

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie



**Vývoj AMPK v kosterním svalu během časného postnatálního
vývoje**

Maturation of AMPK in skeletal muscle during early postnatal development

Diplomová práce

Jana Hansíková

Praha, 2013

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Janovská
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Oddělení biologie tukové tkáně

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Petry Janovské ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky za použití dále uvedené literatury. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci ani žádnou její část nepoužila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.4.2013

.....
Jana Hansíková

Děkuji své školitelce Ing. Petře Janovské za odborné vedení, obětavost a velkou trpělivost, se kterou se mi věnovala při vypracovávání diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. a všem kolegům z Oddělení biologie tukové tkáně FgÚ AV ČR, v.v.i. za podnětné připomínky a přátelské prostředí. RNDr. Martině Hůlkové, PhD. z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch 1.LF UK a VFN bych chtěla poděkovat za cenné rady a pomoc při měření a vyhodnocení genové exprese v rámci mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za zázemí a podporu během mého studia.

Abstrakt

AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK) je důležitým metabolickým senzorem u eukaryot a hraje významnou roli v regulaci energetické homeostázy jak na úrovni buňky, tak celého organismu. Podílí se na okamžité regulaci glukózového i lipidového metabolismu přímou stimulací aktivit enzymů nebo dlouhodobě stimulací exprese genů zapojených do energetického metabolismu především v játrech a kosterním svalu. Kosterní svalstvo se podstatně podílí na celotělové hmotnosti a metabolickém obratu a významně přispívá k udržování glukózové homeostázy. Vzhledem k tomu, že energetický výdej v kosterním svalu může tvořit až 95% celotělového energetického výdeje, je pravděpodobné, že vývoj a naprogramování metabolismu svalu v časně postnatálním období je velmi důležitý i pro organismus v dospělosti. V období časně postnatálního vývoje dochází k podstatným změnám energetických nároků organismu a to naznačuje významné zapojení AMPK. Cílem diplomové práce bylo charakterizovat aktivitu a expresi izoform katalytické podjednotky AMPK v kosterním svalu během časně postnatálního vývoje u myších kmenů A/J a C57BL/6, tedy kmenů, které se liší v náchylnosti k obezitě indukované dietou s vysokým obsahem tuku. Dalším úkolem bylo analyzovat expresi vybraných genů zahrnutých do energetického metabolismu - GLUT4, PGC-1 α a UCP3, které AMPK reguluje. Bylo zjištěno, že aktivita AMPK se rozdílně mění během časně postnatálního období v závislosti na genetickém pozadí myši. Vývoj exprese podjednotek $\alpha 1$ a $\alpha 2$ AMPK se liší v porovnání se změnami v aktivitě izoform enzymu. Profil hladiny exprese genů GLUT4, PGC-1 α a UCP3 ukazuje na silný vliv výživy a vývoje svalu na regulaci exprese genů energetického metabolismu. Během časně postnatálního vývoje dochází v kosterním svalu ke značným změnám v aktivitě a regulaci energetického metabolismu, které by mohly přispívat k dalšímu profilování metabolismu v dospělosti v závislosti na genetickém pozadí myšího kmene.

Klíčová slova: AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK), energetický metabolismus, časný postnatální vývoj, kosterní sval

Abstract

AMP-activated protein kinase (AMPK) is an important metabolic sensor in eukaryotic organisms and it plays an important role in regulating energy homeostasis, at both the cells and the whole organism. AMPK controls glucose and lipid metabolism by direct stimulation of enzymes or by long term stimulation of the gene expression of energy metabolism. Skeletal muscles significantly contribute to the total body weight and metabolic rate and to the maintenance of glucose homeostasis. Due to the ability of the muscle to increase energy expenditure to 95% of whole-body energy expenditure, could be the proper development and programming of metabolism in the early postnatal period crucial for the further development of the organism in adulthood. Early postnatal development leads to substantial changes in energy requirements of the body and this suggests the significant involvement of AMPK in this period. The aim of this thesis was to study the activity and expression of isoforms of the catalytic subunit of AMPK in skeletal muscle during early postnatal development of both mouse strains A/J and C57BL/6 that differ in the development of diet-induced obesity. The next task was to analyze the expression of selected genes involved in energy metabolism - GLUT4, PGC-1 α and UCP3 that AMPK regulates. It was found that the activity of AMPK changes differently during early postnatal period, depending on the genetic background of the mice. Expression of AMPK subunits α 1 and α 2 are different in comparison with changes in the activity of the enzyme isoforms. Profile expression levels of genes GLUT4, PGC-1 α a UCP3 shows the strong influence of nutrition and development of muscle on the regulation of gene expression of energy metabolism. Significant changes in activity and the regulation of energy metabolism in skeletal muscle during the early postnatal development may contribute to the further profiling of metabolism in adulthood depending on the genetic background of the mice.

Key words: AMP-activated protein kinase (AMPK), energetic metabolism, early postnatal development, skeletal muscle

Seznam zkratek

ACC	acetyl-CoA-karboxyláza (acetyl-CoA carboxylase)
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxyamid-ribonukleotid (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside)
AMP	adenozinmonofosfát (adenosine monophosphate)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMP-activated protein kinase)
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenozintrifosfát (adenosin triphosphate)
CaMKK	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kináza kináza (Ca ²⁺ /calmoduline-dependent kinase kinase)
CNS	centrální nervový systém
CPT-1	karnitinpalmitoyltransferáza 1 (carnitine palmitoyltransferase 1)
CREB	(cAMP response element-binding)
D	den (časová jednotka)
EDL	<i>musculus extensor digitorum lungus</i>
emb	embryonální
F	samice (female)
FAT/CD36	přenašeč mastných kyselin CD36 (fatty acid transporter CD36)
FG	rychlá glykolytická (fast glycolytic)
FOG	rychlá oxidativní-glykolytická (fast oxidative-glycolytic)
GDP	guanozindifosfát (guanosine diphosphate)
GEF	(GLUT4 enhancer factor)
GLUT1, GLUT4	glukózový přenašeč typu 1 a 4 (glucose transporter type 1 and 4)
HF	dieta s vysokým obsahem tuku (high fat)
HSL	hormon-senzitivní lipáza (hormone-sensitive lipase)
LCACoA	acetyl-CoA s dlouhým řetězcem
LCFA	mastná kyselina s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acid)
LKB1	tumor supresorová kináza 1 (tumor suppressor kinase 1)
M	samci (male)
MCD	malonyl-CoA-dekarboxyláza (malonyl-CoA decarboxylase)
MCT1, MCT4	monokarboxylátový přenašeč typu 1 a 4 (monocarboxylate transporter type 1 nad 4)
MEF2	(myocyte enhancer factor)
MHC	těžký myozinový řetězec (myosin heavy chain)
MK	mastná kyselina
MO25	(mouse protein-25)
neo	neonatální
NRF-1, NRF-2	(nuclear respiratory factors 1 and 2)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PGC-1 α	(peroxisome-proliferator activated receptor γ co-activator 1)
PGS	protein G sepharóza

PKB	proteinkináza B
PP2C α	proteinová fosfatáza 2C α (protein phosphatase 2C α)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RQ	respirační kvocient
SDS	dodecylsírán sodný
SO	pomalá oxidativní (slow oxidative)
SOL	<i>musculus soleus</i>
STRAD	(sterile-20-related adaptor)
T172	threonin na pozici 172
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A (mitochondrial transcriptional factor A)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TZD	thiazolidindiony (thiazolidinediones)
UCP3	odpřahující protein 3 (uncoupling protein 3)
WB	western blot
ZMP	5-amino-4-imidazol karboxamid-ribosid 5'-monophosfát

OBSAH

1 Úvod.....	10
2 Literární přehled	11
2.1 AMP-aktivovaná proteinová kináza.....	11
2.1.1 Struktura AMPK.....	11
2.1.2 Regulace AMPK.....	12
2.1.2.1 Nadřazené kinázy	12
2.1.2.2 Hormonální regulace AMPK.....	13
2.1.2.3 Farmakologické aktivátory AMPK	14
2.2 Kosterní sval	15
2.2.1 Typy vláken a jejich metabolické vlastnosti	16
2.3 Funkce AMPK v kosterním svalu	19
2.3.1 Glukózový metabolismus.....	20
2.3.2 Lipidový metabolismus	21
2.3.3 Mitochondriální biogeneze.....	23
2.4 Vývoj kosterního svalu	24
2.5 Vliv výživy na energetický metabolismus v perinatálním a časně postnatálním období.....	27
2.6 Přehled rozdílů metabolismu myších kmenů A/J a C57BL/6J.....	29
3 Cíle diplomové práce	32
4 Experimentální část.....	33
4.1 Materiál	33
4.1.1 Chemikálie.....	33
4.1.2 Přístroje a materiál.....	34
4.2 Metody	35
4.2.1 Práce s laboratorními zvířaty.....	35
4.2.1.1 Myší linie	35
4.2.1.2 Experimentální podmínky	36
4.2.1.3 Soubor vzorků.....	36
4.2.1.4 Odběr vzorků	36
4.2.2 Příprava vzorků na stanovení aktivity AMPK a kvantifikaci proteinů.....	37

4.2.2.1	Extrakce proteinů z tkáně	37
4.2.2.2	Stanovení obsahu proteinů metodou kyseliny bicinchoninové (BCA)...	38
4.2.3	Stanovení aktivity izoform katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2)	39
4.2.3.1	Purifikace AMPK (imunoprecipitace).....	39
4.2.3.2	Stanovení enzymové aktivity AMPK.....	40
4.2.4	SDS - polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	41
4.2.5	Western blot (WB)	43
4.2.6	Měření genové exprese.....	44
4.2.6.1	Izolace RNA	44
4.2.6.2	Reverzní transkripce	45
4.2.6.3	Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR)	45
4.2.7	Stanovení referenčních genů	47
4.2.8	Zpracování výsledků	48
5	Výsledky	49
5.1	Stanovení celkového a fosforylovaného množství proteinu (aktivity) AMPK metodou Western blot.....	49
5.2	Stanovení aktivity jednotlivých izoform katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2) imunoprecipitací a fosforylací syntetického peptidu AMARA	51
5.3	Stanovení referenčních genů pro normalizaci dat genové exprese	57
5.4	Stanovení genové exprese AMPK α 1, AMPK α 2, GLUT4, PGC-1 α a UCP3	58
6	Diskuze	66
7	Závěr	71
8	Přehled literatury.....	72
9	Přílohy.....	78

1 Úvod

V dnešní době často se vyskytující metabolická onemocnění zahrnující především obezitu a diabetes mellitus 2. typu (**T2DM**) nejsou problémem jen u dospělých, ale přináší riziko i pro potomky matek s těmito onemocněními. Poruchy metabolismu spojené s T2DM či glukózovou intolerancí mohou mít dopad na vývoj a pozdější fungování organismu. Příjem nutrientů v perinatálním období má vliv na vývoj metabolismu jedince a nevyvážený energetický příjem nutrientů může mít za následek predispozici k různým metabolickým onemocněním v pozdějším věku. Hlavní regulátor metabolismu je AMP-aktivovaná proteinová kináza (**AMPK**). Jako senzor energetického stavu řídí oxidaci mastných kyselin (**MK**), transport a vstup glukózy do buňky, glukoneogenezi a další metabolické dráhy ve tkáních jako jsou játra, kosterní sval a tuková tkáň, včetně centrální regulace příjmu potravy a výdeje energie v hypothalamu.

V časném období postnatálního vývoje dochází k významným změnám v lipidovém a glukózovém metabolismu kosterního svalu v důsledku nutričních změn a diferenciací tkáně. V tomto období by se mohla AMPK významně podílet na regulaci energetického metabolismu. Navzdory klíčové roli AMPK v metabolismu kosterního svalu jsou studie o úloze AMPK v časně postnatálním vývoji ojedinělé.

V diplomové práci navazuji na informace ve své bakalářské práci, která se týkala role AMPK v různých metabolicky významných tkáních. Práce byla vypracována v rámci Oddělení biologie tukové tkáně AV ČR v. v. i., která se studiem AMPK již dlouho zabývá. Diplomová práce je zaměřena na studium AMPK ve vzorcích kosterního svalu z různých časových období postnatálního vývoje. Cílem práce bylo porovnat vývoj aktivity a genové exprese katalytických podjednotek AMPK v závislosti na věku, pohlaví a genetickém pozadí myších kmenů. Jako zástupci dvou genetických pozadí byly zvoleny myší kmeny, lišící se náchylností k dietou indukované obezitě: i) myší kmen A/J k obezitě rezistentní a ii) myší kmen C57BL/6J (**B6**) k obezitě citlivý. Další část práce byla zaměřena na měření genové exprese genů - zástupců jednotlivých drah energetického metabolismu, do kterých je AMPK zapojena. Práce má přispět k objasnění mechanismů regulace energetického metabolismu v kosterním svalu v průběhu časného postnatálního (období od narození do odstavu od matky) vývoje u zdravých myších jedinců s rozdílnou náchylností k obezitě.

2 Literární přehled

2.1 AMP – aktivovaná proteinová kináza

Enzym AMPK je serin/threoninová proteinová kináza, která se nachází ve všech eukaryotech. Hlavní úlohou AMPK je udržování energetické rovnováhy v buňce regulací glukózového a lipidového metabolismu. V savčí buňce se AMPK nachází hlavně v cytoplasmě, ale může migrovat mezi jádrem a cytoplazmou. Regulace pohybu není dosud přesně známa (Kodiha et al., 2007). Savčí AMPK je heterotrimerický enzym skládající se z katalytické podjednotky α a dvou regulačních podjednotek β a γ . Každá podjednotka je kódována více geny a kombinací izoform jednotlivých podjednotek může vzniknout až 12 různých heterotrimerů, jejichž výskyt je tkáňově specifický (Witczak et al., 2008).

2.1.1 Struktura AMPK

Katalytická podjednotka α se vyskytuje ve dvou izoformách $\alpha 1$ a $\alpha 2$. Obě izoformy se nacházejí v cytoplasmě. Podjednotka $\alpha 2$ se může vyskytovat i v jádře, kde se účastní regulace genové exprese. Součástí podjednotky je katalytická doména obsahující threonin na pozici 172 (**T172**), jehož fosforylace je nezbytná pro aktivaci enzymu. Výskyt jednotlivých izoform je tkáňově specifický. Podjednotka $\alpha 1$ se ve větší míře nachází v adipocytech, erytrocytech a játrech. Podjednotka $\alpha 2$ je dominantní v kosterním svalu, srdci, hypothalamu a játrech (Hardie, 2007).

Regulační podjednotka β se vyskytuje v izoformách $\beta 1$ a $\beta 2$ a podjednotka γ má tři izoformy - $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$. Funkcí podjednotky β je především spojovat všechny podjednotky do komplexu. Alosterickou aktivaci zajišťuje podjednotka γ . Na své domény navazuje AMP, tím komplex alostericky aktivuje a zároveň brání defosforylaci podjednotky α (Sanz, 2008).

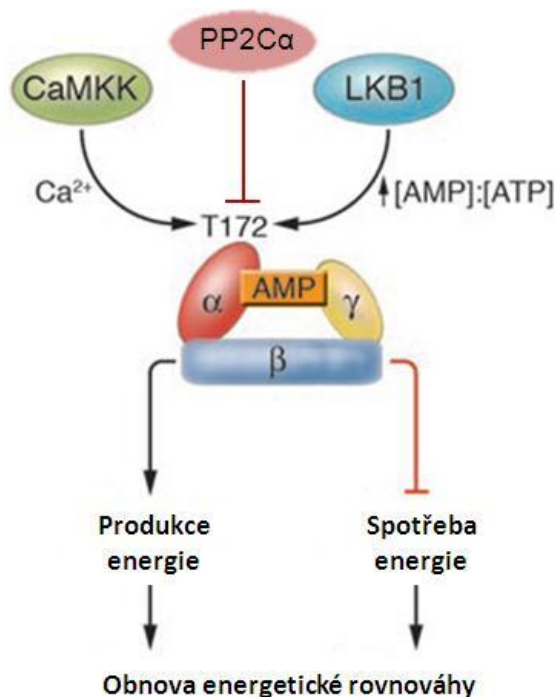
V lidském kosterním svalu se vyskytují pouze tři z 12 možných kombinací podjednotek. Byla detegována kombinace (heterotrimer) podjednotek $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ a dále $\alpha 2\beta 2\gamma 3$, jejíž výskyt se v trénovaném svalu snižuje ve prospěch heterotrimeru $\alpha 2\beta 2\gamma 1$, který je v lidském svalu nejdominantnější (Wojtaszewski et al., 2005). U potkanů je ve svalu, stejně jako u člověka, nejvíce exprimovaný komplex $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (Cheung et al., 2000).

2.1.2. Regulace AMPK

AMPK plní v buňce funkci energetického senzoru, jehož úlohou je zajišťovat stabilní poměr AMP:ATP. Komplex AMPK je citlivý na změnu poměru AMP a ATP, kdy při zvýšení hladiny AMP dochází k aktivaci AMPK. Hladina ATP klesá (ATP se spotřebovává a tím se zvyšuje hladina AMP) při různých formách buněčného stresu (např. hypoxii a nedostatku glukózy) nebo při náročných energetických procesech jako je např. svalová kontrakce. Aktivovaná AMPK následně fosforyluje a aktivuje další enzymy metabolických drah, které mají za následek tvorbu ATP a obnovu energetické rovnováhy v buňce. Současně AMPK inhibuje syntetické dráhy spotřebovávající energii (Hardie et al., 2012).

2.1.2.1 Nadřazené kinázy

K aktivaci komplexu je nutná fosforylace α podjednotky jednou z nadřazených kináz (obr. 2.1). U savců patří mezi hlavní nadřazené kinázy Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kináza kináza (**CaMKK**), především její izoforma β (Woods et al., 2005) a hlavně tumor supresorová kináza (**LKB1** - liver kinase B1), která má katalytickou aktivitu, společně v komplexu s proteiny STRAD (sterile-20-related adaptor) a MO25 (mouse protein-25) (Hawley et al., 2003). Také vysoká hladina AMP přispívá k aktivaci AMPK. AMP se váže na AMPK a dochází k alosterické aktivaci. Vazba AMP také zároveň brání defosforylaci komplexu (Sanders et al., 2007). LKB1 je hlavní nadřazenou kinázou zejména v kosterním svalu a také v játrech (Sakamoto et al., 2005, Shaw et al., 2005). Aktivace AMPK pomocí CaMKK je spouštěna nárůstem intracelulární hladiny Ca^{2+} iontů bez změny hladiny AMP. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě může vzniknout například v důsledku membránového transportu způsobeného depolarizací membrány. Vysokou expresi CaMKK lze nalézt v CNS, endoteliálních a hematopoetických buňkách (Fogarty et al., 2010, Woods et al., 2005). Inaktivace AMPK je způsobena defosforylací α podjednotky proteinovou fosfatázou 2C α (**PP2C α**). Defosforylace je regulována hladinou AMP. Schopnost nukleotidu podílet se na inaktivaci AMPK nespočívá v přímé regulaci fosfatázové aktivity PP2C α , ale AMP svou vazbou spíše brání fosfatáze v přístupu k aktivační doméně AMPK (Davies et al., 1995, Suter et al., 2006).



Obr. 2.1: Regulace AMPK (upraveno podle Long and Zierath, 2006).

AMPK je aktivována fosforylací threoninu na pozici 172 (T172) nadřazenou kinázou LKB1 v závislosti na změně poměru AMP:ATP. Další nadřazenou kinázou je CaMKK, která fosforyluje T172 jako odpověď na zvýšenou koncentraci Ca^{2+} . Působením proteinové fosfatázy PP2C α dochází k defosforylaci a přechodu AMPK do neaktivní formy. Aktivovaná AMPK následně aktivuje metabolické dráhy, které produkují ATP. Metabolické dráhy, které energii spotřebovávají, jsou AMPK inhibovány. Výsledkem těchto procesů je obnova energetické rovnováhy v buňce.

2.1.2.2 Hormonální regulace AMPK

Mnoho metabolických hormonálních účinků, které ovlivňují metabolismus jak na celotělové úrovni, tak na úrovni periferních tkání, je zprostředkováno přes aktivaci AMPK. Mezi nejdůležitější centrální orgány, kde AMPK ovlivňuje energetický metabolismus, patří játra, srdce a hypothalamus, z periferních tkání jsou ústřední kosterní sval a tuková tkáň. K nejvýznamějším fyziologicky aktivním látkám, které ovlivňují aktivitu AMPK, patří hormony vylučované tukovou tkání, tzv. adipokiny, některé prozánětlivé cytokiny a inzulín.

Nejdůležitějšími hormony v regulaci metabolismu kosterního svalu jsou leptin, adiponektin a tumor nekrotizující faktor α (TNF α) (Kola et al., 2006). Leptin působí buď přímo přes leptinové receptory na povrchu svalové buňky nebo centrálně přes sympatický nervový systém a α -adrenergní receptory. V kosterním svaly leptin aktivuje AMPK α 2, dochází ke stimulaci β -oxidace MK a tím zamezení hromadění lipidů ve svaly, který je tak chráněn před poškozením v důsledku lipotoxicity (Minokoshi et al., 2002, Minokoshi et

al., 2012). Dlouhodobé podávání leptinu navíc stimuluje expresi AMPK (Steinberg et al., 2003). Deficience leptinu nebo leptinového receptoru má za následek snížení aktivity AMPK ve svalu a játrech, ukládání lipidů v těchto tkáních a rozvoj inzulínové rezistence (Yu et al., 2004). Dalším významným adipokinem je adiponektin, který se uplatňuje především v regulaci metabolismu v játrech a kosterním svalu a na celotělové úrovni pak v hypothalamu. Prostřednictvím AMPK adiponektin stimuluje β -oxidaci MK, vstup glukózy do buňky a zároveň inhibuje glukoneogenezi. Výsledkem je regulace glukózového metabolismu a inzulínové citlivosti periferních tkání. (Yamauchi et al., 2002). TNF α je prozánětlivý adipokin a jeho koncentrace vzrůstá s množstvím tuku v organismu, který způsobuje mírný zánět. Zvýšená hladina TNF α ve svalu, která se vyskytuje u pacientů s inzulínovou rezistencí a T2DM, způsobuje zvýšenou expresi fosfatázy PP2C α a deaktivaci AMPK. Snížená aktivita AMPK snižuje oxidaci MK ve svalu a zvyšuje ukládání nadbytku triacylglycerolů (lipidů) do tukových dep, případně do ostatních tkání. Zvyšuje se sekrece inzulínu Langerhansovými ostrůvky, snižuje se citlivost k inzulínu periferních tkání a dochází k rozvoji inzulínové rezistence (Steinberg et al., 2006).

2.1.2.3 Farmakologické aktivátory AMPK

Snížení hladiny glukózy a lipidů v krvi stimulací určitých metabolických drah má benefiční účinky při léčbě některých patologických stavů spojených s metabolickým syndromem. Proto se farmakologické aktivátory AMPK používají především při léčbě T2DM.

K nejvíce používaným antidiabetickým lékům v České republice patří v současné době metformin. Tato látka náleží do skupiny biguanoidů a zvyšuje aktivitu AMPK, ale beze změny poměru AMP:ATP. Metformin aktivuje AMPK a stimuluje vstup glukózy do buněk v kosterním svalu a tím snižuje hladinu glukózy v krvi a potlačuje rozvoj inzulínové rezistence (Zhou et al., 2001) Dále metformin stimuluje β -oxidaci a snižuje glykémii redukcí jaterní glukoneogeneze. Přesný mechanismus účinku metforminu na AMPK není stále zcela znám (Andújar-Plata, 2011).

Mezi další léčiva používané při léčbě T2DM patří také látky ze skupiny thiazolidindionů (TZD), rosiglitazon a pioglitazon. TZD jsou agonisty PPAR γ receptorů (peroxisome proliferator activated receptor γ) v adipocytech, čímž ovlivňují jejich další proliferaci a diferenciaci, lipidový metabolismus a sekreci signálních molekul. V důsledku

proliferace se lipidy ukládají v nově vznikajících adipocytech a nedochází k jejich ukládání v ostatních tkáních. Vlivem snižování lipidů v játrech a kosterním svalu dochází ke zlepšení inzulínové rezistence. Při podávání TZD dochází k výraznému nárůstu poměru AMP:ATP, což vede ke stimulaci aktivace AMPK. Možným vysvětlením změny v poměru nukleotidů by mohla být inhibice komplexu I dýchacího řetězce nebo redukce mitochondriálního membránového potenciálu. (Fryer et al., 2002, LeBrasseur et al., 2006).

