

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE



**Funkčně genomická a farmakogenomická analýza
aspektů metabolického syndromu**

**Functional genomic and pharmacogenomic analysis of
metabolic syndrome aspects**

Mgr. Michaela Krupková

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN
Albertov 4, 120 00 Praha 2

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Šeda, PhD.

Autor: Mgr. Michaela Krupková

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
1.1. Komparativní genomika.....	6
1.2. Farmakogenetika a farmakogenomika.....	7
2. Cíle práce.....	8
3. Komentáře k publikacím.....	9
3.1. Farmakogenetické interakce kyseliny all-trans retinové a diferenciálního segmentu chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-Lx PD5.....	9
3.1.2. Ustanovení farmakogenetického modelu kyseliny retinovou indukované dyslipidémie a inzulínové rezistence.....	9
3.1.3. Farmakogenomická analýza kongenního kmene SHR-Lx PD5 jako modelu kyseliny retinovou indukované dyslipidémie.....	10
3.2. Farmakogenetická interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8.....	12
3.3. Gen <i>Plzf</i> jako kandidátní gen predisponující spontánně hypertenzní kmen potkana k rozvoji hypertenze, hypertrofie levé komory a intersticiální fibrózy.....	13
3.4. Farmakogenetická interakce a funkčně genetická analýza diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4.....	16
3.4.1. Farmakogenetická interakce dexametazonu a <i>Cd-36</i> deficientního segmentu chromozomu 4 ovlivňuje distribuci triacylglycerolů a cholesterolu do jednotlivých lipoproteinových frakcí.....	16
3.4.2. Metabolický a transkriptomický profil <i>Cd-36</i> deficientních kongenních kmenů PD.SHR4a a PD.SHR4b.....	17
4. Diskuze.....	19
5. Závěr.....	23
6. Použitá literatura.....	24
7. Seznam publikací.....	27

Abstrakt

Metabolický syndrom je prevalentní onemocnění, charakterizované současnou manifestací inzulínové rezistence, obezity, dyslipidémie, hypertenze a metabolických poruch. Jeho výsledný fenotyp závisí jak na genetických faktorech, tak na faktorech vnějšího prostředí a jejich vzájemných interakcích. Z toho vyplývá komplikovanost detailní analýzy genetické komponenty tohoto syndromu v obecné lidské populaci. Geneticky definované savčí modely jsou významným nástrojem pro analýzu genetické architektury lidských komplexních onemocnění, mezi která se řadí i metabolický syndrom.

Cílem této dizertační práce je využití nástrojů funkční a komparativní genomiky k odhalení patogeneze aspektů metabolického syndromu a jeho genetických determinant. Rovněž jsme se zabývali farmakogenetickými interakcemi těchto genetických determinant s látkami ovlivňujícími jednotlivé složky metabolického syndromu. S použitím několika kongenních kmenů laboratorního potkana jsme řešili čtyři různé projekty, zabývající se: farmakogenetickou interakcí kyseliny *all-trans* retinové a ondansetronu s diferenciálním segmentem chromozomu 8 u potkana, farmakogenetickou interakcí diferenciálního segmentu chromozomu 4 a dexametazonu a stanovením role genu *Plzf* při vývoji hypertenze, hypertrofie levé komory srdeční (LVH) a intersticiální fibrózy. Výsledkem těchto projektů bylo ustavení kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 jako vhodného modelu pro hyperlipidémii a glukózovou intoleranci indukovanou kyselinou retinovou a farmakogenomická charakterizace této interakce. Dále jsme ustavili kongenní kmen SHR.(PD/BN)8 jako užitečný experimentální nástroj pro farmakogenetickou a farmakogenomickou analýzu působení ondansetronu na metabolismus sacharidů a lipidů. Identifikovali jsme *Plzf* (*Zbtb16*) jako prominentní kandidátní gen při vývoji hypertenze, LVH a intersticiální fibrózy u kmene SHR. Rovněž jsme popsali kontextuálně podmíněný efekt mutovaného genu *Cd36* na metabolické parametry včetně jeho farmakogenetické interakce s podáním glukokortikoidů.

Ukázali jsme, že funkční komparativní genomika poskytuje velmi cenný vhled do farmakogenetických interakcí genetických determinant metabolického syndromu.

klíčová slova: metabolický syndrom, komparativní genomika, farmakogenomika, kongenní kmen, inzulínová rezistence, cholesterol, triacylglycerol, kyselina *all-trans* retinová, dexametazon, systémová biologie, hypertenze

Abstract

Metabolic syndrome is a prevalent disease characterized by concurrent manifestation of insulin resistance, obesity, dyslipidemia, hypertension and other hemodynamic and metabolic disorders. It has multifactorial type of inheritance and its resultant phenotype is determined by both environmental and genetic factors as well as their interactions. That is the main reason why comprehensive analysis of the genetic component of this syndrome is complicated in human population. Genetically designed experimental animal models are significant tools for analysis of genetic architecture of human complex conditions including the metabolic syndrome.

The aim of this Thesis is utilization of functional and comparative genomic tools to uncover pathogenesis of metabolic syndrome aspects and their genetic determinants. We also studied pharmacogenetic interactions of these genetic determinants with drugs affecting particular components of the metabolic syndrome. Establishing and utilizing several genetically designed congenic rat strains, we undertook four different research projects focusing on pharmacogenetic interaction of all-*trans* retinoic acid and ondansetron with differential segment of rat chromosome 8, pharmacogenetic interaction of differential segment of rat chromosome 4 and dexamethasone, determining *Plzf* as a candidate gene predisposing the spontaneously hypertensive rat to hypertension, left ventricular hypertrophy, and interstitial fibrosis. The main results of our projects included validating of congenic strain SHR-*Lx* PD5 as a model of RA-induced hyperlipidemia and glucose intolerance and pharmacogenomic characterization of this interaction. Further we established congenic strain SHR.(PD/BN)8 as a suitable experimental tool for pharmacogenetic and pharmacogenomic analysis of ondansetron effect on lipid and carbohydrate metabolism. We identified *Plzf* as a prominent candidate gene in the development of hypertension, LVH and interstitial fibrosis in SHR. Finally we described the contextually dependent effect of mutant *Cd36* gene on metabolic parameters including its pharmacogenetic interaction with glucocorticoid administration.

