

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2014

Mgr. Michaela Krupková

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Michaela Krupková

FUNKČNĚ GENOMICKÁ A FARMAKOGENOMICKÁ ANALÝZA ASPEKTŮ
METABOLICKÉHO SYNDROMU

Functional genomic and pharmacogenomic analysis of metabolic syndrome aspects

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Šeda, PhD.

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.7.2014

Mgr. MICHAELA KRUPKOVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

KRUPKOVÁ, Michaela. *Funkčně genomická a farmakogenomická analýza aspektů metabolického syndromu. [Functional genomic and phamacogenomic analysis of metabolic syndrome aspects]*. Praha, 2014. Počet stran: 182, počet příloh: 6. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze. Školitel: Šeda, Ondřej

Poděkování

Práce byla vypracována v laboratořích Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze.

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Ondřeji Šedovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu, cenné rady a připomínky.

Ráda bych na tomto místě poděkovala také všem svým spolupracovníkům, bez nichž by nebyla má práce možná. Jsou to především PharmDr. Lucie Šedová, Ph.D., Michaela Janků a Mgr. Miloslava Hodúlová, které mi poskytly odbornou pomoc a inspiraci při řešení dílčích problémů dizertační práce. Moje poděkování patří i všem dalším výslovně nejmenovaným kolegům, technickým i administrativním pracovníkům.

Obsah

Seznam zkratk	8
Abstrakt	14
Abstract	15
1. Úvod	16
1.1. Metabolický syndrom	16
1.1.1. Původ konceptu a definice metabolického syndromu	17
1.1.2. Patofyziologie jednotlivých složek metabolického syndromu	17
1.1.3. Genetická složka metabolického syndromu	21
1.1.4. Metody zkoumání genetické složky metabolického syndromu	22
1.1.5. Systémová genetika	24
1.1.6. Teorie sítí	25
1.2. Komparativní genomika	26
1.3. Farmakogenetika a farmakogenomika	28
2. Cíle práce	30
3. Materiál a metody	31
3.1. Soubor experimentálních modelových kmenů laboratorního potkana	31
3.1.1. Experimentální modelové kmeny potkana	31
3.2. Molekulárně genetické metody	35
3.2.1. Izolace DNA	35
3.2.2. Izolace RNA	35
3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
3.2.4. Kvantitativní („real-time“) reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR)	36
3.2.5. Stanovení genové exprese pomocí čipů Affymetrix	36
3.3. Metabolická fenotypizace	37
3.3.1. Základní metabolické parametry	37
3.3.2. Obsah triglyceridů a cholesterolu v jaterní tkáni	37
3.3.3. Měření krevního tlaku	37
3.3.4. Histomorfometrická analýza srdce	38
3.4. Bioinformatické a statistické metody zpracování dat	38
3.4.1. Základní statistické metody	38

3.4.2.	Analýza transkriptomických dat.....	38
4.	Komentáře k publikacím.....	39
4.1.	Farmakogenetické interakce kyseliny all-trans retinové a diferenciálního segmentu chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-Lx PD5	39
4.1.1.	Farmakogenetická interakce retinoidů a znaků metabolického syndromu	39
4.1.2.	Ustanovení farmakogenetického modelu kyselinou retinovou indukované dyslipidémie a inzulínové rezistence.....	40
4.1.3.	Farmakogenomická analýza kongenního kmene SHR-Lx PD5 jako modelu kyselinou retinovou indukované dyslipidémie.....	48
4.2.	Farmakogenetická interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8.....	54
4.3.	Gen <i>Plzf</i> jako kandidátní gen predisponující spontánně hypertenzní kmen potkana k rozvoji hypertenze, hypertrofie levé komory a intersticiální fibrózy	60
4.4.	Farmakogenetická interakce diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4	65
4.4.1.	Farmakogenetická interakce dexametazonu a Cd-36 deficientního segmentu u chromozomu 4 ovlivňuje distribuci triacylglycerolů a cholesterolu do jednotlivých lipoproteinových frakcí.....	66
4.4.2.	Metabolický a transkriptomický profil Cd-36 deficientních kongenních kmenů PD.SHR4a a PD.SHR4b	69
5.	Diskuze	78
6.	Závěr	82
7.	Použitá literatura.....	83
8.	Seznam publikací.....	102
9.	Příloha – publikace	Chyba! Záložka není definována. 103
9.1.	Příloha I.....	Chyba! Záložka není definována. 103
9.2.	Příloha II.....	Chyba! Záložka není definována. 117
9.3.	Příloha III.	Chyba! Záložka není definována. 149
9.4.	Příloha IV.	Chyba! Záložka není definována. 157
9.5.	Příloha V.	Chyba! Záložka není definována. 166
9.6.	Příloha VI.	Chyba! Záložka není definována. 174

Seznam zkratek

(P)RR	(pro)reninový receptor
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
5-HT ₃	receptor 5-hydroxytryptaminu typu 3
5-HT ₄	receptor 5-hydroxytryptaminu typu 4
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ABCG5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE) member 5
ACACA	acetyl-koenzym A karboxyláza α
ADIPOQ	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
APOB	apolipoprotein B
APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
APOE	apolipoprotein E
APOL3	apolipoprotein L3
ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
AT ₁	receptor pro angiotensin II, typu 1
AT ₂	receptor pro angiotensin II, typu 2
ATII	angiotensin II
BMAL1	brain and muscle Arnt-like protein 1
BMI	body mass index
BN	kmen potkana Brown Norway
BTB/POZ	BR-C, tkk and bab / Pox virus and Zinc finger; doména genu <i>Plzf</i>

CD3	cluster of differentiation 3
CD28	cluster of differentiation 28
CD36	translokáza mastných kyselin; známá také jako FAT
CM	chylomikrony
CPT1B	karnitin palmitoyltransferáza 1b
CROT	karnitin O-oktanoyltransferáza
CRP	C reaktivní protein
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1
CTL	kontrolní skupina
CYP26A1	cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1
DEX	dexametazon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRD2	dopaminový receptor D2
EGIR	European Group for the study of Insulin Resistance
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENaC	epiteliální sodný kanál
ENDOG	endonukleáza G
eQTL	expression quantitative trait locus/loci
ERG1	ETS-related gene-1
F1	1. filiální generace
F2	2. filiální generace
FDR	False Discovery Rate

GRIA2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2
GWAS	celogenomová asociační analýza
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě; high density lipoprotein
C	cholesterol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSD	vysokosacharózová dieta
HTR3A	podjednotka A receptoru typu 3 pro 5-hydroxytryptamin (serotonin)
HTR3A-E	podjednotka A-E receptoru typu 3 pro 5-hydroxytryptamin (serotonin)
HTR3B	podjednotka B receptoru typu 3 pro 5-hydroxytryptamin (serotonin)
HTR4	receptor pro 5-hydroxytryptamin (serotonin), typu 4
HTR5A	podjednotka A receptoru typu 5 pro 5-hydroxytryptamin (serotonin)
IDF	International Diabetes Federation
IFG	zvýšená glukóza nalačno
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2
IGT	zhoršená glukózová tolerance
IL1	interleukin 1
IL1B	interleukin 1 β
IL2	interleukin 2
IL6	interleukin 6
INS1	insulin 1
INSIG1	insulin induced gene 1
INSIG2	insulin induced gene 2

IPA	Ingenuity Pathway Analysis
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
LDL	lipoprotein o nízké hustotě; low density lipoprotein
LPS	lipopolysacharid / interleukin 1
LVH	hypertrofie levé srdeční komory
LX	mutace Luxate u potkana
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaCl	chlorid sodný
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NFE2L2	nuclear factor, erythroid 2-like 2
NRLI3	nuclear-receptor subfamily 1, group 1, member 3
OGN	osteoglycin
OGTT	orální glukózový toleranční test
OND	ondansetron
p85 α	podjednotka fosfatidylinositol-3-kinázy
PAI1	plasmininogen-activator inhibitor 1
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD	polydaktylní kmen potkana
PER2	period homolog 2 (drosophila)
PER3	period homolog 3 (drosophila)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger

PPAR β/δ	peroxisome proliferator-activated receptor β/δ
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PTPRS	protein tyrosine phosphatase, receptor type S
PXR	pregnane X receptor
QTL	lokus kvantitativního znaku
RA	kyselina all- <i>trans</i> retinová
RAR α	retinoic acid receptor α
RDH11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)
RMA	Robust Multichip Average
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RXR	retinoid X receptor
SHR	spontánně hypertenzní kmen potkana
SIGMAR1	sigma non-opioid intracellular receptor 1
SIRT3	sirtuin 3
SLC22A2	solute carrier family 22, member 2
SMCR7	mitochondrial elongation factor 2 (<i>Mief2</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
STD	standardní dieta
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
TG	triacylglycerol
TGFB1	transforming growth factor, beta 1

TMPRSS5	transmembrane protease, serine 5
TNF α	tumor necrosis factor α
TPMT	thiopurin S-metyltransferáza
USP28	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě; very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization
WT	„wild type“
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16
ZW10	kinetochorový protein

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

K fenotypovému projevu multifaktoriálních znaků a onemocnění člověka výrazně přispívá genetická složka a faktory prostředí. Genetická složka těchto komplexních znaků vykazuje v běžné lidské populaci poměrně vysokou variabilitu, což společně s dalšími faktory komplikuje jejich detailní genetickou analýzu. Z tohoto důvodu jsou využívány experimentální modelové organizmy, které nesou příslušný fenotypický znak nebo onemocnění.

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. Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je prevalentní onemocnění, charakterizované současnou manifestací inzulinové rezistence, obezity, dyslipidémie, hypertenze a dalších hemodynamických a metabolických poruch. Jedná se o multifaktoriální onemocnění s relativně vyrovnanou složkou dědičnou a složkou prostředí, která zahrnuje faktory jako je například strava, úroveň fyzické aktivity, kouření, výchova (Cameron A.J. et al., 2004) nebo spánkový režim (Mesarwi O. et al., 2013). Z toho vyplývá komplikovanost detailní genetické analýzy metabolického syndromu v obecné lidské populaci.

1.1.1. Původ konceptu a definice metabolického syndromu

Původ konceptu metabolického syndromu sahá do dvacátých let 20. století, kdy byla poprvé zjištěna asociace hypertenze, hyperglykémie a dny (Kylin E., 1923; Kaur J., 2014). V následujících letech došlo k přidání dalších kauzálních souvislostí spojených s metabolickými abnormalitami, které byly nalezené u pacientů trpících kardiovaskulárním onemocněním nebo diabetem 2. typu. K výraznému posunu v dané oblasti pak došlo v roce 1988, kdy Reaven popsal skupinu rizikových faktorů spojených s kardiovaskulárním onemocněním a diabetem a pojmenoval je společným názvem jako „syndrom X“ (Reaven G.M., 1988).

První definice metabolického syndromu vznikla v roce 1998 v rámci WHO (World Health Organization). V rychlém sledu následovala další skupina definic, z nichž nejčastěji používané jsou definice European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR, 1999), definice National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III report (NCEP ATP III, 2001), definice American Association of Clinical Endocrinologists (AACE, 2003), případně celosvětová konsenzuální definice International Diabetes Federation (IDF, 2005). Posledně jmenovaná zavádí geoetnicko-specifická kritéria pro stanovení prahových hodnot jednotlivých složek metabolického syndromu (Tabulka 1).

Ačkoliv všechny výše zmíněné definice nesly určité společné rysy, existují parametry, ve kterých se lišily. Jednalo se především o absenci nebo přítomnost inzulínové rezistence. To vedlo k problémům s použitím zmíněných definic v běžné klinické praxi díky jejich neuniformitě. Z tohoto důvodu došlo v roce 2009 po dohodě předních světových organizací k vytvoření unifikující definice metabolického syndromu (Tabulka 2). Definice stanovuje 5 rizikových faktorů. Jedná se o abdominální obezitu, kde jsou prahové hodnoty stanoveny na základě geo-etnických hledisek, zvýšenou hladinu triacylglycerolů, nízkou hladinu HDL cholesterolu, zvýšený krevní tlak a zvýšenou lačnou glykémii. V rámci této definice je u pacientů diagnostikován metabolický syndrom, jestliže splňují 3 a více z uvedených pěti rizikových faktorů (Alberti K.G. et al., 2009).

1.1.2. Patofyziologie jednotlivých složek metabolického syndromu

Mezi nejvýznamnější komponenty metabolického syndromu patří abdominální obezita, inzulínová rezistence, dyslipidémie a hypertenze. Každá z těchto složek má podstatný podíl na vytvoření symptomů metabolického syndromu.

Klinické kritérium	WHO (1998)	EGIR (1999)	ATPIII (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)
inzulínová rezistence	IGT, IFG, T2DM nebo snížená inzulínová senzitivita + jakékoliv 2 z následujících znaků	hladina inzulínu v plazmě > 75. percentil + jakékoliv 2 z následujících znaků	žádná, ale jakékoliv 3 z následujících 5 znaků	IGT nebo IFG + jakékoliv z následujících znaků v závislosti na klinickém uvážení	žádná
abdominální obezita	muži: > 0,90 (poměr pas/boky) ženy: > 0,85 (poměr pas/boky) a/nebo BMI > 30 kg/m ²	muži: ≥ 94 cm (obvod pasu) ženy: ≥ 80 cm (obvod pasu)	muži: ≥ 102 cm (obvod pasu) ženy: ≥ 88 cm (obvod pasu)	BMI ≥ 25 kg/m ²	zvětšený obvod pasu (populačně specifické) + jakékoliv 2 z následujících znaků
lipidy	TG ≥ 150 mg/dL a/nebo HDL-C < 35 mg/dL u mužů nebo HDL-C < 39 mg/dL u žen	TG ≥ 150 mg/dL a/nebo HDL-C < 39 mg/dL u mužů nebo u žen	TG ≥ 150 mg/dL HDL-C < 40 mg/dL u mužů nebo < 50 mg/dL u žen	TG ≥ 150 mg/dL a HDL-C < 40 mg/dL u mužů nebo < 50 mg/dL u žen	TG ≥ 150 mg/dL nebo hypolipidemická léčba HDL-C < 40 mg/dL u mužů nebo < 50 mg/dL u žen nebo HDL-C léčba
krevní tlak	≥ 140/90 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg nebo antihypertenzní léčba	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130 mm Hg systolický tlak nebo ≥ 85 mm Hg diastolický tlak nebo antihypertenzní léčba
glukóza	IGT, IGF nebo T2DM	IGT nebo IFG (bez diabetu)	> 110 mg/dL (včetně diabetu)	IGT nebo IFG (bez diabetu)	≥ 100 mg/dL (včetně diabetu)
další	mikroalbuminurie: rychlost exkrece močí > 20 mg/min nebo poměr albumin:kreatinin > 30 mg/g			další znaky inzulínové rezistence ^a	

Tabulka 1: Srovnání diagnostických kritérií v rámci jednotlivých definic metabolického syndromu. Převzato z Kaur J., 2014. BMI : body mass index, HDL-C : HDL cholesterol, IFG : zvýšená glukóza nalačno, IGT: zhoršená glukózová tolerance, TG: triacylglyceroly, T2DM: diabetes mellitus 2. typu. ^a familiární výskyt diabetu mellitu 2. typu, syndrom polycystických ovárií, sedavý způsob života, vyšší věk, etnická skupina citlivá k diabetu mellitu 2. typu

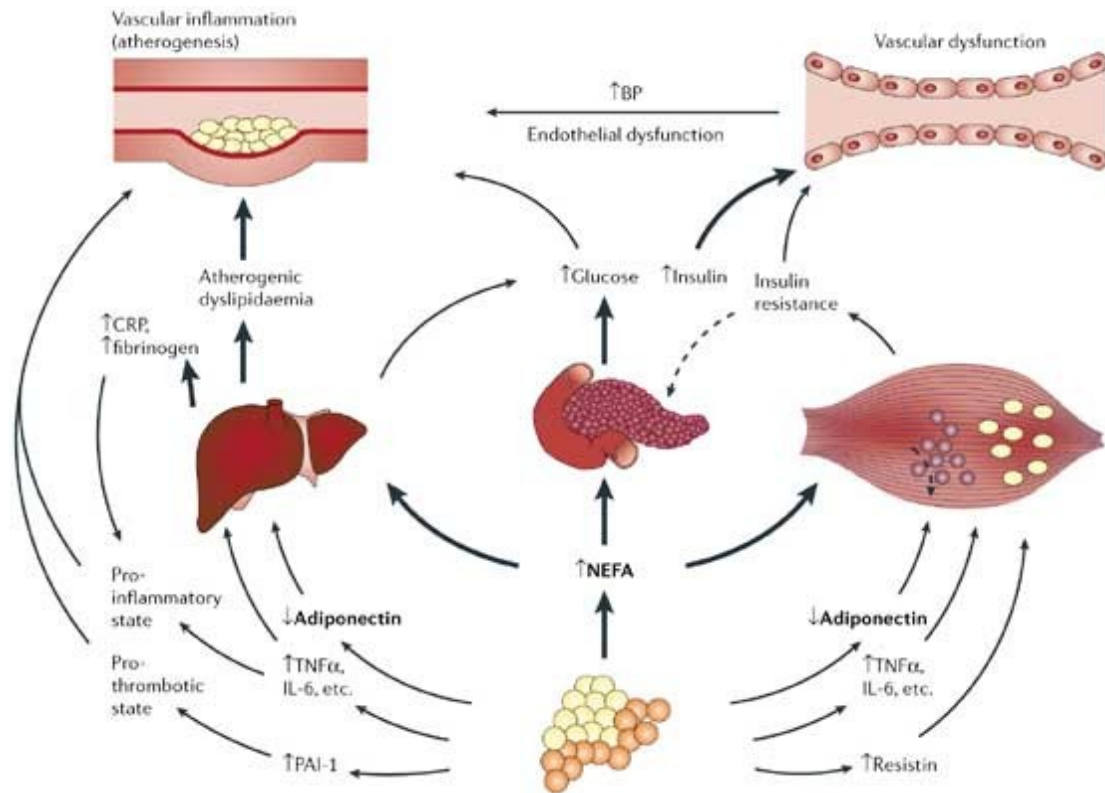
Abdominální obezita je primárně způsobena vyšším energetickým příjmem a současně sníženou fyzickou aktivitou. Tuková tkáň velmi rychle a dynamicky reaguje na nadbytek živin a výsledkem je její hypertrofie a hyperplázie, která v konečném důsledku vede k hypoxii tukové tkáně (Halberg N. et al., 2008). Hypoxie iniciuje nekrózu a infiltraci tkáně makrofágy. Odpovědí je produkce adipocytokinů, mezi které patří glycerol, neesterifikované mastné kyseliny, prozánětlivé mediátory (TNF α , IL-6) a CRP (Lau D.C.W. et al., 2005). Adipocytokiny integrují endokrinní, parakrinní a autokrinní signalizaci. Současně se podílí na mnoha procesech, které zahrnují inzulínovou senzitivitu, energetický metabolismus, srážení krve nebo zánětlivou odpověď (Obrázek 1). Tuková tkáň tak neslouží pouze ke skladování lipidů, ale je také významným endokrinním orgánem uvolňujícím řadu cytokinů a ovlivňujícím metabolismus organismu (Haluzík M. et al., 2014).

Kritéria	Prahové hodnoty
Abdominální obezita	Definována na základě geo-etnické příslušnosti -> pro evropskou populaci: muži (≥ 102 cm); ženy (≥ 88 cm)
TG	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) nebo hypolipidemická léčba
HDL cholesterol	Muži: < 40 mg/dL (1,0 mmol/L) Ženy: < 50 mg/dL (1,3 mmol/L)
Krevní tlak	Systolický: ≥ 130 mm Hg Diastolický: ≥ 85 mm Hg nebo antihypertenzní léčba
Glykémie nalačno	≥ 100 mg/dL

Tabulka 2: Kritéria unifikující definice metabolického syndromu. Převzato z Alberti et al. 2009.