Pro výzkum mechanismu a účinků AMPK je nejčastěji používán farmakologický aktivátor 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (**AICAR**). AICAR je v buňce metabolizován adenosinkinázou na nukleotid AICAR monofosfát (**ZMP**), analog AMP. ZMP pak následně funguje jako endogenní AMP a alostericky aktivuje AMPK (Corton et al., 1995).

2.2 Kosterní sval

Kosterní svaly tvoří podstatnou část tělesné hmotnosti organismu (asi 40%) a významně se podílí na klidovém metabolickém obratu. Během fyzické aktivity se může metabolický obrat ve svalu prudce zvýšit až na 95% z celkového energetického výdeje organismu. Svaly spolu s játry patří k hlavním orgánům, které udržují relativně konstantní hladinu glukózy v krvi. (Kopecky and Flachs, 2004)

Pro svalovou tkáň jsou hlavními zdroji energie glukóza z krve nebo glykogenu uloženého přímo ve svalu. Dále mohou energii poskytovat MK a ketonové látky. V klidovém stavu a při krátkodobé intenzivní zátěži je hlavním energetickým zdrojem glukóza. V situaci, kdy je glukóza vyčerpána nebo při déle trvající mírné zátěži jsou využívány MK, které jsou uvolňovány z tukové tkáně a dopravovány krví na místo potřeby. Zejména v oxidačních svalech jsou pak metabolizovány MK z triacylglycerolů, uložených přímo ve svalových vláknech (Westerblad et al., 2010).

Glukóza je z krve do buňky dopravována převážně přes inzulín dependentní glukózový přenašeč typu 4 (**GLUT4**) a podle metabolického typu svalového vlákna je metabolizována buď v aerobní nebo anaerobní glykolýze. V případě anaerobní glykolýzy vzniká laktát, který je transportován ven z buňky přes monokarboxylátový přenašeč typu 4 (**MCT4**). Vyloučený laktát je krví dopraven do jater, kde je zpracován v Coriho cyklu, nebo je přenesen přes monokarboxylátový přenašeč typu 1 (**MCT1**) do oxidačních svalových vláken, kde je přeměněn na pyruvát a dále po přeměně na acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu (Schiaffino and Reggiani, 2011). Dalším důležitým substrátem ve

svalech jsou MK, které jsou katabolizovány v procesu β -oxidace. Jedním z regulačních míst lipidového metabolismu je **FAT/CD36** (fatty acid transporter CD36), který zajišťuje přenos mastných kyselin s dlouhým řetězcem (**LCFA** – long chain fatty acid) do buňky (Koonen et al., 2004). Dalším významným místem regulace je místo vstupu MK do mitochondrie přes karnitinpalmitoyltransferázu 1 (**CPT-1**) (Kim et al., 2002) (podrobněji viz kapitola 2.3.1 a 2.3.2.). Vzhledem k významné úloze svalů k celotělovému metabolismu a k metabolickému obratu je správné fungování svalu nezbytné pro zdravý vývoj a funkci organismu.

2.2.1. Typy vláken a jejich metabolické vlastnosti

Svaly jsou složeny z několika typů vláken s odlišnými metabolickými a funkčními vlastnostmi. Charakterizace svalových vláken může být na základě dvou hlavních kritérií. Vlákná se dají rozlišovat podle exprese jednotlivých izoform těžkých řetězců myozinu (**MHC** - myosin heavy chain) a podle jejich kapacity oxidativního a glykolytického metabolismu. Ve svalu dospělého potkana se rozlišují podle exprese MHC vlákna typu I, IIa, IIx/d, IIb (Bar and Pette, 1988). V lidském svalu se vyskytují všechny tyto typy vláken kromě vláken typu IIb (Smerdu et al., 1994). V jednom svalovém vlákně nemusí být exprimována pouze jedna izoforma MHC, v případě výskytu dvou izoform vzniká vlákno se smíšenými vlastnostmi. Podle metabolické a kontraktilní aktivity jsou vlákna rozdělena na pomalá oxidativní (**SO** - slow oxidative), rychlá oxidativní-glykolytická (**FOG** - fast-twitch oxidative glycolytic) a rychlá glykolytická (**FG** - fast-twitch glycolytic). Podle obsahu myoglobinu, proteinu vázajícího kyslík, lze vlákna dále rozdělovat na červená a bílá (Schiaffino and Reggiani, 2011). Základní vlastnosti jednotlivých typů vláken jsou shrnuty v tabulce 2.2.

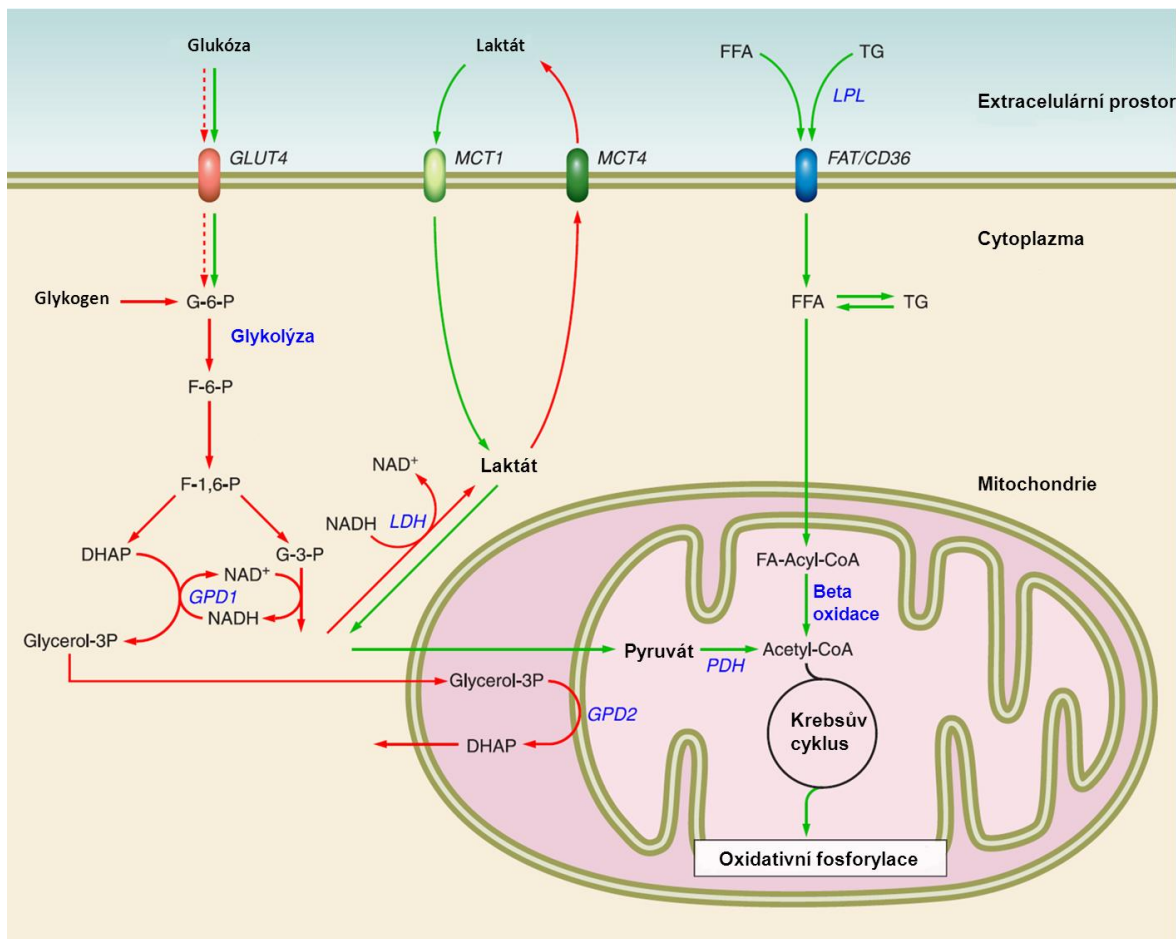
Tab. 2.2: Základní metabolické vlastnosti jednotlivých typů kosterních svalových vláken hlodavců (upraveno dle Schiaffino and Reggiani, 2011).

typ vláken	I (SO) červená	II a (FOG) červená	II x/d	II b (FG) bílá
rychlost kontrakce	pomalá	středně rychlá	rychlá	velmi rychlá
odolnost k únavě	vysoká	poměrně vysoká	střední	nízká
typ metabolické aktivity	aerobní	dlouhodobá anaerobní	krátkodobá anaerobní	krátkodobá anaerobní
obsah mitochondrií	velmi vysoký	vysoký	střední	nízký
oxidativní kapacita	vysoká	střední	nízká	nízká
glykolytická kapacita	nízká	vysoká	vysoká	vysoká
hlavní substrát	triglyceridy	glykogen, CrP	ATP, CrP, glykogen	ATP, CrP

Zastoupení jednotlivých typů vláken ve svalecth určuje nejen vlastnosti daného svalu, ale i metabolismus a preferenci substrátu k získání energie. Jednotlivé typy vláken se liší v:

- a) **množství mitochondrií** - V závislosti na oxidativní kapacitě jednotlivých typů vláken se mění i počet mitochondrií. U člověka se zastoupení mitochondrií pohybuje okolo 6 % ve vláknech typu I, 4,5 % je ve vláknech IIa a v typu IIx je to jen 2,3% (w/V) (Howald et al., 1985).
- b) **ukládání energie do rozdílných substrátů** - Bílá svalová vlákna typu IIb využívají k tvorbě ATP převážně anaerobní glykolýzu. Glukózu získávají prvotně z glykogenu uloženého přímo ve svalových vláknech. Je v nich uloženo přibližně o třetinu více glykogenu než v pomalých oxidativních vláknech, kde je naopak uloženo více lipidů (Schiaffino and Reggiani, 2011).
- c) **produkci, exportu a využití laktátu** - Při studii na svalových vláknech u člověka se ukázalo, že nejvyšší exprese MCT1 je v SO vláknech. Jsou tedy nejvíce schopny přijímat a využívat (metabolizovat) laktát vytvořený ostatními typy vláken. O něco nižší exprese MCT1 byla nalezena v FOG vláknech a v FG vláknech byla exprese velmi nízká (až nedetekovatelná). Vyšší exprese MCT4 (transport laktátu ven z buňky) byla popsána ve FOG a FG vláknech. (Fishbein et al., 2002).

- d) kapacitě a rychlosti glukózového transportu** - Kapacita příjmu glukózy z krve přes GLUT4 je vyšší u SO a FOG, ve srovnání s FG vlákny, které jsou závislé především na endogenní glukóze, kterou si v pozitivní energetické bilanci ukládají v podobě glykogenu. (Goodyear et al., 1991). V rychlých vláknech je také při kontraktilní aktivitě vyšší rychlost glykogenolýzy a následné glykolýzy. Výtěžek ATP glykolytickou cestou je tedy větší v FG než v SO vláknech (Greenhaff et al., 1993).
- e) transportu mastných kyselin** - Transport palmitátu přes FAT/CD36 je až třikrát vyšší v SO a FOG vláknech než v FG, což koresponduje s větším množstvím přenašeče na úrovni exprese i proteinu (Chabowski et al., 2006). Na rozdíl od glykolýzy, zisk ATP z MK je v procesu β -oxidace v rychlých vláknech nižší. Rozdílný příspěvek β -oxidace do obnovy energetické bilance v různých typech vláken je dán zejména obsahem mitochondrií, rychlostí vstupu MK do buňky a do mitochondrie, která je v pomalých vláknech vyšší (Kim et al., 2002).



Obr. 2.3: Rozdíly v preferenci metabolismu pomalých a rychlých svalových vláken (upraveno podle Schiaffino and Reggiani, 2011). Červené šipky znázorňují metabolické dráhy v rychlých vlákních (FG a částečně FOG vlákních) preferujících anaerobní glykolýzu. Zelené šipky zobrazují dráhu substrátů ve vlákních, které využívají oxidativní metabolismus (SO a FOG vlákna).

GLUT4 – glukózový přenašeč typu 4, G-6-P – glycerol-6-fosfát, F-6-P – fruktóza-6-fosfát, F-1,6,P – fruktóza-1,6-bisfosfát, DHAP – dihydroxyacetonfosfát, G-3-P – glycerol-3-fosfát, GPD1; 2 – glycerol-3-fosfátdehydrogenáza 1; 2, LDH – laktátdehydrogenáza, MCT1; 4 – monokarboxylátový přenašeč typu 1; 4, PDH pyruvátdehydrogenáza, FFA – volná mastná kyselina (free fatty acid), TG – triacylglycerol, FAT/CD36 – přenašeč mastných kyselin (fatty acid transporter CD36),

2.3 Funkce AMPK v kosterním svalu

AMPK je klíčovým enzymem mnoha signálních kaskád metabolických drah. Její hlavní funkcí je pomocí aktivace nebo inaktivace signálních drah udržovat energetickou rovnováhu jak na celotělové, tak na buněčné úrovni. Její aktivace stimuluje katabolické procesy generující energii (např. glykolýza, β -oxidace MK) a zároveň dochází k inhibici anabolických energeticky náročných procesů (např. glukoneogeneze, syntéza proteinů). Vzhledem k významnému podílu kosterního svalstva na metabolickém obrátu a celotělovém energetickém výdeji jak v klidovém, tak aktivním stavu, je AMPK velmi významnou komponentou metabolismu ve svalu. AMPK může regulovat metabolismus

akutně (krátkodobě) pomocí aktivace či deaktivace enzymů jednotlivých metabolických kaskád, ale i dlouhodobě regulací genové exprese (McGee and Hargreaves, 2010).

V experimentu na svalech člověka se ukázalo, že během stimulace svalu cvičením došlo k nárůstu aktivity AMPK α 2, která částečně přetrvávala i po skončení cvičení, na rozdíl od aktivity AMPK α 1 podjednotky, která se neměnila. Tento výsledek ukazuje, že v metabolické odpovědi na energetické nároky způsobené cvičením, se podílí spíše komplexy AMPK s podjednotkou α 2 (Fujii et al., 2000). Výsledky studií množství zastoupení izoform α 1 a α 2 v jednotlivých typech svalů a vláken laboratorních hlodavců nejsou shodné. Putman et al. ukázali, že největší obsah proteinu AMPK α 2 je v SO vláknech, o něco méně v FOG a nejméně v FG vláknech. Stejný poměr obsahů vykazovala i izoforma AMPK α 1. Jiná studie detekovala nejvíce AMPK α 2 ve FOG a FG vláknech, nejméně bylo SO vláknech. Rozdílné výsledky by mohly být způsobeny použitím odlišných modelových organismů (Putman et al., 2007, Bonen et al., 2007).

2.3.1 Glukózový metabolismus

Sval a játra patří mezi nejdůležitější orgány v regulaci glukózové homeostázy na celotělové úrovni. Zatímco játra glukózu produkují glukoneogenezí z jiných než sacharidových zbytků nebo glykogenolýzou glykogenu a uvolňují ji do krve, kosterní sval glukózu z krve přijímá a metabolizuje za uvolnění energie z makroergických vazeb. Hlavní funkcí AMPK ve svalu je usnadnění vstupu glukózy do myocytu a stimulace glykolýzy.

V klidovém stavu svalu, kdy nejsou zvýšené požadavky na dodávku energie z glukózy, je část GLUT4 uložena ve váčcích v cytoplazmě. Při potřebě zvýšeného příjmu glukózy do buňky dochází k navýšení počtu GLUT4 v cytoplazmatické membráně. Ke stimulaci začlenění GLUT4 do membrány dochází dráhou regulovanou inzulínem přes proteinkinázu B (PKB/Akt), nebo cestou nezávislou na inzulínu prostřednictvím AMPK. Enzymový komplex, aktivovaný kontrakcí svalu nebo AICARem, fosforyluje protein AS160/TBC1D4 nebo jeho homolog TCB1D1. Tyto proteiny patří mezi Rab-GTPázové aktivující proteiny, které regulují translokaci GLUT4 tím, že udržují Rab protein v méně aktivním stavu s navázaným GDP. Fosforylace AS160 způsobí přechod proteinu do méně aktivní formy, čímž je umožněno proteinu Rab navázat GTP. Rab proteiny jsou asociované s vezikuly a jejich aktivací dojde k uvolnění váčku s GLUT4 v cytoplazmě a začlenění přenašečů do plazmatické membrány. Vyšší počet přenašečů poskytuje buňce vyšší příjem

glukózy do buňky a umožňuje rychlejší odpověď na nepříznivý energetický stav (Chen et al., 2008).

V situacích, kdy je negativní energetická bilance, aktivovaná AMPK inhibuje syntézu glykogenu a tím zablokuje spotřebu ATP (energie), která je pro syntézu nezbytná. AMPK inaktivuje fosforylací glykogensyntázu a tím zablokuje syntézu glykogenu a současně usnadní vstup glukózy do buňky. AMPK tak zajišťuje dostatečné množství volné glukózy pro okamžité využití v glykolýze (Jorgensen et al., 2004).

Kromě akutního účinku se AMPK uplatňuje také v dlouhodobé regulaci glukózového metabolismu regulací genové exprese. Dlouhodobě zvýšená hladina aktivované AMPK zvyšuje expresi genu pro GLUT4 a hexokinázu, enzymu, který katalyzuje první iniciační reakci glykolýzy (Holmes et al., 1999). Aktivace AMPK vede k aktivaci několika transkripčních faktorů. V regulaci transkripce genů zapojených do energetického metabolismu glukózy hraje významnou roli transkripční koaktivátor **PGC-1 α** (peroxisome-proliferator activated receptor γ coactivator 1 α), který v buňce reguluje mnoho dalších dějů. AMPK přímo fosforyluje PGC-1 α , což má za následek zvýšení aktivity tohoto transkripčního koaktivátoru na promotoru *GLUT4* genu (Jager et al., 2007). Další důležité transkripční faktory, které reguluje AMPK, jsou **MEF2** (myocyte enhancer factor 2) a **GEF** (GLUT4 enhancer factor). AMPK fosforyluje GEF a ten spolu s MEF2 přechází do jádra, kde vazbou s PGC-1 α na promotor genu *GLUT4* zvyšují jeho expresi (Knight et al., 2003, Holmes et al., 1999, Michael et al., 2001).

2.3.2 Lipidový metabolismus

AMPK je klíčový regulátor lipidového metabolismu v kosterním svalu. Kromě strukturální a signalizační funkce se lipidy uplatňují především jako zdroj energie. Lipidy jsou hlavním energetickým substrátem převážně v oxidativních vláknech. Vzhledem k omezeným zásobám lipidů ve svalu je nutné vstup MK do myocytu v případě zvýšení energetických nároků regulovat. AMPK reguluje jak rychlost β -oxidace, tak i její kapacitu stimulací mitochondriální biogeneze (Thomson and Winder, 2009).

Hlavním bodem regulace oxidace MK je rychlost transportu LCFA do mitochondrie. Limitujícím enzymem v tomto procesu je CPT-1. Tento přenašeč je ve svalu alostericky regulován hladinou malonyl-CoA. Vysoká hladina malonyl-CoA inhibuje CPT-1 a tím snižuje obrát β -oxidace. Za změny hladiny malonyl-CoA jsou zodpovědné dva enzymy, acetyl-CoA-karboxyláza (**ACC**) a malonyl-CoA-dekarboxyláza (**MCD**). ACC

katalyzuje vznik malonyl-CoA z acetyl-CoA, působením MCD se malonyl-CoA naopak rozkládá. Aktivovaná AMPK fosforyluje a inhibuje ACC. Dochází tedy ke snížení hladiny malonyl-CoA, k aktivaci CPT-1 a zvýšení transportu MK, které mohou být oxidovány. (Winder et al., 1997). Vliv AMPK na stimulaci MCD je dosud sporný. Saha et al. ukázali, že AMPK, aktivovaná svalovou kontrakcí, fosforyluje MCD a zvyšuje oxidaci MK (Saha et al., 2000). Jiná skupina však publikovala výsledky z *in vitro* studie, kde po aktivaci AMPK kontrakcí i AICARem nepozorovali žádnou fosforylaci a ani nárůst aktivity MCD (Habinowski et al., 2001).

Rychlost oxidace MK však nezávisí jen na rychlosti vstupu MK do mitochondrie, ale také na jejich vstupu do buňky. MK s krátkým řetězcem procházejí do buňky přes membránu difúzí, ale LCFA ke vstupu do buňky potřebují proteinové přenašeče. Transportérů MK byla identifikována celá řada, zdá se ale, že klíčovým je FAT/CD36. AMPK ovlivňuje pravděpodobně i množství přenašečů MK v membráně (Pandke et al., 2008). Bylo zjištěno, že v srdečním svalu AMPK reguluje počet FAT/CD36 na membráně, pravděpodobně podobným mechanismem jako u GLUT4 (Luiken et al., 2003). Současné experimenty ukazují, že FAT/CD36 přenašeče se vyskytují i v mitochondriální membráně. Jejich koncentrace narůstá při chronické stimulaci svalové kontrakce. Podílí se pravděpodobně na vstupu MK do mitochondrie společně s CPT-1 (Holloway et al., 2008). V současné době je však studií zabývajících se regulací FAT/CD36 v kosterním svalu stále málo a přesné mechanismy a dráhy regulace jsou zatím nejasné a musí být dále upřesněny.

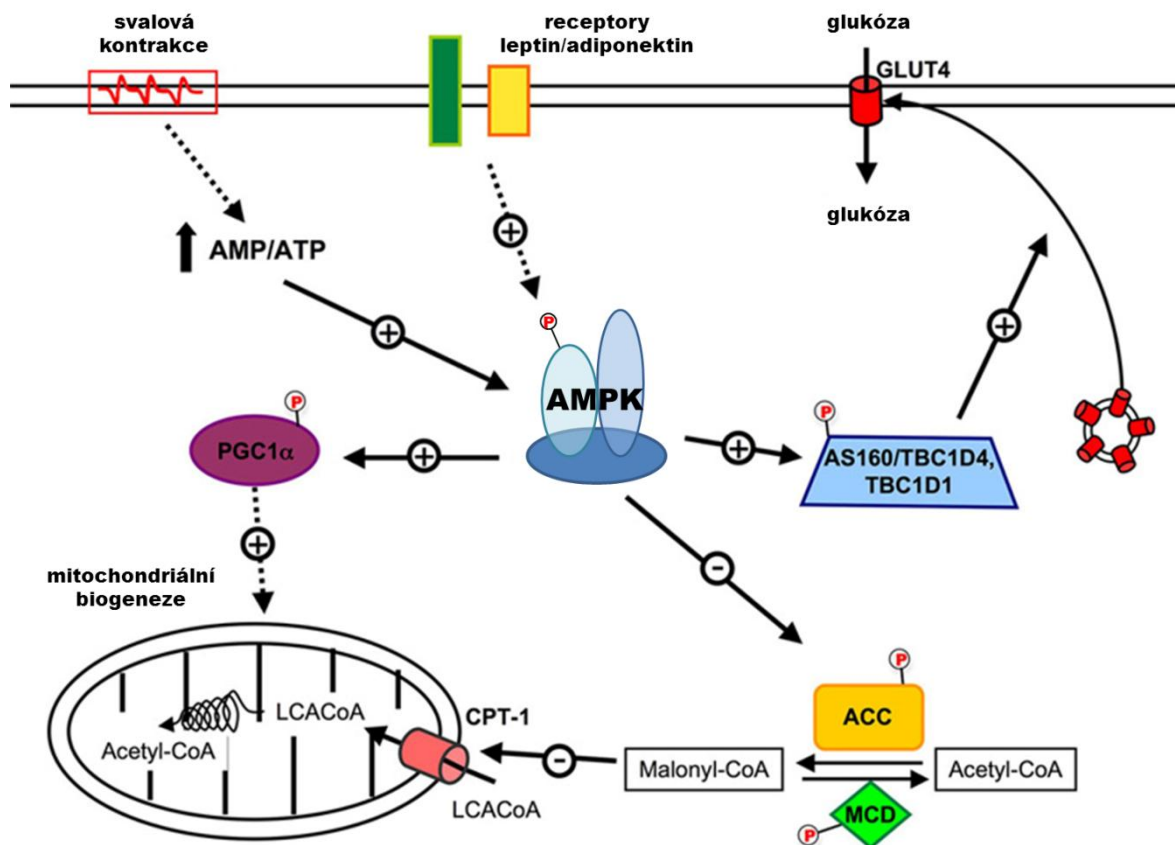
Dalším důležitým účastníkem lipidového metabolismu je pravděpodobně odpráhuující protein **UCP3** (uncoupling protein 3). UCP3 je primárně exprimován v mitochondriích kosterního svalu, kde snižuje protonový gradient nutný k syntéze ATP. Úlohou UCP3 je pravděpodobně ochrana buňky před oxidativním stresem příp. ochrana před poškozením vysokou hladinou lipidů (lipotoxicitou) (Nabben and Hoeks, 2008). Zvýšená hladina UCP3 proteinu byla pozorována při nadměrném přísunu MK, kdy je překročena oxidativní kapacita mitochondrií. Při dlouhodobém působení aktivátoru AICAR na AMPK dochází ke zvýšení hladiny exprese i proteinu UCP3 u potkanů. Současně došlo ke zvýšení i aktivity mitochondriálních enzymů, které poukazují na stimulaci mitochondriální biogeneze. (Putman et al., 2003, Suwa et al., 2003). Popsaná pozitivní korelace mezi genovou expresí AMPK α 2 a UCP3 ve svalech předčasně narozených lidských novorozenců, naznačuje vliv AMPK na UCP3 v časně postnatálním

vývoji u člověka, kdy dochází k aktivaci některých drah lipidového metabolismu (Brauner et al., 2006).