We demonstrated that functional comparative genomics provides significant insight into pharmacogenetic interactions of individual genetic determinants of metabolic syndrome.

keywords: metabolic syndrome, comparative genomics, pharmacogenomics, congenic strain, insulin resistance, cholesterol, triacylglycerol, all-*trans* retinoic acid, dexamethasone, systems biology, hypertension

1. Úvod

Metabolický syndrom je jedno z nejčastějších onemocnění s multifaktoriální etiologií. V dnešní době, díky známým sekvencím potkaního, myšího a lidského genomu, je možné využít metod komparativní a funkční genomiky pro studium jednotlivých molekulárních drah a mechanismů, které se na patogenezi komplexních znaků podílejí. Geneticky definované savčí modely tak představují významný nástroj pro analýzu genetické architektury multifaktoriálních onemocnění jako je metabolický syndrom. U řady inbredních kmenů laboratorního potkana se manifestují jednotlivé komponenty metabolického syndromu, případně metabolický syndrom kompletní. Tyto kmeny jsou vhodným nástrojem pro odhalování patogeneze metabolických poruch a jejich genetických determinant.

1.1. Komparativní genomika

Komparativní genomika využívá modelových systémů pro objasnění zákonitostí genetiky a jejího vztahu k onemocněním člověka. Modelové systémy se mohou využívat na několika úrovních: *in silico* (počítačové modely), *in vitro* (buněčné kultury) a *in vivo* (experimentální, především savčí modely). Ačkoliv počítačové modely a buněčné kultury přinesly řadu poznatků o biologii člověka, je jejich využití spojeno s řadou limitací. Především pokud studujeme danou problematiku na úrovni tkání, orgánů nebo celého organismu. Buněčné kultury svými charakteristikami častokrát neodpovídají vlastnostem původního typu tkáně. Kromě toho dochází k izolaci buňky z přirozených vazeb prostředí. Tyto důvody svědčí pro důležitost použití experimentálních savčích modelových organismů. V současné době patří mezi nejčastěji využívané savčí modelové organismy myš a laboratorní potkan (Aitman T.J. et al., 2011). Genetická a evoluční blízkost hlodavců společně s rostoucím rozvojem bioinformatických metod umožňují aplikovat zjištěná data na biologii člověka. Potkaní a myší modely poskytují unikátní genetické architektury například ve formě inbredních a kongenních kmenů pro zkoumání podstaty komplexních znaků. Můžeme využít metod cíleného křížení. Dalšími výhodami jsou produkce dostatečného množství potomstva, možnost standardizace a cílené manipulace podmínek vnějšího prostředí. V neposlední řadě je zde i možnost cílené modifikace genomu v podmínkách živého organismu a následné zpětné sledování dopadů takové změny.

1.2. Farmakogenetika a farmakogenomika

Farmakogenomika se zabývá studiem účinku léčiv na globální úrovni (transkriptom, proteom, metabolom) v závislosti na individuálním genotypu jednotlivce. Pojem farmakogenomika je často zaměňován s pojmem farmakogenetika, která studuje jednotlivé genetické polymorfismy ovlivňující účinek léku. Každý člověk je geneticky zcela unikátní a fenotypově odlišný a z tohoto hlediska je také reakce na podání léčiva vysoce individuální. Stejná dávka léku u zhruba srovnatelných jedinců (pohlaví, věk, hmotnost, diagnóza) může vést k celé škále účinků. V extrémním případě může být tento účinek i život ohrožující (Ghosh D. et al., 2007).

Nejlépe jsou v současné době charakterizovány genetické polymorfismy podmiňující farmakogenetické interakce, u nichž bylo možné sledovat výrazné klinické či biochemické rozdíly a které podléhaly monogennímu typu dědičnosti. V těchto případech se často jednalo o znaky podílející se na farmakokinetice daného léčiva, kdy defekt v molekule příslušného transportéru, metabolizujícího enzymu nebo některého z faktorů podílejících se na absorpci, distribuci, interakci s cílovou strukturou nebo odbourání a exkreci vede k přílišné nebo nedostatečné koncentraci farmaka v organismu (Weinshilboum R. a Wang L., 2004). Problém nastává, pokud genetický polymorfismus ovlivňuje farmakodynamické procesy daného léku nebo pokud je účinek léku závislý na interakci více genů. V těchto případech musíme brát v úvahu například i úroveň genové exprese v cílové tkáni. Léky se rovněž liší ve svém účinku v závislosti na etnických faktorech nebo na fázi ontogenetického vývoje organismu. Jako příklady mohou sloužit léčiva BiDil a paroxetin. BiDil je využíván pro léčbu srdečních selhání u Afroameričanů (Taylor A.L. et al., 2004). Podávání antidepresiva paroxetinu vedlo u pacientů mladších 18 let k sebepoškozujícímu a sebevražednému jednání (Marx V., 2004).

Současný vývoj farmakogenomiky je úzce svázán s technologickým vývojem v oblastech transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky. Získaná data lze využít pro porozumění interakcím a optimalizaci a individualizaci terapie nových a již zavedených léčiv a v konečném důsledku k rozvoji personalizované medicíny (Altman R.B. et al., 2011).

2. Cíle práce

Tato dizertační práce si klade za cíl demonstrovat využití nástrojů funkční a komparativní genomiky k odhalení patogeneze aspektů metabolického syndromu a jeho genetických determinant. V neposlední řadě je cílem této dizertační práce studium farmakogenetických interakcí těchto genetických determinant s látkami ovlivňujícími jednotlivé složky metabolického syndromu.

Dílčí cíle práce:

1. Testování hypotézy existence farmakogenetické interakce kyseliny all-*trans* retinové s diferenciálním segmentem chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-*Lx* PD5
2. Testování hypotézy existence farmakogenetické interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8
3. Stanovení role genu *Plzf* při vývoji hypertenze, hypertrofie levé srdeční komory a intersticiální fibrózy
4. Testování hypotézy existence farmakogenetické interakce diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4

3. Komentáře k publikacím

3.1. Farmakogenetické interakce kyseliny all-trans retinové a diferenciálního segmentu chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-Lx PD5

Tato sekce obsahuje komentář k následujícím publikacím:

Publikace 1

Krupková M., Janků M., Liška F., Šedová L., Kazdová L., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2009). Pharmacogenetic model of retinoic acid-induced dyslipidemia and insulin resistance. *Pharmacogenomics* 10(12):1915-27.

Publikace 2

Krupková M., Liška F., Šedová L., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2014). Pharmacogenomic analysis of retinoic-acid induced dyslipidemia in congenic rat model. *PLoS ONE*, v recenzním řízení.

3.1.2. Ustanovení farmakogenetického modelu kyselinou retinovou indukované dyslipidémie a inzulínové rezistence

Retinoidy jsou přírodně se vyskytující složky nebo syntetické deriváty retinolu. Tyto látky se často využívají při léčbě řady lidských onemocnění, mezi která patří například různá kožní onemocnění nebo akutní promyelocytární leukémie. Kromě teratogenního efektu (Collins M.D. a Mao G.E., 1999), vykazují i širokou škálu metabolických a behaviorálních vedlejších účinků (O'Reilly K. et al., 2008). Jedná se především o rozvoj hyperlipidémie. V této studii jsme testovali hypotézu, zda kongenní kmeny SHR a SHR-Lx PD5 mohou sloužit jako modelové kmeny pro určování farmakogenetických aspektů negativních účinků retinoidů na metabolismus.