Inzulínová rezistence je definována jako patofyziologický stav, kdy normální hladiny inzulínu nevedou ke správné inzulínové odpovědi v cílových tkáních, například tukové tkáni, svalch či játrech (Gill H. et al., 2005). Neschopnost β buněk pankreatu vytvořit dostatečné množství inzulínu pro korekci inzulínové rezistence vede v konečném důsledku ke

vzniku diabetu 2. typu. Ačkoliv jedinci s inzulínovou rezistencí nemusí klinicky trpět obezitou, vykazují často abnormální distribuci tuku přednostně v abdominální oblasti (Jensen M.D. et al., 1989).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Obrázek 1: Obezita a metabolický syndrom. Tuková tkáň obézních osob produkuje řadu adipocytokinů, které přispívají k vývoji metabolického syndromu. V důsledku lipolýzy triacylglycerolů dochází k uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin a k ektopické akumulaci lipidů, což v konečném důsledku vede k rozvoji inzulínové rezistence, aterogenní dyslipidémie a hyperinzulinémie. Dalšími důležitými adipocytokiny jsou PAI1, TNFα, IL6 a rezistin, které hrají roli při vzniku prozánětlivého a protrombotického stavu a také inzulínové rezistence. Obezita rovněž vede k snížení hladiny adiponektinu, což má opět vliv na inzulínovou rezistenci. Převzato z Grundy S.M. 2006.

Dyslipidémie je charakterizována abnormální distribucí lipidů. Ta představuje změnu ve struktuře, metabolismu a biologické aktivitě lipoproteinů a HDL cholesterolu. Inzulínová rezistence přispívá ke vzniku dyslipidémie několika způsoby. Zaprvé, inzulín za normálních podmínek suprimuje lipolýzu v adipocytech. Inzulínová rezistence vede k vzestupu lipolýzy a vzrůstu hladin neesterifikovaných mastných kyselin. Ty slouží v játrech jako substrát pro syntézu triacylglycerolů a také stabilizují tvorbu apoB, který je hlavním lipoproteinem VLDL částic. Za druhé, inzulín hraje roli v degradaci apoB prostřednictvím PI3K-dependentní dráhy. Rezistence tak opět vede k vzestupu hladin VLDL částic. Za třetí, inzulín reguluje aktivitu lipoproteinové lipázy. VLDL částice jsou konvertovány na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), které jsou vycytávány receptorem LDL. Jak VLDL, tak LDL částice mají aterogenní účinek. Triacylglyceroly uvolněné z VLDL obohacují HDL částice a ty pak představují lepší substrát pro jaterní lipázu. Výsledkem je jejich nižší koncentrace. Dyslipidémie asociovaná s inzulínovou rezistencí je přímým důsledkem zvýšené sekrece VLDL částic v játrech (Hegele R.A., 2009).

Hypertenze je často asociována s řadou metabolických abnormalit, jako je obezita, inzulínová rezistence nebo dyslipidémie. Hyperglykémie a hyperinzulinémie vedou k aktivaci renin-angiotensinového systému prostřednictvím zvýšení exprese angiotensinogenu, angiotensinu II (AT II) a AT₁ receptoru (Malhotra A. et al., 2001). V nedávné době bylo zjištěno, že adipocyty v závislosti na AT II produkují aldosteron a tak mohou představovat jakousi zmenšenou verzi systému renin-angiotensin-aldosteron (Briones A.M. et al., 2012).

1.1.3. Genetická složka metabolického syndromu

Metabolický syndrom se řadí ke komplexním onemocněním a předpokládá se u něj polygenní dědičnost. Jeho genetická komponenta je výslednicí působení více genů, které interagují mezi sebou a s faktory vnějšího prostředí. Každý z těchto genů však variabilitu znaku ovlivňuje pouze v malém rozsahu. Všechny komponenty metabolického syndromu jsou velmi výrazně ovlivněny genetickými faktory. Velká variabilita v citlivosti a v nástupu onemocnění u jednotlivců s podobným rizikovým profilem svědčí o rozsáhlé interakci mezi genetickými faktory a faktory prostředí. Je pravděpodobné, že každý rizikový faktor metabolického syndromu částečně spadá pod svou vlastní genetickou kontrolu, která je ovlivněna řadou vnějších faktorů.

Častým jevem komplexních onemocnění je výskyt neúplné penetrance. V tomto případě u nositelů disponujících alel nedojde k manifestaci daného onemocnění. Důvodem může být ochranné působení alel dalších genů a interakcí, případně příznivý vliv složky prostředí (životní styl).

Dosavadní výsledky potvrzují předpoklad, že populace různých etnik vykazují rozdílnou roveň a distribuci znaků metabolického syndromu. Odpovědné geny se tak do určité míry liší a význam jednotlivých variant bude mít v různých populacích jinou míru relevance pro výsledný fenotyp. Podstatně menší heterogenitu vykazují tzv. populační izoláty, tedy populace izolované geograficky, kulturně nebo nábožensky, které v mnohých případech historicky vznikly jen z velmi omezeného počtu původních zakladatelů (Hamet P. et al., 2005).

Podle hypotézy „šetrného fenotypu“ (Hales C.N. a Barker D.J.P., 1992) novorozenci, kteří byly během intrauterinního vývoje vystaveni podvýživě, se adaptují na dané podmínky snížením energetického výdaje. Tyto metabolické adaptace jsou výhodné pro jedince s nízkým energetickým příjmem během dětství a v dospělosti. V případě zvýšeného příjmu potravy ztrácí adaptace svou výhodnost a v dospělosti mohou vést ke zvýšení rizika metabolického syndromu. Hypotéza zdůrazňuje význam prenatálního a perinatálního vývoje pro tvorbu metabolického syndromu, případně jeho složek. I toto tzv. metabolické programování je ovšem do určité míry závislé na genetickém pozadí, na kterém se odehrává (Burešová et al., 2006; Šedová et al., 2007).

1.1.4. Metody zkoumání genetické složky metabolického syndromu

Donedávna spočívaly veškeré naše znalosti týkající se komplexních onemocnění, kam se řadí i metabolický syndrom, pouze na studiích mendelistických znaků člověka a na biochemicky definovaných kandidátních genech. Hovoříme o tzv. funkčním klonování, kdy známe vztah daného genu ke konkrétnímu onemocnění nebo znaku. Kandidátní geny jsou pak podrobeny důkladné genetické a molekulární analýze a zjišťuje se asociace jejich polymorfismů s daným onemocněním, případně znakem. Ačkoliv tyto studie daly základ experimentálnímu zkoumání metabolického syndromu, nemohly vysvětlit vzájemnou interakci genů nebo interakci mezi geny a prostředím. Tato oblast se začala rozvíjet až s nástupem vazebného mapování a celogenomových asociačních analýz. V takovém případě hovoříme o tzv. pozičním klonování, kde pomocí vazebné analýzy je definována oblast

genomu, která ovlivňuje variabilitu zkoumaného znaku. V ideálním případě je výsledkem pozičního klonování identifikace kauzálního polymorfismu. V současné době dochází k nástupu integrativního přístupu ve formě systémové biologie a teorie sítí.

Pro úspěšnou identifikaci genetických variant významně ovlivňujících metabolický syndrom je nezbytné, aby kromě detailní genetické charakterizace bylo možné co nejpřesněji určit i studovaný fenotyp. To je u metabolického syndromu jako celku obzvláště komplikované, neboť i na základě konsenzuální definice zmíněné výše existuje celá řada částečně se překrývajících kombinací klinických entit, splňujících definici syndromu. Proto se většinou přistupuje k analýze dílčích „endofenotypů“, případně k různým formám multivariantní regrese, analýzy hlavních komponent či jejich kombinaci (Mei H. et al., 2010).

1.1.4.1. Vazebná analýza

Vazebná analýza neboli mapování lokusů kvantitativních znaků (QTL) je založena na principu genové vazby, kdy QTL je vázáno v blízkosti „marker“ genu. Prediktivní markery se nacházejí ve velmi těsné blízkosti kauzálního lokusu a segregují společně. Čím blíže se oba lokusy nacházejí, tím nižší je mezi nimi pravděpodobnost rekombinace. Pro genotypizaci se nejčastěji používají stovky anonymních markerů rozmístěných po celém genomu, charakterizujících polymorfismy s vysokou mírou heterozygocie, která je základem pro informativnost analýzy. Jako nejčastější molekulární markery jsou využívány mikrosatelity, polymorfní inserce a delece (indely) a jednonukleotidové polymorfismy (SNP). Mapování QTL se skládá ze dvou složek, detekce a lokalizace (Mackay T. et al., 2009). Počet použitých markerů závisí na vazebné nerovnováze. Při vysoké vazebné nerovnováze jich stačí menší počet. Nicméně v takovém případě je pak daleko obtížnější přesně dané QTL lokalizovat (Carbone M.A. et al., 2006).

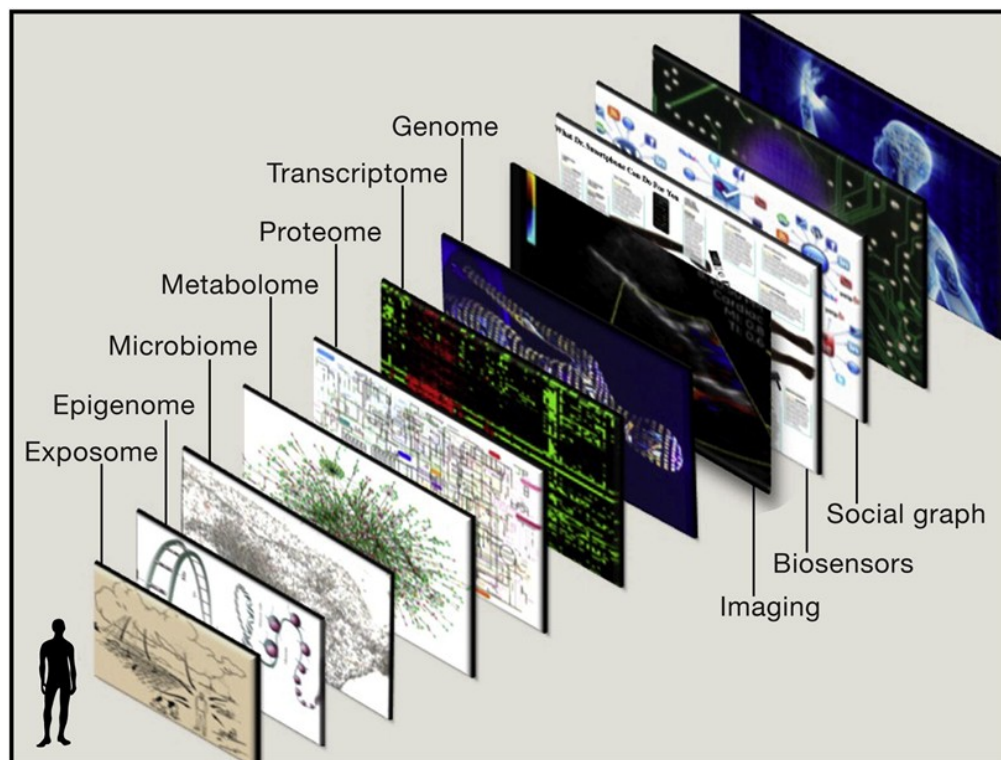
1.1.4.2. Celogenomové asociační studie (GWAS)

Celogenomové asociační studie využívají rozsáhlý soubor jednonukleotidových polymorfismů k testování vztahu mezi konkrétní alelou, genotypem nebo případně haplotypem a onemocněním. Většinou mají charakter „case-control“ (případ-kontrola). Stanovují se rozdíly ve frekvencích alel mezi pacienty se specifickým onemocněním nebo mezi jedinci s určitým znakem („case“) a kontrolní skupinou, u které se dané onemocnění nebo znak nevyskytuje (Kruglyak L., 2008). Pokud je i při zachování zásad správného výběru obou skupin a po statistickém odfiltrování falešně pozitivních výsledků nalezena asociace mezi zkoumanou genetickou variantou a onemocněním, lze vyslovit předpoklad, že tato alela

nějakým způsobem s onemocněním souvisí, nebo je ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) se skutečnou kauzální alelou a slouží tedy víceméně jako její marker. S množstvím testovaných polymorfismů prudce narůstá riziko falešně pozitivních pozorování a je třeba velké opatrnosti při interpretaci výsledků těchto studií (McCarthy M.I. et al., 2008).

1.1.5. Systémová genetika

Systémová genetika se snaží o integraci transkripčních, proteinových a metabolických dat (Obrázek 2) a poskytuje tak globální pohled na molekulární strukturu komplexních znaků a onemocnění (Civelek M. a Lusic A.J., 2014).



Obrázek 2: Systémově biologický pohled na komplexní znaky u člověka.

Převzato z Topol, 2014.

Míra transkripce, stejně jako jiné kvantitativní znaky, může být mapována pomocí vazebných či asociačních studií k příslušným lokusům v genomu. Genomické oblasti, které jsou asociovány s úrovní transkripce, se nazývají eQTL (expression quantitative trait loci). Lokusy regulující expresi genu ve stejné oblasti se označují jako *cis*-eQTL, zatímco lokusy ovlivňující expresi genů ve vzdálených lokusech, umístěných často i na jiném chromozomu, se nazývají *trans*-eQTL (Breitling R. et al. 2008). Na základě dosud provedených studií je odhadováno, že eQTL ovlivňují expresi více než 30 % genů (van Nas A. et al., 2010). Je

proto vysoce pravděpodobné, že primární základ variability komplexních znaků je způsoben genetickými variantami měnícími genovou expresi spíše než těmi, které mění sekvenční proteiny. Nedávná data ukázala, že většina eQTL se nachází v oblastech rozvolněného chromatinu (Degner J.F. et al., 2012), metylovaných oblastech (Bell J.T. et al., 2011) nebo v oblastech vazby transkripčních faktorů (Gaffney D.J. et al., 2012).

Studie provedené u myši a kvasinek potvrzují, že pouze malá část celkové variace proteinů mezi jedinci v běžné populaci může být vysvětlena variabilitou na úrovni exprese (Foss E.J. et al., 2007). Korelace mezi hladinou více než 500 studovaných proteinů a jejich odpovídajícími transkripty zjišťovaná u 100 kmenů laboratorních myši se pohybovala okolo 27 % (Ghazalpour A. et al., 2011). V současné době je známo více než 200 posttranslačních modifikací proteinů, které se účastní signalizační kaskády (Krishna R.G. a Wold F., 1993).

Metabolomika je v současné době velmi dynamicky se vyvíjející odvětví, které využívá především metod hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické resonance k objasnění metabolických procesů. Metabolické profilování je jednou z dalších úrovní jak integrovat genetické a environmentální faktory přispívající ke komplexním znakům. V současné době probíhá snaha o katalogizaci všech metabolitů v lidském těle (Human Metabolome Project) a také o katalogizaci lipidových metabolitů a drah (LIPID MAPS) (Patti G.J. et al., 2012).

Všechny výše zmíněné úrovně jsou spolu navzájem propojené množstvím interakcí. Budoucnost systémové genetiky spočívá ve snaze tyto interakce vysvětlit.

1.1.6. Teorie sítí

Pokrok v oblasti systémové genetiky vedl k úvahám o vhodnosti použití tzv. teorie sítí (network theory) ve vyhledávání nejvhodnějších kandidátních genů ovlivňujících komplexní znaky. Jedná se o grafickou prezentaci interakcí mezi jednotlivými molekulárními znaky. Jednotlivé molekuly představují „uzly“ (nodes), které jsou vzájemně propojeny. Prvky propojující tyto uzly jsou do jisté míry redundantní. Pokud je funkce uzlů zásadně ovlivněna (např. mutací nebo terapeutickou aktivací či inhibicí), mění se chování celé sítě, které pak můžeme pozorovat na klinické úrovni (Barabási A.L. a Oltvai Z.N., 2004). K odкрыtí vztahů a regulačních interakcí je využívána řada algoritmů na bázi regresních modelů, lineárních a nelineárních korelací, Bayesových sítí, informační teorii, maximalizaci entropie, grafickém Gausovském modelování nebo na kombinaci všech těchto algoritmů (Marbach D. et al.,

2012). Aplikace teorie sítí na již získané informace z oblasti biochemie i genetiky stejně tak jako její inkorporace do metod, generujících obrovské množství dat u každého jedince ze zkoumané skupiny (čipy) by tak mohla urychlit identifikaci hlavních genetických determinant metabolického syndromu.

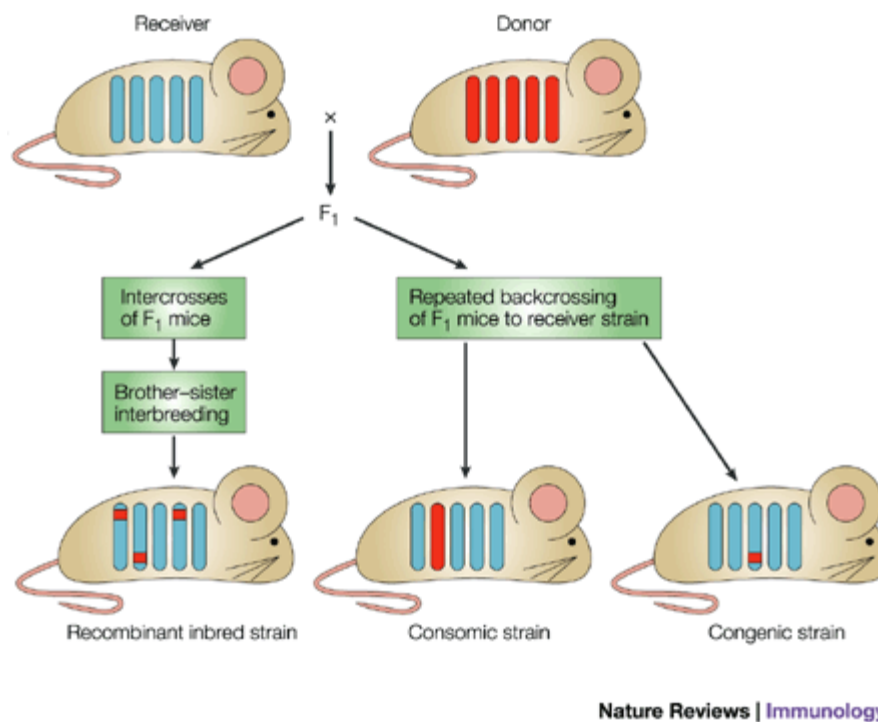
1.2. Komparativní genomika

Celogenomové asociační studie člověka poskytly přímý postup pro nalezení genetických asociací pro komplexní znaky a onemocnění. Nicméně identifikace kauzálních genů a odhalení molekulárního mechanismu jejich působení zůstává velmi komplikovanou problematikou. Konkrétní polymorfismy zjištěné u GWAS jsou většinou pouze malého účinku a dokáží vysvětlit pouze malou část celkové heritability znaku. Navíc variabilita prostředí společně s outbredním a heterogenním charakterem lidské populace redukuje možnost detekovat mezigenové interakce a interakce mezi geny a prostředím (Hunter D.J., 2005). V konečném důsledku nesmíme v oblasti lidské genetiky zapomínat ani na etickou a technickou stránku věci.

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.



Obrázek 3: Vytváření rekombinantních inbredních, konsomických a kongenních kmenů. Převzato z Rogner U.C. a Avner P. 2003.