2.3.3 Mitochondriální biogeneze

Při dlouhodobém nedostatku energie v buňce dochází k navýšení počtu mitochondrií, které poskytují vyšší kapacitu pro oxidaci MK a oxidativní fosforylaci vedoucí k většímu zisku ATP a k obnovení energetické rovnováhy v buňce.

PGC-1 α je hlavním transkripčním faktorem nejen v oxidativním metabolismu, ale i v regulaci mitochondriální biogeneze. Má schopnost koaktivovat určité transkripční faktory, které kontrolují genovou expresi metabolických a mitochondriálních genů (Lin, 2005). Aktivovaná AMPK fosforyluje PGC-1 α a aktivuje tak transkripční faktor na promotorech cílových genů (Jager et al., 2007). PGC-1 α stimuluje expresi transkripčních faktorů **NRF-1** a **NRF-2** (nuclear respiratory factor 1, 2), které aktivují expresi klíčových metabolických genů, regulujících jaderné geny nezbytné pro respiraci, biosyntézu a transkripci a replikaci mitochondriální DNA (Wu et al., 1999, Bergeron et al., 2001). Dále PGC-1 α společně s NRF-1 zvyšují hladinu mitochondriálního transkripčního faktoru A (**TFAM**). TFAM je další transkripční faktor v kaskádě mitochondriální biogeneze, který se translokuje do mitochondrie, kde je zásadní pro replikaci a transkripci mitochondriální DNA (Virbasius and Scarpulla, 1994). PGC-1 α je regulována prostřednictvím AMPK i na úrovni genové exprese přes transkripční faktor **CREB** (cAMP response element-binding protein). AMPK fosforyluje a aktivuje CREB, který se váže na promotor genu pro PGC-1 α a zvyšuje jeho transkripci. U myši s vyřazeným genem pro LKB1 bylo prokázáno, že nedochází k fosforylaci AMPK a proteinová hladina PGC-1 α je redukována (Thomson et al., 2007, Thomson et al., 2008). Snížená aktivace PGC-1 α vede k funkčnímu deficitu oxidativního metabolismu, zhoršení funkce kosterního svalu (nižší vytrvalost, výkonnost a odolnost proti únavě ve svalu) a dalším negativním vlivům v různých tkáních. Tyto výsledky ukazují, že faktor PGC-1 α je nezbytný v odolnosti proti metabolickým a fyziologickým stresům (Leone et al., 2005).



Obr. 2.3: Funkce AMPK ve svalu (upraveno podle Viollet et al., 2009b).

Aktivita AMPK (signální kaskáda) je ve svalu regulována hormonálně (leptin, adiponektin) a svalovou kontrakcí. Aktivovaná AMPK aktivuje a podporuje vstup glukózy do buňky a její využití stimulací translokace přenašečů GLUT4 do plazmatické membrány. Dále AMPK reguluje vstup mastných kyselin (MK) do mitochondrie přes CPT-1. Stimulací MCD a inhibicí ACC snižuje hladinu malonyl-CoA a tím reguluje funkci CPT-1. Podporuje vstup MK do mitochondrie a tím stimuluje jejich oxidaci. Dlouhodobě AMPK reguluje expresi genů pro proteiny zapojených do mitochondriální biogeneze hlavně přes aktivaci transkripčního faktoru PGC-1 α .

PGC-1 α - peroxisome-proliferator activated receptor γ co-activator 1 α , *LCACoA* - acetyl-CoA s dlouhým řetězcem, *MCD* – malonyl-CoA-dekarboxyláza, *ACC* - acetyl-CoA-karboxyláza, *CPT-1* – karnitinpalmitoyltransferáza 1

2.4 Vývoj kosterního svalu

Kosterní svalstvo je mezodermálního původu a u malých savců vzniká ve dvou fázích během embryonálního a fetálního období. Během gestace se svalová tkáň mění z málo organizovaných myotubulů na vysoce organizovaný kosterní sval s vysokou glykolytickou a oxidativní kapacitou (Jones and Rolph, 1985). Terminálně diferencované buňky kosterního svalu vytváří mnohojaderná svalová vlákna exprimující proteiny kontraktálního aparátu (Stockdale, 1997). V první fázi dochází k formování primárních mnohojaderných myofibril fúzí sousedních myoblastů. Téměř ve stejném období dochází ke vzniku nervosvalového spojení s motorickými neurony. Ve druhé fázi se začínají tvořit

sekundární svalová vlákna podél rostoucích primárních vláken. Formování začíná v oblasti, kde dochází ke kontaktu primárního vlákna s motorickým neuronem (Duxson et al., 1989, Miller, 2001). U větších savců, včetně člověka, je primární a sekundární myogeneze následována ještě třetí fází formace myofibril. Terciální svalová vlákna se zakládají v pozdním fetálním období a jejich formace přetrvává až do postnatálního období (Miller, 2001).

Kosterní sval je po narození stále ještě nezralý a k důležitým změnám v diferenciaci svalových vláken dochází v časném postnatálním období vývoje. Postnatální změny ovlivňuje několik faktorů, mezi které patří dotváření neuromuskulární aktivity (ztráta polyneurální inervace) a silně zvýšená hladina thyroïdních hormonů (Schiaffino and Reggiani, 2011).

Během několika málo týdnů po narození dochází k radikální změně v expresi izoform MHC. V období kolem narození se ve svalových vláknech téměř nevyskytují dospělé izoformy MHC. Studie na myších ukazují, že prvních několik dní po narození převládá exprese embryonální a neonatální izoformy MHC (**embMHC**, **neoMHC**) z více než 90% z celkového obsahu MHC, zatímco dospělé rychlé izoformy zaujímají méně než 1%. Ve zbývajících několika procentech se zde již vyskytují dospělé pomalé MHC. Neonatální a embryonální MHC jsou v tomto období dominantní ve všech typech kosterních svalů z různých částí těla. Zásadní změna nastává mezi 5. a 20. dnem postnatálního vývoje. Dochází k velkému poklesu exprese nejprve embMHC a poté také neoMHC a naopak se začínají stále více exprimovat dospělé izoformy MHC. Zhruba ve dvou týdnech věku již převládají dospělé izoformy MHC a 21. den po narození zcela nahradí vývojové izoformy (obr. 2.4) (Agbulut et al., 2003, Allen and Leinwand, 2001). Konverze MHC je neuronálně dependentní. Exprese neoMHC může být indukována v důsledku polyneurální inervace, což je přechodný stav ve vývoji motorických jednotek. Postupně v průběhu vývoje dochází ke ztrátě polyneurální inervace a poklesu exprese neoMHC, které je exprimováno do 8. dne věku. V 21. den po narození úplně ztrácejí polyneurální inervaci (Punkt et al., 2004).

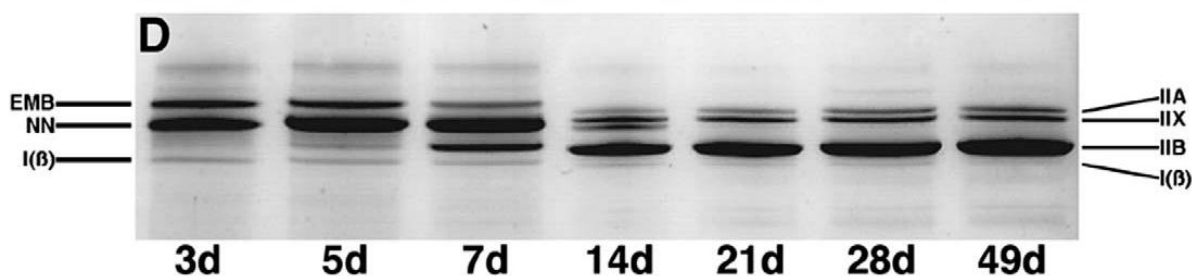
Současně s postnatální diferenciací svalových vláken a změnou exprese izoform MHC dochází také ke změnám enzymatické a metabolické aktivity myofibril. Mění se preference vláken ve využití glykolytického nebo oxidativního metabolismu a dochází k odlišnému vývoji exprese příslušných enzymů v závislosti na typu kosterního svalu daného organismu (Punkt et al., 2004). Postnatální vývoj diferenciaci oxidativní

a glykolytické dráhy také závisí na rychlosti zrání (rychlosti dospívání) a stupni zralosti organismu při narození a v době odstavu, která se druhově velmi liší. U králíků a prasat je oxidativní metabolismus ve svalu zásadní zdroj energie během fetálního období. Při narození jsou sice všechna svalová vlákna oxidativní, ale během prvních týdnů po narození dochází v důsledku změn exprese MHC a enzymů energetického metabolismu ke zvýšení glykolytického metabolismu ve vláknech. U potkanů začínají být oxidativní a glykolytická vlákna rozlišitelná od 10. do 20. dne po narození, u králíků od 21. dne. U větších savců jako jsou skot, ovce a také člověk, probíhá hlavní podíl kontraktilní a metabolické diferenciaci během poslední třetiny gestace a dokončena je brzy po narození. U druhů, jejichž mláďata se rodí méně vyvinutá, se metabolické a kontraktilní vlastnosti svalových vláken vyvíjí převážně během časného postnatálního vývoje - u prasat během prvních dvou týdnů a u hlodavců během prvního měsíce po narození (Picard et al., 2002).

Postnatální změny hlavních enzymů glykolytické a oxidativní dráhy byly popsány hlavně u potkanů. Rozdíly v ATPázové aktivitě jednotlivých typů vláken se začínají objevovat po 8. dni po narození. Změny v aktivitách sukcinátdehydrogenázy, markeru oxidativní aktivity, a glycerol-3-fosfát dehydrogenázy, markeru glykolytické aktivity, byly pozorovány od 21. dne postnatálního vývoje (Punkt et al., 2004). Rozlišení jednotlivých typů rychlých vláken jsou pozorovatelná až v pozdějších stádiích postnatálního vývoje a vyvíjí se společně se změnou typů vláken MHC a motorickým vývojem jedince. Vlákna IIB a IIA jsou rozlišitelná až 21. den po narození.

Analýzy ukázaly rozdílné výsledky ve změnách v preferenci metabolismu v odlišných svalech dolních končetin. *Musculus gastrocnemius* (smíšený sval) a *musculus extensor digitorum longus* (EDL, glykolytický sval) obsahují v dospělosti převážně rychlá vlákna FG a FOG, na rozdíl od *musculus soleus* (SOL, oxidativní sval), který obsahuje z velké části pomalá vlákna SO. V SOL populaci SO vláken (typ I) mezi 8. a 21. dnem stoupá, na rozdíl od smíšeného svalu *m. gastrocnemius* a EDL, kde v tomto období dochází k poklesu SO vláken a k nárůstu množství FG, což naznačuje přeměnu z FOG na FG (Punkt et al., 2004).

Obdobně jako ve studii na potkanech, tak i v pokusu s miniaturními prasaty byl zjištěn postnatální nárůst výskytu SO a FG a pokles FOG vláken v závislosti na typu svalu (Horak, 1995)



Obr. 2.4: Elektroforetická separace izoforem MHC v průběhu vývoje myšního kosterního svalu (*musculus gastrocnemius*) (převzato z Agbulut et al., 2003)

EMB - embryonální izoforma MHC; NN - neonatální izoforma MHC; I(β), IIA, IIX, IIB - dospělé typy izoforem MHC; d - den po narození

2.5 Vliv výživy na energetický metabolismus v perinatálním a časně postnatálním období

U většiny savců dochází v časném vývoji ke dvěma velice zásadním změnám ve výživě. První změna nastává při narození, kdy dochází k metabolickým změnám nejen v důsledku změny z fetální výživy na výživu mateřským mlékem, ale také z důvodu změny prostředí. Druhá změna je postupný přechod z mateřského mléka na pevnou stravu tzv. odstav. Vyhovující nutriční poměr látek v těchto obdobích je velice důležitý pro správný metabolický vývoj jedince a jeho naprogramování do dospělosti. Podvýživa, či naopak přebytek některých látek v průběhu vývoje může mít v pozdějším věku za následek rozvoj závažných metabolických poruch, jako jsou obezita, T2DM, hypertenze a další závažné onemocnění.

Fetální výživa plodu je založena převážně na příjmu glukózy, kterou plod dostává přes placentu od matky. Dále jsou částečně využívány aminokyseliny a laktát. Naopak MK do celkového fetálního metabolismu větší mírou nepřispívají. Po narození dochází ke změně poměru preferenčních nutrientů dodávaných v mateřském mléce. Převládající složkou jsou lipidy ve formě triacylglycerolů. Dále zhruba čtvrtinu tvoří proteiny a jen velice malé množství zaujímají sacharidy (převážně laktóza). Složení (poměr složek energie) mléka se druhově liší, například u člověka není tak dramatický rozdíl mezi množstvím lipidů a sacharidů jako u potkanů, kde je obsah lipidů více než desetinásobně vyšší než sacharidů (tab. 2.6) (Ferre et al., 1986, Girard et al., 1992).

V období krátce po narození dochází k rychlým metabolickým změnám, které zajišťují zachování glukózové homeostázy v organismu. Prvních pár hodin po porodu dochází vlivem zvýšené hladiny glukagonu a katecholaminů ke štěpení glykogenových

zásob v játrech. Dále je udržována hladina glukózy indukcí jaterní glukoneogeneze, především stimulací enzymů glukóza-6-fosfatázy a fosfoenolpyruvátcarboxykinázy (Beardsall et al., 2008). Schopnost oxidovat MK je ve fetálním období nízká, ale po narození stoupá aktivita enzymů účastnících se transportu a oxidace MK. Vysoký obsah MK a triglyceridů přijímaných v mléce, je využíván centrálními i periferními orgány. Ve svalu po narození stoupá aktivita lipoproteinové lipázy (Cryer and Jones, 1978) a CPT-1 (Lin and Odle, 2003). Po odstavu kapacita oxidovat MK mírně klesá, pravděpodobně v důsledku přechodu na pevnou stravu s jiným poměrem energetických složek.

Při odstavu a přechodu na pevnou stravu je mléko s vysokým obsahem lipidů postupně nahrazováno dietou s vysokým obsahem sacharidů (tab. 2.6). Přikrmování pevnou stravou začíná u laboratorních hlodavců kolem 15. dne a zhruba kolem 28. dne po narození pevná strava plně nahradí mateřské mléko (obr. 2.7) (Ferre et al., 1986).

Tab 2.6: Nutriční rozdíly složení mateřského mléka a experimentální diety, na kterou mláďata přecházejí při odstavu (převzato a upraveno podle Ferre et al., 1986 a experimentální dieta - Ssniff, Německo)

Mléko	Lipidy	Sacharidy	Proteiny
	Potkan	69	6
Pes	63	12	25
Prase	59	15	26
Králík	58	5	37
Člověk	53	41	6
Dieta			
Myš	11	53	36

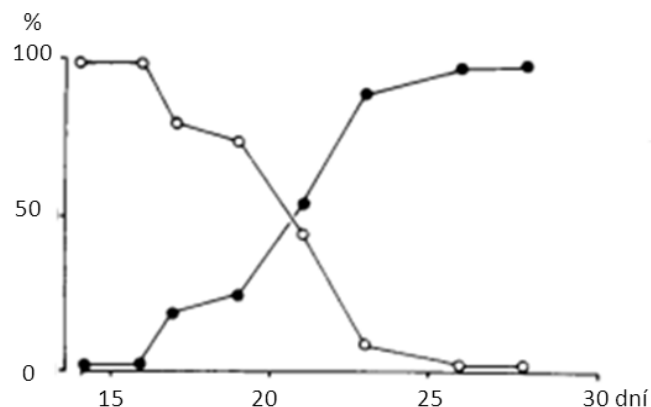
Hodnoty jsou udávány jako procenta z celkového množství kalorií.

Postnatální vývoj u potkanů je spojen s vysoce energeticky náročným metabolickým obratem proteinů v důsledku jejich syntézy v rostoucích tkáních. Během tohoto období je obrat proteinů velmi vysoký ve všech tkáních, zvláště v kosterním svalu, kde je syntéza proteinů dvakrát až třikrát vyšší než jejich degradace. Během dospívání jedince postupně syntéza proteinů klesá až do stavu, kdy se dostane do rovnováhy s degradací. Ta nastává v dospělém již v nerostoucím svalu (Fiorotto et al., 2000).

V současné době se převážná část studií zabývajících se vývojovým metabolismem zaměřuje na sledování vlivu obézních či diabetických matek na metabolické změny potomků během jejich vývoje až do dospělosti. Nevyvážený poměr nutričních látek

dodávaných během fetálního a časně postnatálního vývoje může mít za následek změny v naprogramování některých metabolických a signálních drah, které se mohou patologicky projevit v dospělosti.

Mateřská obezita může mít nepříznivý vliv na vývoj kosterního svalu a jeho metabolickou funkčnost. Potomci obézních matek, krmených vysoce kalorickou dietou, vykazují sníženou kontraktilitu svalových vláken (Bayol et al., 2009). Dále se objevuje změněný glukózový metabolismus, například snížená exprese GLUT4 (Simar et al., 2012) nebo akumulace lipidů mezi svalovými vlákny (Bayol et al., 2005). Ve studii na ovcích bylo ukázáno, že mateřská obezita zhoršovala inzulínovou signalizaci u jejich potomků v dospělosti. To odpovídalo zvýšenému obsahu triglyceridů uložených ve svalu a vyšší expresi transportérů MK. Tyto výsledky ukazují, že potomci obézních matek mají zhoršené funkce kosterního svalu a zároveň ukazují na význam perinatálního období v programování metabolických drah do dospělosti (Yan, 2011).



Obr. 2.7: Vývoj procentuálního podílu mateřského mléka a pevné stravy (experimentální diety) v průběhu postnatálního vývoje potkana (převzato a upraveno podle Ferre et al., 1986). Křivky vyjadřují obsah mléka (○) a pevné stravy (●) v žaludku mláděte od 15. do 28. dne postnatálního vývoje.

2.6 Přehled rozdílů metabolismu myších kmenů A/J a C57BL/6J

Ve výzkumu metabolismu a metabolických onemocnění se dnes používá celá řada inbredních myších kmenů s různým genetickým pozadím. Pro experimenty zaměřené na studium vzniku obezity a jejích dopadů na organismus se používají hlavně myší kmeny C57BL/6J (B6) a A/J z důvodu jejich rozdílné odpovědi na příjem diety s vysokým obsahem tuku (HF – high fat). Pro jejich vlastnosti byly zástupci těchto myších kmenů

použity i v této diplomové práci. Myši kmene B6 jsou náchylné k obezitě indukované HF dietou, zatímco myši kmene A/J krmené HF dietou jsou k obezitě rezistentní. Myši kmene B6 krmené HF dietou výrazně zvyšují hmotnost a rozvíjí se u nich hyperglykémie a hyperinzulinémie. V důsledku těchto změn u nich vzniká obezita a rozvíjí se znaky T2DM. U myši A/J se v důsledku HF diety tyto změny nevyskytují, tyto myši jsou k obezitě a s ní spojenými rizikovými faktory metabolického syndromu rezistentní (Surwit et al., 1988, Surwit et al., 1995). Metabolismus obou myších kmenů se liší v mnoha tkáních. Významné rozdíly lze nalézt hlavně v bílé tukové tkáni, játrech a kosterním svalu, což má vliv na celotělový metabolismus, vytrvalost, výkon a kapacitu svalu a na nárůst tělesné hmotnosti a množství tukové tkáně.

Oba myši kmény se liší v metabolismu v játrech při příjmu HF diety, tj. při příjmu zvýšeného množství lipidů z potravy. Jaterní steatóza, způsobená nahromaděním lipidů v orgánu, je často spojená s inzulinovou rezistencí a zánětem. Metabolismus jater u myši A/J odpovídá na příjem HF diety zvýšením exprese genů oxidativní fosforylace. Mitochondrie vykazují zvýšenou oxidativní kapacitu, která ale nebyla spojena se zvýšenou produkcí ATP. V játrech myši B6 žádná indukce respirace ani odpřažení pozorována nebyla. Změny u A/J ukazují na to, že jejich rezistence k obezitě souvisí se schopností jater vyrovnat se s vysokým příjmem tuků a zabránit jaterní steatóze navýšením aktivity dráhy oxidativní fosforylace spojené s odpřažením (Poussin et al., 2011).

Dalším rozdílem mezi kmény v reakci na příjem HF diety je odlišná hladina leptinu v plazmě. Sekrece leptinu se u A/J myši výrazně zvyšuje již po dvou týdnech na HF dietě a plazmatická hladina leptinu je tedy vyšší než u kmene B6 (Surwit et al., 1997, Kus et al., 2008). HF dieta má také vliv na metabolismus kosterního svalu. Měření oxidativního metabolismu ve svalu *m. soleus* ukázalo, že dochází ke zvýšení obsahu a fosforylace AMPK a ke zvýšení oxidace MK stimulované aktivátorem AICAR u A/J myši. Tento výsledek potvrzuje zvýšenou oxidační kapacitu ve svalu, což koreluje se změněnou hladinou leptinu. Zvýšená hladina leptinu u A/J myši naznačuje, že právě leptin zprostředkovává netřesovou termogenezi v oxidativním svalu pravděpodobně přes dráhu leptin-AMPK (Kus et al., 2008).

Metabolismus myších kmenů se neliší jen v odpovědi na HF dietu. V experimentu, kde byly myši krmény standardní dietou, byly ukázány rozdíly v celotělovém metabolismu způsobených odlišným lipidovým metabolismem v játrech a kosterním svalu. Byly testovány různé parametry v klidovém stavu svalu a při fyzické zátěži. Výsledky ukázaly,

že A/J myši mají menší odolnost ke svalové únavě při fyzické zátěži. V klidovém stavu byl respirační kvocient (**RQ**) jedinců A/J nižší než B6. Při zátěži došlo k výraznému nárůstu RQ především u A/J oproti B6 a to naznačuje, že míra využití lipidů je důležitým faktorem pro kapacitu výkonu při zátěži. Kmeny se liší i ve schopnosti oxidovat MK. U A/J myši oproti B6 je oxidace MK v kosterním svalu nižší, naopak v játrech je míra oxidace výrazně vyšší. Svalová oxidace koreluje s výkonostní kapacitou. Výsledky ukazují, že rozdílná schopnost využití lipidů periferními tkáněmi je spojená náchylností k obezitě v důsledku HF diety. Rozdíly mezi oběma kmeny byly nalezeny i na úrovni exprese genů a v hladině proteinů v kosterním svalu. Jedinci kmene B6 mají větší obsah proteinu PGC-1 α a také vyšší hladinu mRNA UCP3 v *m. gastrocnemius*. V játrech byla změřena vyšší exprese CPT-1 u A/J myši (Haramizu et al., 2009).

3 Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo studium AMPK na souboru vzorků kosterního svalu získaných od mláďat dvou odlišných myších kmenů (A/J a B6) v období časného postnatálního vývoje.