U experimentálních skupin obou kmenů, kterým jsme podali kyselinu all-trans retinovou, byl obsah triacylglycerolů v séru zvýšen u obou kmenů ve všech hlavních

lipoproteinových třídách. Přesto kmen SHR-*Lx* PD5 vykazoval výrazně větší nárůst ve srovnání s kmenem SHR. To v konečném důsledku vedlo k signifikantně vyšším hladinám VLDL, LDL a HDL triacylglycerolů v séru oproti skupině SHR. V hladině celkového cholesterolu jsme nezaznamenali žádné rozdíly specifické pro faktory kmene nebo zařazení do kontrolní či experimentální skupiny. Kyselina *all-trans* retinová vymazala kmenově specifické rozdíly ve většině lipoproteinových tříd, kromě sérových VLDL, kde experimentální skupina kmene SHR-*Lx* PD5 vykazovala signifikantně vyšší koncentraci cholesterolu ve srovnání s experimentální skupinou kmene SHR.

Ustavili jsme modelový systém pro výzkum metabolických vedlejších účinků retinoidů, který je tvořen dvojicí kmenů SHR a SHR-*Lx* PD5. Odhalili jsme genomickou oblast se sedmi protein-kódujícími geny, která zprostředkovává zvýšenou vnímavost k vzestupu sérových triacylglycerolů a zhoršení glukózové tolerance indukovanou podáním RA.

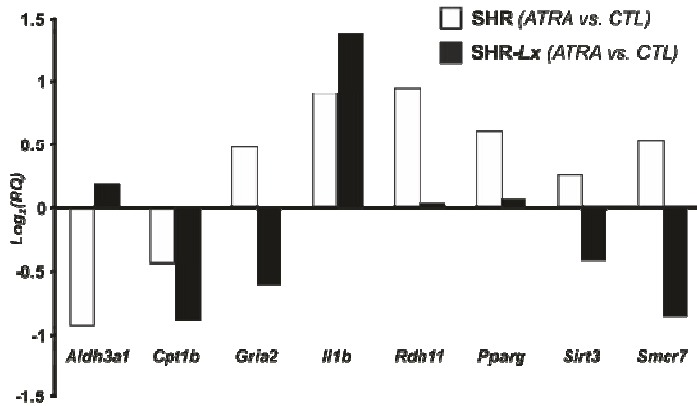
3.1.3. Farmakogenomická analýza kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 jako modelu kyselinou retinovou indukované dyslipidémie

Testovali jsme, zda je zvýšená citlivost k aplikaci kyseliny *all-trans* retinové zachována i při podávání standardní diety a zda je farmakogenetická interakce kyseliny *all-trans* retinové s diferenciálním segmentem chromozomu 8 odražena i v transkriptomu kosterního svalu.

Podávání kyseliny *all-trans* retinové vedlo výlučně u kmene SHR-*Lx* PD5 k podstatnému vzestupu koncentrace triacylglycerolů ve všech lipoproteinových frakcích kromě LDL. Podobný posun jsme pozorovali i pro distribuci cholesterolu v rámci jednotlivých lipoproteinových tříd.

Následně jsme provedli analýzu transkriptomu kosterního svalu (*m. soleus*) a její výsledky jsme otestovali pomocí real-time PCR pro osm vybraných transkriptů (*Aldh3a1*, *Cpt1b*, *Gria2*, *Illb*, *Rdh11*, *Pparg*, *Sirt3* a *Smcr7*), které vykazovaly kmenově specifickou změnu exprese (Obrázek 1). Ve všech případech jsme byli schopni potvrdit směr efektu indukovaného RA. Testování existujících potenciálních funkčních vztahů mezi sedmi geny diferenciálního segmentu u kmene SHR-*Lx* PD5 a sítí propojující rozdílně exprimované

geny odhalilo spojení pouze s genem *Plzf* (*Zbtb16*), který nese delecii v intronu 2 o rozsahu 2,9 kb.



Obrázek 1: Testování microarray analýzy pomocí kvantitativní real-time PCR pro následující geny: *Sirt3*: sirtuin 3; *Smcr7*: mitochondrial elongation factor 2 (Mief2); *Il1b*: interleukin 1 beta; *Cpt1b*: carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle;

Gria2: glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2; *Pparg*: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Aldh3a1*: aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1; *Rdh11*: retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis). Sloupce označují efekt all-trans retinové kyseliny u kmene SHR (bílé sloupce) a kongenního kmene kmene SHR-Lx PD5 (černé sloupce).

3.2. Farmakogenetická interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8

Tato sekce obsahuje komentář k následující publikaci:

Krupková M., Šedová L., Liška F., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2012). Differential effects of 5-HT₃ receptor antagonist on lipid profile in spontaneously hypertensive rat and chromosome 8 congenic strain. Neuro Endocrinol Lett 33 Suppl 2:43-9.

Ondansetron je kompetitivní antagonist 5-HT₃ (5-hydroxytryptaminového) receptoru se strukturální podobností se serotoninem (5-HT). Geny kódující 5-HT₃ podjednotky receptoru, *Htr3a* a *Htr3b* jsou kolokalizovány na lidském chromozomu 11q23 a nacházejí se v syntenní oblasti potkaního chromozomu 8. V této studii jsme porovnali metabolický efekt ondansetronu u spontánně hypertenzního kmene potkana (SHR) ve srovnání s nově odvozeným kongenním kmenem, který nese diferenciální segment chromozomu 8 (včetně genů *Htr3a* a *Htr3b*) z kmene PD/Cub a BN/Cub.

Zatímco u kontrolních skupin byly rozdíly v koncentracích triacylglycerolů nejzřetelnější u malých a velmi malých LDL částic, ondansetron indukoval vzestup hladin triacylglycerolů v celém lipoproteinovém spektru u kmene SHR.(PD/BN)8, ale pouze v LDL u kmene SHR. Při podání ondansetronu u experimentálních skupin došlo k indukci vzestupu hladin cholesterolu ve všech lipoproteinových frakcích u kongenního kmene SHR.(PD/BN)8, což v konečném důsledku vedlo k 30 % vzestupu v celkovém cholesterolu ve srovnání s minimálními změnami pozorovanými u experimentální skupiny kmene SHR.

Nejvýznamnějším zjištěním naší studie je signifikantní vzestup v koncentracích triacylglycerolů a některých frakcí cholesterolu u experimentální skupiny kongenního kmene SHR.(PD/BN)8. Pokud je nám známo, neexistuje dosud publikace popisující vztah mezi ondansetronem a hladinami cholesterolu, ani dyslipidemií obecně. Ustavili jsme nový kongenní kmen vykazující zřetelnou metabolickou odpověď na orální aplikaci ondansetronu a vytvořili jsme tak užitečný experimentální nástroj pro farmakogenetickou a farmakogenomickou analýzu působení ondansetronu na metabolismus sacharidů a lipidů.

