkový soubor čítá 188 vzorků, 19 bylo použito na vnitřní standard (č. 85-103), izolace RNA byla opakována u 4 vzorků pacientů s více odběry z důvodu vysokých hodnot Ct referenčních genů (vzorek č. 75 byl zopakován jako vzorek s č. 183, vzorek č. 74 jako č. 184, vzorek č. 67 jako č. 182 a vzorek č. 150 jako č. 175)

**Tabulka č. 4: Naměřené koncentrace a čistoty RNA izolované z lymfocytů a po ošetření DNasou pro všechny vzorky**

Číslo vzorku	Skladování lymfocytů	Odběr	Izolovaná RNA z lymfocytů			RNA po ošetření DNasou		
			$C_{RNA}$ [ng/ul]	Poměr A 260/280	Poměr A 260/230	$C_{RNA}$ [ng/ul]	Poměr A 260/280	Poměr A 260/230
6**	suspenze	K	125,5	1,98	0,79	84,9	1,88	0,68
7	suspenze	K	477,7	1,98	1,00	260,4	1,92	0,98
10	suspenze	O-MX	966,4	1,96	2,11	218,7	1,94	1,65
12	suspenze	O-MX	381,6	1,96	1,81	202,4	1,92	1,47
13	suspenze	O-MX	512,7	1,93	0,94	275,9	1,90	0,92
14	suspenze	O-MX	311,6	1,91	2,26	140,1	1,91	1,56
15**	peleta	K	350,0	1,81	1,55	179,7	1,89	1,30
16**	peleta	K	221,5	1,74	0,95	108,0	1,82	0,72
17**	peleta	K	425,7	1,75	0,92	194,6	1,77	0,76
18	suspenze	K	212,9	1,80	1,85	82,3	1,93	1,30
19	suspenze	K	107,9	1,73	1,95	53,2	1,93	0,77
20	suspenze	K	518,0	1,91	2,21	286,5	1,97	1,81
21	suspenze	K	553,3	1,89	1,58	224,0	1,95	1,62
22*	suspenze	K	59,4	1,82	0,50	nd		
23	suspenze	A-M6	290,5	1,79	1,94	133,9	1,77	0,92
24	suspenze	O-M6	251,9	1,79	1,90	94,4	1,98	1,46
25	suspenze	K	562,2	1,94	2,06	258,2	1,97	1,70
26	suspenze	A-M0	238,9	1,79	1,92	104,1	1,91	1,22
27	suspenze	O-MX	291,0	1,77	2,09	132,5	1,94	1,54
28	suspenze	A-M0	229,2	1,73	2,18	92,1	1,91	1,50
29	suspenze	O-M6	357,2	1,78	2,04	162,4	1,91	1,36
31	suspenze	O-MX	355,5	1,79	1,95	153,6	1,93	1,49
32	suspenze	O-M6	145,4	1,70	0,53	65,8	1,80	0,38
33	suspenze	O-MX	299,2	1,66	0,62	69,9	1,52	0,32
34*	suspenze	O-MX	18,7	1,65	0,22	nd		

## Pokračování tabulky č. 4

184	peleta	O-M0	437,0	1,93	2,24	230,8	1,94	1,78
8	suspenze	O-M6	1195,3	2,01	1,82	199,1	1,93	1,40
71	suspenze	O-M12	385,2	1,79	1,50	194,3	1,89	1,31
65	suspenze	O-M0	299,4	1,94	1,76	104,9	1,84	1,07
9	suspenze	O-M6	299,4	1,94	1,76	129,7	1,86	1,31
154	suspenze	O-M12	239,6	1,77	1,61	142,3	1,87	1,25
73	suspenze	O-M0	226,8	1,59	0,82	104,2	1,88	1,16
11	suspenze	O-M6	667,4	1,91	1,32	356,7	1,89	0,98
70	suspenze	O-M12	363,1	1,50	0,75	52,5	1,55	0,27
178	suspenze	O-M6	251,1	1,80	2,01	166,6	1,89	1,42
186	peleta	A-M6	330,8	1,95	1,90	239,5	1,89	1,27
182	peleta	O-M0	258,5	1,86	1,85	155,2	1,92	1,49
30	suspenze	O-M6	524,9	1,78	1,77	268,6	1,90	1,48
106	suspenze	O-M12	283,8	1,82	2,17	132,5	1,85	1,50
170	suspenze	A-M12	393,2	1,79	2,03	200,0	1,88	1,58
152	suspenze	O-M0	487,2	1,77	2,09	254,3	1,88	1,57
62	suspenze	O-M6	550,7	1,87	1,26	265,7	1,56	0,38
155	suspenze	O-M12	328,5	1,78	1,83	164,1	1,86	1,41
110	suspenze	O-M0	252,7	1,78	2,13	146,0	1,90	1,48
179	suspenze	O-M6	358,3	1,81	1,92	183,9	1,89	1,50
177	suspenze	A-M6	393,6	1,97	1,70	214,5	1,93	1,47
175	peleta	A-M0	232,5	1,81	1,37	142,6	1,89	1,13
176	suspenze	A-M6	370,1	1,81	1,72	191,1	1,87	1,40
173	suspenze	O-MX	169,6	1,78	2,03	95,3	1,88	1,41
185	suspenze	O-M6	388,7	1,80	1,69	201,0	1,88	1,39
187	suspenze	K	163,9	1,7	1,36	101,8	1,71	1,33
188	suspenze	K	374,9	1,82	2,18	201,2	1,88	1,48
189	suspenze	K	213,2	1,8	1,18	129,3	1,85	0,95
190	suspenze	A-M0	276,7	1,97	1,18	157,5	1,87	0,98
191	suspenze	K	113,5	1,96	1,24	73,6	1,87	1,17
192	suspenze	K	331,1	1,81	1,47	194,7	1,88	1,51