Specifické cíle práce byly následující:

1. Změřit aktivitu $\alpha 1$ a $\alpha 2$ izoforem katalytické podjednotky AMPK, klíčového enzymu energetického metabolismu.
2. Najít vhodný referenční gen pro normalizaci dat genové exprese u vzorků v různých stupních postnatálního vývoje jedince.
3. Změřit vývoj genové exprese $\alpha 1$ a $\alpha 2$ podjednotky AMPK a některých vybraných zástupců z genů energetického metabolismu, na jejichž regulaci genové exprese se AMPK podílí.
4. Získané výsledky vyhodnotit v závislosti na věku, pohlaví a rozdílném genetickém pozadí myších kmenů.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

adeninové nukleotidy (AMP, ATP)	Sigma, USA
akrylamid	Serva, Německo
albumin hovězí sérový (BSA).....	Amresco, USA
AMARA peptid.....	Vidia, ČR
aprotinin	Fluka, ČR
azid sodný	Sigma, USA
benzamidin	Sigma, USA
bisakrylamid.....	Serva, Německo
Brij-35	Fluka, USA
diethylether.....	Penta, ČR
difosforečnan sodný	Lachema, ČR
disodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA–Na ₂).....	Sigma, USA
dithiotreitol (DTT)	Sigma, USA
dNTP	Invitrogen, Německo
dodecylsulfát sodný (SDS).....	Bio-Rad, USA
DTT.....	Invitrogen, Německo
EDTA	Serva, Německo
EGTA	Serva, Německo
ethanol.....	Penta, ČR
fluorid sodný	Lachema, ČR
glycerol.....	Penta, ČR
glycin.....	Serva, Německo
HEPES	Serva, Německo
hydrogenuhličitan sodný	FisherBiotech, USA
hydroxid sodný.....	Penta, ČR
chlorid hořečnatý.....	Fluka, USA
chlorid sodný.....	Merck, Německo
chloroform.....	Penta, ČR
inhibitor fosfatáz	Serva, Německo
izopropanol.....	Serva, Německo
kyselina fosforečná	Lach-Ner, ČR

kyselina chlorovodíková	Penta, ČR
Laemmlí sample buffer	Bio-Rad, USA
leupeptin	Sigma, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Švýcarsko
merkptoethanol.....	Serva, Německo
methanol.....	Penta, ČR
M-MLV reverzní transkriptáza	Invitrogen, Německo
Odyssey blocker	Li-cor, USA
oligo thymidin	Generi Biotech, ČR
pentahydrát síranu hořečnatého.....	Lachema, ČR
pepstatin	Sigma, USA
peroxodisíran amonný (APS).....	Sigma, USA
phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF).....	Sigma, USA
primery pro PCR	Generi Biotech, ČR
protein G sepharóza (PGS).....	GE Healthcare (Bio-Sciences AB), Švédsko
scintilační roztok Ultima Gold	Perkin Elmer, USA
tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
TGS pufr	Bio-Rad, USA
Tris	Sigma, USA
Triton X-100	Serva, Německo
Trizma báze.....	Fluka, USA
TRIzol	Sigma, USA
trypsin inhibitor.....	Serva, Německo
Tween.....	Serva, Německo
uhličitan sodný	Lachema, ČR
vinan sodný	Lachema, ČR
γ -[32P] ATP	Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

4.1.2 Přístroje a materiál

chirurgické nástroje.....	Medin, ČR
pipety rozsahu 0,2 - 1000 μ l.....	Gilson, Francie
multikanálové pipety.....	Gilson, Francie
centrifuga Universal 320 R.	Hettich, Německo
mini centrifuga	Labnet, USA
vortex	Scientific Industries, USA
magnetická míchačka.....	IKA, USA

váhy ADAM.....	Adam Equipment, Velká Británie
analytické váhy Pionerr.....	OHAUS, USA
sonikátor.....	Hielscher, Německo
třepačka MS 3 D	IKA, USA
termální box	Sanyo, Japonsko
spektrofotometr Sunrise BASIC Tecan.....	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr UV-Vis8453.....	Hewlett Packard, USA
spektrofotometr NanoDrop	NanoDrop, USA
aparatura na elektroforézu.....	Bio-Rad, USA
aparatura na polosuché blotování.....	Omni-Bio, ČR
Odyssey IR Imager.....	Li-cor, USA
termoblok	Biometra, Německo
pH metr InLab level	WTW, Německo
Homogenizátor Ultra-Turrax T8.01	IKA, Německo
Spektrofotometr UV-Vis8453	Hewlett Packard, USA
Beta – counter	Hewlett Packard, USA
Hulamixer.....	Invitrogen, USA
přístroj na reverzní transkripci TGradient.....	Biometra, Německo
LightCycler® 480 System.....	Roche, Švýcarsko
vakuová sušička VR-1 Heto	Thermo Scientific, USA

4.2 Metody

4.2.1 Práce s laboratorními zvířaty

4.2.1.1 Myší linie

Ke všem experimentům byly použity inbrední myší kmeny A/J a C57BL/6J (B6). Vzorokly byly odebírány z jedinců obou pohlaví ve věku od 5. dne od narození do odstavy od matky (tj. 28. den věku). Zvířata byla chována a množena ve Fyziologickém ústavu AV ČR v.v.i. Základem kolonie byly chovné páry dovezené z The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) v roce 1998.

4.2.1.2 Experimentální podmínky

Zvířata byla chována ve 12-ti hodinovém světelném režimu (12 h světlo/12 h tma) s volným přístupem k potravě a vodě. Myši byly krmeny standardní dietou (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo). Březí samice a samice s mláďaty dostávaly standardní dietu s větším obsahem tuků a proteinů (Ssniff EF M-Z control diet, Ssniff, Německo). Touto dietou se pak také mláďata přikrmovala při přechodu z mateřského mléka na pevnou potravu. Všechny myši použité v pokusu byly narozeny a chovány ve 30°C (termoneutrální teplota).

4.2.1.3 Soubor vzorků

Svaly pro stanovení aktivity AMPK byly odebírány z mláďat ve věku 10, 15, 20 a 28 dní po narození. Soubor vzorků pro měření genové exprese byl ještě rozšířen o svaly z 5-ti denních mláďat. Do pokusu byly zahrnuty jen mláďata z vrhů o 4 – 6 jedincích. Z každého vrhu byly odebrány pouze dvě mláďata, pokud možno samec a samice.

4.2.1.4 Odběr vzorků

Myši byly usmrceny dislokací krční páteře v etherové narkóze, a co nejrychleji jim byl odebrán sval z lýtky – *musculus gastrocnemius*, zvážen a okamžitě zamražen v tekutém dusíku, ve kterém byly vzorky až do zpracování skladovány. Pro každou skupinu (genotyp, věk, pohlaví) bylo odebráno vzorky ze 5-6 jedinců (tab. 4.1).

Tab. 4.1: Přehled skupin a počet zpracovaných vzorků

A/J M						A/J F					
věk [dny]	5	10	15	20	28	věk [dny]	5	10	15	20	28
aktivita AMPK	-	6	6	6	6	aktivita AMPK	-	6	6	6	6
genová exprese	5	5	5	5	5	genová exprese	5	5	5	5	5

B6 M						B6 F					
věk [dny]	5	10	15	20	28	věk [dny]	5	10	15	20	28
aktivita AMPK	-	6	6	6	6	aktivita AMPK	-	6	6	6	6
genová exprese	5	5	5	5	5	genová exprese	5	5	5	5	5

(sběr vzorků probíhal po dobu 24 měsíců)

4.2.2 Příprava vzorků na stanovení aktivity AMPK a kvantifikaci proteinů

4.2.2.1 Extrakce proteinů z tkáně

Aby bylo možno provádět měření intracelulárních proteinů, je nutno tkáň, respektive buňky rozbít. Buněčný extrakt lze získat mechanicky (drcením, sonikací), membrány je navíc možno rozpustit pomocí detergentu. K vytvoření buněčného extraktu se používá extrakční pufr, což je směs látek vytvářející stabilní fyziologické prostředí společně se směsí inhibitorů fosfatáz a proteáz, které brání degradaci proteinů.

Extrakční pufr

Deionizovaná H₂O, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidin, 1 mM DTT, 20 mM NaF, 2 mM Na pyrofosfát, 0,4 mM PMSF

Směs byla filtrována (0,22 μm, Millipore, Německo) a přidány další složky.

0,2 % Triton X-100, 1 % glycerol, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml (15 μM) leupeptin, 1 μg/ml (15 μM) pepstatin, 1 % SERVA fosfatázový inhibitor

Kousky zmražené tkáně o velikosti 20-35 mg byly spolu s 300μl extrakčního pufru drceny pod tekutým dusíkem. Získaná směs (homogenát) byla sonikována (sonikátor Hielscher UIS250V, 10 cyklů 50Hz) a centrifugována 18 000 g při 4°C po dobu 10 min. Získaný supernatant - extrakt byl dále použit pro stanovení celkového obsahu proteinů a aktivity AMPK.

Standardy na Western blot

K přípravě standardů na SDS-PAGE a western blot byly použity svaly (m. *gastrocnemius*) z dospělých (stáří 3 měsíce) samců kmene B6, narozených a chovaných ve 30°C. Směsný vzorek standardu byl vytvořen ze svalů čtyř jedinců. Standardy byly zpracovány stejným způsobem jako zkoumané vzorky.

4.2.2.2 Stanovení obsahu proteinů metodou kyseliny bicinchoninové (BCA)

Princip metody využívá schopnosti proteinů redukovat ionty Cu^{2+} na Cu^+ . Množství Cu^+ je přímo úměrné množství proteinů ve vzorku. Kyselina bicinchoninová reaguje s ionty Cu^+ vytvořením fialově zbarveného produktu s absorpčním maximem při 562 nm. Skutečné množství proteinu ve vzorku je zjištěno porovnáním absorbance vzorku s absorbancemi kalibrační přímky standardu. Jako standard byl použit BSA

Roztok A

1 % disodná sůl kyseliny bicinchoninové, 0,4 % NaOH, 2 % Na_2CO_3 , 0,16 % vinan disodná sůl, 0,95 % NaHCO_3

Roztok B

4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Vzorek extraktu byl 20x naředěn vodou. Měření bylo prováděno na 96-jamkové destičce ve dvou různých koncentracích. Reakční směs byla připravena smícháním roztoku A a B v poměru 50:1 a ke každému vzorku bylo přidáno 225 μl této směsi. Inkubace (reakce) probíhala 30 min při teplotě 37°C. Absorbance byla změřena při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru Tecan. Pro stanovení pozadí reakce (blank) byl použit čistý extrakční pufr. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočítána podle vytvořené kalibrační křivky o známých koncentracích standardu BSA (tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ředění kalibrační křivky

	množství proteinu [μg]	standard BSA (0,5 mg/ml) [μl]	H_2O [μl]
1	-	-	15
2	1,25	2,5	12,5
3	2,5	5	10
4	5,0	10	5
5	7,5	15	0

4.2.3 Stanovení aktivity izoform katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2)

Stanovení enzymové aktivity AMPK se skládá ze dvou kroků. Zahrnuje izolaci daného proteinu a samotnou enzymovou reakci, při které proběhne fosforylace uměle nasyntetizovaného peptidu AMP-kinázou. V této reakci AMPK využívá radioaktivně značeného ATP. Míra měřené radioaktivity odpovídá schopnosti AMPK fosforylovat protein.

4.2.3.1 Purifikace AMPK (imunoprecipitace)

IP pufr

50 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 50 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF, 1 % Triton X-100

HEPES – Brij pufr

50 mM HEPES, 0,02 % Brij-35, 1 mM DTT

pH = 7,0

HEPES NaCl pufr

50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,02 % Brij-35, 1 mM DTT

pH = 7,4

Radioaktivní mix ATP (*mix ATP)

HEPES-Brij, 25 mM MgCl₂, 1 mM ATP, radioaktivní ATP ([γ -³²P]ATP)

Reakční směs

1 mM AMP, 1 mM *mix ATP, 1 mM AMARA peptid

Příprava „protein G sepharózy“

Protein G sepharóza (PGS - protein G sepharózové kuličky, 10 μ l na reakci) byla nejprve 5x promyta 5-ti násobným objemem vychlazeného IP pufru k odstranění konzervačního roztoku. PGS byly promyty a centrifugovány 4500 g 4°C 1 min. Po promytí

byly PGS inkubovány s protilátkou proti $\alpha 1$ nebo $\alpha 2$ podjednotce AMPK v koncentraci 1 ng/ μ l 2 hod ve 4°C za stálého jemného promíchávání. Po skončení inkubace byly PGS s navázanou protilátkou (**PGS-Ab**) 5x promyty IP pufrem, stejně jako v předchozím kroku, aby došlo k odstranění nenavázané protilátky.

Imunoprecipitace

Extrakt vzorku byl přidán k PGS-Ab ve finální koncentraci 1 mg/ml a směs byla doplněna IP pufrem do finálního objemu 110 μ l. Inkubace vzorku s protilátkou probíhala 2 hod ve 4°C za stálého jemného promíchávání. Po skončení inkubace byla směs (PGS-Ab-protein) 5x promyta 500 μ l IP pufru a 2x HEPES-Brij pufrům o objemu 700 μ l. Centrifugace během promývání probíhala při 9 000 g ve 4°C po dobu 2 min.

4.2.3.2 Stanovení enzymové aktivity AMPK

Komplex PGS-Ab-protein v HEPES-Brij pufru byl centrifugován 9 000 g po dobu 2 min při 4°C. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu s komplexem bylo přidáno 320 μ l HEPES-Brij pufru a směs byla resuspendována. Pro další krok byly vytvořeny dublety po 100 μ l. Pro měření negativní kontroly byl z některých vzorků vytvořen třetí alikvot se 100 μ l. Všechny vzorky byly centrifugovány 9 000 g po dobu 1 min při 4°C a poté bylo odstraněno 80 μ l supernatantu.

Ke zbylým 20 μ l směsi ve zkumavce bylo přidáno 30 μ l reakční směsi s radioaktivním ATP a nasyntetizovaným AMARA peptidem a enzymová reakce probíhala 15 min při 30°C za stálého třepání. Ke vzorkům pro negativní kontrolu byla přidána reakční směs, kde AMARA peptid byl nahrazen HEPES-Brij pufrům. Reakce byla ukončena přenesením 20 μ l vzorku na chromatografický papír (Whatman, Velká Británie) a ponořením do 1 % kyseliny fosforečné. Po usušení na vzduchu byl chromatografický papírek přenesen do lahvičky s 10 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita byla měřena na přístroji Beta counter (Hewlett Packard, USA).

Výpočet aktivity

Pro výpočet aktivity byla v každé sérii měření stanovována aktuální aktivita čistého radioaktivně značeného ATP (standard) v dubletu. Pozadí reakce bylo zjištěno ze vzorků negativní kontroly (směs bez AMARA peptidu). Aktivita standardu (CPM/1 mol ATP) pak byla použita pro výpočet množství nafosforylovaného proteinu (32 P-AMARA) za 1 minutu

na 1 mg proteinu (extraktu). Aktivita AMPK byla uváděna v jednotkách U/mg (U = 1 nmol fosfátu inkorporovaného do AMARA peptidu za 1 minutu).

4.2.4 SDS - polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

30% akrylamid mix

0,2 M akrylamid; 3 mM bisakrylamid

Příprava gelu (rozpočet na 2 gely):

Dělicí gel: 10% SDS - polyakrylamidový gel

H ₂ O	4.0 ml
30% akrylamid mix	3.3 ml
1.5 M Tris pH 8,8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Zaostřovací gel: 5% SDS - polyakrylamidový gel

H ₂ O	2.1 ml
30% akrylamid mix	0.5 ml
1.0 M Tris pH 6,8	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% APS	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

Vzorkový pufr

Laemli sample buffer, β-merkaptoethanol

ředění 20:1

Pufr pro elektroforézu (TGS pufr)

25 mM Tris, 192 mM glycine

pH 8,3

Pufry pro blotování

Pufr I – anodový

150 mM Trizma báze, 10% methanol

Pufr II – anodový

12 mM M Trizma báze, 10% methanol

Pufr III – katodový

20 mM Tris, 5 mM glycin, 10% methanol

roztok TBS-T

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween

pH = 7,6

TBS

50 mM Tris, 150 mM NaCl

Příprava vzorků na SDS - PAGE

Vzorky na SDS-PAGE byly připraveny smícháním 10 μ l vzorkového pufru s množstvím extraktu doplněného vodou do celkového objemu 20 μ l s výslednou koncentrací 30 μ g proteinu. Vzorky byly zvortexovány a denaturovány 12 min v termobloku při teplotě 85°C. Poté byly vzorky zchlazeny na ledu, zvortexovány a stočeny.

SDS - PAGE

Gel na elektroforézu byl připraven s použitím dělicího 10% SDS-polyakrylamidového gelu a 5% SDS-polyakrylamidového zaostřovacího gelu. Gel v aparatuře na elektroforézu byl zalit TGS puftrem a do jamek bylo pipetováno 17 μ l vzorku. Pro stanovení polohy proteinů podle molekulové hmotnosti byl použit marker o velikosti 250 kDa - 10 kDa (Fermentas, USA). Elektroforéza běžela 30 min při napětí 60 V a poté 90 min při 90 V.

4.2.5 Western blot (WB)

Pro přenos proteinů z gelu na membránu byla použita PVDF membrána (Immobilion-FL Transfer membrane, PVDF 0,45 μm , Millipore, USA). Před blotováním byla PVDF membrána aktivována 20 s v metanolu, 2 min v destilované vodě a 5 min v blotovacím pufru II. Dále byl připraven daný počet filtračních papírů (Whatman, Velká Británie) ekvilibrováných v blotovacích pufrech určených použitou blotovací aparaturou. Po skončení elektroforézy byl gel ekvilibrován po dobu 15 min v pufru III. Do aparatury na polosuché blotování byl poskládán systém v pořadí 6 filtračních papírů inkubovaných v pufru I, 3 filtrační papíry v pufru II, PVDF membrána, gel a 6 filtračních papírů v pufru III. Blotování probíhalo 1 hod při konstantním proudu 120 mA při 4°C. Po skončení blotování byla membrána opláchnuta v 6 ml TBS 5 min na třepačce. Poté byla membrána inkubována 1 hod v blokovacím roztoku (6 ml Odyssey Blockeru a 6 ml TBS).

Značení primární a sekundární protilátkou

Ze zablokované membrány byl vyříznut proužek s proteiny o odpovídající molekulové hmotnosti testovaného proteinu (63 kDa). Značení proteinu na membráně probíhalo v roztoku s Odyssey Blocker, TBS-T a primární protilátkou přes noc při 4°C za stálého jemného kývání. Pro stanovení proteinu byly použity primární protilátky proti fosforylované (aktivní) formě AMPK (králičí protilátka proti p-AMPK, Cell Signaling, USA) v koncentraci 1:5000 a dále primární protilátky proti celkovému množství proteinu podjednotek $\alpha 1$ a $\alpha 2$ AMPK (ovčí protilátky proti AMPK $\alpha 1$, AMPK $\alpha 2$, dar od prof. Hardieho, University of Dundee, UK) v koncentraci 1:3500. Druhý den byla membrána promyta od nenavázané protilátky 5x5 min v TBS-T. Značení sekundární protilátkou probíhalo v roztoku s Odyssey Blocker a TBS-T po dobu 1 hod ve tmě při laboratorní teplotě za stálého kývání. Jako sekundární protilátky byly použity fluorescenčně značené protilátky proti primárním protilátkám (oslí protilátka proti IgG králíka, Rockland, USA a oslí protilátka proti IgG ovce, Invitrogen, USA), obě v koncentraci 1:1000. Po inkubaci byla membrána opět promyta 5x5 min v TBS-T a 1x10 min v TBS.

Detekce

Intenzita fluorescence protilátek vázaných na zkoumaném proteinu byla detekována na přístroji Odyssey (Li-cor, USA) v detekčních spektrech 700 nm a 800 nm.

4.2.6 Měření genové exprese

4.2.6.1 Izolace RNA

Homogenizace

Zmrazená tkáň (10 - 70 μg) byla přenesena do 1 ml TRIzolu a homogenizována pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax. Homogenát byl centrifugován 12 000 g po dobu 10 min při 4 °C. Čirá fáze mezi dolní fází tvořenou Trizolem se zbytky buněčných membrán a horní fází tvořenou proteiny, která obsahuje RNA, byla odebrána do nové zkumavky a inkubována 5 min při laboratorní teplotě.

Separace fází

K čiré mezifázi s RNA bylo přidáno 200 μl chloroformu a 20 s důkladně vortexováno. Po dobu 10 min byly vzorky inkubovány při laboratorní teplotě a poté centrifugovány 14 000 g 15 min při 4°C, kdy se oddělila horní vodná fáze, která obsahovala RNA.

Precipitace RNA

K odebrané vodné fázi bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu, vzorky byly protřepány a ponechány 10 min při laboratorní teplotě, kdy došlo k vysrážení RNA. Vysrážená RNA ve formě pelety byla získána centrifugací vzorků 12000 g po dobu 10 min ve 4 °C.

Promývání RNA

Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a k peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Vzorek byl zvortexován a inkubován 5 min při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek opět centrifugován 12 000 g po dobu 5 min při 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet s RNA byla sušen 5 min při 40°C pod vakuem (VR-1 Heto, Thermo Scientific, USA).

Rozpuštění a stanovení koncentrace RNA

Suchá peleta s RNA byla rozpouštěna ve 20 μl redestilované vody po dobu 15 min při 60°C. Během inkubace byly vzorky vortexovány každých 5 min. Koncentrace RNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop. Alikvoty z vyizolované RNA byly skladovány v -80°C.

4.2.6.2 Reverzní transkripce

Mix A (množství na 1 reakci)

deionizovaná H ₂ O	10,5 µl
primer oligo thymidin	0,5 µl

Mix B (množství na 1 reakci)

5x RT pufr	4,0 µl
0,1 M DTT	2,0 µl
10 mM dNTP mix	1,0 µl
M-MLV RT	1,0 µl

Vzorky s vyizolovanou RNA byly naředěny na stejnou koncentraci (1 µg/µl). Složky reakční směsi (mix A a mix B) pro reverzní transkripci byly ke vzorku přidány ve dvou krocích. Vstupní množství RNA použité do reakce bylo 1 µg/µl. Reakce probíhala v přístroji pro reverzní transkripci TGradient (Biometra, Německo). Nejprve bylo smícháno 11 µl mixu A a 1 µl vzorku. Vzorky byly vloženy do přístroje, kde probíhalo po dobu 5 min rozvolnění sekundární struktury řetězce při 65°C. Poté byly vzorky zchlazeny na 4°C a bylo přidáno 8 µl mixu B, výsledný objem reakční směsi byl 20 µl. Poté reakce pokračovala při 37°C po dobu 1 hodiny, následovala inaktivace reakce 10 min 72°C a zchlazení na 4°C.

4.2.6.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR)

Reakční směs (množství na 1 reakci)

2x Master mix	5 µl
deionizovaná H ₂ O	3 µl
5' primer	0,5 µl
3' primer	0,5 µl

Jako fluorescenční sonda pro měření amplifikace po každém kroku bylo použito interkalační barvivo SYBR Green (Roche), které se váže na dvouvláknovou RNA a míra fluorescence je přístrojem na RT-PCR detekována.

Tab 4.3: Experimentální protokol pro qRT-PCR (LightCycler® 480 Real-Time PCR System)

	Cílová teplota [°C]	Čas udržení teploty [s]	Rychlost změny teploty [°C/s]
Počáteční denaturace	95	300	4,4
Amplifikace (45 cyklů)			
Denaturace	95	10	4,4
Nasedání primerů *	60	10	2,2
Polymerace	72	10	4,4
Denaturační analýza			
Denaturace	95	5	4,4
Renaturace	65	60	2,2
Postupná denaturace	97	-	
Ochlazení	40	30	2,2

* teplota nasedání primerů je individuální pro primery jednotlivých genů (tab. 4.4)

Vzorky s cDNA, získanou z reverzní transkripce, byly naředěny vodou (20x), zvortexovány a stočeny. Reakční směs byla připravena ve sterilním boxu. Reakce probíhala na 96-jamkové destičce. Do každé jamky bylo napipetováno 9 µl reakční směsi a mimo box bylo přidáno 1 µl (zkoumaného) vzorku/cDNA. Jako blank byla použita reakční směs bez cDNA. Celá práce probíhala na vychlazeném bločku při 4°C. Destička byla poté krátce stočena (2500 rpm, Z 300, Hermle) a vložena do předem vychlazeného (4°C) přístroje na RT-PCR (LightCycler, Roche) a spuštěna amplifikace. Všechny vzorky byly měřeny v dubletech.