3.3. Gen *Plzf* jako kandidátní gen predisponující spontánně hypertenzní kmen potkana k rozvoji hypertenze, hypertrofie levé komory a intersticiální fibrózy

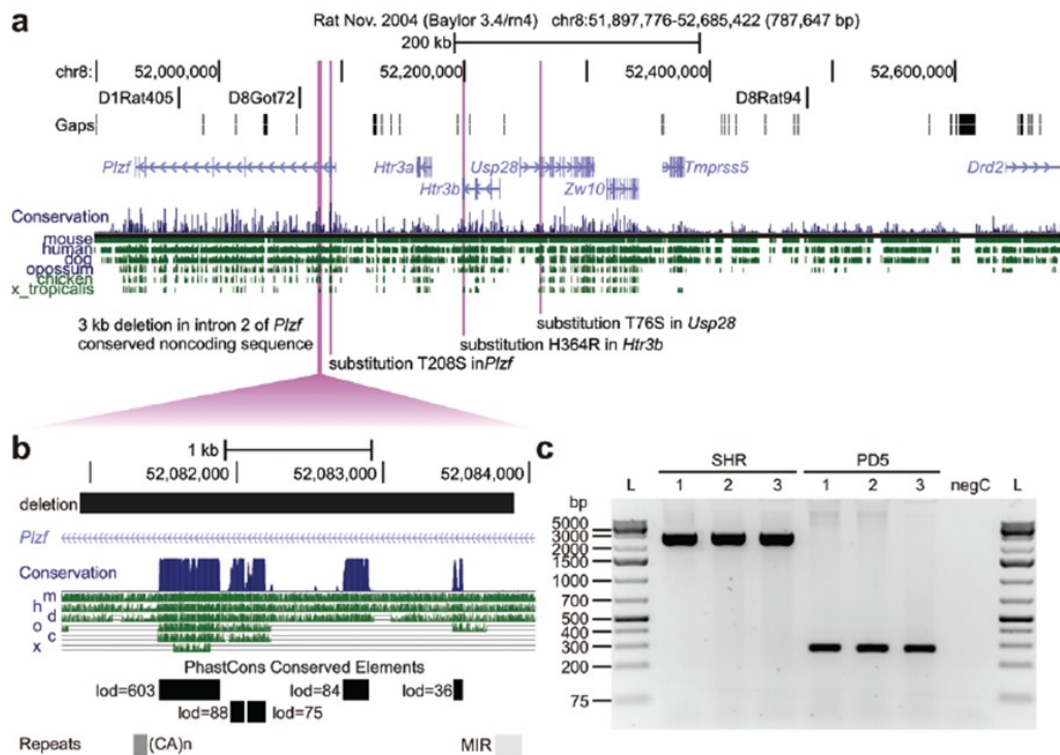
Tato sekce obsahuje komentář k následující publikaci:

Liška F., Mancini M., Krupková M., Chylíková B., Křenová D., Šeda O., Šilhavý J., Mlejnek P., Landa V., Zídek V., d' Amati G., Pravenec M., Křen V. (2014). *Plzf* as a candidate gene predisposing the spontaneously hypertensive rat to hypertension, left ventricular hypertrophy, and interstitial fibrosis. *Am J Hypertens.* 27(1):99-106.

Myokardiální fibróza je multifaktoriální patologická změna, která zahrnuje přestavbu extracelulární matrix a buněčných komponent, mezi které patří fibroblasty/myofibroblasty, zánětlivé buňky a další (Pardo Mindan F.J. a Panizo A., 1993; Jellis C. et al., 2010). Spontánně hypertenzní kmen potkana SHR reprezentuje excelentní model LVH a srdeční fibrózy. V našich předchozích studiích jsme identifikovali QTL na chromozomu 8, které bylo asociováno s predispozicí k hypertenzi a LVH a které bylo geneticky izolované uvnitř kongenního kmene SHR-*Lx* (Křen V. et al., 1997).

V naší studii jsme geneticky definovali diferenciální segment chromozomu 8 izolovaný u SHR.PD-chr.8 minimální kongenní podlinie (SHR-*Lx* PD5). Diferenciální segment u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 má rozsah 788 kb a obsahuje následujících 7 genů: *Plzf*, *Htr3a*, *Htr3b*, *Usp28*, *Zw10*, *Tmprss5* a *Drd2*. Gen *Drd2* je v segmentu přítomen pouze svým promotorem, prvním nekódujícím exonem a částí prvního intronu. Protože genomové sekvence kmenů SHR/Ola a BN-*Lx*/Cub (kongenní kmen nesoucí segment chromozomu 8 PD původu izolovaný u podlinie SHR-*Lx* PD5) jsou známy, provedli jsme přímo analýzu genetických polymorfizmů v diferenciálním segmentu SHR-*Lx* PD5. Podle tohoto srovnání jsme zjistili 710 jednonukleotidových polymorfizmů, 352 malých inzercí nebo delecí a 1 velkou delecí. Navíc jsme sekvenovali kódující části genů a vybraných konzervativních nekódujících oblastí. Výsledky byly v souladu s předpoklady založenými na datech z celogenomových metod. Kódující sekvence obsahují 3 nesynonymní aminokyselinové substituce u genů *Plzf*, *Htr3b* a *Usp28*. Protože tyto substituce jsou buďto konzervativní (T208S u *Plzf* a T76S u *Usp28*) nebo lokalizované v nekonzervovaných oblastech proteinu (H364R u *Htr3b*), jejich funkční role jako možné příčiny pozorovaného fenotypového rozdílu

je nepravděpodobná. Z nekódujících sekvenčních variant je nejnápadnější velká 2964 bp delece v druhém intronu genu *Plzf*. Tato delece zahrnuje vysoce konzervovanou nekódující sekvenci, která může potencionálně sloužit jako „enhancer“ (Obrázek 2).



Obrázek 2: (a) Detailní mapa diferenciálního segmentu chromozomu 8 v kongenním kmenu SHR-*Lx* PD5. Vizualizace je založena na UCSC Genome Browser. (b) Detail delece v genu *Plzf* (*Zbtb16*). (c) PCR amplifikace oblasti. Očekávaná velikost PCR produktu je 3240 bp pro kmen SHR a 276 bp pro SHR-*Lx* PD5.