\* takto označené vzorky byly pro nízké výtěžky izolované RNA vyřazeny (vzorky č. 34, 151, 164)

\*\* takto označené vzorky kontrol byly z důvodů vysokých hodnot Ct referenčních genů z analýzy softwarem GenEx (Multid, Švédsko) vyřazeny (vzorky č. 6, 14, 15, 16)

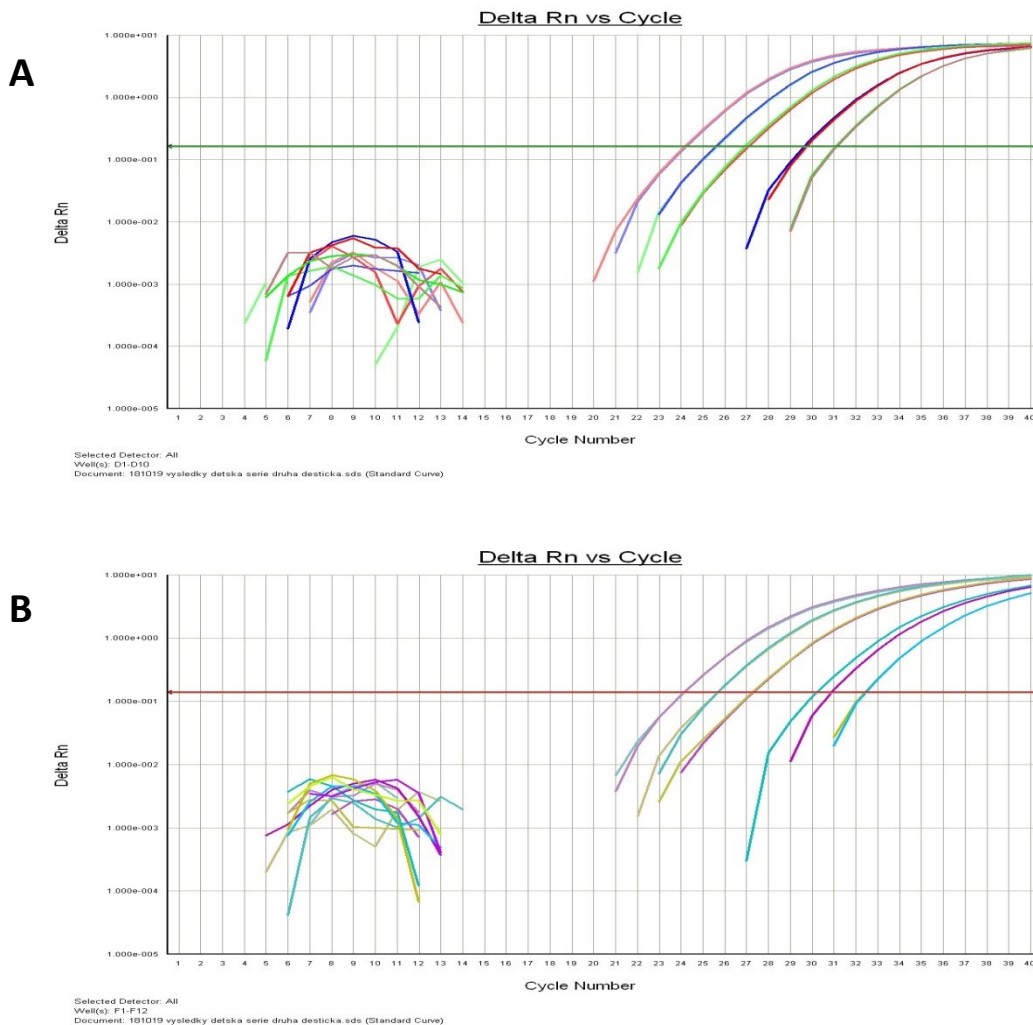
Měření probíhalo na přístroji Spektrofotometr NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific (USA).

Zkratky: O-M0 - obézní dospělý po redukci váhy, první návštěva, O-MX - obézní dospělý s maximální tělesnou hmotností, první odběr, O-M6 - obézní dospělý 6 měsíců po změně stravovacího režimu, O-M12 - obézní dospělý 12 měsíců po změně stravovacího režimu, K – dospělá kontrola, A-M0 - obézní dospívající při první návštěvě, A-M6 - obézní dospívající 6 měsíců po první návštěvě po změně stravovacího režimu A-M12 - obézní dospívající 12 měsíců po změně stravovacího režimu, AK – dospívající kontrola, peleta – izolované lymfocyty uchovávané

bez TriReagentu, suspenze – lymfocyty rozpuštěné a uchovávané v TriReagentu,  
 $C_{RNA}$  – koncentrace RNA,  $A$  – absorbance, nd – nebylo provedeno, nd – nebylo odebráno.