Mezi nejčastěji využívané typy experimentálních kmenů laboratorního potkana a myši patří (Peters L.L. et al., 2007) (Obrázek 3) :

- 1) Inbrední kmeny vznikají systémem páření bratr x sestra po více než 20 generací, kdy všichni jedinci jsou odvozeni z jediného páru. Výsledkem takového inbredu jsou jedinci geneticky identičtí a homozygotní ve všech lokusech.
- 2) Kongenní kmeny vznikají cíleným vnesením části genomu jednoho inbredního kmene na genetické pozadí druhého inbredního kmene. Protože se jedná současně i o kmen inbrední, je tzv. diferenciální segment jediným genetickým rozdílem mezi kmenem, na jehož genetické pozadí byl segment vložen, a novým kongenním kmenem.

Jakákoliv odlišnost ve fenotypickém znaku je potom s vysokou pravděpodobností spojena s geny uloženými na diferenciálním segmentu (Markel P. et al, 1997).

- 3) Konsomické kmeny vznikají cíleným vnesením celého chromozomu jednoho inbredního kmene na genetické pozadí kmene druhého. Jedná se tedy o speciální skupinu kongenních kmenů, kde diferenciální segment představuje celý chromozom.
- 4) Rekombinantní inbrední kmeny vznikají komplikovaným systémem křížení. Nejdříve vzájemným spojením dvou inbredních kmenů vytvoříme první filiální generaci F1. Jejich křížením získáme druhou filiální generaci F2, kde dochází k segregaci alel obou parentálních kmenů. Z F2 populace jsou náhodně vybrány páry, které dají vznik budoucím rekombinantním inbredním kmenům. Opakovaným křížením bratr x sestra po více než 20 generací je ustanoven inbrední stav. Nový kmen je homozygotní ve všech lokusech a je unikátní kombinací genomů původních parentálních kmenů (Flint J. a Eskin E., 2012).

Genetika laboratorního potkana zaznamenala v nedávné době výrazný vývoj, který souvisí se založením velkých mezinárodních konsorcií, které se podíleli na sekvenaci genomu laboratorního potkana, a také s rozvojem technik cílené modifikace genomu u potkana. V posledních letech bylo vytvořeno okolo 54 „knockoutů“. U některých z nich již byl analyzován fenotyp a byla zjištěna vyšší podobnost k lidským onemocněním než u odpovídajících knockoutů u myši (Jacob H.J. et al., 2010).

1.3. Farmakogenetika a farmakogenomika

Pojem farmakogenomika je relativně nový. V literatuře se objevil v roce 1997 (Marshall A., 1997). Zabývá se 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 znaků, 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). Klasickým příkladem je polymorfismus v genu pro thiopurin S-metyltransferázu (*TPMT*), která se podílí na metabolismu thiopurinů a ovlivňuje tak působení léčiv jako je merkaptopurin a azathiopurin (Evans W.E. et al., 2001).

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 antidepressiva 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. Materiál a metody

3.1. Soubor experimentálních modelových kmenů laboratorního potkana

Všechny postupy zahrnující práci s experimentálními modely byly prováděny v souladu s platnou legislativou ČR a EU na ochranu zvířat. Protokoly všech zde popisovaných experimentů byly schváleny Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.1.1. Experimentální modelové kmeny potkana

3.1.1.1. Polydaktylní kmen potkana PD/Cub

Polydaktylní kmen potkana PD/Cub (Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu>), Rat Genome Database ID 728161; Cub: Charles University, Institute of Biology, byl vytvořen z geneticky nehomogenního kmene Wistar, u kterého byla zachycena spontánní mutace vedoucí k malformaci končetin a vzniku syndromu polydaktylie-luxace. Mezi základní fenotypové znaky syndromu patří preaxiální polydaktylie končetin a postižení kostí bérce, projevující se „luxací“ zadních končetin. Kmen PD/Cub je od roku 1969 chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN systémem cíleného křížení bratr x sestra po více než 90 generací (Křen V., 1975). Syndrom polydaktylie-luxace je způsoben mutantní alelou *Lx*, která je lokalizována na chromozomu 8. Tento kmen byl rovněž ustaven jako model hypertriglyceridémie (Vrána A. et al., 1993) a metabolického syndromu (Šedová L. et al., 2000), včetně farmakogenomických aspektů tohoto syndromu (Šedová L. et al., 2004; Šeda O. et al., 2008).

3.1.1.2. Kmen Brown Norway (BN/Cub)

Kmen Brown Norway (BN/Cub), Rat Genome Database ID 737899, pochází z divoce žijících potkanů odchycených v roce 1917 v USA a následně chovaných odděleně od ostatních kmenů. Od roku 1964 je tento kmen chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN systémem cíleného křížení bratr x sestra po více než 90 generací. Kmen BN/Cub je často využíván jako kontrolní kmen u metabolických a fyziologických studií. Genom tohoto kmene byl plně sekvenován (Gibbs RA et al., 2004) a již několik let probíhá systematická analýza jeho fenomu (Kwitek AE et al., 2006).

3.1.1.3. Spontánně hypertenzní kmen potkana (SHR/OlaIpcv)

Spontánně hypertenzní kmen potkana SHR/OlaIpcv, Rat Genome Database ID 631848, byl vytvořen v roce 1963 v Japonsku selektivním křížením geneticky nehomogenního potkaního kmene Wistar (Okamoto K., Aoki K., 1963). Jedná se o nejčastěji využívaný model lidské esenciální hypertenze. Hypertenze se u tohoto kmene vyskytuje společně s dalšími atributy metabolického syndromu. V roce 1999 byla u kmene SHR identifikována komplexní přestavba genu *Cd36/Fat* kódujícího receptor mastných kyselin, který se podílí na transmembránovém přenosu mastných kyselin s dlouhým řetězcem v tukové tkáni, srdečním a příčně pruhovaném svalstvu. SHR nese deleční mutaci tohoto genu, což vede k téměř úplnému chybění exprese normálního proteinu Cd36 (FAT) v membráně adipocytů (Aitman et al., 1999). Genom tohoto kmene byl rovněž sekvenován (Simonis S. et al., 2012).

3.1.1.4. Kongenní kmen BN-Lx/Cub

Kongenní kmen BN.PD-(*D8Rat39-D8Rat35*)/Cub (BN-Lx/Cub), Rat Genome Database ID 728144, byl vytvořen vnesením diferenciálního segmentu chromozomu 8 z kmene PD/Cub na genetické pozadí kmene BN/Cub metodou zpětného křížení (Křen 1975, Křen et al. 1995, Křen et al. 1996).

3.1.1.5. Kongenní kmen SHR-Lx/Cub

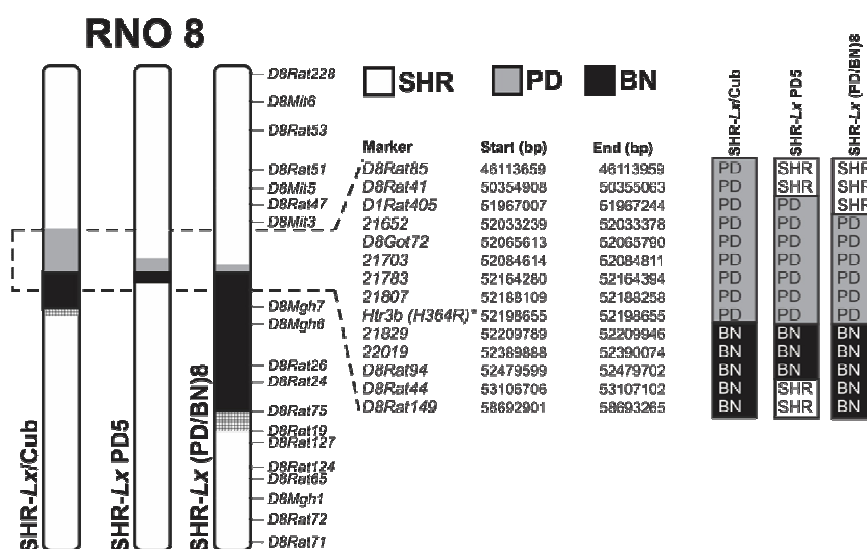
Kongenní kmen SHR-Lx/Cub (SHR.PD(*D8Mgh9-D8Rat149*)/Cub), Rat Genome Database ID 1641863, vznikl introgresí segmentu chromozomu 8 (nesoucím mj. mutantní alelu genu *Lx*) z normotenzního kongenního kmene BN-Lx na genetické pozadí kmene SHR (Křen et al., 1997).

3.1.1.6. Kongenní kmen SHR-Lx PD5

Kongenní kmen SHR-Lx PD5 (SHR.PD(*D8Rat42-D8Arb23*)/Cub), Rat Genome Database ID 1641851, byl odvozen vnesením diferenciálního segmentu chromozomu 8 PD/Cub původu na genetické pozadí kmene SHR pomocí postupného zužování segmentu přítomného u kmene SHR-Lx/Cub (Křen et al., 1997; Křenová et al., 2000). Diferenciální segment u kongenní podlinie SHR-Lx PD5 má rozsah 788 kb a obsahuje následujících 7 genů: *Zbtb16 (Plzf)*, *Htr3a*, *Htr3b*, *Usp28*, *Zw10*, *Tmprss5* a *Drd2*. Data o rozsahu diferenciálního segmentu a obsahu genů jsou součástí této práce (kapitola 4.3.).

3.1.1.7. Kongenní kmen SHR.(PD/BN)8

Nově vytvořený kongenní kmen SHR.(PD/BN)8 vznikl vnesením diferenciálního segmentu chromozomu 8 z kmenů PD a BN na genetické pozadí spontánně hypertenzního kmene potkana SHR. Identitu diferenciálního segmentu přítomného na osmém chromozomu jsme ověřili genotypizací 22 mikrosatelitních markerů polymorfních mezi kmeny BN/Cub, PD/Cub a SHR/OlaIpcv. Jednalo se o následující sadu: *D8Rat53*; *D8Mit5*; *D8Rat85*; *D8Rat41*; *D1Rat405*; *21652*; *D8Got72*; *21703*; *21783*; *21807*; *Htr3b (H364R)**; *21829*; *22019*; *D8Rat94*; *D8Rat44*; *D8Rat149*; *D8Mgh6*; *D8Rat26*; *D8Rat75*; *D8Rat19*; *D8Rat65*; *D8Rat72*. Nový kongenní kmen tak nese na genetickém pozadí spontánně hypertenzního kmene na osmém chromozomu přibližně 40 Mb úsek původem od kmene BN/Cub a 422 kb úsek původem od polydaktylního kmene PD/Cub včetně varianty H364R v genu *Htr3b* (Obrázek 4). Bylo provedeno několik celogenomových analýz, které vyloučily přítomnost dalších alel, které by nebyly SHR původu, než těch přítomných na chromozomu 8, což potvrzuje kongenicitu nového kmene. BN/Cub a PD/Cub segmenty tak představují jediný genomický rozdíl mezi progenitorovým kmenem SHR a novým kongenním kmenem SHR(PD/BN)8.



Obrázek 4: Schematické znázornění diferenciálních segmentů v kongenních kmenech SHR-Lx/Cub, SHR-Lx PD5 a SHR.(PD/BN)8. RNO8: chromozom 8 potkana.

3.1.1.8. Kongenní kmen BN.SHR4

Kongenní kmen BN.SHR4 (BN.SHR-(*Il6-Cd36*)/Cub), Rat Genome Database ID 728142, byl vytvořen vnesením diferenciálního segmentu chromozomu 4 ze spontánně

hypertenzního kmene potkana SHR/OlaIpcv včetně mutovaného genu *Cd36* na genomické pozadí kmene BN/Cub. Diferenciální segment se nachází v telomerické části chromozomu 4 a má délku cca 13,5 Mbp (Šeda O., 2002).

3.1.1.9. Kongenní kmeny PD.SHR4a a PD.SHR4b

Nové kongenní kmeny PD.SHR4a (PD.SHR(*D4Arb13-D4Rat125*)) a PD.SHR4b (PD.SHR(*cen-Lmbr; D4Rat147-D4Rat151*)) byly odvozeny vnesením diferenciálních segmentů chromozomu 4 SHR/OlaIpcv původu na genetické pozadí polydaktylního kmene PD/Cub. Rozsah diferenciálního segmentu přítomného na čtvrtém chromozomu jsme ověřili genotypizací 54 polymorfních mikrosatelitních markerů u obou PD.SHR4 kongenních kmenů (Tabulka 3). U kmene PD.SHR4a má diferenciální segment rozsah 21Mb, zatímco u PD.SHR4b sahá diferenciální segment 37 Mbp od centromery s přerušением o velikosti 1,3-2,4 Mbp v okolí markeru *D4Mgh7*. S výjimkou těchto úseků chromozomu 4 vyloučily provedené celogenomové analýzy provedené u obou kmenů přítomnost dalších alel, které by nebyly PD původu, což potvrzuje kongenicitu obou nových kmenů. Segmenty SHR původu na chromozomu 4 proto představují jediný genomický rozdíl mezi kmenem PD a kongenními kmeny PD.SHR4a a PD.SHR4b.

Marker	Mbp	PD.SHR4a	PD.SHR4b	Marker	Mbp	PD.SHR4a	PD.SHR4b
<i>D4Rat248</i>	0,28	PD	SHR	<i>D4Rat119</i>	63,10	PD	PD
<i>D4Arb14</i>	0,45	PD	SHR	<i>D4Rat102</i>	66,49	PD	PD
<i>Il6</i>	0,46	PD	SHR	<i>D4Rat27</i>	71,71	PD	PD
<i>D4Rat117</i>	1,18	PD	SHR	<i>D4Rat28</i>	75,34	PD	PD
<i>Lmbr1_i4</i>	1,25	PD	SHR	<i>D4Rat168</i>	77,42	PD	PD
<i>Lmbr_i5_120-816</i>	1,26	PD	SHR	<i>D4Mit24</i>	78,32	PD	PD
<i>D4Mgh7</i>	1,55	PD	PD	<i>D4Rat33</i>	80,47	PD	PD
<i>D4Rat147</i>	2,45	PD	SHR	<i>D4Rat34</i>	85,25	PD	PD
<i>D4Rat139</i>	3,04	PD	SHR	<i>D4Rat35</i>	91,57	PD	PD
<i>D4Arb13</i>	3,17	SHR	SHR	<i>D4Rat172</i>	95,16	PD	PD
<i>D4Rat4</i>	3,23	SHR	SHR	<i>D4Rat39</i>	104,44	PD	PD
<i>D4Rat142</i>	4,82	SHR	SHR	<i>D4Rat175</i>	106,72	PD	PD
<i>D4Rat2</i>	5,43	SHR	SHR	<i>D4Rat97</i>	111,29	PD	PD
<i>D4Bro1</i>	5,12	SHR	SHR	<i>D4Rat176</i>	116,55	PD	PD
<i>D4Rat1</i>	5,69	SHR	SHR	<i>D4Rat53</i>	126,31	PD	PD
<i>D4Rat136</i>	8,48	SHR	SHR	<i>D4Rat90</i>	132,50	PD	PD
<i>D4Rat5</i>	9,63	SHR	SHR	<i>D4Rat58</i>	136,33	PD	PD
<i>D4Rat148</i>	9,68	SHR	SHR	<i>D4Rat196</i>	143,99	PD	PD
<i>D4Rat6</i>	10,29	SHR	SHR	<i>D4Rat60</i>	149,80	PD	PD
<i>D4Rat7</i>	10,67	SHR	SHR	<i>D4Rat59</i>	150,28	PD	PD
<i>D4Rat221</i>	14,38	SHR	SHR	<i>D4Rat137</i>	155,58	PD	PD
<i>D4Rat222</i>	19,03	SHR	SHR	<i>D4Rat203</i>	161,67	PD	PD
<i>D4Rat125</i>	19,46	SHR	SHR	<i>D4Arb27</i>	164,84	PD	PD
<i>D4Rat10</i>	26,29	PD	SHR	<i>D4Rat68</i>	172,40	PD	PD
<i>D4Rat151</i>	29,44	PD	SHR	<i>D4Rat69</i>	175,18	PD	PD
<i>D4Rat17</i>	46,03	PD	PD	<i>D4Rat140</i>	182,98	PD	PD
<i>D4Rat16</i>	49,33	PD	PD	<i>D4Rat72</i>	186,34	PD	PD

Tabulka 3: Diferenciální segmenty u nových kongenních kmenů PD.SHR4.

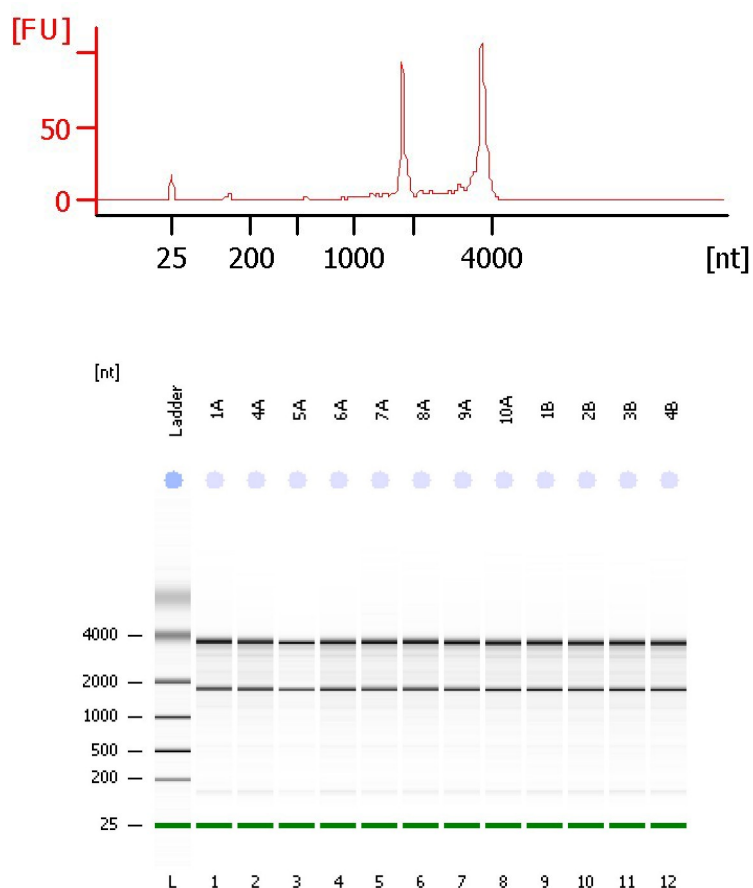
3.2. Molekulárně genetické metody

3.2.1. Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována ze vzorku tkáně ocasu, získané při odběru orgánů na konci experimentálního protokolu. Použita byla upravená fenol-chloroformová metoda extrakce dle Sambrooka.

3.2.2. Izolace RNA

Celková RNA byla extrahována z tkání pomocí modifikované fenol-chloroformové metody a následně purifikována pomocí RNeasy Mini kit (Qiagen) UDG dle postupu doporučeného výrobcem. Kvalita celkové RNA byla ověřena pomocí systému Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) (Obrázek 5).



Obrázek 5: Kvalita a integrita celkové RNA vyhodnocená pomocí systému Agilent 2100 Bioanalyzer.

3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Při genotypizaci kongenních kmenů byla použita standardní metoda PCR, jejíž podmínky byly optimalizovány pro jednotlivé markery dle konkrétních fyzikálně-chemických vlastností samotných markerů i výsledného produktu. Poté následovala elektroforéza produktů PCR na akrylamidovém (7-10%), případně agarózovém gelu (2-4%) a vizualizace pomocí barvení ethidiumbromidem. Detekce byla realizována pomocí digitalizačního a zobrazovacího zařízení G-Box (Syngene).