Hmotnosti srdce byly signifikantně menší u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s kmenem SHR. Navíc jsme při histologické analýze odhalili, že redukce velikosti srdce je u kongenního kmene doprovázena redukcí objemu kardiomyocytů o více než jednu třetinu, což jasně demonstruje zlepšení hypertrofie. Nepozorovali jsme žádné signifikantní korelace mezi krevním tlakem a intersticiální fibrózou nebo LVH u rekombinantních inbredních kmenů, což potvrzuje, že tyto znaky nejsou na krevním tlaku závislé. Radiotelemetrická měření ukazují signifikantní pokles v systolickém krevním tlaku u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s kmenem SHR. Diastolický krevní tlak byl také

nižší, ale ne signifikantně rozdílný. Pokles krevního tlaku nebyl závislý na příjmu soli, protože při jejím podání došlo k doporučenému vzestupu krevního tlaku u obou skupin.

Gen *Plzf* obsahuje delecii intronu, která je prominentním kandidátem pro LVH a intersticiální fibrózu. Důsledkem této delece je také pokles exprese genu *Plzf* v končetinových pupenech s následným vznikem polydaktylie (Liška F. et al., 2009). Z tohoto důvodu jsme měřili expresi genu *Plzf* v srdeční tkáni u prehypertenzních juvenilních potkanů a zjistili jsme výraznou redukcii hladiny mRNA genu *Plzf* u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s SHR kontrolními skupinami. Naopak jsme nepozorovali žádné změny v renální expresi genu *Plzf* mezi kmeny SHR a SHR-*Lx* PD5. Navíc jsme nezjistili rozdíly v srdeční expresi *p85α* a proreninového receptoru, což jsou dva možné cílové geny *Plzf* v srdci (Senbonmatsu T. et al., 2003; Schefe J.H. et al., 2006).

3.4. Farmakogenetická interakce a funkčně genetická analýza diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4

Tato sekce obsahuje komentář k následujícím publikacím:

Publikace 1

Krupková M., Šedová L., Liška F., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2010). Pharmacogenetic interaction between dexamethasone and Cd36-deficient segment of spontaneously hypertensive rat chromosome 4 affects triacylglycerol and cholesterol distribution into lipoprotein fractions. *Lipids Health Dis.* 9:38.

Publikace 2

Šedová L., Liška F., Křenová D., Kazdová L., Tremblay J., Krupková M., Corbeil G., Hamet P., Křen V., Šeda O. (2012). CD36-deficient congenic strains show improved glucose tolerance and distinct shifts in metabolic and transcriptomic profiles. *Heredity (Edinb).* 109(1):63-70.

3.4.1. Farmakogenetická interakce dexametazonu a *Cd36* deficientního segmentu chromozomu 4 ovlivňuje distribuci triacylglycerolů a cholesterolu do jednotlivých lipoproteinových frakcí

V této studii jsme testovali vliv deficiencie jednoho z cílových genů dexametazonu, translokázy mastných kyselin *Cd36* (Abumrad N.A. et al., 1993; Yesner L.M. et al., 1996), na dexametazonem indukované metabolické změny a srovnali jsme koncentrace triacylglycerolů a cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích a glukózovou toleranci u dospělých samců dvou potkaních kmenů: Brown Norway (BN/Cub) a kongenní kmen BN.SHR-(*Il6-Cd36*)/Cub (BN.SHR4).

Podání dexametazonu vedlo k indukci podstatně silnějšího poklesu triacylglycerolů u kmene BN.SHR4, kromě malých HDL frakcí. Výsledkem pak byla vyšší koncentrace triacylglycerolů ve velkých, středních a malých LDL frakcích u experimentální skupiny

samců kmene BN/Cub. Po podání dexametazonu poklesl celkový cholesterol u kmene BN.SHR4 o více než 21 %, což bylo v kontrastu se vzestupnou tendencí zaznamenanou u kmene BN. Při detailnější analýze vykazovala experimentální skupina kmene BN vyšší koncentraci cholesterolu v některých frakcích LDL a v rámci celého spektra frakcí HDL.

V této studii vykazoval *Cd36*-deficientní kongenní kmen sníženou vnímavost k diabetogennímu působení dexametazonu a dokonce došlo k částečnému zlepšení jeho lipidového profilu ve srovnání s progenitorovým kmenem BN/Cub.

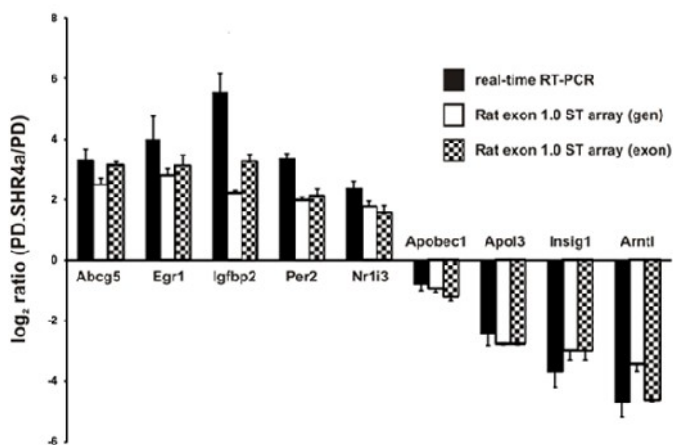
3.4.2. Metabolický a transkriptomický profil *Cd36* deficientních kongenních kmenů PD.SHR4a a PD.SHR4b

Testovali jsme efekt přítomnosti mutovaného genu *Cd36* uvnitř genomického pozadí vysoce inbredního modelu metabolického syndromu, kmene PD/Cub, na metabolický a transkriptomický profil nově vytvořených kongenních kmenů. Provedli jsme genotypizaci diferenciálního segmentu pomocí 54 polymorfních mikrosatelitních markerů u obou kongenních kmenů PD.SHR4. U kmene PD.SHR4a má diferenciální segment rozsah 21Mb, zatímco PD.SHR4b má diferenciální segment rozsah o velikosti 37 Mb od centromery s přerušením velikosti 1,3-2,4 Mb.

Zaznamenali jsme signifikantně nižší celkovou koncentraci triacylglycerolů u kmene PD.SHR4a ve srovnání s kmenem PD/Cub. Jednalo se především o snížení o 43% a 22% u frakcí VLDL a LDL. Podobný, ale méně výrazný trend byl zaznamenán i u kmene PD.SHR4b. Zde došlo k statisticky významnému snížení koncentrace triacylglycerolů pouze u LDL a HDL frakce. Celkový cholesterol byl srovnatelný mezi kmeny PD/Cub a PD.SHR4a. Při detailnější analýze jsme odhalili signifikantní zvýšení LDL cholesterolu u kongenního kmene PD.SHR4a. Celkový cholesterol u kongenního kmene PD.SHR4b byl nižší ve srovnání s progenitorovým kmenem PD/Cub.