## 4.2 Hodnoty Ct a relativní genová exprese

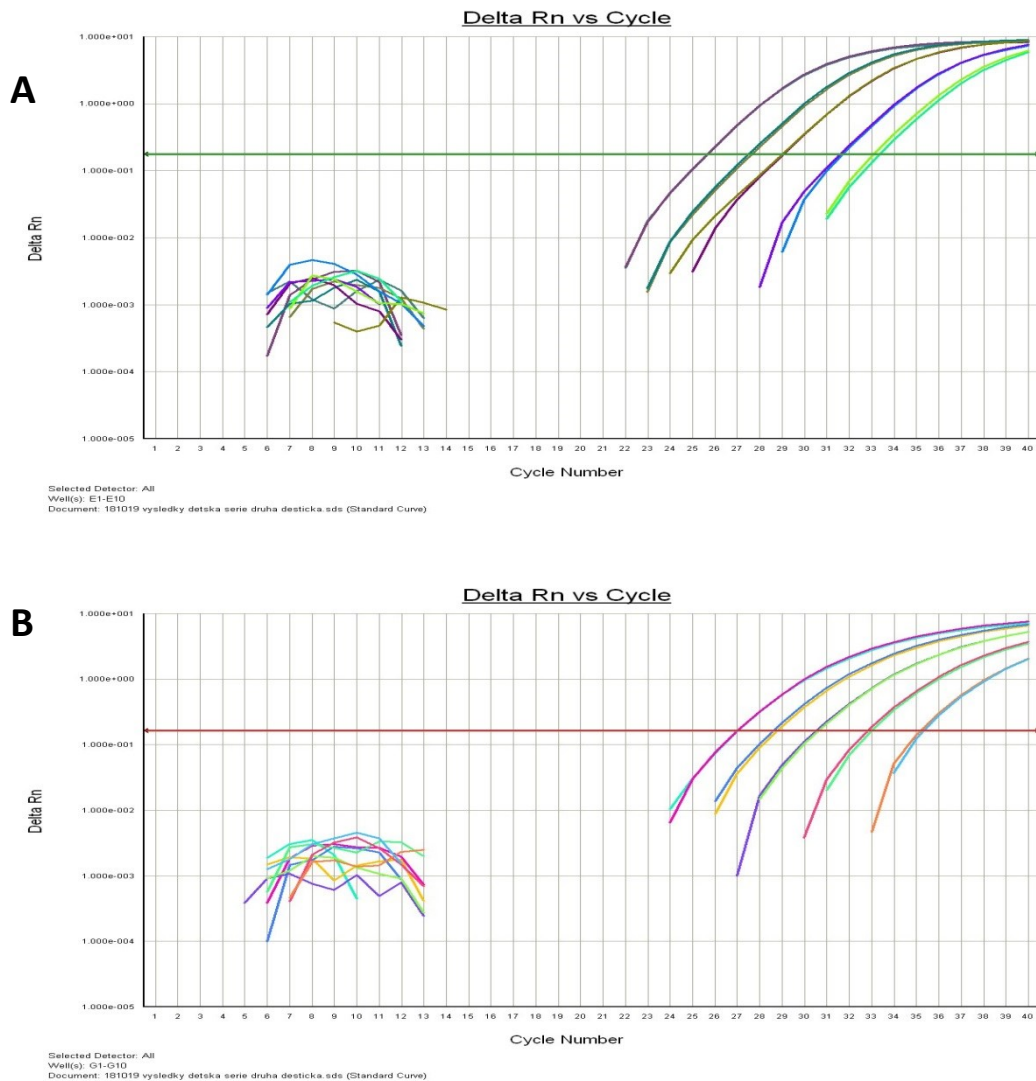
Ukázka kalibrační křivky exprese genu *OGT* složené ze vzorků dospívajících pacientů i kontrol vzniklá dvojkovou ředící řadou. Každá křivka (vždy v duplikátu), která má unikátní barvu, znázorňuje poloviční zředění oproti předchozímu vzorku. Z každé řady kalibračních křivek pro jednotlivé geny byly odečteny hodnoty „baseline“ a „thresholdu“, které byly přiřazeny jednotlivým vzorkům v sérii. Softwarem GenEx (Multid, Švédsko) byla pak určena účinnost reakce pro každý gen.



**Graf č. 1: Ukázka kalibrační křivky pro sledovaný *OGT* (A) a referenční gen *PSMB6* (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu**

Měřeno na přístroji 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), zobrazeno v softwaru 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA) Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S, Rn – normalizovaná fluorescence

Ukázka kalibrační křivky exprese genu *MGEA5*, resp. *HPRT1* složená ze vzorků dospívajících pacientů i kontrol vzniklá dvojkovou ředící řadou. Každá křivka (vždy v duplikátu), která má unikátní barvu, znázorňuje poloviční zředění oproti předchozímu vzorku. Z každé řady kalibračních křivek pro jednotlivé geny byly odečteny hodnoty „baseline“ a „thresholdu“, které byly přiřazeny jednotlivým vzorkům v sérii. Softwarem GenEx (Multid, Švédsko) byla pak určena účinnost reakce pro každý gen.