3.2.4. Kvantitativní („real-time“) reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR)

Celková RNA (2 µg) byla podrobena zpětné transkripci za použití oligo (dT) primerů, reverzní transcriptázy Superscript III (Invitrogen) a dNTP v konečném objemu 20 µl. Samotná real-time PCR reakce byla provedena v triplikátech s použitím TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) dle postupu doporučeného výrobcem (Invitrogen) na cykléru Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System. Jako referenční gen jsme použili glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu a výsledky jsme vyhodnotili pomocí analýzy dle Livaka (Livak KJ., Schmittgen TD., 2001).

3.2.5. Stanovení genové exprese pomocí čipů Affymetrix

Celková RNA byla extrahována z tkání pomocí TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) a následně purifikována pomocí RNeasy® MinElute cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA) dle postupu doporučeného výrobcem. Kvalita celkové RNA byla ověřena pomocí systému Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Pro microarray analýzu jsme použili Affymetrix GeneChip® Rat Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) pomocí přístroje Affymetrix GeneChip® system dle instrukcí doporučených výrobcem. Výsledky hybridizace byly hodnoceny v Affymetrix GeneChip® Command Console Software a kvalita čipu se hodnotila pomocí Affymetrix Expression Console. Data byla následně normalizována algoritmem Robust Multichip Average (RMA) a analyzována v aplikaci Partek Genomics Suite 6.6 (Partek, St. Louis, Missouri).

3.3. Metabolická fenotypizace

3.3.1. Základní metabolické parametry

Orální glukózový toleranční test (OGTT) byl prováděn u potkanů po celonočním lačnění. Krev pro stanovení glykémie v průběhu testu byla odebírána z ocasní žíly potkanů v době podání glukózy (3g/kg tělesné váhy, 30% vodný roztok) intragastrickou sondou a poté po 30, 60, 90, 120 a 180 minutách od doby podání. Pro stanovení glykémie, stejně jako hladiny celkových sérových triacylglycerolů a cholesterolu, byly použity komerčně dostupné kity (Lachema, Brno, ČR). Hladina volných (neesterifikovaných) mastných kyselin v séru byla určena pomocí kolorimetrického kitu na bázi acyl-CoA oxidázy (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Sérové koncentrace inzulínu byly stanoveny pomocí ELISA kit (Merckodia, Uppsala, Švédsko). Koncentrace adiponektinu v séru byly určeny pomocí Rat Adiponectin ELISA kitu (B-Bridge International, CA, USA). Koncentrace triacylglycerolů a cholesterolu ve 20 třídách plazmatických lipoproteinů a velikost lipoproteinových částic byly analyzovány speciální metodou pro simultánní kvantifikaci cholesterolu, triacylglycerolu a volného glycerolu pomocí HPLC (Usui S. et al., 2002) ve Skylight Biotech Inc. (Akita, Japonsko).

3.3.2. Obsah triglyceridů a cholesterolu v jaterní tkáni

Jaterní tkáň byla rozdrovena v tekutém dusíku a následně 16 hodin extrahována ve směsi chloroform:metanol, potom byl přidán 2% KH_2PO_4 a roztok byl centrifugován. Organická fáze byla odpařena pod tekutým dusíkem. Výsledná peleta byla rozpuštěna v isopropanolu a obsah triglyceridů a cholesterolu byl stanoven pomocí enzymatického kitu (Pliva-Lachema, Brno, ČR).

3.3.3. Měření krevního tlaku

Arteriální krevní tlak byl kontinuálně měřen s využitím radiotelemetrie. Záznam měření započal minimálně 7 dní po chirurgické implantaci radiotelemetrické sondy. Krevní tlak byl zaznamenáván 24 hodin denně, vždy po dobu 5s v 10 minutových intervalech. Po uplynutí 2 týdnů byl pokusným jedincům podáván 1 % roztok NaCl po dobu 1 týdne, zatímco stále probíhal záznam krevního tlaku.

3.3.4. Histomorfometrická analýza srdce

Po fixaci tkáně došlo k jejímu zalití do parafinu a nakrájení na 4 μ m řezy. Ty byly následně zbaveny parafinu, rehydratovány a obarveny pomocí kombinace barviv hematoxylin a eozin. Takto připravené vzorky byly histomorfometricky analyzovány při 40x zvětšení pomocí digitální kamery (MOTICAM 2300, MOTIC BA 300, Motic China Group Co. Ltd, Xiamen, Čína). Získaná data byla uložena ve formátu jpg a následně analyzována pomocí softwaru Image J (verze 1.43, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Pro stanovení srdeční fibrózy byly některé řezy obarveny barvivem Sirius red a pozorovány světelným mikroskopem při 10x zvětšení.

3.4. Bioinformatické a statistické metody zpracování dat

3.4.1. Základní statistické metody

Při vzájemném srovnání dvou kmenů jsme použili nepárový Studentův t-test. Pro srovnání tří a více experimentálních skupin (kmenů, skupin s rozdílným farmakologickým ovlivněním nebo dietou) jsme použili analýzu rozptylu (ANOVA) s následnou Tukeyho metodou mnohonásobného porovnávání jednotlivých skupin. Tato metoda snižuje pravděpodobnost chyby prvního druhu oproti opakovanému porovnávání významností pomocí dvouvýběrových t-testů.

3.4.2. Analýza transkriptomických dat

Transkriptomická data byla analyzována pomocí algoritmů obsažených v Partek Genomics Suite 6.6. (Partek, St.Louis, Missouri). Data byla nejprve normalizována a transformována procedurami založenými na algoritmu RMA (Robust Multichip Average). Srovnávací analýzy zahrnují metody od prostého porovnání exprese jednotlivých transkriptů po komplexnější analýzy využívající metod hierarchického shlukování, analýzy genové ontologie a profilování metabolických a signalizačních drah (Ingenuity Pathway Analysis (IPA) spring 2014 edition). Pro stanovení hladiny signifikance jsme použili metodu FDR (False Discovery Rate). Nejvýznamnější zjištěné rozdíly v expresi byly ověřeny pomocí metody kvantitativní RT-PCR (viz 2.2.4). Funkční analýza a analýza kanonických drah byla provedena pomocí IPA za použití Benjamini-Hochbergovy korekce mnohonásobného porovnávání.

4. Komentáře k publikacím

4.1. 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.

4.1.1. Farmakogenetická interakce retinoidů a znaků metabolického syndromu

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. I přes jejich vysokou účinnost je podávání retinoidů doprovázeno řadou nežádoucích účinků (Brelsford M. a Beute T.C., 2008). Kromě teratogenního efektu (Collins M.D. a Mao G.E., 1999), vykazují i širokou škálu metabolických a behaviorálních vedlejších vlivů (O'Reilly K. et al., 2008). Jedná se především o rozvoj hyperlipidémie. Bylo také zjištěno, že aplikace kyseliny retinové a isotretinoinu vedla k redukcí inzulínové senzitivity (Koistinen H.A. et al., 2001). Je velmi pravděpodobné, že výše uvedené příklady jsou alespoň v určitém rozsahu závislé na genetických faktorech.

Farmakogenetických studií, které by se věnovaly problematice retinoidů, není mnoho. Stávající informace zabývající se touto skupinou látek pocházejí především z onkologických prací (Meani N. et al., 2005). Jednou z prvních čistě farmakogeneticky cílených terapií bylo podávání kyseliny retinové při léčbě akutní promyelocytární leukémie. Toto onemocnění vzniká v důsledku chromozomální translokace, která vede k poškození funkce receptoru pro kyselinu retinovou. U pacientů s akutní promyelocytární leukémií vedla aplikace kyseliny retinové ke snížení progresu onemocnění (Ross J.S., 2008). Stejně jako u dalších komplikovaných farmakogenetických interakcí, mohou geneticky definované modely živočichů sloužit jako užitečný nástroj pro určení příslušných biologických mechanismů (Šeda O. et al., 2008). Ačkoliv doposud nebyly provedeny žádné studie zaměřené na farmakogenetické aspekty léčby pomocí retinoidů, hlavní informace byly získány pomocí experimentů na různých modelových organizmech (Mercader J. et al., 2006). Podávání isotretinoinu, který účinkuje prostřednictvím izomerizace s kyselinou *all-trans* retinovou, vyvolává řadu změn metabolismu sacharidů a lipidů společně se vzestupem adipozity u potkaniho polydaktylního kmene PD/Cub (Šedová L. et al., 2004). Kongenní kmen SHR-*Lx*, který nese diferenciální segment chromozomu 8 pocházející z kmene PD na genetickém pozadí kmene SHR (Křen V. et al., 1997), vykazuje vysokou citlivost k teratogennímu účinku kyseliny retinové (Bílá V. et al., 2000), což zůstává zachováno také u minimálního kongenního kmene SHR-*Lx* PD5, kde byl původní diferenciální segment zkrácen na oblast obsahující pouze 7 genů.

4.1.2. Ustanovení farmakogenetického modelu kyselinou retinovou indukované dyslipidémie a inzulinové rezistence

V této studii jsme testovali hypotézu, zda kongenní kmene SHR a SHR-*Lx* PD5 mohou sloužit jako modelové kmene pro určování farmakogenetických aspektů negativních účinků retinoidů na metabolismus. Samcům kmene SHR a SHR-*Lx* PD5 jsme podávali standardní dietu, kterou jsme ve věku 15 týdnů nahradili dietou vysokosacharózovou po dobu dvou týdnů. Poté jsme jedince každého kmene náhodně rozdělili do dvou skupin, experimentální a kontrolní. Za pokračujícího podávání vysokosacharózové diety jsme gastrickou sondou aplikovali experimentální skupině po dobu 16 dní kyselinu *all-trans* retinovou (RA) v denní koncentraci 15 mg/kg a kontrolní skupině jsme podávali pouze vehikulum bez RA. Mimo kompletního metabolického a morfometrického profilu jsme během celého období podávání RA monitorovali spotřebu potravy, celkovou hmotnost a

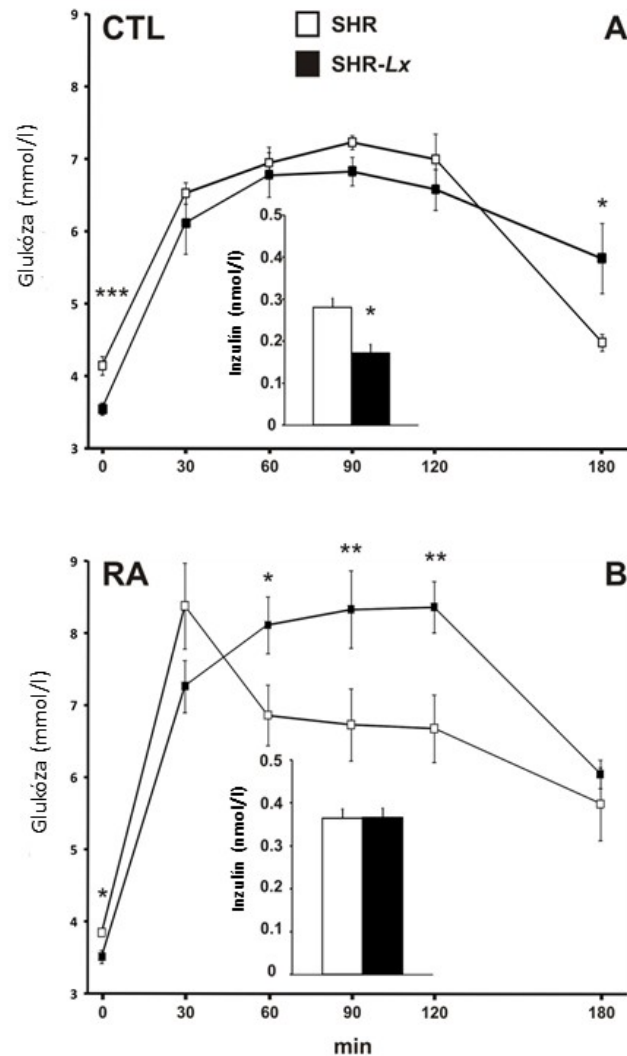
syťou glykémii. V rámci metabolických měření jsme provedli orální glukózový toleranční test čtrnáctý den aplikace RA.

Na začátku pokusu byli samci kmene SHR-*Lx* PD5 přibližně o 8 % lehčí. V průběhu celého pokusu se dynamika vývoje hmotnosti a příjmu potravy nelišila mezi kontrolními skupinami. Naproti tomu u jedinců, kterým jsme aplikovali kyselinu *all-trans* retinovou, jsme pozorovali postupné vyrovnávání hmotností obou kmenů, což bylo dáno jejím poklesem u kmene SHR. Podávání kyseliny *all-trans* retinové vedlo k signifikantnímu vzestupu relativní hmotnosti jater u obou kmenů, zatímco index adipozity (marker viscerální obezity vypočítaný jako hmotnost epididymálního tukového tělesa na 100g tělesné hmotnosti) vzrostl pouze u kmene SHR-*Lx* PD5.

Při srovnání základního metabolického profilu byla hladina glukózy a inzulínu v plazmě výrazně nižší u kontrolní skupiny kmene SHR-*Lx* PD5 oproti kontrolní skupině kmene SHR. Poměr inzulín:glukóza a celková glukózová tolerance byla u obou kontrolních skupin srovnatelná především v důsledku vyšší glykémie u kmene SHR-*Lx* PD5 3 hodiny po podání glukózy (Obrázek 6A). Podání kyseliny *all-trans* retinové indukovalo výrazné, kmenově specifické změny. U kmene SHR-*Lx* PD5 jsme zjistili téměř dvojnásobné zvýšení hladiny inzulínu, společně se signifikantním zhoršením glukózové tolerance. Oproti tomu kmen SHR nevykázal žádnou změnu v hladinách inzulínu nebo v glukózové toleranci, a to i navzdory lehkému vzestupu glykémie 30 minut po podání glukózy (Obrázek 6B). Nezaznamenali jsme žádné signifikantní změny v hladinách adiponektinu nebo volných mastných kyselin, ačkoliv hladina glycerolu vzrostla ve stejném rozsahu u obou experimentálních skupin.

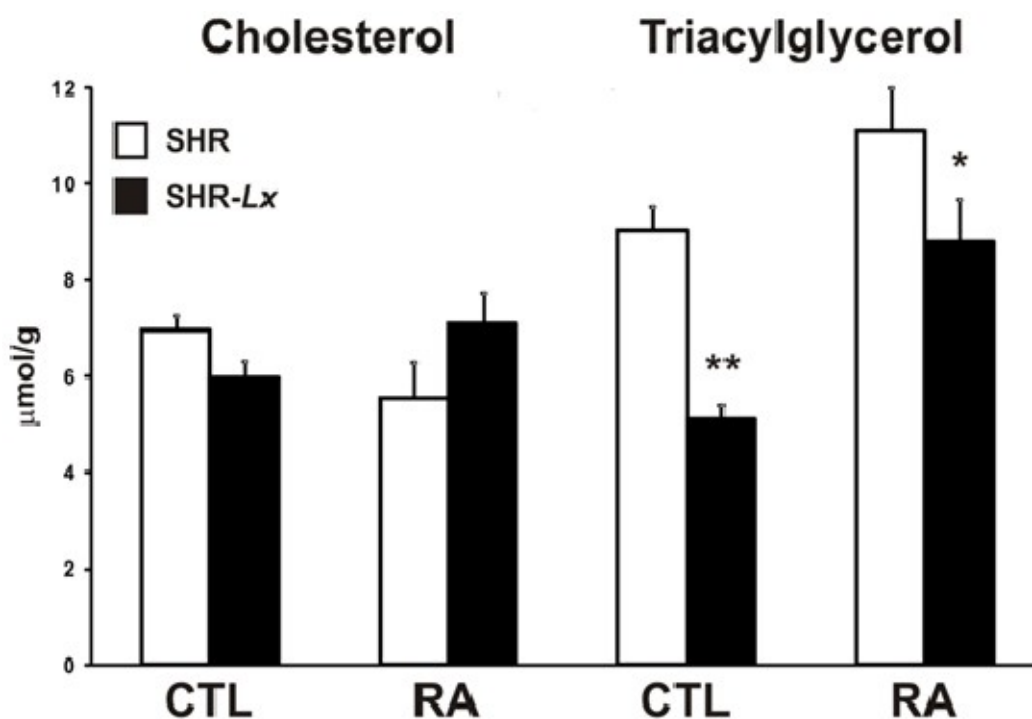
Při detailnějším testování lipidového profilu jsme mezi kontrolními skupinami nezjistili žádné rozdíly v sérových koncentracích triacylglycerolu u převážné většiny lipoproteinových tříd, kromě nepatrných změn v několika LDL podskupinách (Obrázek 8A). U experimentálních skupin, kterým jsme podali kyselinu *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 (Obrázek 8B). U obsahu triacylglycerolů v játrech jsme zjistili podobný průběh. Přestože kmen SHR vykazuje vyšší absolutní koncentraci

triacylglycerolů v játrech, indukovala kyselina all-*trans* retinová jejich signifikantní vzestup pouze u kmene SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s mírným nesignifikantním zvýšením jaterních triacylglycerolů u kmene SHR (Obrázek 7).