Rozhodli jsme se porovnat jaterní transkriptom kmene PD.SHR4a s transkriptomem kmene PD/Cub. Počet transkriptů se sníženou nebo zvýšenou expresí u kmene PD.SHR4a oproti PD/Cub byl srovnatelný. Kromě očekávané redukce exprese genu *Cd36* u kongenního kmene nebyly zjištěny žádné další rozdílně exprimované geny umístěné v diferenciálním segmentu SHR původu, který se nachází na chromozomu 4. Z důvodu ověření výsledků byla

provedena kvantitativní real-time PCR analýza 9 reprezentativních genů (Obrázek 3). S využitím všech 172 signifikantně diferenciatně exprimovaných genů jsme provedli systematické vyhledávání jejich zastoupení v ontologických kategoriích, kanonických drahách nebo v sadách genů spojených s konkrétními patologickými stavy a identifikovali jsme několik hlavních modulů, z nichž nejvýraznější obsahoval čtyři geny se zásadní rolí v regulaci cirkadiálního rytmu.



Obrázek 3: Ověření výsledků microarray analýzy pomocí kvantitativní real-time PCR pro následující geny: ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5 (*Abcg5*); early growth response 1 (*Egr1*); insulin-like growth factor binding protein 2 (*Igfbp2*); period homolog 2 (*Drosophila*) (*Per2*);

nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (*Nr1i3*); apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1 (*Apobec1*); apolipoprotein L, 3 (*Apol3*); insulin induced gene 1 (*Insig1*); aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*Arntl*). Tmavé sloupce odpovídají rozdílu exprese stanovovaného pomocí real-time PCR, bílé a šrafované sloupce ukazují rozdíl exprese na úrovni genů a jednotlivých exonů stanovený pomocí čipu.

Vnesení mutovaného *Cd36* do genomického pozadí inbredního modelu metabolického syndromu vedlo k zdánlivě diskrepantním změnám metabolického profilu spolu se zřetelnými změnami v jaterním transkriptomu. Analýza odhalila možné dráhy zprostředkovávající zlepšení inzulínové senzitivity a změny v lipidovém profilu. Syntéza nynějších výsledků s těmi získanými u dalších *Cd36*-deficientních kmenů indikuje, že eventuální metabolický efekt mutace jako např. u genu *Cd36* SHR původu není absolutní, ale jedná se spíše o funkci komplexních interakcí mezi prostředím a genomickým pozadím, na kterém mutace operuje.

4. Diskuze

Cílem této dizertační práce je využití nástrojů funkční a komparativní genomiky k odhalení patogeneze aspektů metabolického syndromu a jeho genetických determinant. V neposlední řadě jsme se zabývali farmakogenetickými interakcemi těchto genetických determinant s látkami ovlivňujícími jednotlivé složky metabolického syndromu. Všechny popsané projekty poskytly řadu cenných dat, která byla publikována v impaktovaných časopisech. Ukázali jsme, že funkční komparativní genomika poskytuje velmi cenný vhled do farmakogenetických interakcí jednotlivých genetických determinant metabolického syndromu a jeho složek.

I přes dosažené úspěchy naší práce jsme si vědomi omezení, která souvisí s provedením experimentů a s technickými limity funkční a komparativní genomiky.

Limity a omezení jednotlivých projektů

V prvním projektu jsme testovali hypotézu existence farmakogenetické interakce kyseliny all-*trans* retinové s diferenciálním segmentem chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-*Lx* PD5. Ustavili jsme modelový systém pro výzkum metabolických vedlejších účinků retinoidů, který je tvořen dvojicí kmenů SHR a SHR-*Lx* PD5 a stanovili jsme gen *Plzf* jako kandidátní gen pro pozorovanou interakci. Nicméně kromě genu *Plzf* se uvnitř diferenciálního segmentu nachází i geny *Htr3a* a *Htr3b*, které kódují 5-HT₃A a 5-HT₃B podjednotky 5-HT₃ receptoru. 5-HT₃ hraje roli v regulaci příjmu potravy (Savastano D.M., et al., 2007). 5-HT₃ receptory lokalizované v centrálním nervovém systému se také podílí na regulaci hladin glukózy (Carvalho F. et al., 2005). Sekvenovali jsme kódující oblasti obou podjednotek a identifikovali jsme několik variant v kódující oblasti těchto genů (Liška F. et al., 2009). Z tohoto důvodu nemůžeme vyloučit možnost účasti 5-HT₃A a 5-HT₃B na zprostředkování kmenových rozdílů v hmotnosti indukovaných RA (přes podobný příjem potravy) a v glukózové toleranci. Pokud je nám známo, žádný z dalších genů přítomných v diferenciálním segmentu nemá dosud zjištěnou spojitost s kyselinou all-*trans* retinovou a současně metabolismem sacharidů nebo lipidů. Dále jsme provedli transkriptomickou analýzu kosterního svalu u obou kmenů. Žádný ze sedmi genů, které jsou přítomné na diferenciálním segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR-*Lx* PD5, nevykázal změněnou expresi

v důsledku aplikace kyseliny all-*trans* retinové. Přesto nemůžeme vyloučit možnost kmenově-specifických změn v expresi genů diferenciálního segmentu v jiných typech tkání, které jsme netestovali (játra, tuková tkáň).

Cílem našeho druhého projektu bylo testování hypotézy existence farmakogenetické interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8. Jsme si vědomi několika limitací naší studie. Za prvé je to studie založená pouze na aplikaci ondansetronu v jediném dávkovacím režimu. Na základě předchozích studií jsme vybrali relativně vysokou dávku ondansetronu ve srovnání s lidskými klinickými studiemi, a to z důvodu poměrně nízké biodostupnosti ondansetronu u potkana (Yang S.H. a Lee M.G., 200). Kongenní kmen SHR.(PD/BN)8 může navíc nést kromě studované mutace více genetických variant relevantních pro interakci s podáním ondansetronu. Již dříve jsme zaznamenali, že mutovaný gen *Zbtb16* (též *Plzf* - promyelocytic leukemia zinc finger) u kmene PD/Cub je nejpravděpodobnějším kandidátem pro farmakogenetické interakce s dexametazonem (Šeda O. et al., 2005a) a kyselinou all-*trans* retinovou (viz kapitola 3.1.). Nicméně je nepravděpodobné, že tato mutace hraje důležitou roli u farmakogenetické interakce s ondansetronem. V současné době je známo 9 genů s potvrzenou interakcí k ondansetronu včetně 5-HT₃ receptorových podjednotek *HTR3A-E*, 5-HT₄ receptoru (*HTR4*), solute carrier family 22, member 2 (*SLC22A2*), sigma non-opioid intracellular receptor 1 (*SIGMARI*) a protein tyrosine phosphatase, receptor type S (*PTPRS*). Z těchto genů jsou v diferenciálním segmentu obsaženy pouze geny *Htr3a* a *Htr3b*. Zatím nemůžeme vyloučit další polymorfismy přítomné v diferenciálním segmentu, které by se mohly účastnit výrazné reakce na aplikaci ondansetronu. Polymorfismus v genu *Htr3b* u PD/Cub potkanů (Liška et al., 2009) zůstává nejpravděpodobnějším kandidátem pro pozorovanou farmakogenetickou interakci a právě na něj se zaměří naše další studie.