Tab. 4.4: Seznam použitých primerů

Gen	Kód GenBank	Sekvence	Délka produktu [bp]	Teplota nasedání [°C]
GAPDH	14433	5'CTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC 5'CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT	162	60,5
PSMB6	19175	5'TGCAGTTTAAATGGGGGCGTGGTT 5'ATCACATCTTCTGCTGCCGCTCA	122	58,7
HPRT	15452	5'GCTGAGGCGGCGAGGGAGAG 5'GCTAATCACGACGCTGGGACTGC	148	62,9
β-aktin	11461	5'GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 5'ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	434	60,2
GLUT4	20528	5'GCCGACTCGAAGATGCTGGTTGAATAG 5'ACCGGCTGGGCTGATGTGTCT	209	60,5
UCP3	7352	5'AGAACCATCGCCAGGGAGGAAGGA 5'CACCGGGGAGGCCACCACTGT	216	61,9
cyklofilin B	19035	5'ACTACGGGCCTGGCTGGGTGAG 5'TGCCGGAGTCGACAATGATGA	216	59,4
AMPK-α1	105787	5'TGCCCCATCCCCAAACC 5'ATAAAACAAGCCCCGAACAAAAG	141	53,8
AMPK-α2	108079	5'AGCAGCTGGGTTTTGAATGGAAGGT 5'GGAGGCCCGCAGCAGAACAGG	216	58,8
Eef-1α	13627	5'TGACAGCAAAAACGACCCACCAAT 5'GGCCATCTTCCAGCTTCTTACCA	192	58,6
Eef-2	13629	5'CCCAAAGGATGCGCTCTCGTT 5'TGCGGTGTCTGTAGTGCTTGATT	142	58,7
PGC-1α	19017	5'TGCGGTGTCTGTAGTGCTTGATT 5'CCCAAAGGATGCGCTCTCGTT	150	57,2

Vyhodnocení množství transkriptu

Pro každý měřený transkript je nutné změřit kalibrační křivku, podle které je pak vypočítáváno množství mRNA měřeného genu ve zkoumaných vzorcích. Kalibrační křivka je vytvořena ředící řadou (5 koncentrací v dubletu) ze směsného vzorku. Směsný vzorek byl vytvořen smícháním vyizolované RNA z co největšího počtu vzorků pokrývajících celý zkoumaný soubor. Směs RNA pak byla použita do reverzní transkripce stejně jako jednotlivé studované vzorky. Pomocí hodnot z kalibrační křivky jsou pak vypočtena množství transkriptu ve vzorcích. Pro optimální vyhodnocení vzorku je nutné provést normalizaci, kdy je vypočtená hladina transkriptu vztažena ideálně na dva geny, jejichž hladina exprese je vyrovnaná u všech studovaných skupin. Získáme tak výsledky nezkreslené různými vstupními hodnotami cDNA.

4.2.7 Stanovení referenčních genů

Výběr referenčních genů vhodných pro normalizaci dat genové exprese zkoumaných vzorků byl prováděn na výběrovém souboru vzorků. Byly použity vzorky

svalů z myši kmene B6 ve čtyřech časových bodech (10D, 15D, 20D, 28D) pokrývající průběh postnatálního vývoje. V každém časovém bodě byly 3 vzorky. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako zkoumané vzorky (izolace RNA kap 4.2.6.1, reverzní transkripce kap. 4.2.6.2) a metodou qRT-PCR (kap 4.2.6.3) byla změřena jejich genová exprese. Pomocí programu GenEx byla vyhodnocena proměnlivost jejich exprese. Výsledné geny s nejmenší hodnotou proměnlivosti (M-value) byly následně použity pro normalizaci.

Tab. 4.5: Kandidátní referenční geny

GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
Cycph B	cyklofilin B
Eef-1α	elongační faktor 1 α
Eef-2	elongační faktor 2
HPRT	hypoxantinribosyltransferáza
PSMB6	(proteasome subunit beta type 6)
β-actin	β aktin

4.2.8 Zpracování výsledků

Vyhodnocení Western blotů

Množství celkové a fosforylované AMPK detekované na skenovaných membránách byla vyhodnocována v programu AIDA (Raytest, Německo).

Zpracování dat genové exprese

Naměřená data metodou qRT-PCR byla vyhodnocena v programu GenEx (bioMCC, Německo). Program byl použit k vyhodnocení nejvhodnějších referenčních genů. Dále v něm byla provedena normalizace vzorků na referenční geny.

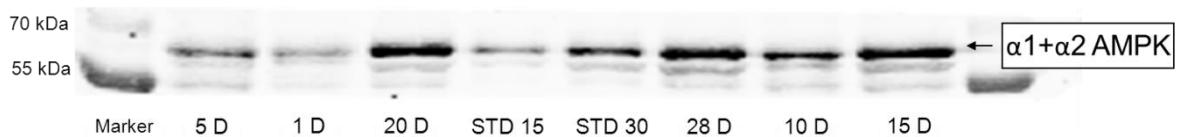
Statistické zpracování výsledků

Data byla statisticky zpracována v programu SigmaStat 3.5 od firmy (Systat Software, USA). Pro porovnávání dat byla použita dvoucestná ANOVA s Holm-Sidak testem. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). Hladina signifikance byla stanovena na $p < 0,05$ (případně na $p < 0,01$ nebo $p < 0,001$). Grafy byly zpracovány v programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software, USA) nebo Excel (Microsoft, USA).

5. Výsledky

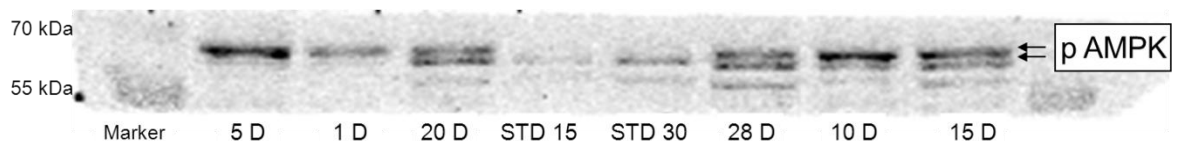
5.1. Stanovení celkového a fosforylovaného množství proteinu AMPK metodou Western blot

Aktivitu AMPK lze vyjádřit nepřímou pomocí poměru celkového ($\alpha 1 + \alpha 2$ AMPK) a fosforylovaného množství proteinu AMPK (p-AMPK). S využitím SDS PAGE a WB (kap 4.2.4 a 4.2.5) lze detekovat celkové množství proteinu AMPK ve vzorku použitím protilátek proti jednotlivým podjednotkám $\alpha 1$ a $\alpha 2$ (obr. 5.1) a množství fosforylovaného proteinu použitím protilátky, která detekuje pouze fosforylovaný threonin na pozici 172 AMPK (obr. 5.2).



Obr. 5.1: Analýza celkového množství proteinu AMPK v lýtkovém svalu u myšního kmene B6 odebraného v průběhu postnatálního vývoje (1. - 28. den)

Proteiny byly rozděleny na 10% SDS PAGE s následným WB a AMPK detekována s využitím specifických primárních protilátek proti oběma podjednotkám $\alpha 1$ a $\alpha 2$ (dar od prof. Hardieho, University of Dundee) a specifických sekundárních protilátek značených fluorescenčně. Detekce imunofluorescence byla provedena pomocí přístroje Odyssey a intenzita signálu byla vyhodnocena v programu AIDA. Celkové množství nanášeného proteinu každého vzorku bylo 30 μg , jako standard byl použit extrakt z lýtkového svalu (*m. gastrocnemius*) dospělé myši. Množství nanášeného proteinu u standardu bylo u STD 15 - 15 μg a u STD 30 - 30 μg . *D – den*



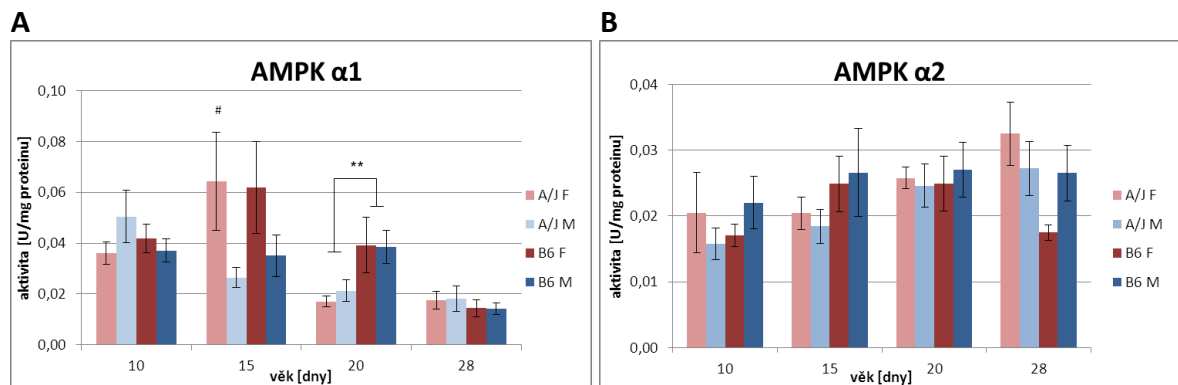
Obr 5.2: Analýza množství fosforylované formy proteinu AMPK (p-AMPK) v lýtkovém svalu myšního kmene B6 odebraného v průběhu postnatálního vývoje (1. - 28. den)

Proteiny byly zpracovány jako v obr. 5.1. K detekci fosforylovaného proteinu AMPK byla použita specifická protilátka proti fosforylovanému threoninu v pozici 172 a specifická sekundární protilátka značená fluorescenčně. Detekce a vyhodnocení bylo provedeno stejně jako v případě obr. 5.1. *D – den*

Při detekci p-AMPK u myšího kmene B6 byly v některých časových bodech (10D, 15D, 20D, 28D) pozorovány dva velmi blízké proužky na rozdíl od vzorku z dospělé myši téhož kmene (obr. 5.2). Na základě problematické detekce fosforylovaného proteinu WB, jsme se rozhodli u odebraných vzorků stanovit aktivitu AMPK jinou (citlivější) metodou.

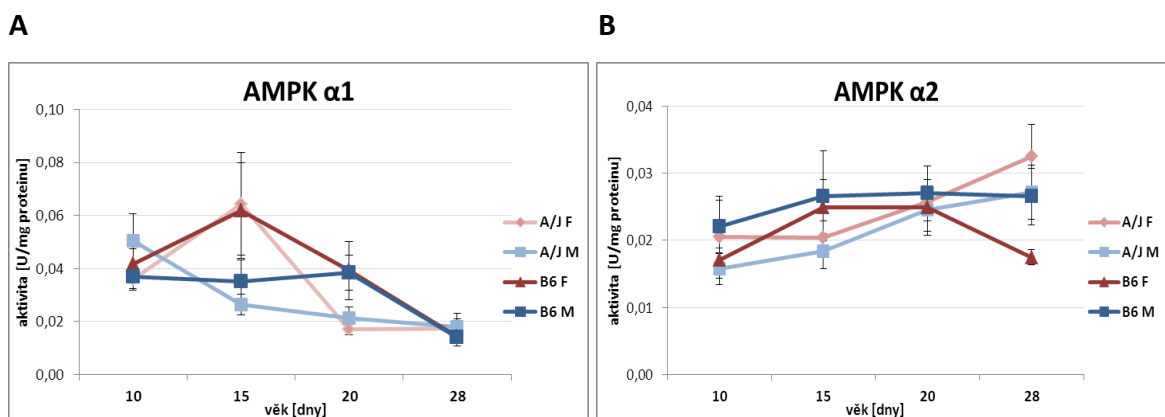
5.2 Stanovení aktivity jednotlivých izoforem katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2) imunoprecipitací a fosforylací syntetického peptidu AMARA

Aktivita obou izoforem katalytické podjednotky (α 1 a α 2) AMPK byla stanovena imunoprecipitací enzymu a fosforylací syntetického peptidu AMARA pomocí radioaktivního ATP (kap. 4.2.3) ve vzorcích kosterního svalu z období během časného postnatálního vývoje. Vzorky byly odebírány v období průběhu 2 let z mláďat rozených a chovaných v termoneutralní teplotě (30°C). V jednom časovém bodě byly srovnávány (i) dva myší kmeny (genotypy): myší kmen B6, který je citlivý k obezitě indukované HF dietou, a myší kmen A/J, který je rezistentní k obezitě indukované HF a (ii) mezipohlavní rozdíly (samice (F) vs. samci (M)). Měření bylo provedeno ve čtyřech skupinách myší (**A/J F**, samice kmene A/J; **A/J M**, samci kmene A/J; **B6 F**, samice kmene B6; **B6 M**, samci kmene B6) ve čtyřech časových bodech (**10D**, **15D**, **20D**, **28D**). V každé skupině bylo 6 vzorků příslušného věku a pohlaví a v každém vzorku byla změřena aktivita obou izoforem (AMPK α 1 a AMPK α 2). Aktivita jednotlivých izoforem byla porovnávána v rámci skupin genotypů, průběh aktivity a celkové rozdíly v aktivitě byly porovnávány mezi jednotlivými skupinami. Naměřená data jsou uvedena v příloze (kap. 9)



Graf 5.3: Porovnání aktivit AMPK α 1 (A) a AMPK α 2 (B) mezi testovanými skupinami myší v závislosti na pohlaví a kmenu v jednotlivých časových bodech.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny [γ - 32 P]ATP. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA) ** $p<0,01$ rozdíl mezi genotypy; # $p<0,05$ rozdíl mezi pohlavími; M - samci, F- samice

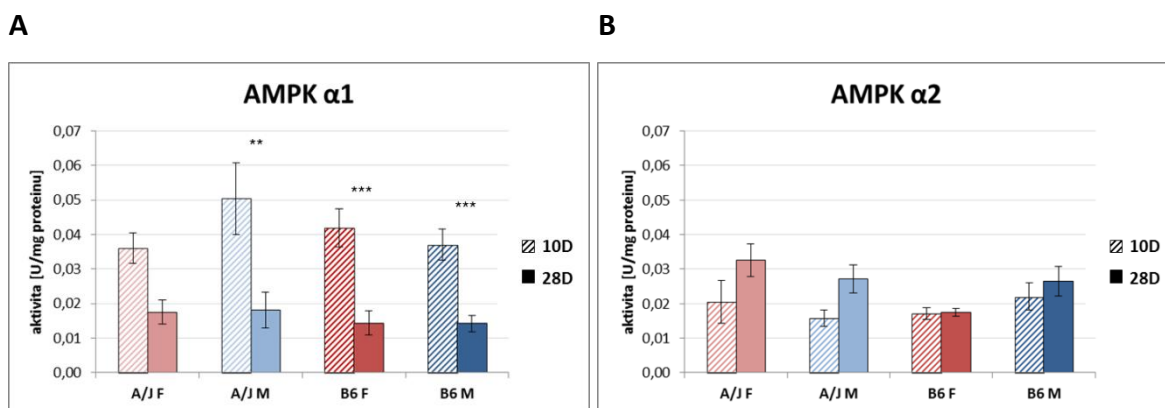


Graf 5.4: Průběh aktivity izoforem AMPK α 1 (A) a AMPK α 2 (B) v kosterním svalu během časného postnatálního vývoje v období 10. a 28. dne věku.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). *M* - samci, *F* - samice

V aktivitě izoforem AMPK α 1 a AMPK α 2 mezi oběma genotypy v jednotlivých časových bodech (graf 5.3) nebyly nalezeny žádné výrazné rozdíly, kromě 20. dne, kdy aktivita AMPK α 1 u myší kmene A/J byla signifikantně nižší ve srovnání s kmenem B6 ($p<0,01$). U samic obou kmenů byla aktivita AMPK α 1 v 15. den vyšší než u samců, u A/J byl tento rozdíl signifikantní (A/J F vs. A/J M, $p<0,05$).

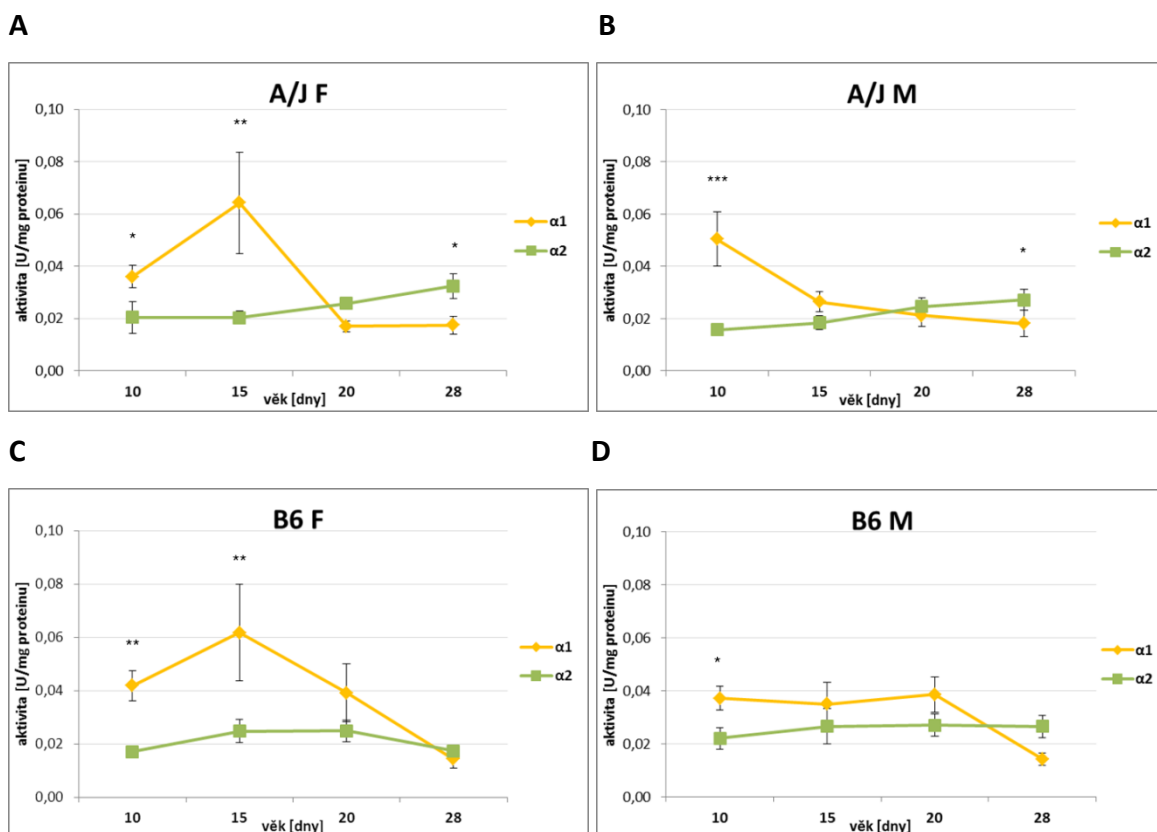
Při analýze průběhu aktivit obou izoforem (graf 5.4) během postnatálního vývoje bylo prokázáno, že aktivity jednotlivých izoforem katalytické podjednotky mají opačný vývojový trend. Aktivita izoformy AMPK α 1 klesala u všech skupin se vzrůstajícím věkem narozdíl od aktivity izoformy AMPK α 2, která stoupala (A/J F, A/J M) nebo se neměnila (B6 F, B6 M).



Graf 5.5: Rozdíl v aktivitách izoform AMPK $\alpha 1$ (A) a AMPK $\alpha 2$ (B) mezi 10. a 28. dnem u jednotlivých skupin.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny [γ - 32 P]ATP. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA) *** $p<0,001$; ** $p<0,01$ rozdíl mezi 10D a 28D; *M* - samci, *F* - samice, *D* - den

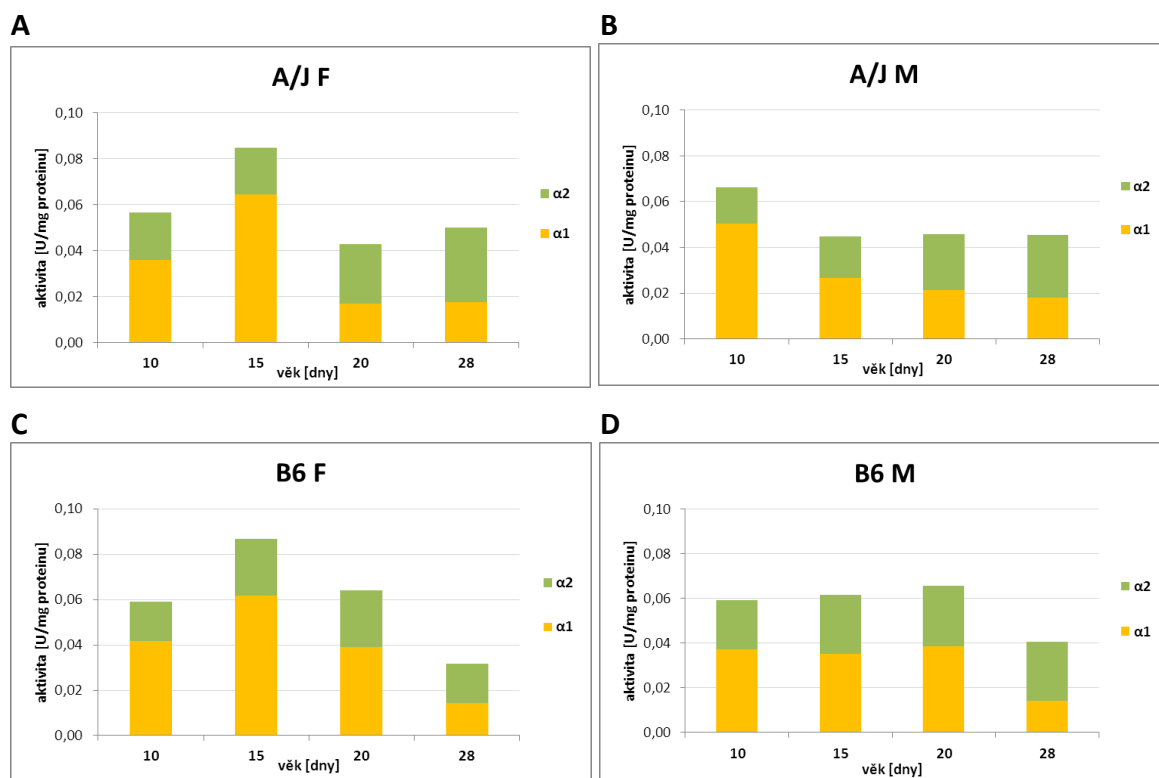
Aktivita obou izoform v 10. dnu, kdy jsou mláďata plně kojena mateřským mlékem, byla dále porovnávána s aktivitou izoform v 28. dnu, kdy jsou mláďata odstavena od matky a krmena standardní dietou. Aktivita izoformy AMPK $\alpha 1$ mezi 10. a 28. dnem (graf 5.5 A) byla signifikantně nižší u tří ze čtyř studovaných skupin (B6 F, B6 M $p<0,001$; A/J M $p<0,01$). U skupiny A/J F byl zaznamenán trend poklesu této izoformy. Narozdíl od AMPK $\alpha 1$ se aktivita AMPK $\alpha 2$ (graf 5.5 B; 5.6) mezi 10. a 28. dnem neměnila, i když u genotypu A/J byl pozorován náznak zvýšení aktivity této izoformy.