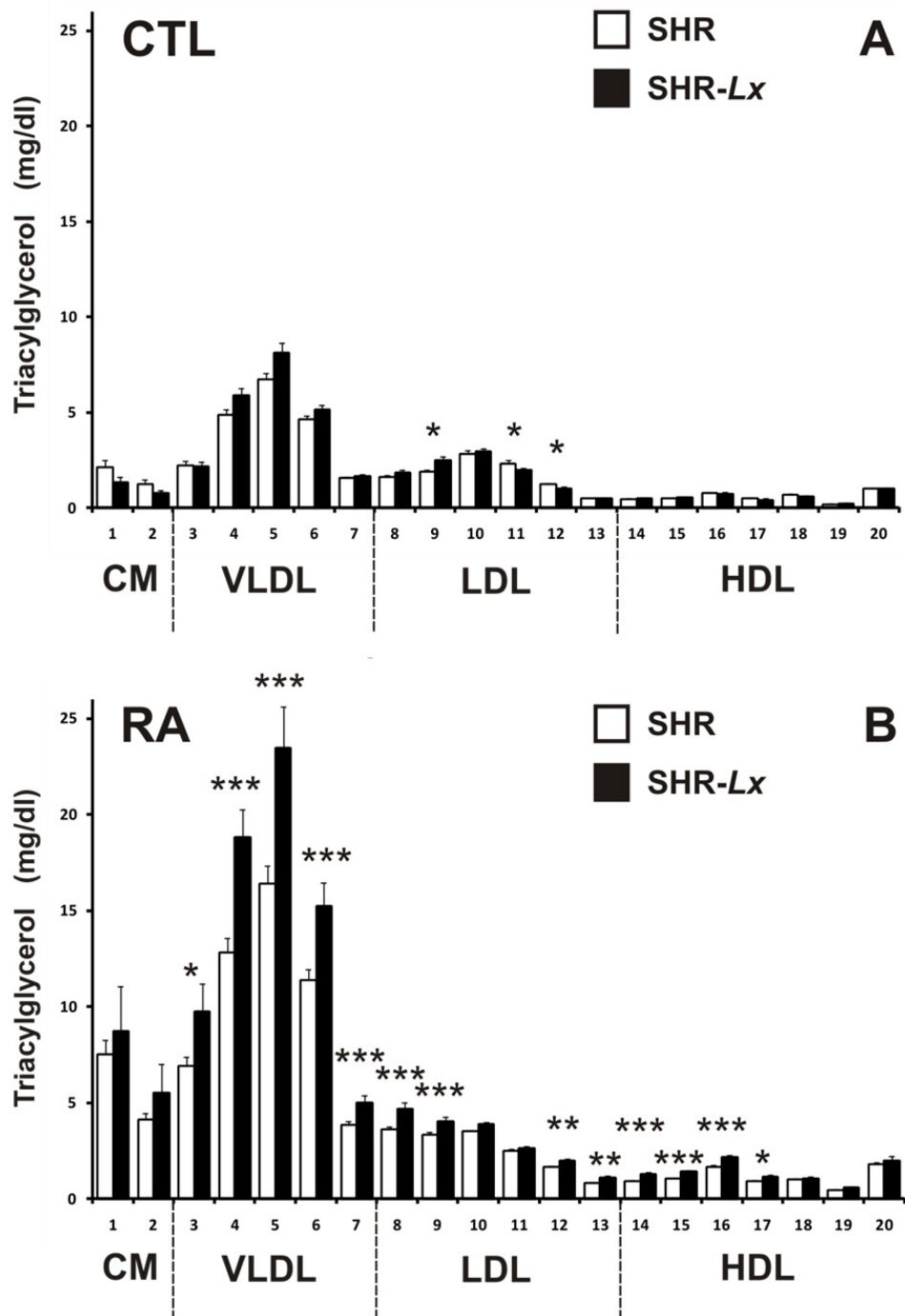


Obrázek 6: Srovnání průběhu glykemických křivek orálního glukózového tolerančního testu u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (RA, panel B) mezi samci kmene SHR (prázdné symboly) a kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 (plné symboly). Na vloženém grafu se nachází porovnání inzulinémie mezi kmeny SHR (prázdné sloupce) a SHR-*Lx* PD5 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$.**

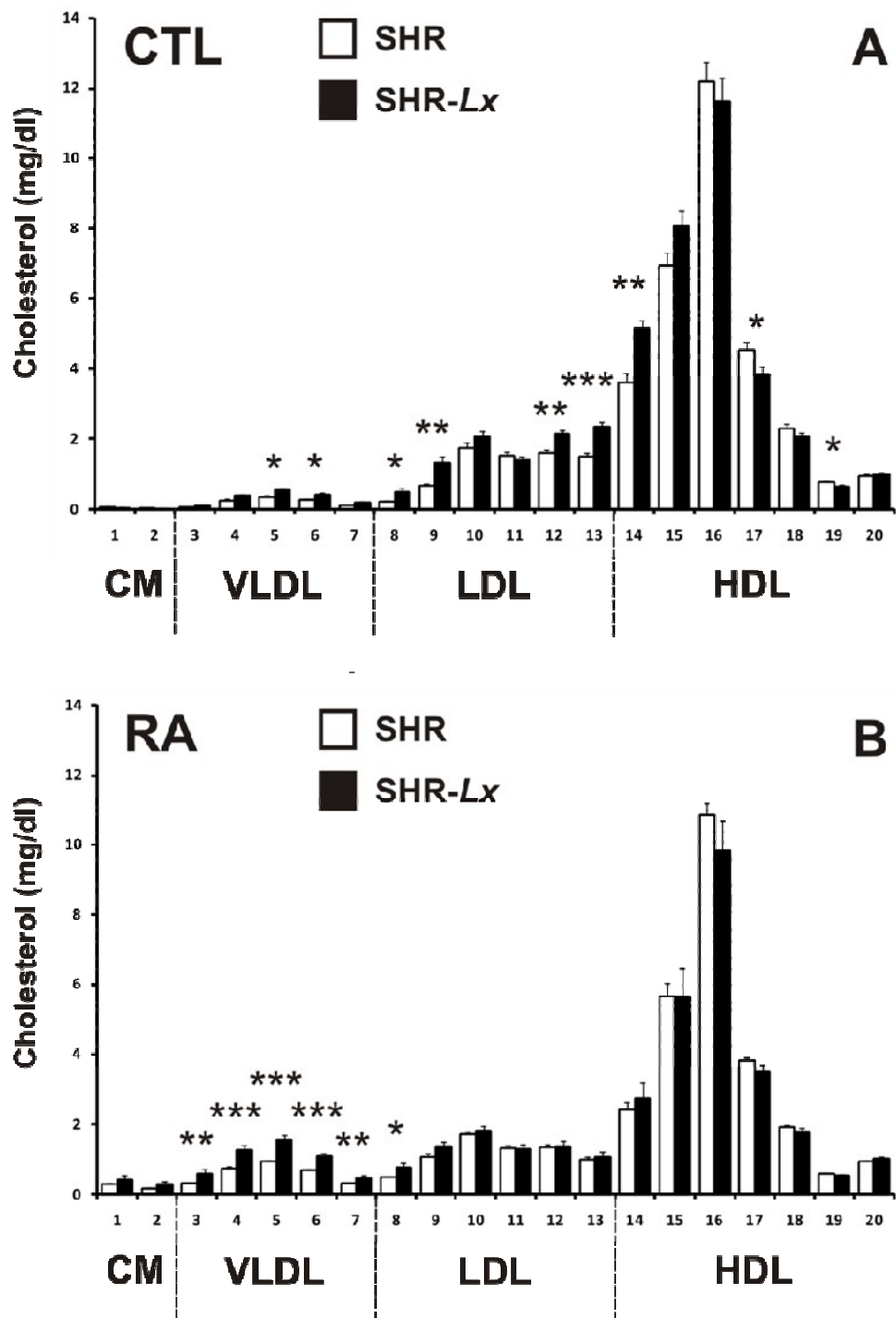
V hladině celkového cholesterolu jsme nezaznamenali žádné rozdíly specifické pro faktory kmene nebo RA. Nicméně kontrolní skupina kmene SHR-*Lx* PD5 měla vyšší hladinu sérového cholesterolu u VLDL a malých LDL frakcí (obrázek 9A). U obou kmenů vedla aplikace kyseliny *all-trans* retinové k poklesu LDL a HDL cholesterolu. Současně došlo k vzestupu koncentrace cholesterolu v chylomikronech a VLDL. 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 (Obrázek 9B). Signifikantní interakci faktorů kmen a RA jsme zaznamenali také pro obsah cholesterolu v játrech. Tento rozdíl byl zapříčiněn jeho poklesem u kmene SHR a naopak vzestupem u kmene SHR-*Lx* PD5 v důsledku podávání RA (Obrázek 7).



Obrázek 7: Koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů v játrech u kontrolních (CTL) a experimentálních skupin (RA) kmenů SHR (prázdné sloupce) a SHR-*Lx* PD5 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$.



Obrázek 8: Koncentrace triacylglycerolů ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (RA, panel B) kmenů SHR (prázdné sloupce) a SHR-Lx PD5 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti, od největších po nejmenší částice.**



Obrázek 9: Koncentrace cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (RA, panel B) kmenů SHR (prázdné sloupce) a SHR-Lx PD5 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti, od největších po nejmenší částice.**

Již dříve bylo zjištěno, že dlouhodobá aplikace vysokých dávek vitamínu A pacientům vedla k zvýšení obsahu cholesterolu a fosfolipidů v plazmě (van Bruggen T.J. a Straumfjord J.V., 1948). Společně s myalgiemi a vzestupem sérových hladin jaterních enzymů patří dyslipidémie mezi nejčastější vedlejší účinky doprovázející podávání retinoidů (Brelsford M. a Beute T.C., 2008). Doposud bylo popsáno několik polymorfismů, které ovlivňují odpověď na terapeutické podávání retinoidů. Sem patří například SNP rs833061 v promotoru genu *VEGF* (vascular endothelial growth factor) u retinoidy léčené lupénky (Young H.S. et al., 2006), varianty v *CYP26A1* a dalších genech v rámci terapie akutní promyelocytární leukémie (Quere R. et al., 2007). Nicméně z hlediska genetických determinant nežádoucích účinků retinoidů je k dispozici pouze minimum informací. Jednou z mála popsaných interakcí je asociace alel $\epsilon 2$ a $\epsilon 4$ apolipoproteinu E (ApoE) se vzestupem triacylglycerolů po podání isotretinoinu (Rodondi N. et al., 2002).

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. Tímto se ukazuje, že dříve zjištěná citlivost kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 na kyselinu all-*trans* retinovou (Bílá V. et al., 2000) se rozšiřuje i za fetální období a není omezena pouze na teratogenní vliv, ale představuje komplexní farmakogenetickou interakci zahrnující také metabolismus sacharidů a lipidů. Stejně jako u lidských studií zvyšuje RA sérové koncentrace triacylglycerolů u obou potkaních kmenů. Vzrůst triacylglycerolů ve všech hlavních frakcích lipoproteinů byl podpořen v důsledku podávání vysokosacharóзовé diety, která je silným induktorem dyslipidémie a inzulinové rezistence (Vrána A. a Kazdová L., 1970) a která byla podávána ještě před začátkem aplikace kyseliny all-*trans* retinové. Již dříve bylo prokázáno, že oba kmeny jsou geneticky predisponovány k rozvoji znaků metabolického syndromu (Pravenec M., et al., 2004) zhoršených po indukci vhodnou dietou (Šeda O. et al., 2006). Proto napodobují pacienty s normálním (SHR) nebo zvýšeným (SHR-*Lx* PD5) stupněm odpovědi k metabolicky nežádoucím účinkům RA. Jedním z možných mechanismů nárůstu koncentrace triacylglycerolů může být zvýšená jaterní lipogeneze, čemuž napovídá výrazné obohacení VLDL frakce triacylglycerolů spolu se vzestupem zásob triacylglycerolu v jaterní tkáni. Vliv na hladiny sérového cholesterolu a jejich distribuci v lipoproteinových frakcích byl méně výrazný a u pozorovaných kmenů se nelišil. Zhoršení

glukózové tolerance u kmene SHR-*Lx* PD5 indukované kyselinou all-*trans* retinovou je v souladu s dříve zaznamenaným účinkem isotretinonu na kmen PD/Cub (Šedová L. et al., 2004), který je dárce diferenciálního segmentu chromozomu 8 u kmene SHR-*Lx* PD5. Výsledek ukazuje na zachycení kauzálních genetických faktorů uvnitř diferenciálního segmentu kongenního kmene SHR-*Lx* PD5.

Jak již bylo dříve zmíněno, nachází se v oblasti diferenciálního segmentu kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 sedm genů. Tato oblast odpovídá lidskému chromozomu 11q23. Ačkoliv k omezením této studie patří přímé určení kauzálních genetických variant zodpovědných za zvýšenou citlivost k metabolickým změnám indukovaným RA, můžeme spekulovat o významu několika genů přítomných v diferenciálním segmentu na základě našich předchozích studií. Diferenciální segment byl již dříve studován a byla nalezena 2964 bp delece v intronu 2 genu *Plzf* (promyelocytic leukemia zinc finger), která vedla k poklesu jeho exprese ve vyvíjejících se končetinových pupenech (Liška F. et al., 2009). Byla potvrzena interakce proteinu PLZF s RAR α (retinoic acid receptor α) (Martin P.J. et al., 2003). Další potvrzení pro interakci genu *Plzf* s kyselinou all-*trans* retinovou pochází z lidských onkologických studií. V tomto případě se jedná o podskupinu akutní promyelocytární leukémie, která je způsobena vznikem fúzního genu *PLZF-RAR α* a která neodpovídá na jinak účinnou léčbu kyselinou retinovou (Guidez F. et al., 2003). Ačkoliv naše studie neposkytuje definitivní důkaz, jeví se gen *Plzf* jako pravděpodobný kandidát pro pozorovanou farmakogenetickou interakci.

Naše výsledky jsou ve zjevném kontrastu s daty ze studií, které popisují pozitivní působení retinoidů na lipidový profil (Misra U.K., 1966) za určitých experimentálních podmínek a terapeutických režimech (Ziouzenkova O. et al., 2007) s průvodními změnami v některých adipokinech (např. resistin, leptin nebo retinol-binding protein 4) (Felipe F. et al., 2004; Felipe F. et al., 2005; Mercader J. et al., 2008). Klíč k řešení tohoto zdánlivého paradoxu by mohla poskytnout studie (Schug T.T. et al., 2007), podle které konečný efekt závisí na intracelulárním poměru dvou transportérů kyseliny retinové, což v konečném důsledku vede buď k aktivaci RAR nebo PPAR β/δ .

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

Předchozí studii jsme uzavřeli zjištěním, že minimální kongenní kmen SHR-*Lx* PD5, který se liší od progenitorového kmene v přesně definované oblasti chromozomu 8 s pouze sedmi geny, je vysoce vnímavý k dyslipidémii indukované kyselinou all-*trans* retinovou za podmínek vysokosacharóзовé diety. Současně vykazuje kongenní kmen SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s progenitorovým kmenem SHR vznik inzulinové rezistence.

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 diferenciatním segmentem chromozomu 8 odražena i v transkriptomu kosterního svalu. Protokol byl z hlediska stáří zvířat i dávky a časování podání RA identický jako u předchozí studie s tou výjimkou, že po celou dobu studie byla experimentální i kontrolní skupinám podávána standardní dieta.

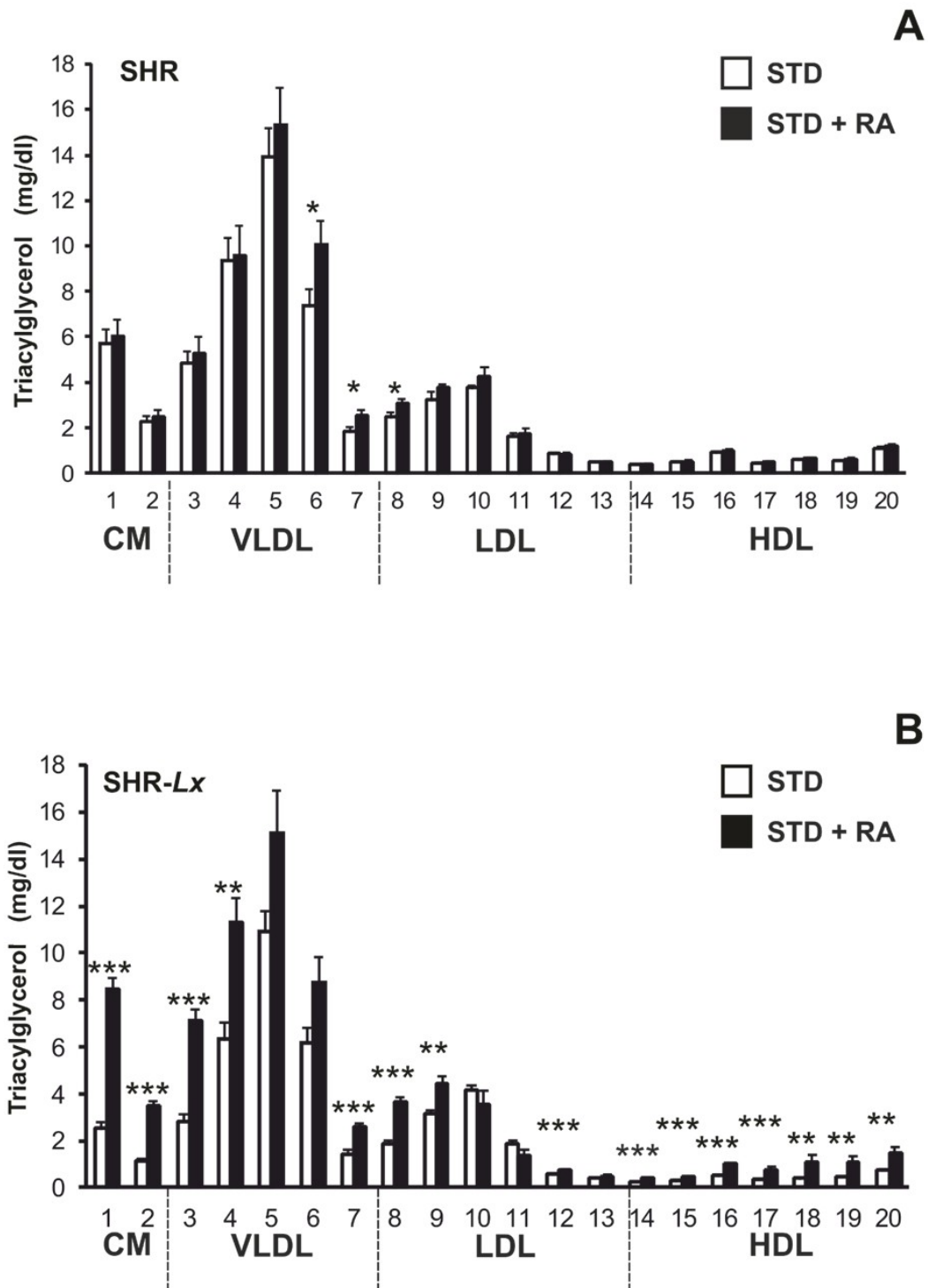
Kontrolní skupiny obou kmenů měly srovnatelnou tělesnou hmotnost a také relativní hmotnost viscerálního a retroperitoneálního tuku byla shodná. U kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 jsme zjistili nižší relativní hmotnosti jater a ledvin ve srovnání s kmenem SHR. Hmotnost nadledvinek byla naopak ve srovnání s kmenem SHR vyšší. Aplikace kyseliny all-*trans* retinové po dobu 16 dní nevedla u experimentálních skupin obou kmenů k žádným změnám v celkové hmotnosti nebo v množství tukové tkáně. Experimentální skupina kmene SHR vykazovala signifikantně vyšší relativní hmotnost jater, srdce a ledvin ve srovnání s experimentální skupinou kongenního kmene SHR-*Lx* PD5. Zatímco glykémie nalačno nevykázala významné rozdíly, glukózová tolerance byla signifikantně nejhorší u experimentální skupiny kongenního kmene SHR-*Lx* PD5, a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou SHR-*Lx* PD5, tak s experimentální skupinou SHR.