Cílem třetího projektu bylo určení role genu *Plzf* při vývoji hypertenze, hypertrofie levé srdeční komory a intersticiální fibrózy. V této studii jsme použili minimální kongenní kmen SHR-*Lx* PD5 k identifikaci genetických determinant predisponujících k hypertenzi, LVH a intersticiální fibróze. Srdeční hypertrofie a fibróza jsou obvykle považovány za sekundární znak poškození komor, jako je například tlakové přetížení způsobené hypertenzí. Na druhou stranu bylo demonstrováno, že prominentní roli v predispozici k srdeční hypertrofii a fibróze, nezávislých na krevním tlaku, mohou hrát genetické faktory. U kmene SHR-*Lx* PD5 jsme pozorovali signifikantní pokles intersticiální fibrózy a LVH, který byl

vzhledem k relativně malé redukci systolického krevního tlaku disproportční. Navíc u rekombinantních inbredních kmenů telemetrická měření systolického krevního tlaku nekorelují s intersticiální fibrózou nebo hmotností levé komory srdeční. Tato pozorování potvrzují, že predispozice k intersticiální fibróze a srdeční hypertrofii může být přednostně určena genetickými faktory a není sekundárním jevem variability krevního tlaku. Na druhou stranu větší rozdíl v LVH a fibróze může být zaviněn kumulativním efektem rozdílu krevního tlaku po delší časové období. Pro zodpovězení této otázky bude nutné kontinuální monitorování krevního tlaku po dobu 30 týdnů. Je možné, že pleiotropní účinky genu *Plzf* jsou zodpovědné za všechny fenotypické rozdíly, tedy snížení krevního tlaku, zlepšení LVH a intersticiální fibrózy. Nižší exprese protektivní alely genu *Plzf*, která obsahuje 3 kb delecii v intronu 2, potvrzuje, že deletovaná konzervovaná nekódující oblast může plnit roli enhanceru (Liška F. et al., 2009). Původ této delecce je v inbredním kmeni PD/Cub, ze kterého byl segment chromozomu 8, včetně mutantní PD alely, přenesen na genetické pozadí kmenů BN/Cub a SHR/Ola. S ohledem na naše znalosti je tato delecce intronu v genu *Plzf* unikátní pro kmen PD/Cub a není přítomna u žádných dalších normotenzních nebo hypertenzních potkaních kmenů.

Cílem čtvrtého projektu bylo testování hypotézy existence farmakogenetické interakce diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4. V první části jsme testovali farmakogenetickou interakci dexametazonu s kmenem BN.SHR4, který nese diferenciální segment chromozomu 4 ze spontánně hypertenzního kmene potkana SHR/OlaIpcv včetně mutovaného genu *Cd36* na genomickém pozadí kmene BN/Cub. Jednou z limitací této práce je možnost, že další geny v rámci diferenciálního segmentu mimo mutovaného genu *Cd36* mohou být zapojeny v mechanismu odlišné farmakogenetické odpovědi. V další části jsme vytvořili metabolický a transkriptomický profil *Cd-36* deficientních kongenních kmenů PD.SHR4a a PD.SHR4b. Je zjevné, že konečný metabolický efekt deficiencie genu *Cd36* je těsně svázán s určitým nastavením genomického pozadí (Šeda O. et al., 2003b; Šeda O. et al., 2002) a s faktory prostředí, především diety (Febbraio M. et al., 1999; Hajri T. et al., 2002; Kennedy D.J. et al., 2011; Koonen D.P.Y. et al., 2007) nebo medikace (Qi N. et al., 2002; Šeda O. et al., 2003a; Šeda O. et al., 2008). Z tohoto důvodu může být kontroverzní problém kauzálního vztahu mezi hladinou exprese genu *Cd36* a metabolickým účinkem vyřešen přijetím širšího konceptuálního rámce inkorporujícího další ekogenomické faktory. K posouzení vlivu *Cd36* a celého diferenciálního

segmentu za určitých nutričních a farmakologických změn, především vzhledem k naší předchozí dokumentaci nutrigenetických a farmakogenetických interakcí podobné genomické oblasti u kongenního kmene BN.SHR4 (Šeda O. et al., 2003a; Šeda O. et al., 2008), jsou potřeba další studie.

5. Závěr

Metabolický syndrom je jedno z nejčastějších onemocnění s multifaktoriální etiologií. V dnešní době, díky známé sekvenci potkaního, myšičího a lidského genomu, je možné využít metod komparativní a funkční genomiky pro studium jednotlivých molekulárních drah a mechanismů, které se na patogenezi komplexních znaků podílejí.

V této dizertační práci jsme využili metod komparativní a funkční genomiky k ustavení kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 jako vhodného modelu pro hyperlipidémii a glukózovou intoleranci indukovanou kyselinou retinovou a rovněž k farmakogenomické charakterizaci této interakce. Dále jsme stanovili kongenní kmen SHR.(PD/BN)⁸ jako užitečný experimentální nástroj pro farmakogenetickou a farmakogenomickou analýzu působení ondansetronu na metabolismus sacharidů a lipidů. Identifikovali jsme *Plzf* jako prominentní kandidátní gen při vývoji hypertenze, LVH a intersticiální fibrózy u kmene SHR. Rovněž jsme popsali kontextuálně podmíněný efekt mutovaného genu *Cd36* na metabolické parametry včetně jeho farmakogenetické interakce s podáním glukokortikoidů.

Funkční komparativní genomika v podobě experimentálních modelových organizmů poskytuje velmi cenný vhled do farmakogenetických interakcí jednotlivých genetických determinant metabolického syndromu a jeho složek. Získaná data lze využít pro validaci v klinických translačních studiích a v konečném důsledku mohou napomoci lepšímu porozumění zkoumaným farmakogenetickým interakcím, optimalizaci terapie nových nebo již zavedených léčiv a přispět tak k rozvoji personalizované medicíny.