**Graf č. 2: Kalibrační křivka genu sledovaného genu *MGEA5* (A) a referenčního genu *HPRT1* (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu**

Měřeno na přístroji 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), zobrazeno v softwaru 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: *HPRT1* – gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, Rn - normalizovaná fluorescence

Tabulka č. 5 znázorňuje naměřené hodnoty Ct genových expresí vzorků od dospělých účastníků studie, které byly změřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA). Relativní genové exprese sledovaných genů byly vypočteny softwarem GenEx (Multid, Švédsko) a pro přehlednost byly přepočteny na hodnotu vnitřního standardu, který činil 100 %. Barevně rozlišené odběry odpovídají grafu č. 3 a 4: pacienti s více odběry jsou znázorněni vždy jednou barvou, modrá barva znázorňuje pacienty pouze s jedním odběrem, kontrolní vzorky jsou znázorněny šedě.

**Tabulka č. 5: Naměřené hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospělých pacientů a kontrol**

Číslo vzorku	Odběr	Hodnoty Ct dospělého souboru pro jednotlivé geny				Relativní genová exprese sledovaných genů [%]	
		<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>HPRT1</i>	<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>
183	O-M0	24,09	25,75	26,33	30,04	445	404
5	O-M6	23,73	25,03	23,78	27,19	101	114
72	O-M12	23,36	25,14	24,22	25,96	99	82
184	O-M0	24,71	26,04	28,44	31,66	964	1092
8	O-M6	22,18	23,94	23,31	25,98	163	133
71	O-M12	23,64	24,67	23,41	26,12	68	91
65	O-M0	23,10	25,23	23,65	26,24	108	71
9	O-M6	23,08	25,02	24,06	27,16	167	125
154	O-M12	22,18	23,94	23,31	25,98	163	133
73	O-M0	26,37	27,37	25,28	29,89	69	100
11	O-M6	23,24	25,01	23,41	26,43	98	81
70	O-M12	27,11	28,94	25,03	28,24	23	20
13	O-MX	23,19	25,04	24,41	26,88	159	125
178	O-M6	22,64	25,02	23,20	26,00	118	66
44	O-M0	22,76	24,90	23,32	26,86	150	97
24	O-M6	22,49	24,52	24,38	25,41	154	107
159	O-M12	22,56	23,95	23,45	25,60	118	122
36	O-M0	23,19	24,74	24,17	26,39	126	120
29	O-M6	24,21	27,89	22,73	26,83	48	12
111	O-M12	22,72	24,21	22,88	25,32	81	79
182	O-M0	25,33	26,28	28,02	30,95	447	656
30	O-M6	23,52	25,22	23,31	26,10	71	62
106	O-M12	22,95	24,52	23,11	25,60	82	77
48	O-MX	23,15	25,20	24,76	26,45	158	110
32	O-M6	23,01	24,67	24,11	26,04	124	109
63	O-M12	23,72	24,97	23,10	25,66	50	59
35	O-M0	22,99	24,79	23,99	26,03	121	98
77	O-M6	23,62	25,01	23,98	26,72	100	106
104	O-M12	25,77	26,84	23,61	26,63	21	29
112	O-M0	22,16	24,17	23,12	25,63	140	97

Genové exprese byly změřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), relativní genové exprese sledovaných genů byly vypočteny softwarem GenEx (Multid, Švédsko).

Zkratky k tabulce č. 5: O-M0 - obézní dospělý po redukcii váhy, první návštěva, O-MX - obézní dospělý s maximální tělesnou hmotností, první odběr, O-M6 - obézní dospělý 6 měsíců po změně stravovacího režimu, O-M12 - obézní dospělý 12 měsíců po změně stravovacího režimu, K – dospělá kontrola, Ct – číslo cyklu, kdy hodnota exprese konkrétního genu překročí hodnotu pozadí fluorescence, *HPRT1* – gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasua 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S

Tabulka č. 6 znázorňuje naměřené hodnoty Ct genových expresí 40 vzorků dospívajícího souboru, relativní genové exprese sledovaných genů, které pro přehlednost byly přepočteny na hodnotu vnitřního standardu, který činil 100%. Barevně rozlišené odběry odpovídají grafu č. 5 A, B: pacienti s více odběry jsou znázorněni vždy jednou barvou, modrá barva znázorňuje pacienty pouze s jedním odběrem, kontrolní vzorky jsou znázorněny šedě

**Tabulka č. 6: hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospívajících obézních pacientů a kontrol**

		Hodnoty Ct dospívajícího souboru pro jednotlivé geny				Relativní genová exprese sledovaných genů [%]	
Číslo vzorku	Odběr	<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>HPRT1</i>	<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>
181	A-M0	27,01	27,08	29,13	31,67	257	721
41	A-M6	23,36	25,65	24,94	26,88	162	103
3	A-M0	22,65	24,89	23,63	26,05	132	84
144	A-M6	25,95	26,10	23,72	27,97	29	75
180	A-M12	23,38	25,15	23,65	26,75	103	90
49	A-M0	23,75	26,07	24,94	26,94	128	80
23	A-M6	24,56	26,35	25,56	27,30	103	92
26	A-M0	24,27	25,43	23,43	26,70	53	70
186	A-M6	23,25	25,87	24,22	28,15	211	108
28	A-M0	22,64	25,46	24,86	26,23	205	91
80	A-M6	22,32	24,00	23,14	25,61	122	110
37	A-M0	23,39	25,07	24,03	27,09	128	119
138	A-M6	23,52	25,06	23,36	25,70	61	62
170	A-M12	22,40	24,15	23,34	25,51	119	103
139	A-M0	23,26	24,86	24,38	26,79	141	138
38	A-M6	26,16	27,29	24,55	28,21	35	50