Při detailní analýze lipidového profilu jsme u kontrolní skupiny kmene SHR zaznamenali signifikantně vyšší hladinu jak celkových triacylglycerolů, tak triacylglycerolů v chylomikronech ve srovnání s kontrolní skupinou kmene SHR-*Lx* PD5. Podávání kyseliny all-*trans* retinové vedlo výlučně u kmene SHR-*Lx* PD5 k podstatnému vzestupu koncentrace triacylglycerolů ve všech lipoproteinových frakcích kromě LDL (Obrázek 10). Podobný posun jsme pozorovali i pro distribuci cholesterolu v rámci jednotlivých lipoproteinových tříd. Zatímco hladina celkového cholesterolu a cholesterolu v chylomikronech, VLDL, LDL a

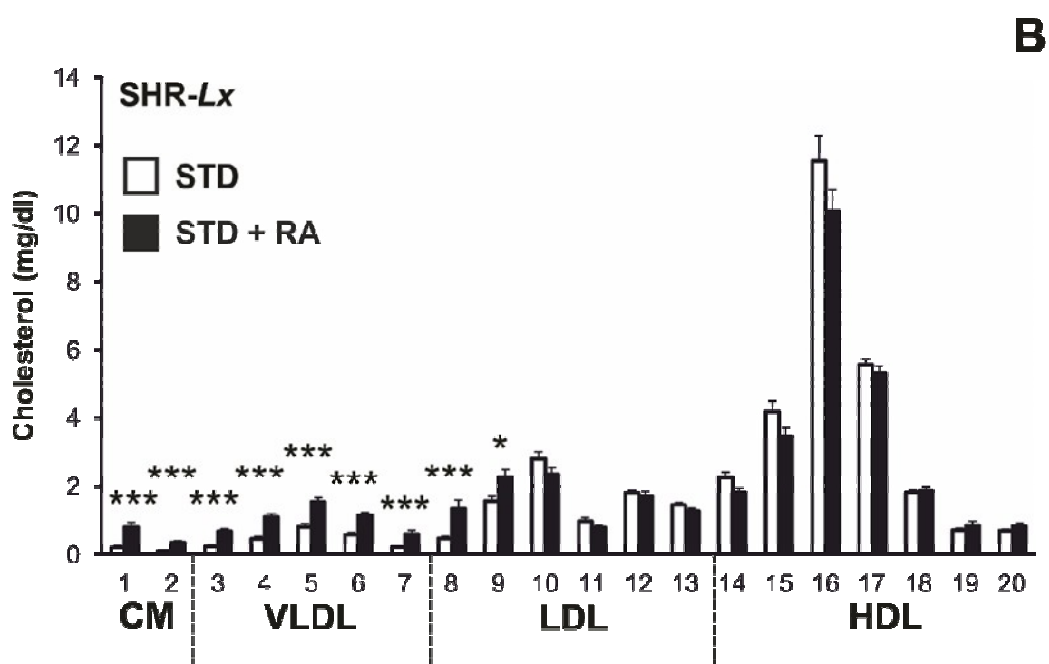
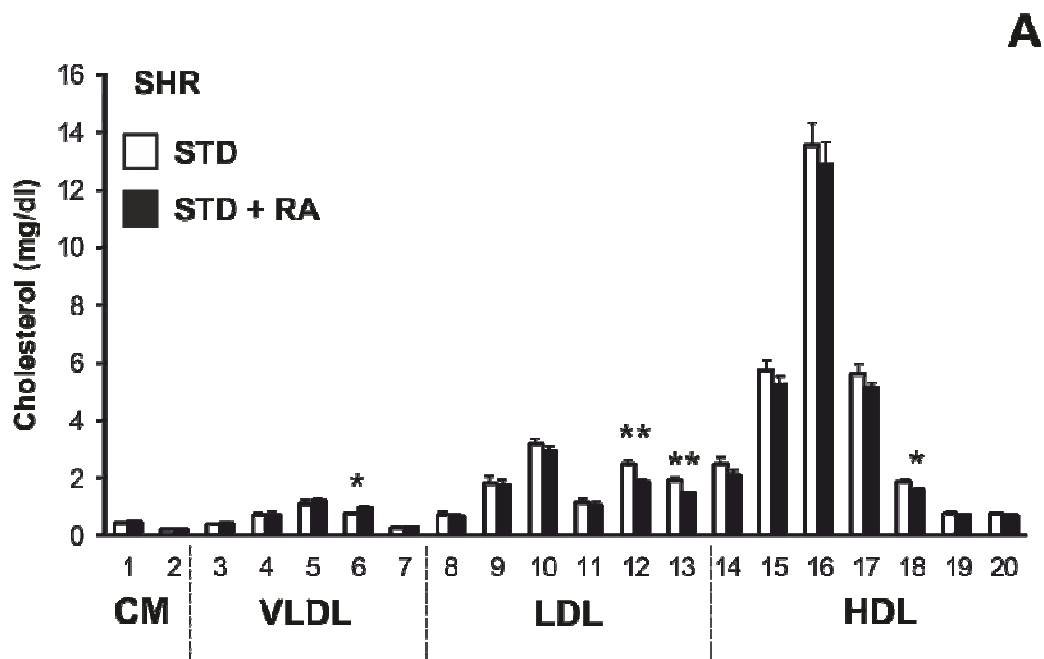
HDL lipoproteinových třídách byla signifikantně vyšší u kontrolní skupiny kmene SHR ve srovnání s kontrolní skupinou kongenního kmene SHR-*Lx* PD5, vedla aplikace kyseliny all-*trans* retinové k signifikantnímu nárůstu koncentrace cholesterolu u chylomikronů a VLDL výhradně u kongenního kmene SHR-*Lx* PD5. U experimentální skupiny kmene SHR jsme zaznamenali pouze lehký pokles v hladinách LDL cholesterolu. U HDL cholesterolu nedošlo ani u jedné z experimentálních skupin k žádným změnám. Velikosti VLDL, LDL a HDL částic byly u obou kontrolních skupin podobné. Kyselina all-*trans* retinová indukovala u kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 vzestup velikosti VLDL a LDL částic společně s poklesem velikosti částic HDL, což představuje signifikantní rozdíl oproti nezměněným hodnotám u kmene SHR (Obrázek 11).

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*, *Il1b*, *Rdh11*, *Pparg*, *Sirt3* a *Smcr7*). Ve všech případech jsme byli schopni potvrdit směr efektu indukovaného RA (Obrázek 12).

Jedním z častých vedlejších účinků podávání agonistů retinoidních receptorů je indukce hyperlipidémie (Desphande A. et al., 2014). V předchozí studii jsme pozorovali hyperlipidemický efekt aplikace kyseliny all-*trans* retinové u dospělých samců kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 za podmínek vysokosacharóзовé diety (Bílá V. et al., 1996; Bílá V. a Křen V., 2000). V této práci jsme ukázali, že zvýšená citlivost u tohoto kmene zůstává zachována i za podmínek standardní diety a tak není závislá na interakci mezi dietou a medikací. Rovněž jsme potvrdili zhoršení glukózové tolerance po aplikaci kyseliny all-*trans* retinové. Tento výsledek se na první pohled jeví jako kontrastní k výsledkům několika nedávných studií u myši C57BL/6, kde aplikace kyseliny all-*trans* retinové bránila vytváření tukových zásob a vzniku dietou indukované obezity (Berry D.C. et al., 2012) a vedla ke zlepšení glukózové tolerance, inzulínové rezistence a dokonce i dyslipidémie (Li Y. et al., 2013; Berry D.C. a Noy N., 2009). Pokud odhlédneme od mezidruhových rozdílů, může být důvodem takovéto odlišnosti geneticky determinovaná citlivost, neboť i v našem experimentu kmen SHR nevykazoval po podání kyseliny all-*trans* retinové žádné metabolické zhoršení. Kongenní kmen SHR-*Lx* PD5 tak reprezentuje model zvýšené vnímavosti napodobující vedlejší účinky kyseliny all-*trans* retinové u člověka. Vzhledem k důležitosti tkáně kosterního svalstva pro celkovou inzulínovou senzitivitu a lipidový metabolismus jsme provedli transkriptomickou analýzu kosterního svalu u obou kmenů.

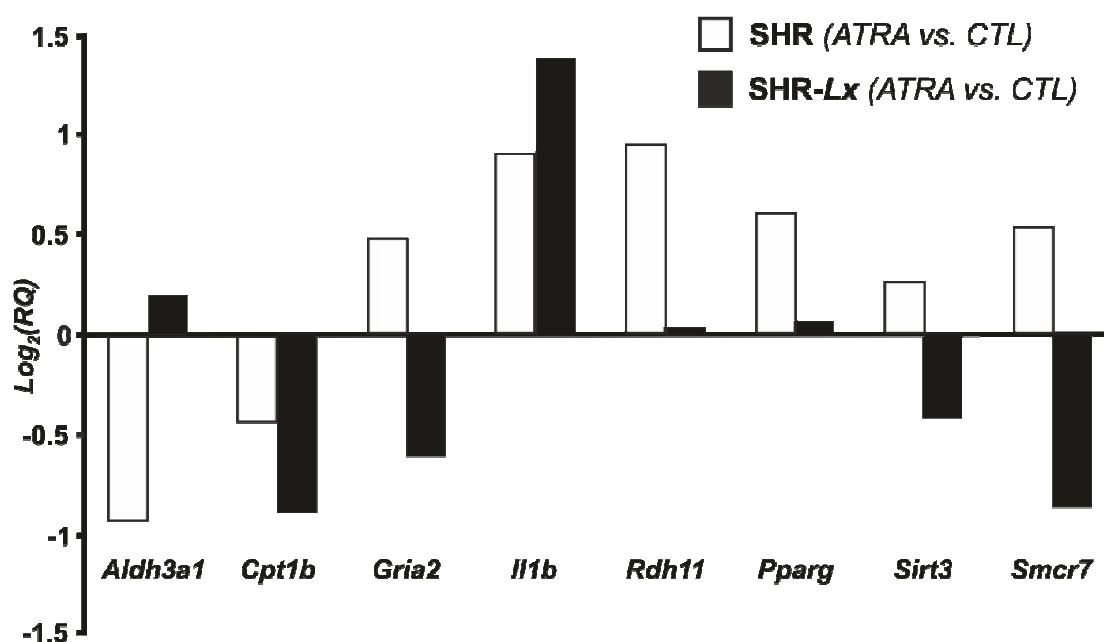


Obrázek 10: Koncentrace triacylglycerolů ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (STD, prázdné sloupce) a experimentálních skupin (STD+RA), plné sloupce) kmenů SHR a SHR-*Lx* PD5. Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti, od největších po nejmenší částice.**



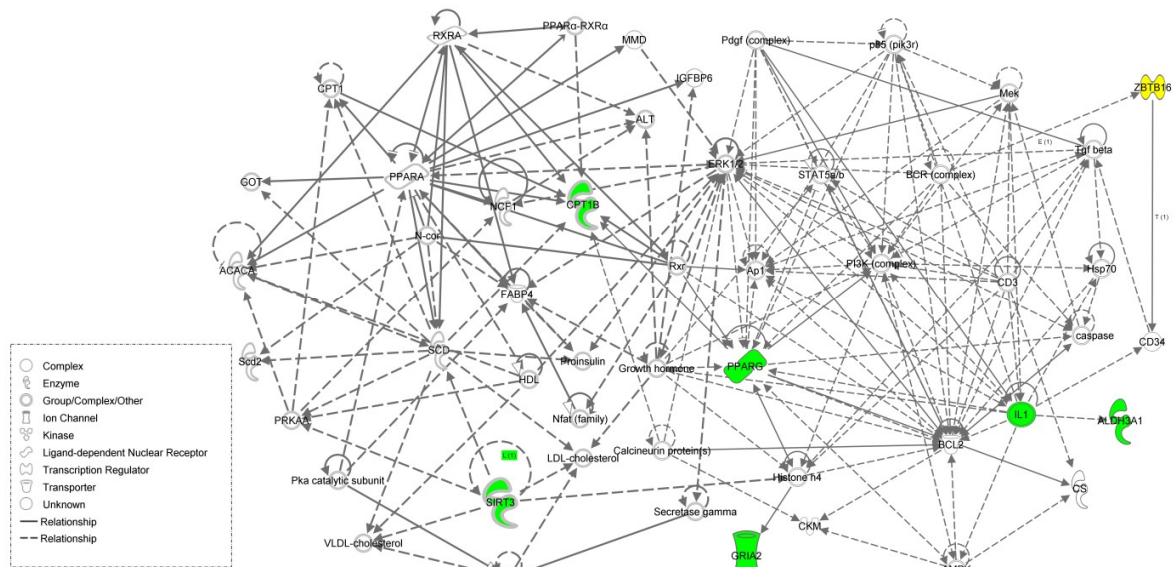
Obrázek 11: Koncentrace cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (STD, prázdné sloupce) a experimentálních skupin (STD+RA, plné sloupce) kmenů SHR a SHR-Lx PD5. Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a RA) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti od největších po nejmenší částice.**

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. Nicméně testování existujících drah mezi výše zmíněnými sedmi geny a sítí propojující rozdílně exprimované geny odhalilo spojení s genem *Plzf* (*Zbtb16*), který nese delecii v intronu 2 o rozsahu 2,9 kb (Obrázek 13). Gen *Plzf* je významným kandidátem pro preaxiální polydaktylii, hypertrofii levého komory srdeční, hypertenzi a inzulínovou rezistenci (viz. kapitola 4.3.; Šeda O. et al., 2005b; Liška F. et al., 2009). Limitací této práce je možnost kmenově-specifických změn v expresi genů diferenciálního segmentu v jiných typech tkání, které jsme netestovali (játra, tuková tkáň).



Obrázek 12: 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).

Ustavili jsme kongenní kmen SHR-*Lx* PD5 jako vhodný model pro kyselinou retinovou indukovanou hyperlipidémií a glukózovou intolerancí a identifikovali jsme předpokládanou síť zodpovědnou za mechanismus farmakogenetické interakce.



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Obrázek 13: Analýza regulačních uzlů. Obrázek znázorňuje síť s nejvyšším skóre v analýze mechanistických sítí pomocí modulu IPA s použitím transkriptů se signifikantní interakcí faktorů Kmen (SHR, SHR-Lx) * Terapie (standardní dieta, standardní dieta + kyselina all-*trans* retinová). Zeleně jsou vyznačeny geny s validovanou změnou exprese pomocí real-time PCR. Žlutě je vyznačen jediný gen přítomný v diferenciálním segmentu kongenního kmene SHR-Lx, pro který bylo možné identifikovat spojení s touto sítí. TGFB1: transforming growth factor, beta 1; Ins1: insulin 1; PPARG: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; ADIPOQ: adiponectin, C1Q and collagen domain containing, NFE2L2: nuclear factor, erythroid 2-like 2; CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa; LPS: Lipopolysaccharide; TNF: Tumor necrosis factor; IL2: interleukin 2; APOE: apolipoprotein E; CD3: cluster of differentiation 3; CD28: cluster of differentiation 28.

4.2. 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 antagonista 5-HT₃ (5-hydroxytryptaminového) receptoru se strukturální podobností se serotoninem (5-HT). Klinicky se nejčastěji využívá k léčbě chemoterapií indukované a pooperační nevolnosti a zvracení (Machu T.K., 2011). Nicméně jsou známy i antiflogistické (Liu F.C. et al., 2012) a antiproliferativní účinky (Prada J. et al., 2012) ondansetronu, stejně tak jako jeho modulační působení na příjem potravy (Hayes M.R. et al., 2004) a metabolismus (Carvalho F. et al., 2005). Odpověď na podání ondansetronu je značně individuální, přičemž se alespoň u části této variace předpokládá závislost na genetickém pozadí. Ačkoliv nejsou pochybnosti o důležitosti farmakogenetických aspektů působení ondansetronu, je tato oblast jen velmi málo prozkoumána (Ho K.Y. a Gan T.J., 2006). Jedním z potenciálně důležitých genetických faktorů je v tomto ohledu polymorfismus přímo v 5-HT₃ receptoru. Geny kódující 5-HT₃ podjednotky receptoru, *Htr3a* a *Htr3b* jsou kolokalizovány na lidském chromozomu 11q23 a nacházejí se v syntenní oblasti potkaního chromozomu 8. Již dříve byla identifikována substituční mutace v genu *Htr3b* u polydaktylního kmene potkana (Liška F. et al., 2009), který představuje model metabolického syndromu (Šeda O. et al., 2005b; Šedová et al., 2000). 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.

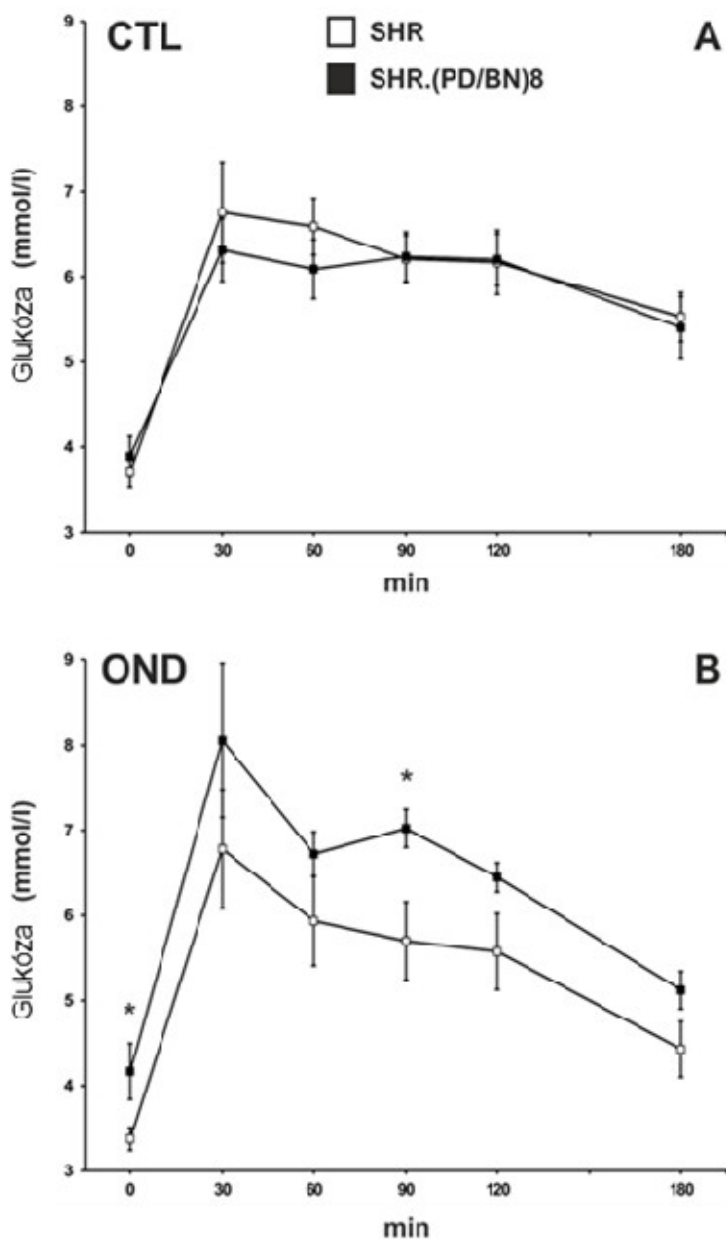
Při genotypizaci pomocí polymorfních mikrosatelitních markerů jsme určili rozsah diferenciálního segmentu kmene SHR.(PD/BN)8, který je PD/Cub a BN/Cub původu. Zatímco BN segment má rozsah okolo 40 Mb, přilehlá genomická část PD/Cub původu (zahrnuje již dříve identifikovanou variantu H364R genu *Htr3b*) má velikost 422 kb. Bylo provedeno několik celogenomových analýz, které vyloučily přítomnost dalších alel, které by

nebyly SHR původu, než těch přítomných na chromozomu 8, což potvrzuje kongenicitu nového kmene. BN/Cub a PD/Cub segmenty tak představují jediný genomický rozdíl mezi kmeny SHR a SHR(PD/BN)8.

Z hlediska morfometrické analýzy byla kontrolní skupina samců kmene SHR.(PD/BN)8 výrazně těžší než kontrolní skupina samců kmene SHR. Nicméně podávání ondansetronu vedlo k vymazání tohoto rozdílu. Ondansetron indukoval signifikantní redukci viscerálního, ale nikoliv retroperitoneálního tuku u obou kmenů. Opačný trend jsme pozorovali pro relativní hmotnost jater. Glukózová tolerance kontrolních skupin nebyla signifikantně odlišná. Nicméně jedinci kongenního kmene SHR(PD/BN)8, jimž byl podáván ondansetron, vykazovali signifikantně vyšší glykémii nalačno a zhoršenou glukózovou toleranci vyjádřenou obsahem plochy pod glykemickou křivkou ve srovnání s kmenem SHR (Obrázek 14).

Při detailnějším zkoumání lipidového profilu vykazovaly kontrolní i experimentální skupiny kmene SHR.(PD/BN)8 vyšší celkovou triacylglycerolémii ve srovnání s příslušnými skupinami kmene SHR. Navíc ondansetron indukoval signifikantní vzestup celkové triacylglycerolémie pouze u kongenního kmene SHR.(PD/BN)8. Zatímco u kontrolních skupin byly rozdíly v koncentracích triacylglycerolů nejzřetelnější u malých a velmi malých LDL částic, ondansetron indukoval vzestup hladin triacylglycerolu v celém lipoproteinovém spektru u kmene SHR.(PD/BN)8, ale pouze v LDL u kmene SHR (Obrázek 15).