Graf 5.6: Porovnání průběhu aktivity jednotlivých izoforem AMPK α 1 a AMPK α 2 v kosterním svalu mezi 10. a 28. dnem postnatálního vývoje u kmenů A/J a B6 obou pohlaví.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA) *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$ rozdíl mezi podjednotkami; *M* - samci, *F* - samice

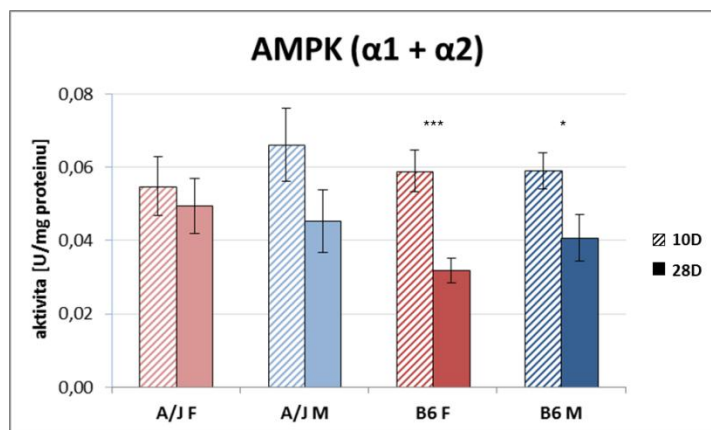
Aktivita izoformy AMPK α 1 byla signifikantně vyšší (A/J F, B6 M $p<0,05$; B6 F $p<0,01$; A/J M $p<0,001$) u všech testovaných skupin (genotyp, pohlaví) 10. den postnatálního věku ve srovnání s aktivitou AMPK α 2. U samic obou kmenů došlo narozdíl od samců mezi 10. a 15. dnem k nárůstu aktivity izoformy AMPK α 1. Aktivita AMPK α 1 byla u samic obou kmenů signifikantně vyšší ve srovnání s aktivitou AMPK α 2 (A/J F, B6 F $p<0,01$) (graf 5.6). Po 15. dnu (u A/J) a 20. dnu (B6) došlo k postupnému poklesu aktivity AMPK α 1 a postupné výměně dominance podjednotek. Pouze však u myši A/J u obou pohlaví byla 28. den signifikantně zvýšená aktivita izoformy AMPK α 2 (A/J F, A/J M $p<0,05$) ve srovnání s aktivitou AMPK α 1. Zvýšení aktivity AMPK α 2 se odráží i ve změně celkové aktivity AMPK (graf 5.7 a 5.8).



Graf 5.7: Změna poměru mezi aktivitami AMPK α 1 a AMPK α 2 u jednotlivých skupin.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot. *M* - samci, *F* - samice

Z analýzy aktivit obou izoforem katalytické podjednotky bylo zjištěno, že v průběhu postnatálního vývoje dochází ke změně poměru jejich aktivity. Na začátku testovaného období (10. den) byla v celkové aktivitě AMPK více zastoupená izoforma AMPK α 1, jejíž aktivita během vývoje mláďete postupně klesá a dochází k navýšení druhé izoformy AMPK α 2.



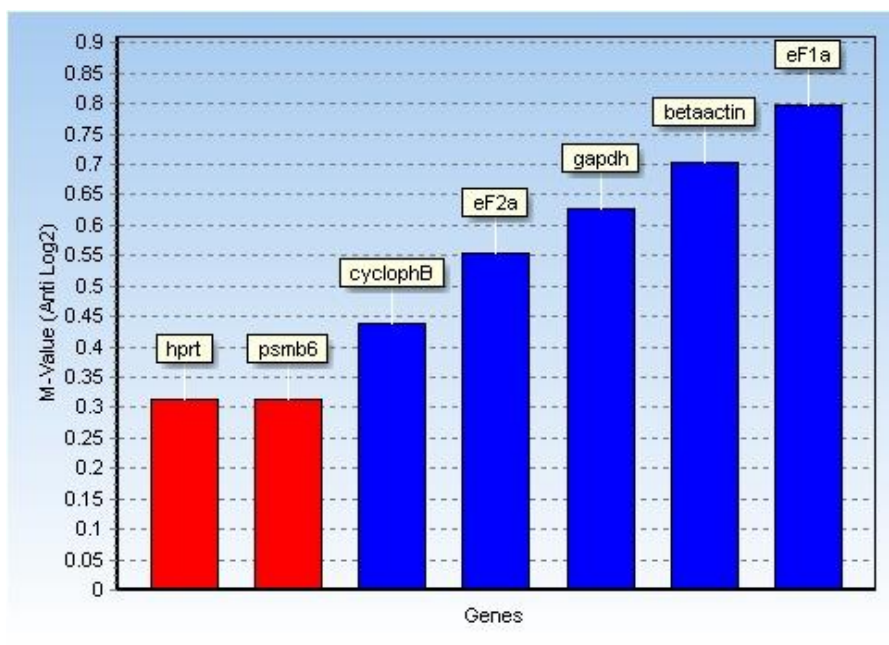
Graf 5.8: Rozdíl celkové aktivity AMPK mezi 10. a 28. dnem u jednotlivých testovaných skupin.

Aktivita byla stanovena radioaktivní metodou s využitím přeměny $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=6$. Výsledky jsou udávány jako průměry naměřených hodnot a odchylky jsou střední chyby průměru (SE). Statistické vyhodnocení dat bylo proведено pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA) *** $p<0,001$; * $p<0,05$ rozdíl 10D vs. 28D; *M* - samci, *F* - samice

Celková aktivita AMPK byla vypočítána jako součet naměřených aktivit izoform $\text{AMPK}\alpha_1$ a $\text{AMPK}\alpha_2$. K poklesu celkové aktivity došlo u všech skupin, ale pouze u myši kmene B6 byl pokles signifikantní u obou pohlaví (B6 F $p<0,001$; B6 M $p<0,05$).

5.3. Stanovení referenčních genů pro normalizaci dat genové exprese

Z kandidátních genů byly na základě stanovení proměnlivosti genové exprese určeny nejvhodnější referenční geny pro normalizaci dat genové exprese zkoumaných vzorků.



Graf 5.9: Analýza proměnlivosti testovaných referenčních genů.

Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a vyhodnoceny v programu GenEx. M-value - hodnota, která udává proměnlivost genové exprese.

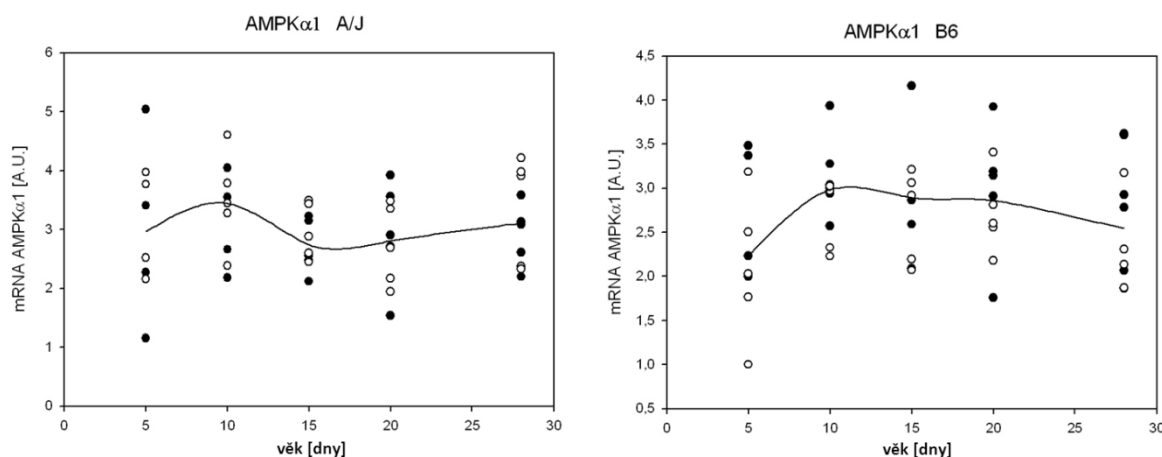
(*hprt* – hypoxantinrybosiltransferáza, *psmb6* – proteasome subunit beta type 6, *cyclophB* – cyklofilin B, *eF2a* – elongační faktor 2, *gapdh* – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, *betaactin* – β -aktin, *eF1a* – elongační faktor 1 α)

Podle literatury bylo vybráno a testováno 7 genů (HPRT, PSMB6, cyclophB, Eef-2, GAPDH, B-aktin, Eef-1 α (tab. 4.5)), které by mohly být vhodné pro normalizaci dat genové exprese genů zapojených do metabolismu a vývoje v kosterním svalu zkoumaných vzorků. Z dat genové exprese získané metodou qRT-PCR byla v programu GenEx (BioMCC, Německo) vybrána dvojice genů, jejichž genová exprese se v porovnání s ostatními kandidátními geny nejméně měnila (M-value). Ze souboru testovaných referenčních genů měly nejmenší proměnlivost geny pro hypoxantinrybosiltransferázu (*HPRT*) a gen pro podjednotku proteazomu (*PSMB6* - proteasome subunit beta type 6), byly tedy nejvhodnější pro normalizování dat exprese zkoumaných vzorků (graf 5.9).

5.4. Stanovení genové exprese AMPK α 1, AMPK α 2, GLUT4, PGC-1 α a UCP3

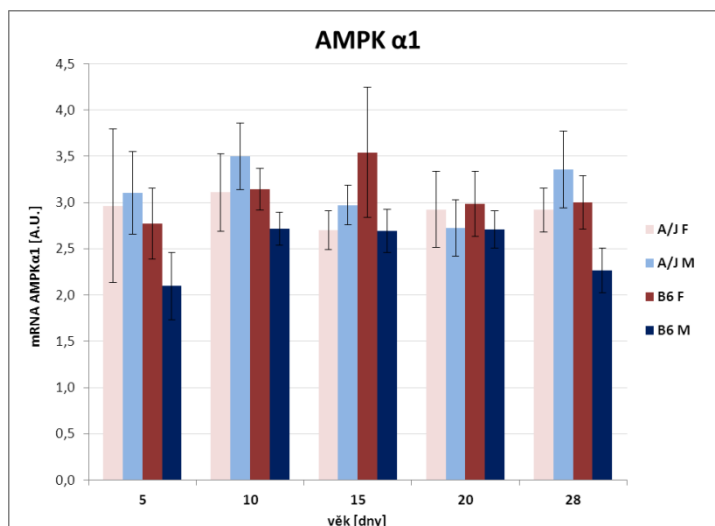
Vývoj genové exprese obou izoforem katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2) a dalších genů zapojených v metabolismu kosterního svalu obou genotypů A/J a B6 (A/J F, A/J M, B6 F, B6 M) během časného postnatálního období mezi 5. a 28. dnem po narození (5D, 10D, 15D, 20D, 28D) byl stanoven metodou kvantitativní RT-PCR (kap. 4.2.6). V každém časovém bodě bylo 5 vzorků z každé testované skupiny (genotyp, pohlaví). Jako zástupci energetického metabolismu byly vybrány geny: pro GLUT4, který je významným článkem v glukózovém metabolismu, dále pro PGC-1 α , účastní se signální kaskády regulace oxidativního metabolismu a hlavně mitochondriální biogeneze a gen pro UCP3, který má nejpíše významnou úlohu v lipidovém metabolismu. Na regulaci exprese těchto genů se AMPK podílí. Vzhledem k tomu, že nebyly pozorovány žádné významné mezipohlavní rozdíly, byly skupiny analyzovány pouze na úrovni genotypu. Hladina exprese všech genů byla normalizována na dva referenční geny – *HPRT* a *PSMB6*.

5.4.1 Stanovení genové exprese α 1 a α 2 podjednotky AMPK



Graf 5.10.: Vývoj genové exprese AMPK α 1 v průběhu časného postnatálního věku v kosterním svalu u obou genotypů A/J a B6.

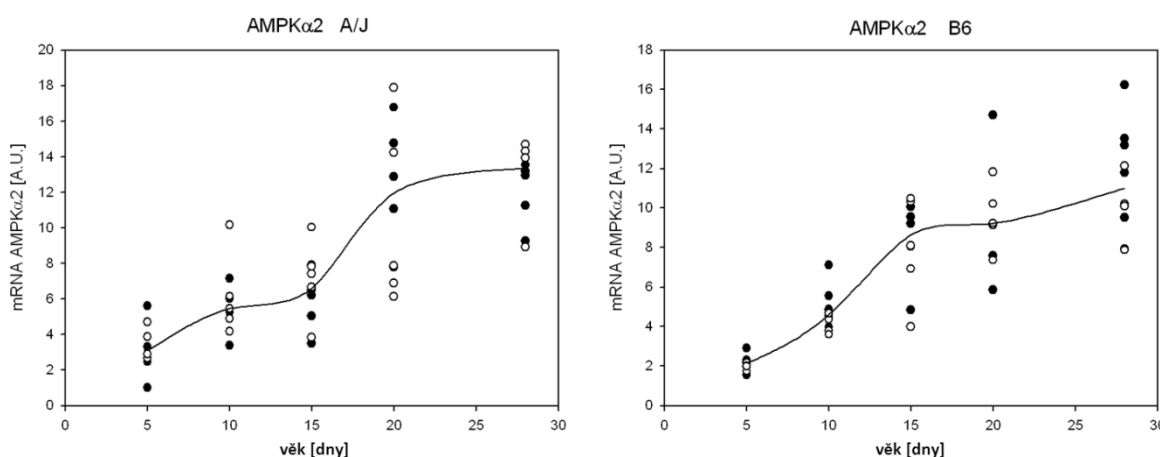
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). ● *samci*, ○ *samice*



Graf 5.11: Vývoj exprese mRNA AMPK α 1 u testovaných skupin myši v závislosti na pohlaví, kmenu a věku.

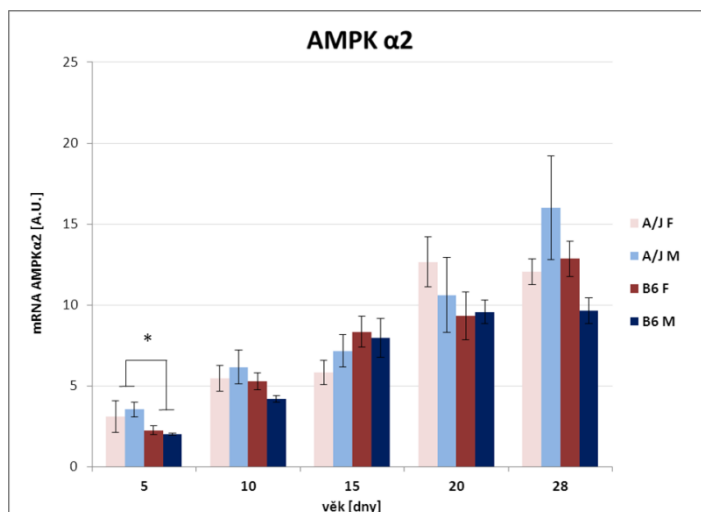
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=5$. Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). *M* - samci, *F* - samice

Analýza genové exprese AMPK α 1 v období mezi 5. a 28. dnem postnatálního vývoje neprokázala signifikantní změny na rozdíl od aktivity proteinu stejné izoformy AMPK. Hladina mRNA AMPK α 1 se během vývoje daného genotypu nemění. Nebyl nalezen ani rozdíl mezi danými genotypy (graf 5.11).



Graf 5.12: Vývoj genové exprese AMPK α 2 v průběhu časného postnatálního věku v kosterním svalu u obou genotypů A/J) a B6

Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). A/J, B6 $p<0,001$ 5D vs. 28D; ● samci, ○ samice

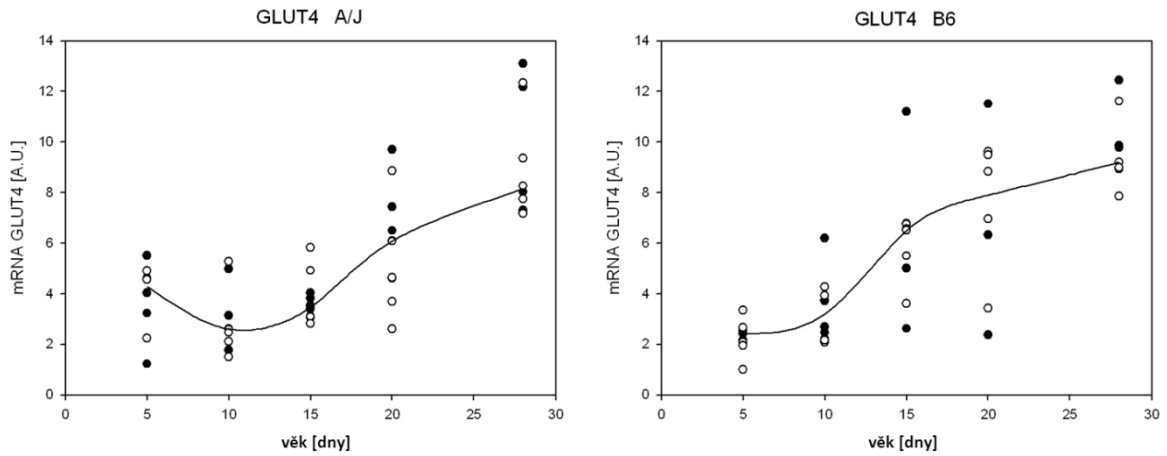


Graf 5.13: Vývoj exprese mRNA AMPK α 2 u testovaných skupin myši v závislosti na pohlaví, kmenu a věku.

Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=5$. Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). * $p<0,05$ rozdíl mezi genotypy; *M* - samci, *F* - samice

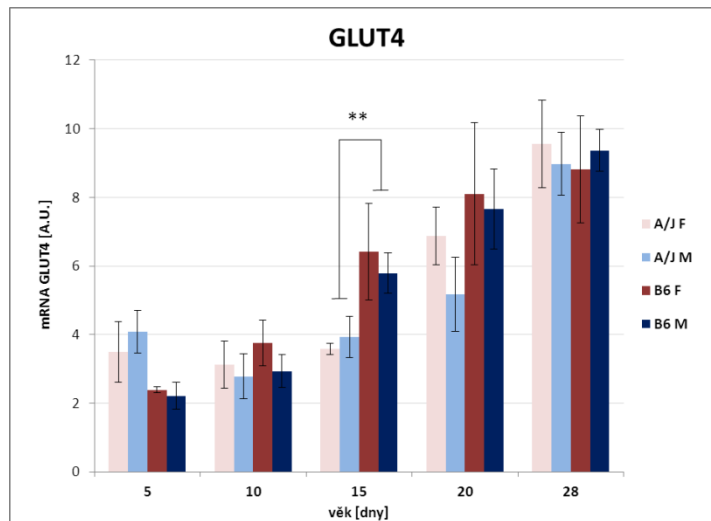
Na rozdíl od genu pro izofornu AMPK α 1, hladina exprese AMPK α 2 v průběhu vývoje signifikantně stoupala u obou kmenů ($p<0,001$) (graf 5.12). V 5. dnu byl naměřen signifikantní rozdíl v hladině transkriptu AMPK α 2 mezi oběma genotypy bez ohledu na pohlaví, hladina mRNA AMPK α 2 byla u A/J signifikantně vyšší než u genotypu B6 ($p<0,05$) (graf 5.13). V ostatních časových bodech nebyla změřena žádná signifikantní změna (ani mezi pohlavím ani genotypem).

5.4.2. Stanovení genové exprese GLUT4, PGC-1 α a UCP3



Graf 5.14: Vývoj genové exprese GLUT4 v průběhu časného postnatálního věku v kosterním svalu u obou genotypů A/J a B6.

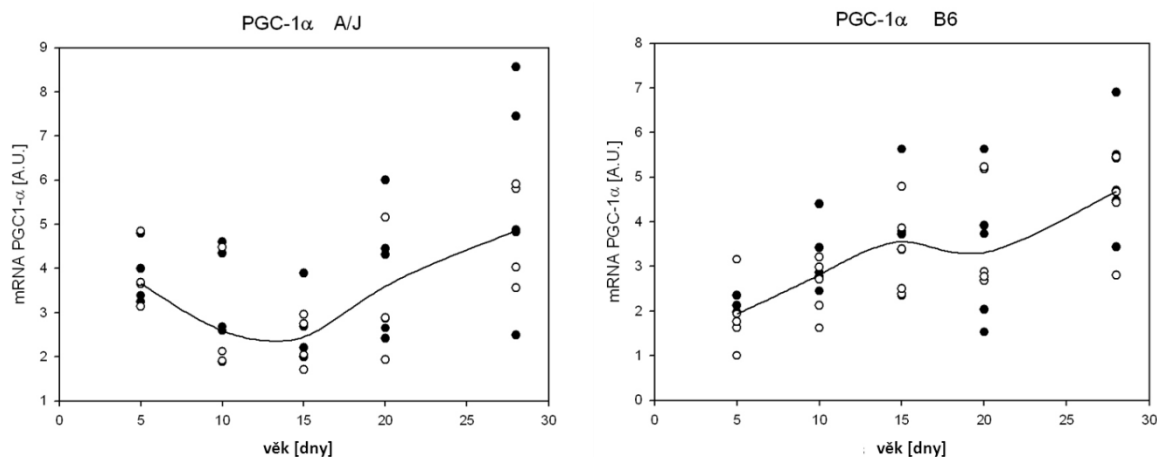
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). A/J, B6 $p < 0,001$ 5D vs. 28D; ● *samci*, ○ *samice*



Graf 5.15: Vývoj genové exprese GLUT4 u testovaných skupin myší v závislosti na pohlaví, kmenu a věku.

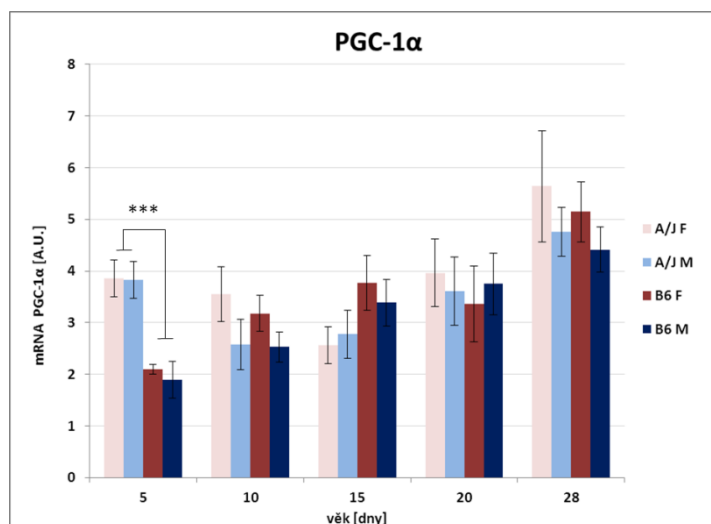
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=5$. Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). ** $p < 0,01$ rozdíl mezi genotypy; *M* - *samci*, *F* - *samice*

Genová exprese GLUT4 v období postnatálního vývoje signifikantně stoupala u obou kmenů (graf 5.14). V porovnání obou genotypů byla 15. den hladina mRNA GLUT4 signifikantně vyšší u myší kmene B6 v porovnání s A/J ($p < 0,05$) (graf 5.15).



Graf 5.16: Vývoj genové exprese PGC-1 α v průběhu časného postnatálního věku v kosterním svalu u obou genotypů A/J (A) a B6 (B).

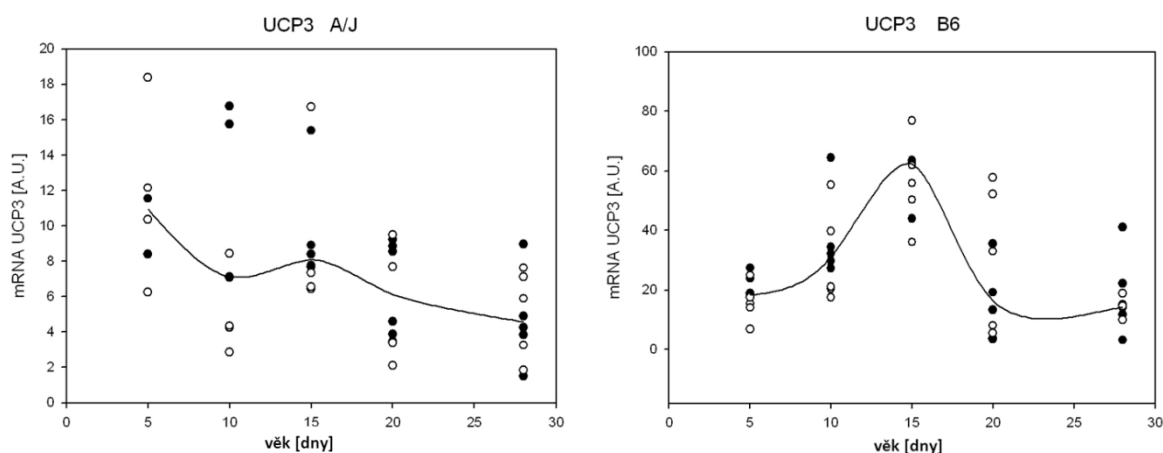
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). B6 $p < 0,001$ 5D vs. 28D; ● *samci*, ○ *samice*



Graf 5.17: Vývoj genové exprese PGC-1 α u testovaných skupin myši v závislosti na pohlaví, kmenu a věku.