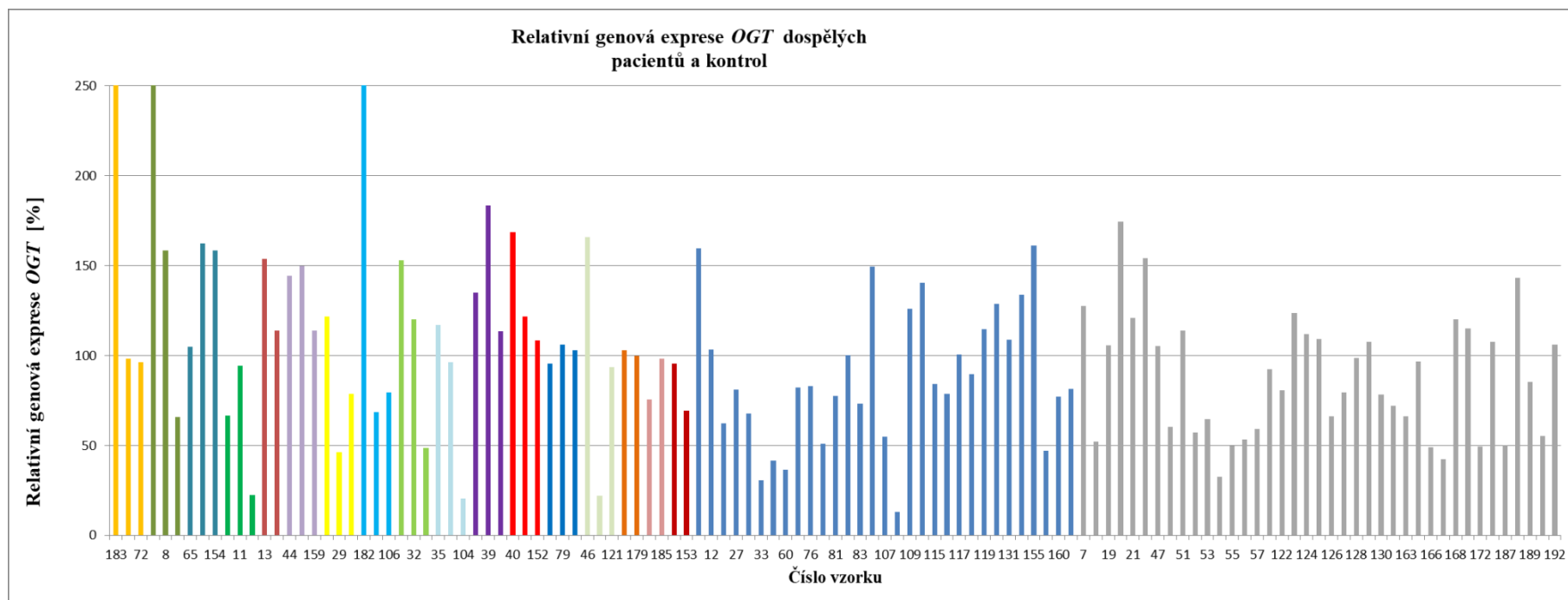
## Pokračování tabulky č. 6

43	A-M0	24,25	25,83	23,98	27,35	78	79
148	A-M6	23,30	25,18	23,04	25,79	66	54
66	A-M0	24,71	26,35	25,29	28,11	145	130
45	A-M6	24,14	25,91	25,90	27,20	111	110
145	A-M0	25,31	26,14	23,45	26,85	28	47
146	A-M6	24,03	25,48	23,19	25,73	42	46
149	A-M0	25,46	26,84	24,05	27,79	42	49
177	A-M6	23,41	25,13	23,83	26,96	114	104
175	A-M0	24,82	26,05	25,20	29,26	146	187
176	A-M6	23,30	25,16	23,47	26,72	102	84
140	A-M0	23,05	24,64	23,63	26,21	48	56
141	A-M0	26,30	27,05	24,18	28,47	107	104
142	A-M0	22,13	24,16	23,56	25,85	31	56
143	A-M0	22,97	24,61	23,68	26,14	170	123
147	A-M0	25,14	26,56	22,67	25,78	112	105
137	A-M0	24,01	25,36	23,16	26,15	18	20
158	A-M0	25,31	27,03	24,40	28,12	57	54
190	A-M0	23,41	25,24	23,53	26,69	95	81
169	AK	23,18	24,98	23,15	25,55	68	58
69	AK	23,89	25,45	23,37	26,09	55	55
133	AK	23,36	24,52	23,22	25,89	69	89
134	AK	24,47	25,68	24,34	27,09	70	90
135	AK	23,81	25,32	23,55	26,20	63	66
136	AK	23,87	25,69	23,29	25,96	52	45

Genové exprese byly změřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), relativní genové exprese sledovaných genů byly vypočteny softwarem GenEx (Multid, Švédsko)

Zkratky: A-M0 - obézní adolescent při první návštěvě, A-M6 - obézní adolescent 6 měsíců po první návštěvě (po redukci váhy), A-M12 - obézní adolescent 12 měsíců po první návštěvě, AK – adolescentní kontrola, Ct – číslo cyklu, kdy hodnota exprese konkrétního genu překročí hodnotu pozadí fluorescence, *HPRT1* – gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S

Grafické znázornění relativní exprese genu *OGT* dospělého souboru pacientů a kontrol. Jednou barvou je vždy označen pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly.