Celkový cholesterol byl signifikantně vyšší u kontrolní skupiny kmene SHR ve srovnání s kongenním kmenem SHR.(PD/BN)8. Tento rozdíl byl zapříčiněn především rozdílem koncentracemi cholesterolu v LDL a HDL. 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 (Obrázek 16).



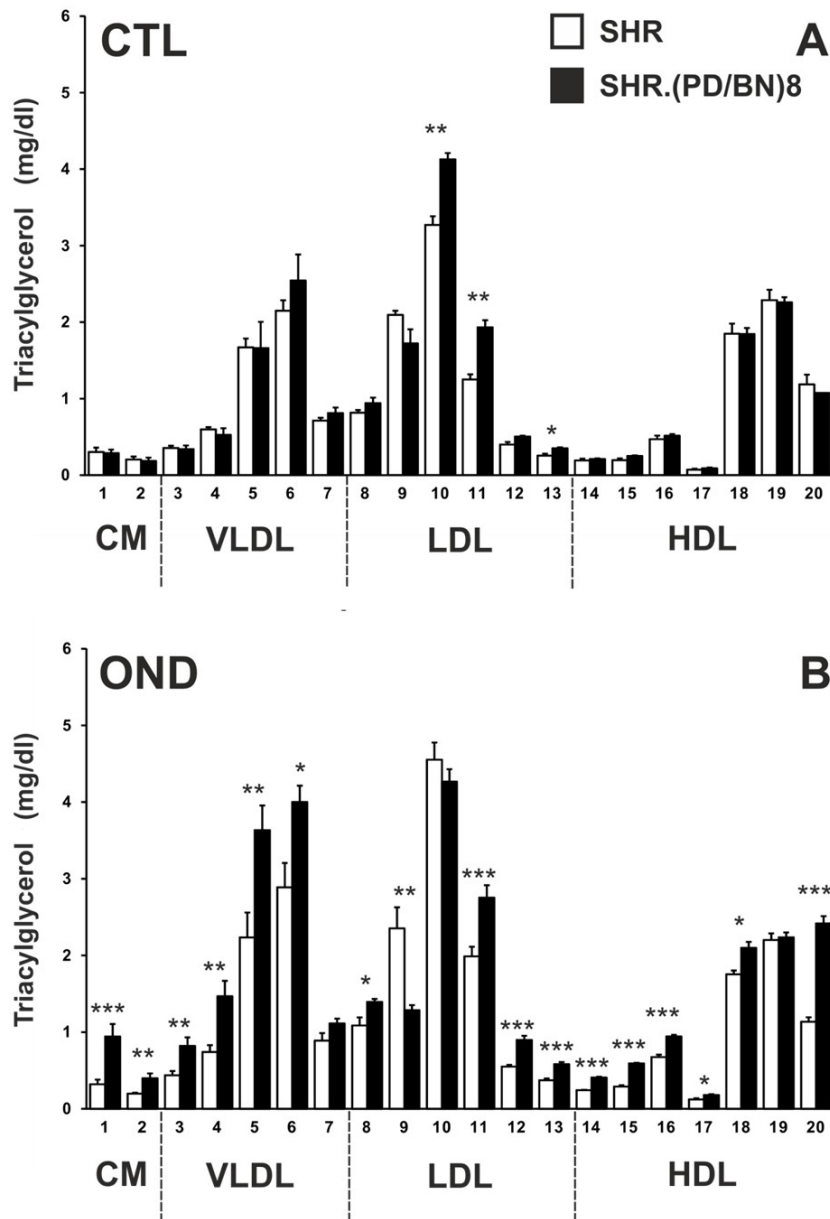
Obrázek 14: Srovnání průběhu glykemických křivek orálního glukózového tolerančního testu u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (OND, panel B) mezi samci kmene SHR (prázdné symboly) a kongenního kmene SHR.(PD/BN)8 (plné symboly). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a OND) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$**

Podávání ondansetronu nepatrně zhoršilo glukozovou toleranci u kmene SHR.(PD/BN)⁸ ve srovnání s jeho progenitorovým kmenem SHR. Účinek ondansetronu na metabolismus sacharidů byl popsán již dříve jak u experimentálních modelových organizmů (Carvalho F. et al., 2002; Madhane S. et al., 2012), tak u člověka (Patel A. et al., 2011). Potenciální vysvětlení se pravděpodobně vztahuje k roli serotoninu v regulaci energetické rovnováhy a glykémie prostřednictvím drah centrálního nervového systému (Tecott L.H., 2007). Vlastní mechanismus ještě zbývá objasnit, protože v příslušných oblastech hypotalamu je exprimováno několik podskupin serotoninových receptorů. V našem modelovém systému jsme nepozorovali žádné rozdíly v příjmu potravy mezi experimentálními skupinami obou testovaných kmenů, kterým byl podáván ondansetron. Zřetelná změna se objevila v utilizaci energie u obou kmenů, kdy při podávání ondansetronu oba kmene vykazovali redukci viscerálního tuku a zřetelný posun v lipidovém profilu. Při orální aplikaci ondansetronu jsou pozorované účinky pravděpodobně způsobeny modulací periferní serotoninové stimulace. Nejvýznamnějším zjištěním naší studie je signifikantní vzestup v koncentracích triacylglycerolu 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.

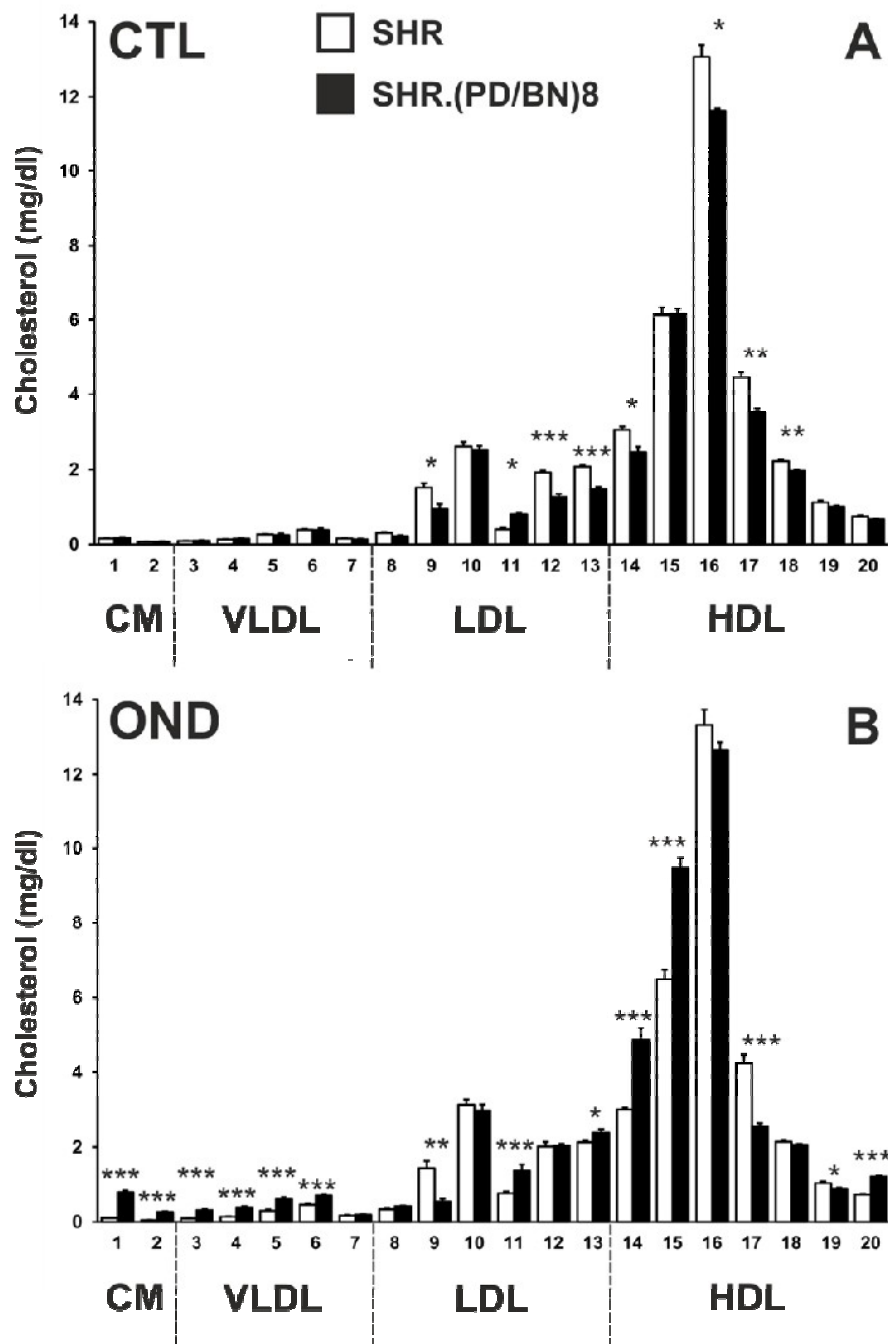
Podobný efekt byl popsán při použití druhé generace antipsychotických léčiv s antagonistickým účinkem na serotoninové receptory např. olanzapinu (Rummel-Kluge C. et al., 2010), kdy došlo k indukci dyslipidémie a sekundárně i k nárůstu hmotnosti (de Leon J. a Diaz F.J., 2007). Předpokládá se určitá role jednonukleotidového polymorfismu rs2229416 u genu pro acetyl-koenzym A karboxylázu α (*ACACA*) ve zprostředkování výše zmíněného hyperlipidemického efektu. Tento gen není obsažen v diferenciálním segmentu kongenního kmene SHR.(PD/BN)⁸ a ani nemá zřetelné funkční vazby na geny v segmentu obsažené.

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.

Tento projekt byl řešen v rámci grantu GA UK na téma Farmakogenomický nexus mezi metabolickým syndromem a morfogenezí (*Pharmacogenomic nexus between metabolic syndrome and morphogenesis*), hlavní řešitelkou projektu byla Mgr. Michaela Krupková.



Obrázek 15: Koncentrace triacylglycerolů ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (OND, panel B) kmenů SHR (prázdné sloupce) a SHR.(PD/BN)8 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a OND) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti, od největších po nejmenší částice.**



Obrázek 16: Koncentrace cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (CTL, panel A) a experimentálních skupin (OND, panel B) kmenů SHR (prázdné sloupce) a SHR.(PD/BN)8 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a OND) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti od největších po nejmenší částice.**

4.3. 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.

Arteriální hypertenze je hlavním nezávislým rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění. Hypertenze predisponuje k hypertrofii levé srdeční komory (LVH), která dále zvyšuje kardiovaskulární morbiditu a mortalitu. Srdce hypertenzních pacientů podstupuje strukturní a funkční přestavbu (Zhang P. a Mende U., 2011), která zahrnuje všechny tkáňové komponenty. Kromě hypertrofie kardiomyocytů tento proces zahrnuje také zvýšené ukládání intersticiálního a perivaskulárního kolagenu a přestavby intramurálních arteriol (Schwartzkopff B. et al., 1995). Tyto strukturální změny jsou považovány za anatomický podklad funkčních abnormalit, které ovlivňují levou srdeční komoru a koronární cirkulaci u pacientů s hypertenzí (Cecchi F. et al., 2009).

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). Tyto přestavby v konečném důsledku způsobují negativní změny komor vedoucí k abnormalitám v srdeční funkci, zvláště zhoršení diastolické relaxace a plnění bez systolické dysfunkce (Slama M. et al., 2002). V současné době se odhaduje, že okolo 50 % pacientů se srdečním selháním trpí diastolickým srdečním selháním (Gradman A.H. a Wilson J.T., 2009).

Mimo hypertenze přispívají k vývoji myokardiální fibrózy u lidské hypertenze další hemodynamické faktory. Mezi tyto faktory patří nález myokardiální fibrózy nejen v levé, ale také v pravé komoře a interventrikulárním septu v postmortem studiích lidských srdcí u jedinců s hypertenzním srdečním onemocněním. Nedávné studie také ukázaly, že schopnost antihypertenzní léčby redukovat fibrózu u hypertenzních pacientů, u nichž byla biopsií prokázána myokardiální fibróza, může být nezávislá na jejich antihypertenzním efektu (Gonzales A. et al., 2004; Castoldi G. et al., 2010).

Spontánně hypertenzní kmen potkana SHR reprezentuje excelentní model LVH a srdeční fibrózy. U tohoto kmene a dalších kmenů od něj odvozených byla mapována řada lokusů kvantitativních znaků (QTL) pro regulaci hmotnosti srdce. Nedávno byly na molekulární úrovni identifikovány první dvě QTL nezávislá na krevním tlaku asociovaná s LVH. Jedná se o geny *Ogn* (osteoglycin) a *Endog* (endonukleáza G), které se nachází na chromozomech 17 a 3 (Petretto E. et al., 2008; McDermott-Roe C. et al., 2011). Tyto nálezy podporují možnost, že LVH není pouze sekundárním znakem hypertenze a že genetická predispozice může hrát důležitou roli v hypertrofické odpovědi. 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). Kromě toho bylo nedávno identifikováno nové QTL asociované se srdeční intersticiální fibrózou u rekombinantních inbredních kmenů BXH/HXB na chromozomu 8 v okolí genu *Zbtb16* (*Plzf*) (Mancini et al., 2013). Gen *Plzf* se jeví jako prominentní kandidát pro QTL asociované se srdeční hypertrofií a také s fibrózou (Wang N. et al., 2012). V naší studii jsme geneticky definovali diferenciální segment chromozomu 8 izolovaný u SHR.PD-*chr.8* minimální kongenní podlinie (SHR-*Lx* PD5). Využili jsme sekvenování genů a expresní analýzy, stejně jako histomorfometrického a hemodynamického profilování k identifikaci genu *Plzf* jako genu odpovědného za QTL asociované s predispozicí k hypertenzi, LVH a intersticiální fibróze.

Odvození a charakterizace kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 bylo popsáno již dříve. Nicméně návrhem dalších polymorfních markerů pro genotypizaci jsme byli schopni definovat kongenní segment s daleko větší přesností, což vedlo k vyloučení několika genů z původní anotace diferenciálního segmentu. 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

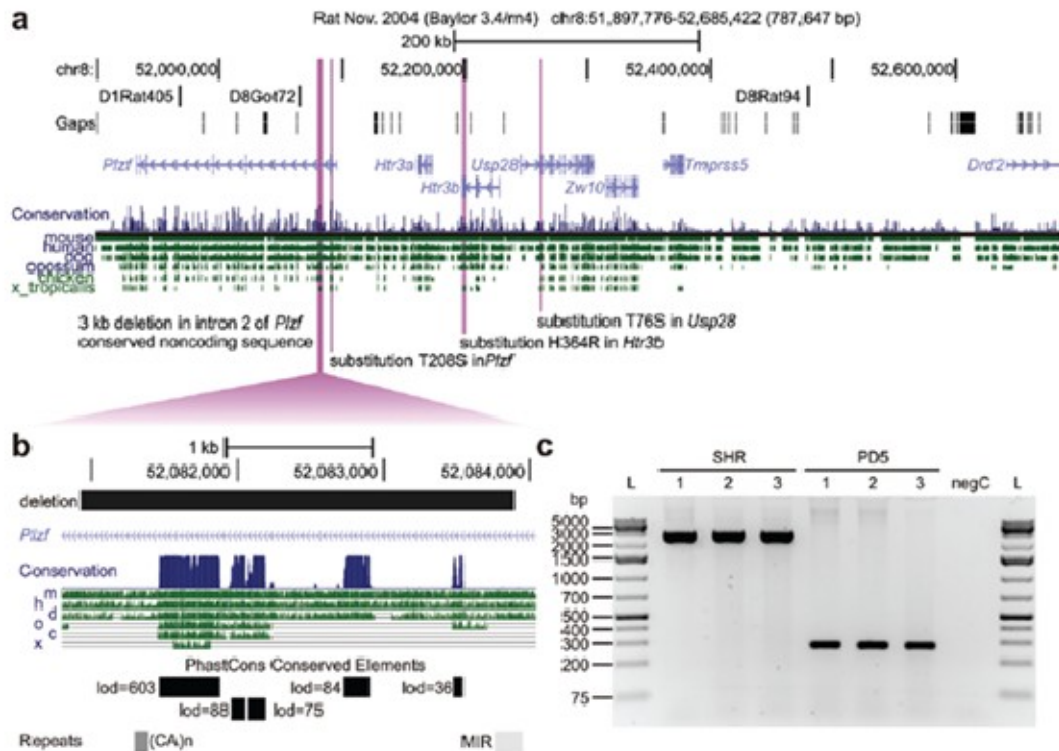
nekódujícím exonem a částí prvního intronu. Protože genomové sekvence kmenů SHR/Ola a BN-*Lx/Cub* (kongenní kmen nesoucí segment chromozomu 8 PD původu izolovaný u podlinie SHR-*Lx* PD5) jsou známy, provedli jsme přímo analýzu genetických polymorfizmů v diferenciálním segmentu SHR-*Lx* PD5. Podle tohoto 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 17).

Hmotnosti srdce jsou signifikantně menší u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 ve srovnání s kmenem SHR. Navíc jsme při histologické analýze odhalili, že redukce velikosti srdce je 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 nezávisí na příjmu soli, protože při jejím podání došlo k propočetnému vzestupu krevního tlaku u obou skupin.

Gen *Plzf* obsahuje delecí intronu, která je prominentním kandidátem pro LVH a intersticiální fibrózu. Důsledkem této delecce 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 prehypertenčních juvenilních potkanů a zjistili jsme výraznou redukcí 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; Sचेfe J.H. et al., 2006). Také jsme nezaznamenali rozdílnou expresi dalších genů přítomných uvnitř diferenciálního segmentu, s výjimkou zvýšené exprese genu *Tmprss5* v srdci osmidenních potkanů. Hladiny mRNA genů *Htr3a*, *Htr3b* a *Drd2* byly u obou orgánů sotva detekovatelné.



Obrázek 17: (a) Detailní mapa diferenciálního segmentu chromozomu 8 v kongenním kmenu SHR-*Lx* PD5. Vizualizace je založena na UCSC Genome Browser. (b) Detail delecce 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.