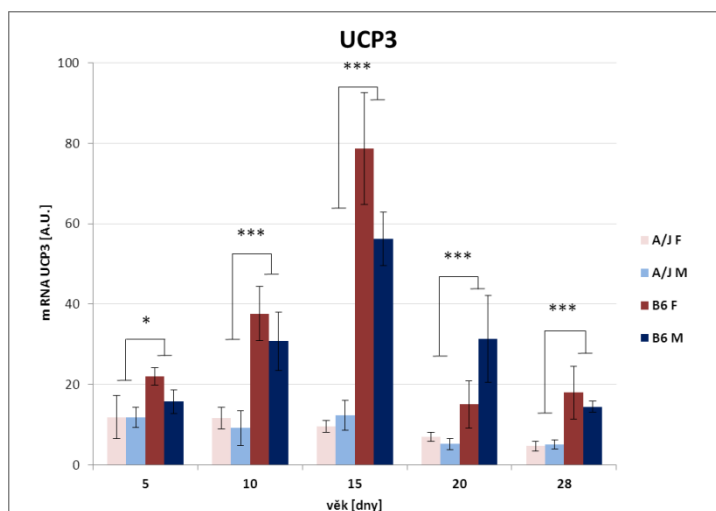
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=5$. Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). *** $p < 0,001$ rozdíl mezi genotypy; *M* - *samci*, *F* - *samice*

V průběhu vývoje genové exprese PGC-1 α byl pozorován pokles u kmene A/J mezi 5. a 15. dnem a poté signifikantní nárůst exprese od 15. dne (graf 5.16 A), narozdíl od kmene B6, kdy byl pozorován signifikantní nárůst exprese již od 5. dne (graf 5.16 B). V porovnání genotypů byl naměřen signifikantní rozdíl v hladině mRNA PGC1-1 α 5. den věku (graf 5.17).



Graf 5.18: Vývoj genové exprese UCP3 v průběhu časného postnatálního věku v kosterním svalu u obou genotypů A/J a B6 .

Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). ● *samci*, ○ *samice*



Graf 5.19: Vývoj genové exprese UCP3 u testovaných skupin myši v závislosti na pohlaví, kmenu a věku.

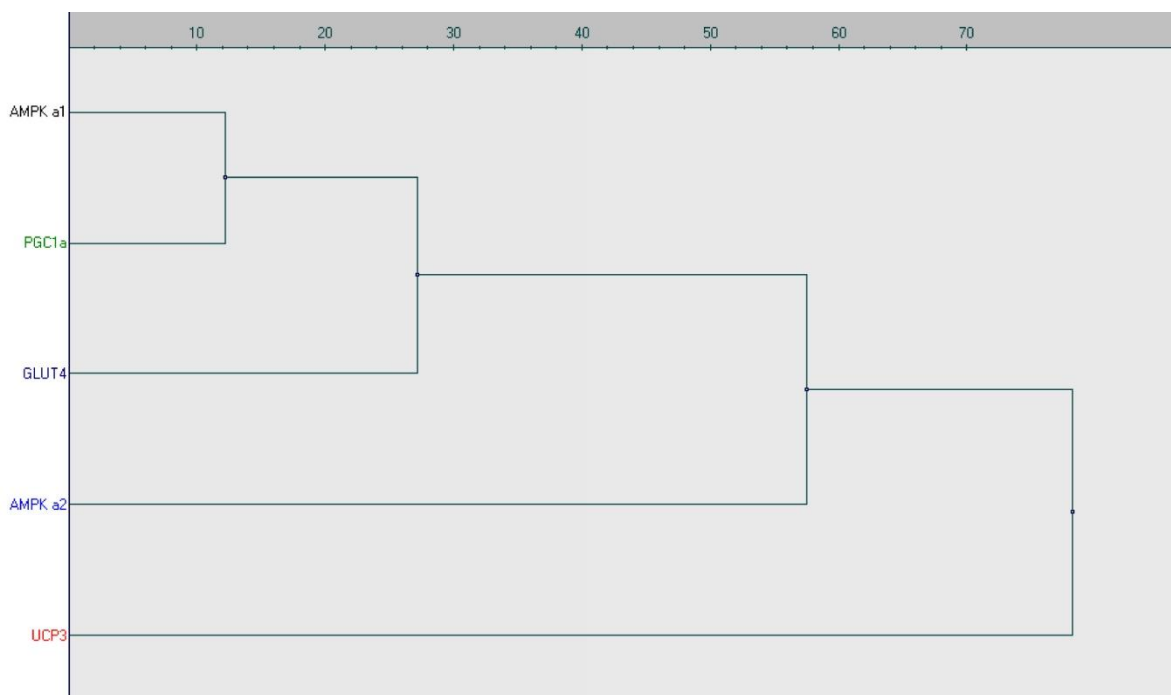
Transkripty byly kvantifikovány metodou qRT-PCR a normalizovány na geny *HPRT* a *PSMB6*. Počet testovaných vzorků v jedné skupině $n=5$. Statistické vyhodnocení dat bylo proveneno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ rozdíl mezi genotypy; *M* - *samci*, *F*- *samice*

Expresse genu UCP3 se u testovaných myších kmenů velice lišila. Z grafu 5.18 je patrné, že zatímco u ostatních měřených genů měly průběhy u obou kmenů podobný trend, v případě exprese UCP3 jsou vývoje hladiny mRNA různé. U myši A/J došlo k mírnému

nesignifikantnímu poklesu hladiny transkriptu. Expze myší kmene B6 nejprve mezi 5. a 15. dnem stoupala ($p < 0,001$) a poté hladina UCP3 prudce signifikantně klesala ($p < 0,001$). Mezikmenové rozdíly byly patrné nejen v rozdílném průběhu expze i na množství mRNA (graf 5.19). Ve všech časových bodech byla hladina expze u B6 signifikantně vyšší než u myší A/J.

5.4.3. Genové dendrogramy

Genové dendrogramy vyjadřují vzájemný vztah mezi profily expzí jednotlivých genů (na úrovni mRNA). Jednotlivé porovnávané profily genové expze zahrnují data z obou pohlaví ve všech časových bodech. Horizontální osa znázorňuje vzdálenost mezi jednotlivými profily genů, jejichž seznam (názvy) je uveden na svislé ose.



Obr. 5.20: Dendrogram expresních profilů studovaných genů u myší z kmene A/J
Zpracováno v programu GenEx.



Obr. 5.21: Dendrogram expresních profilů studovaných genů u myši z kmene B6
Zpracováno v programu GenEx.

Na dendrogramech je patrné, že jsou si nejbližší profily expresí AMPK α 1 a PGC-1 α u kmene A/J i B6. Profily genů GLUT4 a AMPK α 2 se lišily. U kmene B6 byly profily vzájemně bližší než u kmene A/J, kde lze pozorovat vzájemný odstup profilů. Největší rozdíl mezi kmeny byl v profilu exprese genu UCP3. I když u obou kmenů byl profil UCP3 nejvíce odlehlý od ostatních genů, jeho celková vzdálenost byla více než 4x větší u myši z kmene B6 (obr. 5.21) než u kmene A/J (viz horizontální osa na dendrogramech). Genová exprese myši kmene B6 tedy ukazuje značně odlišný profil transkripce UCP3 oproti všem ostatním studovaným genům.

6 Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci změn AMPK v myším kosterním svalu v průběhu časného postnatálního vývoje. Vzhledem ke značným nutričním a vývojovým změnám v tomto období, kdy dochází v metabolismu i ke změnám energetických nároků, by AMPK, jako klíčový regulátor energetického metabolismu, mohla hrát důležitou roli. Hlavním cílem bylo změřit změny v aktivitě a genové expresi katalytických podjednotek AMPK v závislosti na věku, pohlaví a genotypu.

V experimentech byly použity myši kmeny s geneticky rozdílným pozadím – B6 a A/J, které se liší náchylností k obezitě vyvolané HF dietou. Myši se rodily a byly chovány ve 30°C, což je teplota blízká jejich termoneutrální zóně. Tato teplota byla zvolena z důvodu snížení energetických nároků na tvorbu tepla a eliminace možné stimulace metabolismu chladem. Vzorky svalů byly odebírány z mláďat ve věku od 5. do 28. dne od narození. Časové body byly navrženy tak, aby bylo možné sledovat průběh období vývoje v závislosti na technických možnostech provedení odběru a množství získané tkáně. Tyto časové body pokrývají období důležitých změn ve vývoji jedince. Pátý a desátý den jsou mláďata ještě plně závislá na matce a mateřském mléku. Kolem čtrnáctého dne začínají vidět a v závislosti na tom se začíná více rozvíjet pohybová aktivita. Zrak a pohyb jim umožňují více se osamostatnit a okolo dvacátého dne se kromě mateřského mléka krmí i pevnou dietou. Dvacátý osmý den věku jsou již plně samostatná, mateřské mléko zcela nahradí pevnou stravou a jsou schopna žít samostatně.

Stanovení celkového a fosforylovaného množství proteinu AMPK metodou Western blot

Při pokusu měření aktivity AMPK (nepřímo poměrem celkového proteinu AMPK a její fosforylované formy) metodou WB, došlo k problému s detekcí p-AMPK. Na detekovaných membránách byly v některých časových bodech (10., 15., 20. a 28. den věku) zaznamenány dva velice blízko ležící proužky, které ale úplně neodpovídaly poloze standardů. Jedním z možných vysvětlení by mohla být přítomnost nějaké přechodné vývojové formy proteinu AMPK, či jiný protein o stejné molekulové hmotnosti, který je také fosforylován na stejné specifické sekvenci, kterou protilátka proti p-AMPK rozeznává a vyskytuje se v průběhu vývoje svalů. Z důvodu problematické detekce jsme se rozhodli pro přímé měření enzymové aktivity AMPK pomocí [γ -³²P]ATP.

Stanovení aktivity jednotlivých izoform katalytické podjednotky AMPK (AMPK α 1 a AMPK α 2) imunoprecipitací a fosforylací syntetického peptidu AMARA

Stanovení enzymové aktivity katalytických podjednotek α 1 a α 2 AMPK ukázalo, že dochází k významným změnám aktivit jednotlivých podjednotek v průběhu postnatálního vývoje (10. – 28. den věku), které se pak odrážejí v celkové aktivitě AMPK. Hlavními faktory, které by mohly mít vliv na pozorované změny, jsou změny ve výživě a především vývoj svalových vláken. Průběh vývoje aktivity jednotlivých podjednotek AMPK α 1 a AMPK α 2 měl odlišný trend. V průběhu postnatálního období aktivita AMPK α 1 klesala u obou kmenů, zatímco u myši kmene A/J aktivita AMPK α 2 mírně stoupala nebo se u B6 neměnila. Dominance aktivit jednotlivých podjednotek se lišila zejména okolo 10. a 15. dne, kdy α 1 podjednotka byla signifikantně aktivnější v porovnání s izoformou α 2. S postupným vývojem organismu docházelo k výměně poměru zastoupení podjednotek α 1 a α 2. Výzkumy ukazují, že AMPK α 2 je více zapojena do metabolické odpovědi, zatímco AMPK α 1 by se mohla uplatňovat v regulaci růstu buněk inhibicí syntézy proteinů (Mounier et al., 2009). AMPK α 2 hraje důležitou roli převážně v udržování glukózové homeostázy a myši s delecí podjednotky α 2 vykazují mírnou inzulínovou rezistenci a zhoršenou glukózovou toleranci (Viollet et al., 2009a). Cheung et al. ukázali, že v kosterním svalu dospělých potkanů je v případě fyzické aktivity dominantní AMPK α 2 (Cheung et al., 2000). Podle výše uvedených poznatků by změřený průběh vývoje aktivity jednotlivých podjednotek ve svalu odpovídal tomu, že během postnatálního vývoje dochází nejdříve k dokončování růstu buněk a tím vývoji svalu (dominantní aktivita podjednotky AMPK α 1, regulátoru růstu buněk), který postupně klesá a nastupuje dominance izoformy AMPK α 2, která se uplatňuje zejména v dospělosti. V naší studii v průběhu postnatálního vývoje došlo k poklesu celkové AMPK, který byl signifikantní pouze u jedinců kmene B6. Postnatální pokles celkové aktivity AMPK je ve shodě s experimentem na ovcích, kdy bylo prokázáno, že v kosterním svalu dochází ke snížení poměru p-AMPK/AMPK (fosforylovaná forma/celkový protein). Aktivita a AMPK se snížila v porovnání mezi fetálním stádiem a mládětem ve věku měsíc po narození (Philp et al., 2008). Kromě nárůstu aktivity AMPK α 1 od 10. do 15. dne, který byl pozorován v naší studii pouze u samic obou kmenů, nebyly pozorovány žádné jiné biologicky významné rozdíly mezi pohlavími. Signifikantní pokles aktivity enzymu (u myši linie B6) by mohl naznačovat

souvislost s náchylností k obezitě v dospělosti, závisující na genetickém pozadí myší linie. Vhodným doplněním výsledků by bylo rozšíření souboru vzorků ještě o svaly z myší v několika časových bodech po odstavu, abychom zjistili průběh aktivity od narození až do dospělosti.

Stanovení referenčních genů pro normalizaci dat genové exprese

Stanovení vhodných referenčních genů je nutné pro správné vyhodnocení genové exprese. Ideální je ve zkoumaných vzorcích nalézt dva geny, jejichž exprese je vyvážená ve všech časových obdobích. Z výsledků naměřené exprese referenčních genů se pak vypočte geometrický průměr a dále se pak použije na normalizaci dat cílových genů. Kandidátní geny (tab. 4.4) byly vybrány na základě literatury zabývající se vývojem obecně nebo vývojem svalového metabolismu, kterých je ale i v současné době stále velice málo. Tyto geny patří mezi tzv. „housekeeping geny“, které jsou nezbytné pro udržení základních funkcí v buňce, a předpokládá se u nich, že se jejich exprese nemění ani v závislosti na genotypu ani s měnícím se stupněm vývoje. Ze souboru kandidátních genů měly oproti ostatním měřeným navrhovaným genům nejmenší proměnlivost dva geny - *HPRT* a *PSMB6*. Nejmenší variabilita těchto genů byla zjištěna také v perinatálním vývoji kosterního svalu u člověka (Pejznochova et al., 2010). Tyto geny pak byly použity pro normalizaci dat z měření genové exprese ve zkoumaných vzorcích svalů.

Stanovení genové exprese AMPK α 1, AMPK α 2, GLUT4, PGC-1 α a UCP3

V pokusu měření genové exprese jsme se zaměřili na katalytické podjednotky AMPK a některých dalších genů energetického metabolismu, v jejichž regulačních drahách exprese se AMPK může uplatňovat.

Měřením genové exprese podjednotek AMPK α 1 a AMPK α 2 jsme chtěli zjistit souvislost mezi aktivitou a hladinou mRNA dané podjednotky. Překvapivě spolu aktivita a exprese příliš nekorelovaly. Narozdíl od aktivity, kde se výrazně měnila AMPK α 1, v případě hladiny genové exprese nebyla naměřena žádná významná změna hladiny transkriptu. Výsledek byl stejný u obou kmenů. Naopak hladina mRNA AMPK α 2 výrazně stoupala u obou kmenů, ačkoli aktivita této podjednotky se příliš neměnila. Exprese změřená v naší studii je částečně v souladu s pokusem na ovčích, kde byl prokázán nárůst exprese AMPK α 2 mezi fetálním a postnatálním obdobím měsíc po narození. Naopak hladina AMPK α 1 v experimentu u ovcí klesala (Philp et al., 2008). Rozdílné výsledky

mohou být z důvodu rozdílného stupně vývoje kosterního svalu ovce při narození a rozdílného postnatálního dozrávání svalových vláken. V dospělém svalu různých organismů byla detekována vyšší hladina transkriptu AMPK α 2 než AMPK α 1 (Cheung et al., 2000, Proszkowiec-Weglarz et al., 2006). Diference mezi změnami aktivity a hladiny mRNA naznačuje, že regulace aktivity AMPK s největší pravděpodobností neprobíhá na úrovni genové exprese, ale zřejmě by mohla být regulována buď nějakými postrankripčními či postranlačními modifikacemi nebo na úrovni nadřazených kináz, které katalytickou podjednotku α aktivují.

V důsledku přechodu na dietu s vysokým obsahem sacharidů a především v závislosti na zvýšení kontraktilní aktivity dochází ke stimulaci genové exprese GLUT4 (Castello et al., 1993, Leturque et al., 1991). Ke zvýšení hladiny mRNA glukózového přenašeče mezi 5. a 28. dnem došlo u obou kmenů. Rozdíl v 15. dnu mezi liniemi A/J a B6 by mohl být způsoben rozdílným vývojem mláďat obou kmenů, dobou kdy mláďata začínají vidět a více se pohybovat. Vyšší exprese u jedinců kmene B6 by mohla ukazovat na dřívější vyšší svalovou aktivitu a dřívější počátek nahrazování mléka pevnou dietou s vyšším obsahem sacharidů.

Vývoj hladiny genové exprese UCP3 se velmi lišil u obou kmenů. U mláďat A/J došlo mezi 5. a 28. dnem k mírnému poklesu hladiny transkriptu. Naopak u myši B6 byly změny velice výrazné. Mezi 5. a 15. dnem postnatálního vývoje došlo k nárůstu exprese, kdy hladina mRNA UCP3 byla nejvyšší kolem 15. dne a poté byl naměřen prudký pokles transkriptu. Po celou dobu sledovaného období byla hladina mRNA UCP3 u kmene B6 vyšší než u myši A/J, u kterých je i v dospělosti hladina UCP3 v *m. gastrocnemius* nižší v porovnání s B6 (Haramizu et al., 2009). Průběh exprese u B6 by mohl odpovídat průběhu množství přijímaného mateřského mléka v časně postnatálním období mládětem. Bylo zjištěno, že UCP3 postnatálně stoupá v důsledku vlivu příjmu lipidů z mateřského mléka. Vyšší hladina volných MK v plazmě indukuje expresi UCP3 v kosterním svalu. Přechod mláděte z mateřského mléka na dietu obsahující malé množství lipidů způsobuje pokles exprese tohoto genu (Chou et al., 2001, Brun et al., 1999). U kmene A/J se narozdíl od B6 indukce UCP3 lipidy v mléce neobjevila.

Rozdílná regulace genu UCP3 by mohla ukazovat na odlišný mechanismus využití lipidů a jejich metabolismus v postnatálním vývoji myších kmenů s rozdílným genetickým pozadím.

Transkripční koaktivátor PGC-1 α je zapojen do regulačních drah oxidativního metabolismu a především do stimulace mitochondriální biogeneze. Traskripce PGC-1 α se v odpovědi na fyzickou zátěž zvyšuje a tím indukuje nárůst počtu mitochondrií (Baar et al., 2002). U obou kmenů došlo ve vývoji k nárůstu exprese, u kmene B6 bylo zvýšení výraznější. Po narození dochází k postupnému zapojování svalů a nárůst pohybové aktivity a to by mohlo být příčinou námi zjištěného profilu genové exprese PGC-1 α .

U žádného z genů nebyly pozorovány rozdíly v jeho expresi mezi pohlavími.

Naše výsledky prokázaly disociace mezi změnami exprese genu pro AMPK α 2 a genů, jejichž expresi AMPK řídí, a změnami aktivity AMPK v průběhu časného postnatálního vývoje myši. Ačkoliv ve většině případů exprese sledovaných genů (UCP3, PGC-1 α a GLUT4) stoupala, aktivita AMPK se snižovala nebo byla konstantní. Výsledky naznačují, že změny v aktivitě AMPK v raném postnatálním období se mohou uplatňovat v rozdílné náchylnosti k obezitě v závislosti na genetickém pozadí.

7 Závěr

1. Byla uměřena aktivita AMPK α 1 a AMPK α 2 v souboru vzorků svalů m. gastrocnemius v průběhu postnatálního vývoje mezi 10. a 28. dnem po narození. Měření aktivity izoform katalytických podjednotek AMPK v kosterním svalu ukázalo značné změny, především pokles aktivity podjednotky AMPK α 1. Celková aktivita AMPK se mezi 10. a 28. dnem postnatálního vývoje signifikantně snižovala jen u myši kmene B6. Rozdílné změny v aktivitě AMPK po narození u kmenů s geneticky odlišným pozadím by mohly mít vliv na náchylnost k metabolickým onemocněním v pozdějším věku.

2. Ze souboru navrhovaných genů byly nalezeny dva referenční geny vhodné pro vzorky kosterního svalů myši v různých stupních vývoje. Nejvhodnější geny pro normalizaci zkoumaných vzorků byly *HPRT* a *PSMB6*.

3. Byla změřena genová exprese genů pro AMPK α 1, AMPK α 2, GLUT4, PGC-1 α a UCP3 v kosterním svalu myši kmene A/J a B6 v období mezi 5. a 28. dnem věku. Výsledky měření exprese podjednotek AMPK α 1 a AMPK α 2 ukázaly, že změny hladiny transkriptu nekoreluje se změnami v aktivitě podjednotek. Hladina mRNA AMPK α 1 se na rozdíl od aktivity po dobu sledovaného vývojového období neměnila. Naopak hladina exprese AMPK α 2 vykazovala značný nárůst v průběhu vývoje. Zdá se, že měřené geny metabolismu (GLUT4, PGC-1 α , UCP3) jsou v tomto období regulovány spíše nutričními a vývojovými změnami svalů.

4. Výsledky aktivity a genové exprese byly porovnány v závislosti na pohlaví a genotypu. V závislosti na pohlaví nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Největší rozdíly mezi studovanými myšimi kmeny byly pozorovány u aktivity celkové AMPK a genové exprese UCP3. V porovnání s jedinci kmene A/J, tak u kmene B6 došlo k výraznějšímu poklesu aktivity AMPK a jejich exprese odpřahujícího proteinu reflektovala vliv výživy. Výsledky naznačují, že změny v aktivitě AMPK v kosterním svalu v období časného postnatálního vývoje se mohou uplatňovat v rozdílné náchylnosti k obezitě v závislosti na genetickém pozadí myšního kmene.

8 Přehled literatury

- Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F. & Butler-Browne, G. 2003. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol Cell*, **95**, 399-406.
- Allen, D. L. & Leinwand, L. A. 2001. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIb or IId myosin heavy chains. *Dev Biol*, **229**, 383-95.
- Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., *et al.* 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*, **16**, 1879-86.
- Bar, A. & Pette, D. 1988. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett*, **235**, 153-5.
- Bayol, S. A., Macharia, R., Farrington, S. J., Simbi, B. H. & Stickland, N. C. 2009. Evidence that a maternal "junk food" diet during pregnancy and lactation can reduce muscle force in offspring. *Eur J Nutr*, **48**, 62-5.
- Bayol, S. A., Simbi, B. H. & Stickland, N. C. 2005. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol*, **567**, 951-61.
- Beardsall, K., Diderholm, B. M. & Dunger, D. B. 2008. Insulin and carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **22**, 41-55.
- Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., *et al.* 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E1340-6.
- Bonen, A., Han, X. X., Habets, D. D., Febbraio, M., Glatz, J. F. & Luiken, J. J. 2007. A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E1740-9.
- Brauner, P., Kopecky, P., Flachs, P., Kuda, O., Vorlicek, J., Planickova, L., *et al.* 2006. Expression of uncoupling protein 3 and GLUT4 gene in skeletal muscle of preterm newborns: possible control by AMP-activated protein kinase. *Pediatr Res*, **60**, 569-75.
- Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., *et al.* 1999. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett*, **453**, 205-9.
- Castello, A., Cadefau, J., Cusso, R., Testar, X., Hesketh, J. E., Palacin, M., *et al.* 1993. GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **268**, 14998-5003.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. & Hardie, D. G. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, **229**, 558-65.
- Cryer, A. & Jones, H. M. 1978. Developmental changes in the activity of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) in rat lung, cardiac muscle, skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem J*, **174**, 447-51.
- Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. & Hardie, D. G. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett*, **377**, 421-5.
- Duxson, M. J., Usson, Y. & Harris, A. J. 1989. The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development*, **107**, 743-50.
- Ferre, P., Decaux, J. F., Issad, T. & Girard, J. 1986. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod Nutr Dev*, **26**, 619-31.
- Fiorotto, M. L., Davis, T. A. & Reeds, P. J. 2000. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **278**, R845-54.