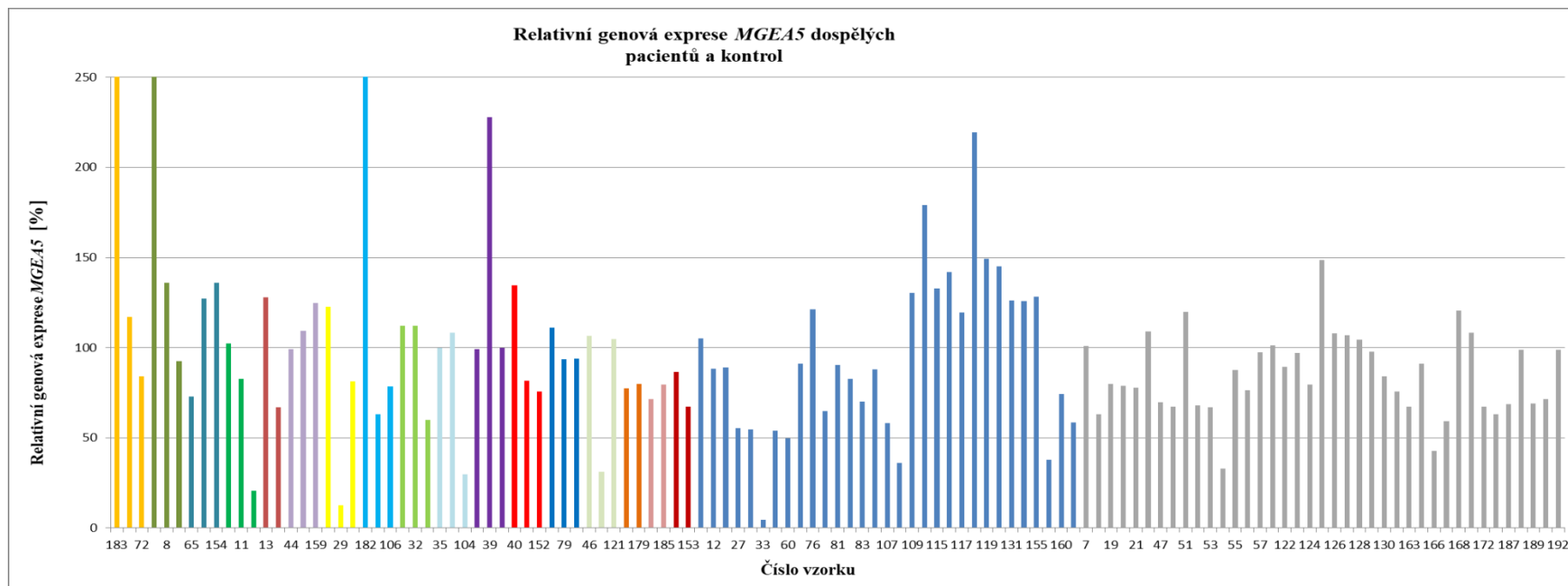


**Graf č. 3: Relativní genová exprese *OGT* u dospělých pacientů a kontrol**

Expresce mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko).  $N_{M0}=25$ ,  $N_{Mx}=23$ ,  $N_{M6}=17$ ,  $N_{M12}=13$ ,  $N_k=39$

Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu

Grafické znázornění relativní exprese genu *MGEA5* dospělého souboru pacientů a zdravých kontrol. Jednou barvou je vždy znázorněn pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly.