6. Použitá literatura

- Abumrad N.A., el-Maghrabi M.R., Amri E.Z., Lopez E., Grimaldi P.A. (1993): Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* 268:17665–17668.
- Aitman T.J., Boone C., Churchill G.A., Hengartner M.O., Mackay T.F., Stemple D.L. (2011): The future of model organisms in human disease research. *Nat Rev Genet.* 12(8):575-82.
- Altman R.B., Kroemer H.K., McCarty C.A., Ratain M.J., Roden D. (2011): Pharmacogenomics: will the promise be fulfilled? *Nat Rev Genet.* 12(1):69-73.
- Carvalho F., Barros D., Silva J., Rezende E., Soares M., Fregoneze J., de Castro-E-Silva E. (2005): Hyperglycemia induced by pharmacological activation of central serotonergic pathways depends on the functional integrity of brain CRH system and 5-HT₃ receptors. *Horm Metab Res.* 37(8):482-8.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999): Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:399-430.
- Febbraio M., Abumrad N.A., Hajjar D.P., Sharma K., Cheng W., Pearce S.F., Silverstein R.L. (1999): A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274(27): 19055-19062.
- Ghosh D., Skinner M.A., Laing W.A. (2007): Pharmacogenomics and nutrigenomics: synergies and differences. *European Journal of Clinical Nutrition* 61: 567-574.
- Hajri T., Han X.X., Bonen A., Abumrad N.A. (2002): Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* 109(10): 1381-1389.
- Jellis C., Martin J., Narula J., Marwick T.H. (2010): Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 56(2):89-97.
- Kennedy D.J., Kuchibhotla S., Westfall K.M., Silverstein R.L., Morton R.E., Febbraio M. (2011): A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res* 89(3): 604-613.
- Koonen D.P., Jacobs R.L., Febbraio M., Young M.E., Soltys C-L.M., Ong H., Vance D.E., Dyck J.R. (2007): Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 56(12): 2863-2871.
- Křen V., Pravenec M., Lu S., Křenová D., Wang J.-M., Wang N., Merriouns T., Wong A., St. Lezin E., Lau D., Szpirer C., Szpirer J., Kurtz T.W. (1997): Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J. Clin. Invest.* 99, 577-581.
- Liška F., Šnajdr P., Šedová L., Šeda O., Chylíková B., Slámová P., Krejčí E., Sedmera D., Grim M., Křenová D., Křen V. (2009): Deletion of a conserved noncoding sequence in Plzf intron leads to Plzf down-regulation in limb bud and polydactyly in the rat. *Dev Dyn.* 238(3):673-84.

- Marx V. (2004): Pharmacogenomics shapes pediatrics' future. *Genomics and Proteomics* 4:12-18.
- O'Reilly K., Bailey S.J., Lane M.A. (2008): Retinoid-mediated regulation of mood: possible cellular mechanisms. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(3):251-8.
- Pardo Mindán F.J., Panizo A. (1993): Alterations in the extracellular matrix of the myocardium in essential hypertension. *Eur Heart J*. 14 Suppl J:12-4.
- Qi N., Kazdová L., Zidek V., Landa V., Křen V., Pershadsingh H.A., Lezin E.S., Abumrad N.A., Pravenec M., Kurtz T.W. (2002): Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem*. 277(50):48501-7.
- Savastano D.M., Hayes M.R., Covasa M. (2007): Serotonin-type 3 receptors mediate intestinal lipid-induced satiation and Fos-like immunoreactivity in the dorsal hindbrain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(3):R1063-70.
- Schefe J.H., Menk M., Reinemund J., Effertz K., Hobbs R.M., Pandolfi P.P., Ruiz P., Unger T., Funke-Kaiser H. (2006): A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res*. 99(12):1355-66.
- Šeda O., Šedová L., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2002): Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biol (Praha)* 48(3):81-8.
- Šeda O., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2003a): Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain. *Physiol Genomics*. 12(2):73-8.
- Šeda O., Liška F., Křenová D., Kazdová L., Šedová L., Zima T., Peng J., Tremblay J., Křen V., Hamet P. (2003b): Differential linkage of triglyceride and glucose levels on rat chromosome 4 in two segregating rat populations. *Folia Biol (Praha)* 49(6): 223-226.
- Šeda O., Liška F., Křenová D., Kazdová L., Šedová L., Zima T., Peng J., Pelinková K., Tremblay J., Hamet P., Křen V. (2005): Dynamic genetic architecture of metabolic syndrome attributes in the rat. *Physiol Genomics* 21: 243-252.
- Šeda O., Šedová L., Oliyarnyk O., Kazdová L., Křenová D., Corbeil G., Hamet P., Tremblay J., Křen V. (2008): Pharmacogenomics of metabolic effects of rosiglitazone. *Pharmacogenomics* 9(2):141-55.
- Senbonmatsu T., Saito T., Landon E.J., Watanabe O., Price E. Jr, Roberts R.L., Imboden H., Fitzgerald T.G., Gaffney F.A., Inagami T. (2003): A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2003 Dec 15; 22(24):6471-82.
- Taylor A.L., Ziesche S., Yancy C., Carson P., D'Agostino R. Jr, Ferdinand K., Taylor M., Adams K., Sabolinski M., Worcel M., Cohn J.N. (2004): Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med*. 2004 Nov 11; 351(20):2049-57.
- Weinshilboum R., Wang L. (2004): Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 739-748.

- Yang S.H., Lee M.G. (2008): Dose-independent pharmacokinetics of ondansetron in rats: contribution of hepatic and intestinal first-pass effects to low bioavailability. *Biopharm Drug Dispos* 29: 414-426.
- Yesner L.M., Huh H.Y., Pearce S.F., Silverstein R.L. (1996): Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:1019–1025.

7. Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem této dizertační práce:

Krupková M., Janků M., Liška F., Šedová L., Kazdová L., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2009). Pharmacogenetic model of retinoic acid-induced dyslipidemia and insulin resistance. *Pharmacogenomics* 10(12):1915-27. **IF = 3,857**

Krupková M., Liška F., Šedová L., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2014). Pharmacogenomic analysis of retinoic-acid induced dyslipidemia in congenic rat model. *PLoS ONE*, *v recenzním řízení*. (IF = 3,730)

Krupková M., Šedová L., Liška F., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2012). Differential effects of 5-HT₃ receptor antagonist on lipid profile in spontaneously hypertensive rat and chromosome 8 congenic strain. *Neuro Endocrinol Lett* 33 Suppl 2:43-9. **IF = 0,932**

Liška F., Mancini M., **Krupková M.**, Chylíková B., Křenová D., Šeda O., Šilhavý J., Mlejnek P., Landa V., Zídek V., d' Amati G., Pravenec M., Křen V. (2014). Plzf as a candidate gene predisposing the spontaneously hypertensive rat to hypertension, left ventricular hypertrophy, and interstitial fibrosis. *Am J Hypertens*. 27(1):99-106. **IF = 3,665**

Krupková M., Šedová L., Liška F., Křenová D., Křen V., Šeda O. (2010). Pharmacogenetic interaction between dexamethasone and Cd36-deficient segment of spontaneously hypertensive rat chromosome 4 affects triacylglycerol and cholesterol distribution into lipoprotein fractions. *Lipids Health Dis*. 9:38. **IF = 2,015**

Šedová L., Liška F., Křenová D., Kazdová L., Tremblay J., **Krupková M.**, Corbeil G., Hamet P., Křen V., Šeda O. (2012). CD36-deficient congenic strains show improved glucose tolerance and distinct shifts in metabolic and transcriptomic profiles. *Heredity (Edinb)*. 109(1):63-70. **IF = 4,110**