- Fishbein, W. N., Merezhinskaya, N. & Foellmer, J. W. 2002. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Muscle Nerve*, **26**, 101-12.
- Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J. & Hardie, D. G. 2010. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca²⁺ and AMP. *Biochem J*, **426**, 109-18.
- Fryer, L. G., Parbu-Patel, A. & Carling, D. 2002. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, **277**, 25226-32.
- Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M. F., Smith, J. T., Habinowski, S. A., Kaijser, L., *et al.* 2000. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 1150-5.
- Girard, J., Ferre, P., Pegorier, J. P. & Duee, P. H. 1992. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev*, **72**, 507-62.
- Goodyear, L. J., Hirshman, M. F., Smith, R. J. & Horton, E. S. 1991. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am J Physiol*, **261**, E556-61.
- Greenhaff, P. L., Soderlund, K., Ren, J. M. & Hultman, E. 1993. Energy metabolism in single human muscle fibres during intermittent contraction with occluded circulation. *J Physiol*, **460**, 443-53.
- Habinowski, S. A., Hirshman, M., Sakamoto, K., Kemp, B. E., Gould, S. J., Goodyear, L. J., *et al.* 2001. Malonyl-CoA decarboxylase is not a substrate of AMP-activated protein kinase in rat fast-twitch skeletal muscle or an islet cell line. *Arch Biochem Biophys*, **396**, 71-9.
- Haramizu, S., Nagasawa, A., Ota, N., Hase, T., Tokimitsu, I. & Murase, T. 2009. Different contribution of muscle and liver lipid metabolism to endurance capacity and obesity susceptibility of mice. *J Appl Physiol*, **106**, 871-9.
- Hardie, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 774-85.
- Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 251-62.
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., *et al.* 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, **2**, 28.
- Holloway, G. P., Luiken, J. J., Glatz, J. F., Spriet, L. L. & Bonen, A. 2008. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)*, **194**, 293-309.
- Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. & Winder, W. W. 1999. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol*, **87**, 1990-5.
- Horak, V. 1995. Fibre type differentiation during postnatal development of miniature pig skeletal muscles. *Reprod Nutr Dev*, **35**, 725-36.
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O. & Straub, R. 1985. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch*, **403**, 369-76.
- Chabowski, A., Chatham, J. C., Tandon, N. N., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J., *et al.* 2006. Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E675-82.
- Chen, S., Murphy, J., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A. & Mackintosh, C. 2008. Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem J*, **409**, 449-59.
- Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G. & Carling, D. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 659-69.

- Chou, C. J., Cha, M. C., Jung, D. W., Boozer, C. N., Hashim, S. A. & Pi-Sunyer, F. X. 2001. High-fat diet feeding elevates skeletal muscle uncoupling protein 3 levels but not its activity in rats. *Obes Res*, **9**, 313-9.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12017-22.
- Jones, C. T. & Rolph, T. P. 1985. Metabolism during fetal life: a functional assessment of metabolic development. *Physiol Rev*, **65**, 357-430.
- Jorgensen, S. B., Nielsen, J. N., Birk, J. B., Olsen, G. S., Viollet, B., Andreelli, F., *et al.* 2004. The α 2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes*, **53**, 3074-81.
- Kim, J. Y., Koves, T. R., Yu, G. S., Gulick, T., Cortright, R. N., Dohm, G. L., *et al.* 2002. Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E1014-22.
- Knight, J. B., Eyster, C. A., Griesel, B. A. & Olson, A. L. 2003. Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14725-30.
- Kodiha, M., Rassi, J. G., Brown, C. M. & Stochaj, U. 2007. Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK \rightarrow ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1427-36.
- Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Grossman, A. B. & Korbonits, M. 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, **17**, 205-15.
- Koonen, D. P., Benton, C. R., Arumugam, Y., Tandon, N. N., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., *et al.* 2004. Different mechanisms can alter fatty acid transport when muscle contractile activity is chronically altered. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E1042-9.
- Kopecky, J. & Flachs, P. 2004. Tkáňový metabolismus a obezita.) *Základy klinické obezitologie*. Grada Publishing.
- Kus, V., Prazak, T., Brauner, P., Hensler, M., Kuda, O., Flachs, P., *et al.* 2008. Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **295**, E356-67.
- LeBrasseur, N. K., Kelly, M., Tsao, T. S., Farmer, S. R., Saha, A. K., Ruderman, N. B., *et al.* 2006. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E175-81.
- Leone, T. C., Lehman, J. J., Finck, B. N., Schaeffer, P. J., Wende, A. R., Boudina, S., *et al.* 2005. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*, **3**, e101.
- Leturque, A., Postic, C., Ferre, P. & Girard, J. 1991. Nutritional regulation of glucose transporter in muscle and adipose tissue of weaned rats. *Am J Physiol*, **260**, E588-93.
- Lin, X. & Odle, J. 2003. Changes in kinetics of carnitine palmitoyltransferase in liver and skeletal muscle of dogs (*Canis familiaris*) throughout growth and development. *J Nutr*, **133**, 1113-9.
- Long, Y. C. & Zierath, J. R. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*, **116**, 1776-83.
- Luiken, J. J., Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., Bonen, A., van der Vusse, G. J., *et al.* 2003. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, **52**, 1627-34.
- McGee, S. L. & Hargreaves, M. 2010. AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*, **118**, 507-18.
- Michael, L. F., Wu, Z., Cheatham, R. B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J. J., *et al.* 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3820-5.
- Miller, J. B. 2001. Developmental biology of skeletal muscle.) *Disorders of voluntary muscle (7th edition)*. Cambridge University Press.

- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., *et al.* 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, **415**, 339-43.
- Minokoshi, Y., Toda, C. & Okamoto, S. 2012. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Indian J Endocrinol Metab*, **16**, S562-8.
- Mounier, R., Lantier, L., Leclerc, J., Sotiropoulos, A., Pende, M., Daegelen, D., *et al.* 2009. Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J*, **23**, 2264-73.
- Nabben, M. & Hoeks, J. 2008. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol Behav*, **94**, 259-69.
- Pandke, K. E., Mullen, K. L., Snook, L. A., Bonen, A. & Dyck, D. J. 2008. Decreasing intramuscular phosphagen content simultaneously increases plasma membrane FAT/CD36 and GLUT4 transporter abundance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R806-13.
- Pejznochova, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Magner, M., Honzik, T., Vinsova, K., *et al.* 2010. Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. *Mitochondrion*, **10**, 321-9.
- Philp, L. K., Muhlhausler, B. S., Janovska, A., Wittert, G. A., Duffield, J. A. & McMillen, I. C. 2008. Maternal overnutrition suppresses the phosphorylation of 5'-AMP-activated protein kinase in liver, but not skeletal muscle, in the fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R1982-90.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C. & Duclos, M. J. 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev*, **42**, 415-31.
- Poussin, C., Ibberson, M., Hall, D., Ding, J., Soto, J., Abel, E. D., *et al.* 2011. Oxidative phosphorylation flexibility in the liver of mice resistant to high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Diabetes*, **60**, 2216-24.
- Proszkowiec-Weglarz, M., Richards, M. P., Ramachandran, R. & McMurtry, J. P. 2006. Characterization of the AMP-activated protein kinase pathway in chickens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **143**, 92-106.
- Punkt, K., Naupert, A. & Asmussen, G. 2004. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. *Acta Histochem*, **106**, 145-54.
- Putman, C. T., Kiricsi, M., Pearcey, J., MacLean, I. M., Bamford, J. A., Murdoch, G. K., *et al.* 2003. AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J Physiol*, **551**, 169-78.
- Putman, C. T., Martins, K. J., Gallo, M. E., Lopaschuk, G. D., Pearcey, J. A., MacLean, I. M., *et al.* 2007. Alpha-catalytic subunits of 5'AMP-activated protein kinase display fiber-specific expression and are upregulated by chronic low-frequency stimulation in rat muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**, R1325-34.
- Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roudit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., *et al.* 2000. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. *J Biol Chem*, **275**, 24279-83.
- Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K. A., Grahame Hardie, D., Ashworth, A., *et al.* 2005. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J*, **24**, 1810-20.
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A. & Carling, D. 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, **403**, 139-48.
- Sanz, P. 2008. AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci*, **9**, 478-92.
- Shaw, R. J., Lamia, K. A., Vasquez, D., Koo, S. H., Bardeesy, N., Depinho, R. A., *et al.* 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, **310**, 1642-6.

- Schiaffino, S. & Reggiani, C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, **91**, 1447-531.
- Simar, D., Chen, H., Lambert, K., Mercier, J. & Morris, M. J. 2012. Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **22**, 269-76.
- Smerdu, V., Karsch-Mizrachi, I., Campione, M., Leinwand, L. & Schiaffino, S. 1994. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol*, **267**, C1723-8.
- Steinberg, G. R., Michell, B. J., van Denderen, B. J., Watt, M. J., Carey, A. L., Fam, B. C., *et al.* 2006. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*, **4**, 465-74.
- Steinberg, G. R., Rush, J. W. & Dyck, D. J. 2003. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, E648-54.
- Stockdale, F. E. 1997. Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct*, **22**, 37-43.
- Surwit, R. S., Feinglos, M. N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A. E., Opara, E. C., *et al.* 1995. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*, **44**, 645-51.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. & Feinglos, M. N. 1988. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, **37**, 1163-7.
- Surwit, R. S., Petro, A. E., Parekh, P. & Collins, S. 1997. Low plasma leptin in response to dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice. *Diabetes*, **46**, 1516-20.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. & Neumann, D. 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **281**, 32207-16.
- Suwa, M., Nakano, H. & Kumagai, S. 2003. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol*, **95**, 960-8.
- Thomson, D. M., Herway, S. T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J. D., Barrow, J. R., *et al.* 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol*, **104**, 429-38.
- Thomson, D. M., Porter, B. B., Tall, J. H., Kim, H. J., Barrow, J. R. & Winder, W. W. 2007. Skeletal muscle and heart LKB1 deficiency causes decreased voluntary running and reduced muscle mitochondrial marker enzyme expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E196-202.
- Thomson, D. M. & Winder, W. W. 2009. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, **196**, 147-54.
- Viollet, B., Athea, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., *et al.* 2009a. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci*, **14**, 19-44.
- Viollet, B., Lantier, L., Devin-Leclerc, J., Hebrard, S., Amouyal, C., Mounier, R., *et al.* 2009b. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*, **14**, 3380-400.
- Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. 1994. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1309-13.
- Westerblad, H., Bruton, J. D. & Katz, A. 2010. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res*, **316**, 3093-9.
- Winder, W. W., Wilson, H. A., Hardie, D. G., Rasmussen, B. B., Hutber, C. A., Call, G. B., *et al.* 1997. Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol*, **82**, 219-25.
- Witczak, C. A., Sharoff, C. G. & Goodyear, L. J. 2008. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3737-55.

- Wojtaszewski, J. F., Birk, J. B., Frosig, C., Holten, M., Pilegaard, H. & Dela, F. 2005. 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol*, **564**, 563-73.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., *et al.* 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, **2**, 21-33.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., *et al.* 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98**, 115-24.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., *et al.* 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 1288-95.
- Yu, X., McCorkle, S., Wang, M., Lee, Y., Li, J., Saha, A. K., *et al.* 2004. Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia*, **47**, 2012-21.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., *et al.* 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, **108**, 1167-74.

9 Přílohy

Tab 9.1: Výsledná data naměřené aktivity AMPK α 1 a AMPK α 2 u jednotlivých vzorků, průměry skupin a směrodatné odchytky

Data jsou vyjádřena v U/mg proteinu, kde U = 1 nmol fosfátu inkorporovaného do AMARA peptidu za 1 min. Výsledné grafy jsou v kapitole 5.2.

AMPK α 1

Kmen	A/J								B6							
Pohlaví	F				M				F				M			
Věk [den]	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28
	0,0263	0,0381	0,0202	0,0139	0,0517	0,0173	0,0156	0,0132	0,0488	0,1349	0,0884	0,0166	0,0552	0,0659	0,0379	0,0201
	0,0427	0,0200	0,0242	0,0191	0,0488	0,0273	0,0163	0,0391	0,0298	0,0617	0,0379	0,0299	0,0375	0,0367	0,0571	0,0164
	0,0438	0,0388	0,0218	0,0318	0,0292	0,0396	0,0390	0,0252	0,0475	0,0911	0,0456	0,0135	0,0399	0,0249	0,0496	0,0203
	0,0256	0,1014	0,0144	0,0187	0,0249	0,0317	0,0140	0,0184	0,0628	0,0252	0,0121	0,0114	0,0334	0,0216	0,0229	0,0122
	0,0455	0,1362	0,0133	0,0098	0,0962	0,0289	0,0287	0,0062	0,0353	0,0347	0,0258	0,0083	0,0357	0,0260	0,0155	0,0094
	0,0225	0,0253	0,0116	0,0082	0,0520	0,0140	0,0139	0,0069	0,0271	0,0233	0,0257	0,0066	0,0209	-	0,0481	0,0068
Průměr	0,0344	0,0600	0,0176	0,0169	0,0505	0,0264	0,0213	0,0182	0,0419	0,0618	0,0392	0,0144	0,0371	0,0350	0,0385	0,0142
SE	0,0043	0,0194	0,0021	0,0035	0,0103	0,0039	0,0042	0,0051	0,0056	0,0180	0,0109	0,0034	0,0045	0,0081	0,0067	0,0023

AMPK α 2

Kmen	A/J								B6							
Pohlaví	F				M				F				M			
Věk [den]	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28
	0,0338	0,0293	0,0221	0,0458	0,0184	0,0103	0,0216	0,0211	0,0203	0,0439	0,0131	0,0184	0,0204	0,0456	0,0338	0,0408
	0,0420	0,0127	0,0255	0,0391	0,0149	0,0271	0,0214	0,0424	0,0121	0,0225	0,0323	0,0154	0,0131	0,0114	0,0395	0,0291
	0,0216	0,0218	0,0267	0,0435	0,0248	0,0241	0,0392	0,0303	0,0119	0,0225	0,0199	0,0172	0,0258	0,0377	0,0155	0,0336
	0,0143	0,0145	0,0207	0,0255	0,0081	0,0183	0,0236	0,0242	0,0170	0,0128	0,0146	0,0198	0,0090	0,0130	0,0186	0,0145
	0,0051	0,0212	0,0318	0,0232	0,0115	0,0129	0,0262	0,0316	0,0209	0,0205	0,0340	0,0207	0,0290	0,0253	0,0202	0,0263
	0,0062	0,0229	0,0278	0,0180	0,0168	0,0180	0,0155	0,0136	0,0204	0,0270	0,0354	0,0133	0,0347	-	0,0345	0,0148
Průměr	0,0178	0,0186	0,0265	0,0299	0,0152	0,0201	0,0252	0,0284	0,0165	0,0210	0,0272	0,0173	0,0223	0,0266	0,0257	0,0265
SE	0,0067	0,0021	0,0018	0,0049	0,0028	0,0025	0,0039	0,0047	0,0019	0,0023	0,0042	0,0014	0,0049	0,0067	0,0048	0,0042

Tab 9.2: Výsledná data naměřené celkové aktivity AMPK (AMPK α 1 + AMPK α 2) u jednotlivých vzorků, průměry skupin a směrodatné odchylky

Data jsou vyjádřena v U/mg proteinu, kde U = 1 nmol fosfátu inkorporovaného do AMARA peptidu za 1 min. Výsledné grafy jsou v kapitole 5.2.

AMPK α 1 + AMPK α 2

Kmen	A/J								B6							
Pohlaví	F				M				F				M			
Věk [den]	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28	10	15	20	28
	0,0601	0,0674	0,0424	0,0597	0,0701	0,0275	0,0372	0,0343	0,0691	0,1789	0,1015	0,0350	0,0756	0,1115	0,0717	0,0609
	0,0847	0,0327	0,0497	0,0582	0,0637	0,0544	0,0377	0,0816	0,0419	0,0842	0,0701	0,0453	0,0505	0,0482	0,0966	0,0456
	0,0654	0,0606	0,0485	0,0752	0,0540	0,0636	0,0783	0,0555	0,0594	0,1136	0,0655	0,0307	0,0657	0,0625	0,0651	0,0539
	0,0400	0,1159	0,0351	0,0442	0,0330	0,0500	0,0376	0,0426	0,0798	0,0380	0,0267	0,0313	0,0424	0,0346	0,0416	0,0267
	0,0506	0,1574	0,0451	0,0330	0,1076	0,0418	0,0548	0,0378	0,0562	0,0551	0,0598	0,0290	0,0647	0,0512	0,0356	0,0357
	0,0287	0,0483	0,0395	0,0262	0,0689	0,0320	0,0295	0,0205	0,0475	0,0503	0,0611	0,0199	0,0557	-	0,0826	0,0216
Průměr	0,0549	0,0804	0,0434	0,0494	0,0662	0,0449	0,0459	0,0454	0,0590	0,0867	0,0641	0,0319	0,0591	0,0616	0,0655	0,0407
SE	0,0081	0,0192	0,0023	0,0075	0,0100	0,0056	0,0073	0,0086	0,0057	0,0215	0,0098	0,0034	0,0049	0,0132	0,0096	0,0063

Tab 9.3: Normalizované hodnoty genové exprese u myši kmene A/J

Data byla naměřena na přístroji pro RT-PCR (LightCycler, Roche). Výsledné grafy jsou v kapitole 5.4.

číslo vzorku	kmene	pohlaví	věk [den]	AMPK α 1	AMPK α 2	PGC-1 α	UCP3	GLUT4
224	A/J	F	5	3,407	3,317	3,385	11,536	4,027
227	A/J	F	5	2,268	2,467	4,789	8,404	3,225
234	A/J	F	5	1,148	1,000	3,243	1,000	1,221
237	A/J	F	5	5,039	5,610	3,999	26,588	5,502
218	A/J	F	10	4,046	7,139	2,675	15,746	2,597
220	A/J	F	10	2,660	6,030	2,588	7,113	1,768
240	A/J	F	10	2,181	3,393	4,597	7,089	3,142
241	A/J	F	10	3,546	5,244	4,338	16,747	4,987
155	A/J	F	15	2,475	3,494	2,008	7,770	3,526
156	A/J	F	15	2,556	6,513	1,990	8,898	3,826
170	A/J	F	15	3,145	5,052	2,685	8,396	3,124
213	A/J	F	15	3,224	7,895	2,206	15,388	3,387
239	A/J	F	15	2,116	6,200	3,891	7,681	4,023
101	A/J	F	20	1,537	7,801	2,647	3,881	4,612
112	A/J	F	20	2,711	16,773	6,002	8,535	6,498
119	A/J	F	20	2,900	14,765	4,446	9,224	7,436
187	A/J	F	20	3,916	11,059	2,412	4,583	6,083
229	A/J	F	20	3,555	12,871	4,311	8,857	9,699
123	A/J	F	28	3,086	13,537	4,876	4,248	7,304
124	A/J	F	28	2,610	13,176	4,820	3,844	12,178
210	A/J	F	28	3,126	11,256	2,492	1,501	7,195
232	A/J	F	28	2,198	9,252	8,558	4,892	8,025
243	A/J	F	28	3,583	12,964	7,445	8,952	13,095
225	A/J	M	5	3,970	4,693	4,845	18,364	4,620
226	A/J	M	5	2,156	2,675	3,140	6,245	2,248
235	A/J	M	5	2,520	2,891	3,640	10,356	4,900
236	A/J	M	5	3,767	3,887	3,689	12,139	4,553
216	A/J	M	10	2,380	4,166	2,121	2,848	2,590
219	A/J	M	10	4,602	10,150	4,475	26,096	5,270
221	A/J	M	10	3,277	4,892	1,886	8,422	1,499
222	A/J	M	10	3,787	6,150	1,912	4,230	2,459
223	A/J	M	10	3,441	5,461	2,501	4,344	2,104
188	A/J	M	15	3,493	6,672	2,743	16,705	4,914
189	A/J	M	15	2,446	3,833	1,706	6,444	3,055
195	A/J	M	15	2,595	7,413	2,044	6,564	2,822
212	A/J	M	15	2,881	7,835	2,962	7,337	3,096
238	A/J	M	15	3,434	10,030	4,412	24,941	5,813
102	A/J	M	20	3,480	14,224	5,159	9,494	4,645
120	A/J	M	20	1,943	17,897	2,857	2,095	6,074
172	A/J	M	20	2,172	6,120	1,930	3,448	2,610
173	A/J	M	20	3,348	6,893	2,879	3,379	3,694
228	A/J	M	20	2,687	7,858	5,198	7,668	8,859
113	A/J	M	28	2,373	14,690	5,801	7,623	12,328
114	A/J	M	28	3,905	14,321	4,027	7,127	7,742
115	A/J	M	28	4,216	28,106	5,916	5,890	9,362
211	A/J	M	28	3,973	13,931	3,555	1,851	7,166
233	A/J	M	28	2,327	8,913	4,475	3,252	8,266

Tab 9.4: Normalizované hodnoty genové exprese u myši kmene B6

Data byla naměřena na přístroji pro RT-PCR (LightCycler, Roche). Výsledné grafy jsou v kapitole 5.4.

číslo vzorku	kmen	pohlaví	věk [den]	AMPK α 1	AMPK α 2	PGC-1 α	UCP3	GLUT4
133	B6	F	5	2,233	2,287	1,975	18,786	2,411
160	B6	F	5	3,480	2,201	2,119	18,277	2,527
161	B6	F	5	3,370	2,910	2,350	27,399	2,460
163	B6	F	5	1,997	1,556	1,934	23,872	2,154
121	B6	F	10	2,935	7,121	4,400	64,446	6,201
131	B6	F	10	3,276	3,975	2,444	34,328	3,722
197	B6	F	10	2,569	4,838	3,419	27,383	2,461
198	B6	F	10	3,931	5,551	2,861	29,811	2,684
207	B6	F	10	3,000	4,877	2,767	32,226	3,746
91	B6	F	15	4,161	9,545	3,788	114,117	4,997
100	B6	F	15	2,589	9,219	3,717	62,789	6,506
128	B6	F	15	2,863	8,046	3,367	63,436	6,762
149	B6	F	15	2,089	4,848	2,343	43,959	2,624
191	B6	F	15	6,006	10,069	5,624	108,972	11,200
81	B6	F	20	3,923	14,707	5,623	35,468	13,982
94	B6	F	20	2,911	9,206	3,728	13,282	6,340
138	B6	F	20	1,759	5,861	1,529	3,534	2,361
180	B6	F	20	3,141	9,236	2,033	19,179	6,323
185	B6	F	20	3,188	7,591	3,909	3,695	11,504
98	B6	F	28	2,780	16,235	4,467	22,139	12,448
103	B6	F	28	3,620	11,804	5,421	11,780	9,860
108	B6	F	28	3,605	13,511	6,905	41,103	9,763
140	B6	F	28	2,066	9,517	3,434	3,156	3,029
254	B6	F	28	2,925	13,194	5,505	11,690	8,926
130	B6	M	5	3,186	2,145	3,154	15,380	3,351
134	B6	M	5	1,000	1,956	1,000	6,855	1,000
162	B6	M	5	2,030	2,178	1,933	24,965	2,665
164	B6	M	5	2,501	1,741	1,627	14,060	2,078
165	B6	M	5	1,767	1,988	1,755	17,475	1,947
122	B6	M	10	3,039	4,536	2,983	55,330	4,262
132	B6	M	10	2,228	4,359	3,206	39,657	3,931
196	B6	M	10	2,968	3,790	2,710	17,497	2,081
199	B6	M	10	3,024	4,683	1,616	20,499	2,228
206	B6	M	10	2,326	3,610	2,120	21,072	2,162
79	B6	M	15	3,058	10,315	4,787	76,938	6,745
99	B6	M	15	3,209	8,097	3,391	50,337	6,576
126	B6	M	15	2,918	10,491	3,862	55,847	6,511
127	B6	M	15	2,070	6,925	2,377	61,880	5,493
153	B6	M	15	2,195	3,995	2,503	36,080	3,617
93	B6	M	20	2,553	9,159	2,886	52,260	3,416
95	B6	M	20	2,178	10,213	5,173	8,098	6,958
110	B6	M	20	3,407	11,832	5,232	57,745	9,626
181	B6	M	20	2,599	7,367	2,682	32,983	8,830
184	B6	M	20	2,813	9,227	2,769	5,553	9,482
97	B6	M	28	2,306	12,130	4,701	15,075	7,850
104	B6	M	28	1,861	7,942	2,801	14,050	9,210
107	B6	M	28	2,134	10,221	4,431	18,801	9,192
247	B6	M	28	3,171	10,110	5,452	14,576	11,606
248	B6	M	28	1,867	7,876	4,668	9,932	8,993