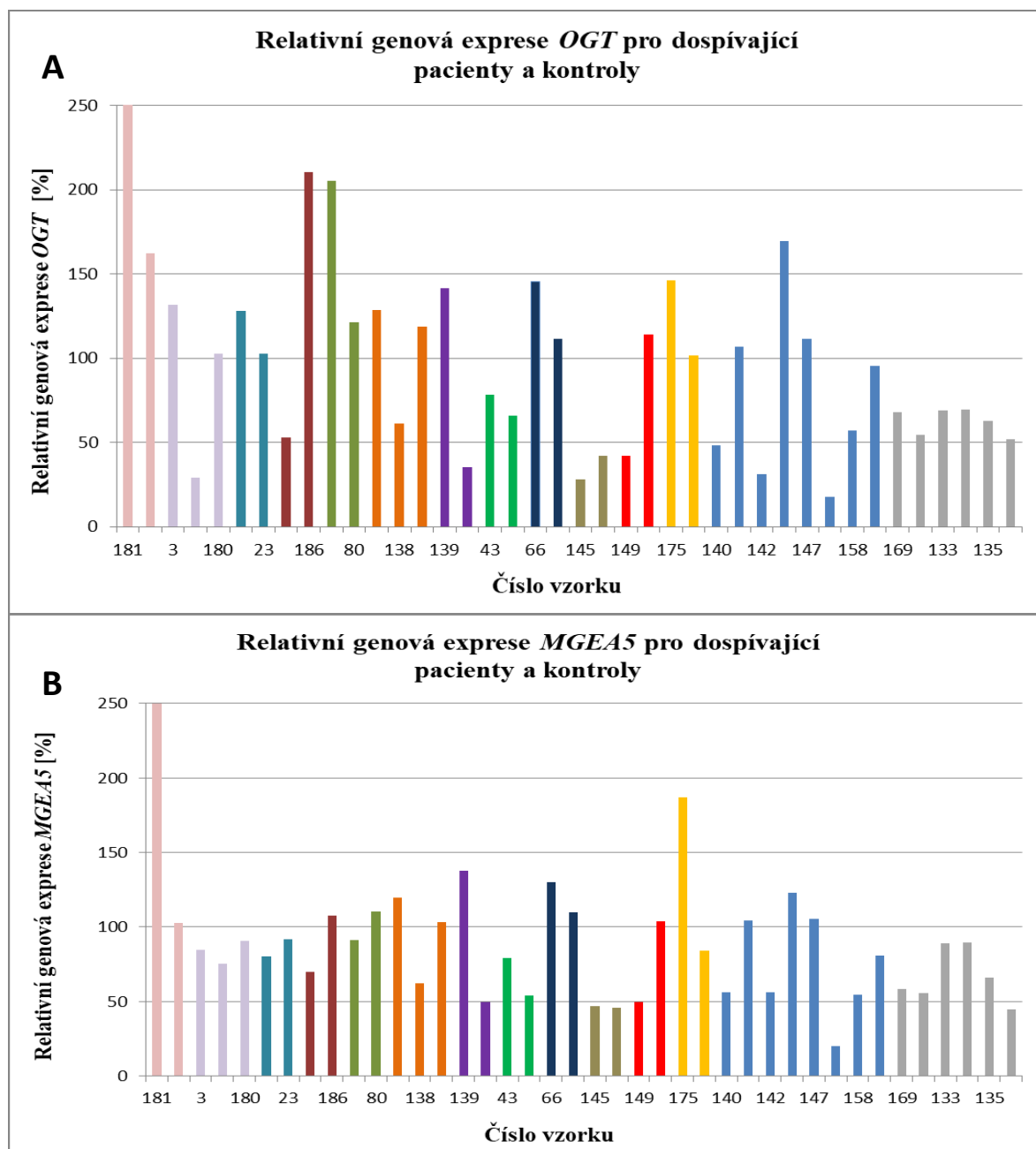


**Graf č. 4: Relativní genová exprese *MGEA5* u dospělých pacientů a kontrol**

Expresce mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko).  $n_{M0}=25$ ,  $n_{Mx}=23$ ,  $n_{M6}=17$ ,  $n_{M12}=13$ ,  $n_k=39$

Zkratky: *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu

Graficky znázorněná relativní exprese genů *OGT* a *MGEA5* dospívajícího souboru pacientů a kontrol. Jednou barvou je vždy znázorněn pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly.

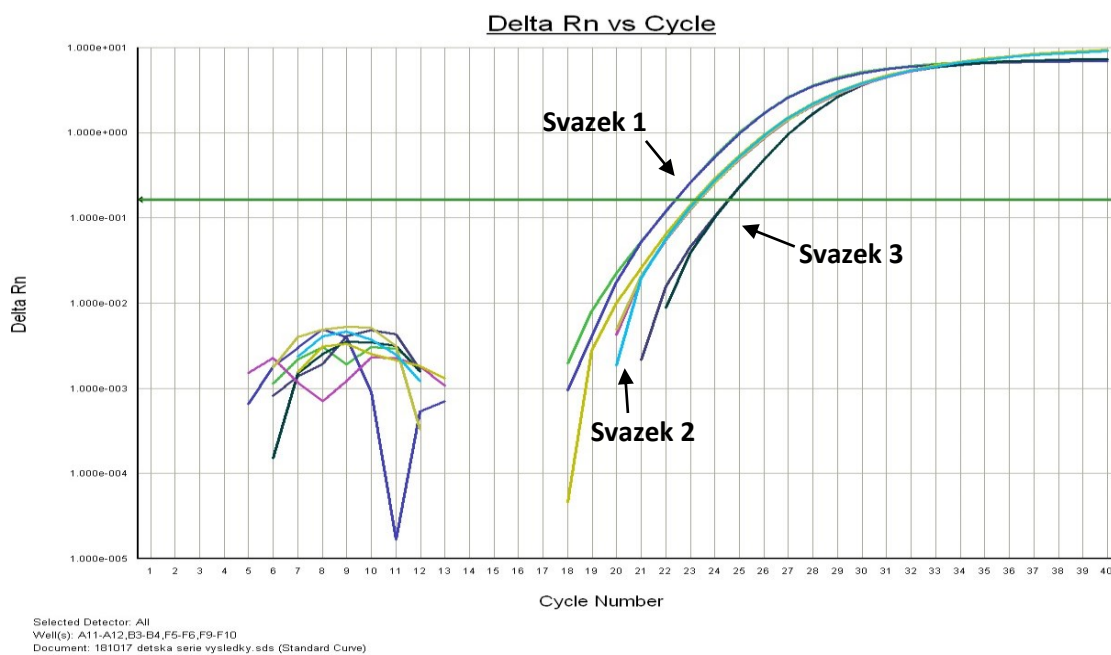


**Graf č. 5: Relativní genová exprese *OGT* (A), resp. *MGEA5* (B) dospívajících obézních pacientů a kontrol**

Expresse mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko).  $n_{M0}=20$ ,  $n_{M6}=12$ ,  $n_{M12}=3$ ,  $n_k=6$

Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu

Graf č. 6 znázorňuje srovnání exprese sledovaného genu *OGT* s referenčním genem *PSMB6* u vybraného vzorku č. 80 od dospívajícího pacienta a kontroly č. 134. První svazek složený ze dvou křivek (dvě křivky vždy tvoří duplikát) značí expresi *OGT* u pacienta (vzorek č. 80). Druhý svazek znázorňuje expresi genu *PSMB6* pro oba vzorky (dohromady 4 křivky), třetí svazek pak expresi *OGT* u zdravé kontroly (vzorek č. 134). Exprese sledovaného genu dosahuje u pacienta nižších hodnot Ct a tedy vyšší genové exprese v porovnání s kontrolním vzorkem. Naproti tomu exprese referenčního genu jsou srovnatelné pro vzorek pacienta i kontroly.

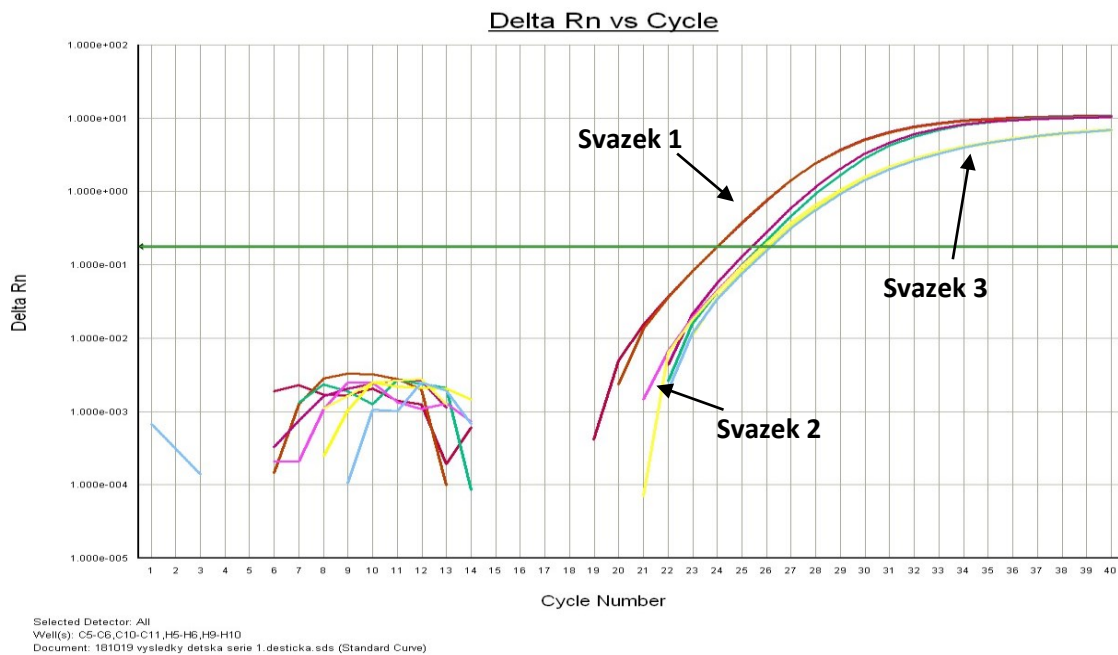


**Graf č. 6: Ukázka exprese genů *OGT* a *PSMB6* pro vybraného pacienta a kontroly**

Křivky exprese všech genů byly naměřeny přístrojem 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems (USA) a 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: Rn - normalizovaná fluorescence

Ukázka (graf č. 7) srovnání exprese sledovaného genu *MGEA5* s referenčním genem *HPRT1* u vybraného pacienta a kontroly. První svazek dvou křivek (dvě křivky vždy tvoří duplikát) značí expresi genu *MGEA5* u pacienta (vzorek č. 80), druhý svazek dvou křivek pak expresi zdravé kontroly (vzorek č. 134). Třetí svazek čtyř křivek znázorňuje expresi referenčního genu *HPRT1* pro oba vzorky. Expres sledovaného genu dosahuje u pacienta nižších hodnot Ct a tedy vyšší genové exprese v porovnání s kontrolním vzorkem. Naproti tomu exprese referenčního genu jsou srovnatelné jak pro vzorek pacienta, tak pro vzorek kontroly.



**Graf č. 7: Ukázka exprese genů *MGEA5* a *HPRT1* pro vybraného pacienta a kontroly**

Křivky exprese všech genů byly naměřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystems (USA) a zobrazeny programem 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: Rn - normalizovaná fluorescence