Plzf působí jako transkripční represor, který se na DNA váže svou C-terminální doménou s motivem zinkových prstů (Li J.Y. et al., 1997), zatímco N-terminální BTB/POZ doména je důležitá pro homodimerizaci a transkripční represi (Melnick A. et al., 2000). Řada důkazů poukazuje na možnou účast *Plzf* v patogenezi hypertenze, srdeční hypertrofie a srdeční fibrózy. Mezi tyto důkazy patří role *Plzf* v renálních epitelálních buňkách jako

součástí negativní zpětnovazebné regulace mineralokortikoidů. Aldosteron indukuje *Plzf*, které naopak suprimuje expresi beta a gama podjednotek epiteliálního sodného kanálu (ENaC), a tak limituje reabsorpci sodíku (Náray-Fejes-Tóth A. et al., 2008). Také přímá interakce *Plzf* s angiotensinovým receptorem AT_2 indukuje expresi podjednotky *p85α* fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), která podporuje proteinovou syntézu. Tato dráha může vysvětlit chybějící srdeční hypertrofickou odpověď u AT_2 deficientních myší (Senbonmatsu T. et al., 2003). Nedávno bylo zjištěno, že knockout myši v genu *Plzf* jsou rezistentní k angiotenzinem indukované srdeční hypertrofii a fibróze (Wang N. et al., 2012). Konečně přímá interakce *Plzf* s proreninovým receptorem vede k vzestupu exprese *p85α* PI3K, což stejný cíl jako u signalizační kaskády AT_2 . Zdá se, že (P)RR hraje klíčovou roli v konečném kardiovaskulárním poškození (Ahmed B.A. et al., 2011). Při použití kompetitivního peptidového inhibitoru proreninového receptoru došlo ke zvýšení vývoje srdeční fibrózy u potkanů kmene SHR, kteří byli vystaveni dietě s vysokým obsahem soli (Ichihara A. et al., 2006). Navíc stimulace reninu měla proliferativní a antiapoptotické účinky na potkaní kardiomyocyty, které jsou kompletně závislé na funkci *Plzf*. Z tohoto důvodu může být tato dráha propojena s predispozicí k srdeční hypertrofii nebo fibrózou spojenou s hypertenzí (Scheffe J.H. et al., 2006). Vzhledem k tomu, že jsme nezaznamenali žádný rozdíl v expresi genu *Plzf* v ledvinách, můžeme předpokládat, že nedošlo k narušení kaskády aldosteron/ENaC. Navíc exprese proreninového receptoru a podjednotky *p85α* PI3K u juvenilních srdcí samců kmene SHR-*Lx* PD5 a SHR se signifikantně nelišila. Tato pozorování potvrzují, že za stanovené fenotypové rozdíly mohou být odpovědné ještě další dráhy nebo regulační kaskády.

Mimo genu *Plzf* obsahuje diferenciální segment kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 dalších 6 genů. Geny *Htr3a* a *Htr3b* představují podjednotky 5-HT₃ receptoru (podtyp serotoninového receptoru), který je exprimován přednostně v centrálním nervovém systému. Inhibitory 5-HT₃ tvoří silné antiemetické léky (Gyermek L., 1995). Gen *Usp28* kóduje deubikvitinační enzym, který se účastní při vývoji tumorů, buď přímo prostřednictvím stabilizace onkogenu *Myc* (Popov N. et al., 2007) nebo nepřímo pomocí procesu angiogeneze a tvorby metastáz (Flugel D. et al., 2012). *Zw10* kóduje kinetochor, který je nutný pro vhodnou segregaci chromozomů během mitózy (Chan G.K. et al., 2000). *Tmprss5*, také nazývaný spinesin, je transmembránová serinová proteáza neznámé funkce, která je exprimována hlavně v astrocytech míchy (Yamaguchi T. et al., 2008). *Drd2* kóduje D2

podtyp dopaminového receptoru. Jeho mutace jsou asociovány s myoklonální dystonií (Klein C et al., 1999) a schizofrenií (Schindler K.M. et al., 2002). Navíc kódující sekvence genu *Drd2* u kongenní podlinie SHR-*Lx* PD5 odrekombinovala, což společně s absencí rozdílu exprese tohoto genu mezi kmeny SHR a SHR-*Lx* PD5 svědčí proti účasti *Drd2* na pozorovaných fenotypových rozdílech.

Identifikovali jsme *Plzf* jako prominentní kandidátní gen při vývoji hypertenze, LVH a intersticiální fibrózy u kmene SHR. Nynější zjištění mohou zvýšit naše pochopení patogeneze hypertenze a srdečních komplikací jako jsou hypertrofie a fibróza, faktorů, které v konečném důsledku vedou k srdečnímu selhání.

4.4. Farmakogenetická interakce 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.

4.4.1. Farmakogenetická interakce dexametazonu a Cd-36 deficientního segmentu u chromozomu 4 ovlivňuje distribuci triacylglycerolů a cholesterolu do jednotlivých lipoproteinových frakcí

Glukokortikoidy se již po desetiletí využívají pro léčbu široké škály zánětlivých, alergických, hematologických a dalších onemocnění. Navzdory jejich významu v terapii řady chorob je léčba glukokortikoidy často doprovázena výraznými vedlejšími účinky, mezi které patří mj. dyslipidémie, diabetes, obezita, osteoporóza, úbytek svalové hmoty, zhoršené hojení ran nebo revmatoidní artritida (Brotman D.J. et al., 2005). Zatímco molekulární mechanismus metabolických poruch indukovaných glukokortikoidy byl předmětem intenzivního zkoumání (Qi D. and Rodrigues B., 2007), genetická podstata rozdílných individuálních odpovědí na podávání glukokortikoidů se dosud nachází na okraji zájmu. Bylo navrženo několik genů, u kterých se předpokládá souvislost se zprostředkováním nebo modulací metabolických účinků glukokortikoidů, včetně funkčních kandidátů (např. glukokortikoidní receptor, 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza 1 a 2 a corticosteroid-binding globulin a peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (Gustafsson J.A. et al., 1987; Paterson J.M. et al., 2005; Sandberg A.A. et al., 1960; Bernal-Mizrachi C. et al., 2003). Již dříve jsme na základě diferenciální vazebné studie identifikovali rozsáhlou sadu lokusů kvantitativních znaků podílejících se na genomické architektuře metabolického syndromu, včetně jeho dynamiky v odpovědi na dexametazonem indukované změny metabolismu lipidů a sacharidů (Šeda O. et al., 2005a).

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. 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; viz Metody).

Ve věku 7 měsíců jsme samce jednotlivých kmenů náhodně rozdělili do dvou skupin, kontrolní a experimentální. Experimentální skupině byl podáván dexametazon (2.6 $\mu\text{g/ml}$) ve vodě po dobu tří dnů.

Kontrolní skupiny obou kmenů vykazovaly podobný morfometrický profil. Kongenní kmen BN.SHR4 měl lehce sníženou relativní hmotnost srdce a testes ve srovnání

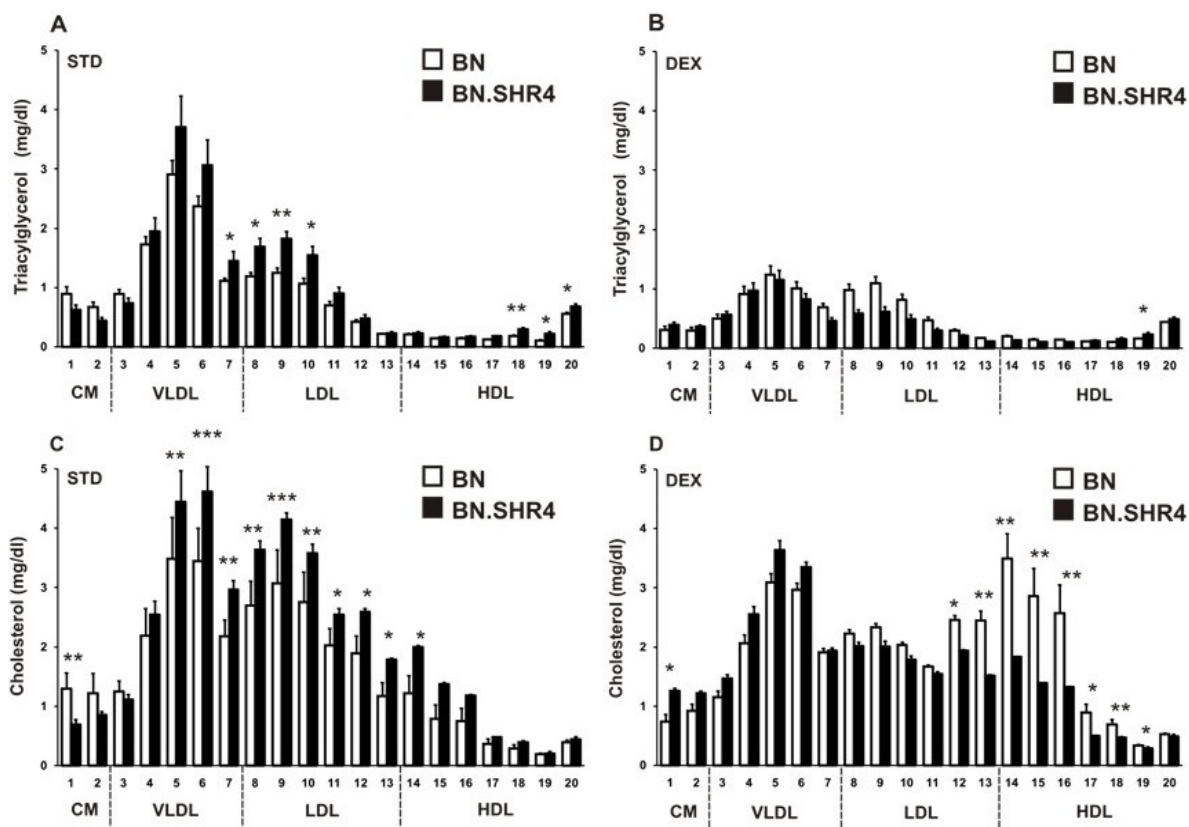
s kmenem BN/Cub. Ačkoli dexametazon vyvolal výraznější snížení tělesné hmotnosti BN.SHR4 při ekvivalentním příjmu potravy, redukce retroperitoneálního tuku byla výraznější u kmene BN/Cub.

Celková hladina triacylglycerolů v séru se mezi kontrolními skupinami obou kmenů signifikantně nelišila, při podrobnější analýze jsme však odhalili vyšší hladinu triacylglycerolů u kmene BN.SHR4 ve frakcích malých VLDL, velkých, středních a malých LDL a malých a velmi malých HDL (Obrázek 18A). 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 (Obrázek 18B).

Kontrolní skupina kmene BN.SHR4 na standardní dietě vykazovala ve srovnání s kmenem BN vyšší hladinu cholesterolu ve většině lipoproteinových frakcí kromě chylomikronů (Obrázek 18C). 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 (Obrázek 18D).

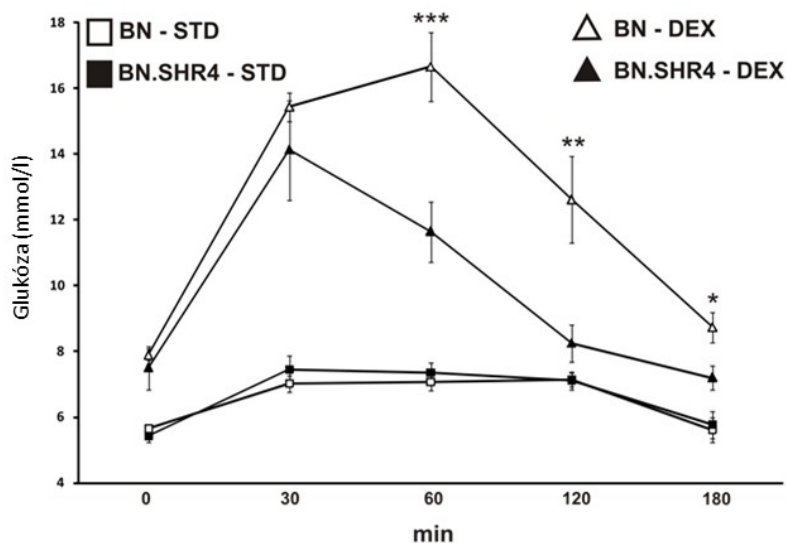
Zatímco u kontrolních skupin nebyl pozorován rozdíl v glukozové toleranci mezi oběma kmeny, dexametazon podstatně výrazněji indukoval glukozovou intoleranci u kmene BN/Cub ve srovnání s kmenem BN.SHR4 (Obrázek 19).

Již dříve byla genetická variace v genu *CD36* spojena s dyslipidemií a inzulinovou rezistencí jak u experimentálních modelů (Aitman T.J., et al. 1999; Febbraio M., et al. 1999), tak u člověka (Love-Gregory L. et al., 2008; Ma X. et al., 2004). Navíc jsme gen *Cd36* ustavili jako klíčovou entitu pro zprostředkování metabolických účinků thiazolidinedionů (Šeda O. et al., 2003a; Qui N. et al., 2002). 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. Dexametazon je znám tím, že navozuje celkovou inzulinovou rezistenci a výrazně ovlivňuje lipidový metabolismus, a to jak při krátkodobém, tak i při dlouhodobém podávání (Qi D. et al., 2004; Brotman D.J. et al., 2005; Gounarides J.S. et al., 2008).



Obrázek 18: Koncentrace triacylglycerolů (A, B) and cholesterolu (C, D) ve 20 lipoproteinových frakcích u kontrolních (STD, A a C) a experimentálních skupin (DEX, B a D) samců kmene BN/Cub (prázdné sloupce) a kongenního kmene BN.SHR4 (plné sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a DEX) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti od největších po nejmenší částice.**

V našich předchozích studiích jsme ukázali, že dexametazon současně indukuje svalově specifickou inzulinovou rezistenci a dyslipidémii u experimentálních modelů metabolického syndromu včetně potkaních kmenů odvozených od kmene SHR (Šeda O. et al., 2005b), polydaktylního kmene, i u kmene BN/Cub (Šeda O. et al., 2005a). Gen *CD36* je přitom jedním z cílových genů dexametazonu (Abumrad et al. N.A., 1993; Yesner L.M. et al., 1996). Ačkoliv je předčasné spekulovat o detailnějším mechanismu sledované interakce, která může zahrnovat zvýšené využití glukózy v periferních tkáních v důsledku neefektivního vstupu mastných kyselin do buněk, můžeme předpokládat, že *Cd36* anebo některé další geny přítomné na diferenciálním segmentu chromozomu 4 reprezentují farmakogenetický uzel zvláštního významu pro metabolické působení glukokortikoidů (Yildirim M.A. et al., 2007).



Obrázek 19: Orální glukózový toleranční test u kontrolních (STD; čtverec) a experimentálních skupin samců (DEX; trojúhelník) kmene BN/Cub (prázdné symboly) a BN.SHR4 (plně symboly). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (dvojcestné analýzy rozptylu s faktory KMEN a DEX) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; ***... $p < 0.001$.

Naše studie prezentuje farmakogenetickou interakci mezi úzkým genomickým segmentem s mutovaným genem *Cd36* a dexametazonem, která ovlivňuje glukózovou intoleranci a redistribuci triacylglycerolů a cholesterolu do lipoproteinových frakcí.

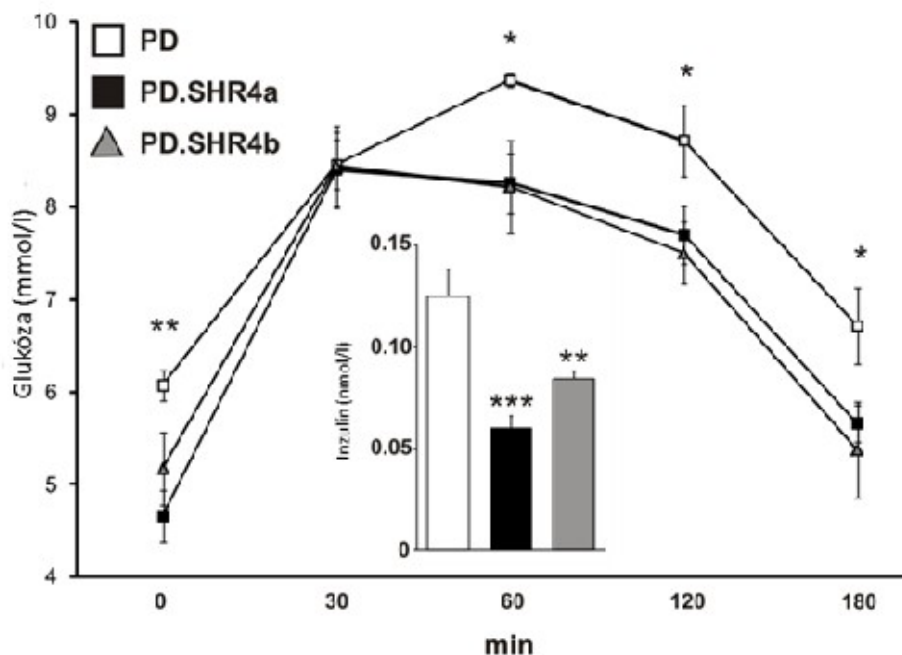
4.4.2. Metabolický a transkriptomický profil *Cd-36* deficientních kongenních kmenů PD.SHR4a a PD.SHR4b

Metabolický syndrom je komplexní lidské onemocnění se vzrůstajícím celosvětovým výskytem. V nedávné době bylo několik dříve využívaných definic sjednoceno do jedné unifikované definice metabolického syndromu (Alberti K.G. et al, 2009). Tato definice řadí dyslipidémii, obezitu, hypertenzi a glykémii nalačno mezi nejvýznamnější rysy tohoto syndromu. I přes zřejmou ekogenomickou (interakce genomu a prostředí) povahu patogeneze syndromu a jeho jednotlivých aspektů je identifikace kauzálních genetických variant nepříliš úspěšná dokonce i v období velkých, celogenomových asociačních studií (Kraja A.T. et al., 2011). K dnešnímu datu je jedním z mála úspěšně a pozičně klonovaných kandidátů, vázaných k řadě aspektů metabolického syndromu, gen kódující translokázu

mastných kyselin *Cd36*, jehož mutace byla původně objevena u potkaního kmene SHR (Aitman T.J. et al., 1997; Aitman T.J. et al., 1999; Pravenec M. et al., 2001). Je zajímavé, že komplexní povaha mutace genu *Cd36* (chimerický gen vzniklý nerovnoměrnou rekombinací mezi genem *Cd36* a jedním z jeho pseudogenů) u kmene SHR nevede k úplnému chybění exprese (Glazier A.M. et al., 2002), ale spíše k její silné tkáňově specifické redukci (Bonen A. et al., 2009). Úplné chybění aktivity genu *CD36* se u člověka vyskytuje jen vzácně, nicméně v literatuře je popsána řada polymorfismů tohoto genu, u kterých se předpokládá jen modulující efekt na expresi a funkci *CD36* (Yamamoto N. et al., 1994; Kashiwagi H. et al., 1996). Modely nesoucí nekompletní typ mutace mohou relevantně reprezentovat jemnější funkční následky běžných polymorfismů člověka v genu *CD36*. V nedávné době bylo několik jednonukleotidových polymorfismů v genu *CD36* u člověka asociováno s koncentrací lipidů, metabolickým syndromem (Love-Gregory L. et al., 2008; Noel S.E. et al., 2010) nebo obezitou (Bokor S. et al., 2010).

Již dříve jsme ukázali, že vnesení segmentu potkaního chromosomu 4, který zahrnuje mutantní gen *Cd36* SHR původu na genetické pozadí kmene BN/Cub, vede k zhoršení inzulinové senzitivity a k vzestupu hladin triacylglycerolů a volných mastných kyselin u kongenního kmene BN.SHR4 (Šeda O. et al., 2002). Navíc jsme zjistili, že tato limitovaná část genomu je klíčová pro silné farmakogenetické interakce zahrnující například rosiglitazon (Šeda O. et al., 2008) a dexametazon (viz 4.4.1). U kmene SHR byl gen *Cd36* identifikován jako klíčová entita pro působení thiazolidinedionů pomocí SHR transgenních a kongenních kmenů exprimujících „wild type“ *Cd36* (Qi N. et al., 2002).

Testovali jsme metabolický a transkriptomický dopad přítomnosti mutovaného genu *Cd36* uvnitř genomického pozadí vysoce inbredního modelu metabolického syndromu, kmene PD/Cub. Volba byla řízena předchozí diferencíální vazebnou studií provedenou v segregující F2 populaci PD/Cub x BN.SHR4, ve kterém jsme mapovali signifikantní lokusy kvantitativních znaků pro prvky metabolického syndromu v oblasti genu *Cd36*.



Obrázek 20: Srovnání orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) a koncentrace inzulínu mezi kmenem PD/Cub a kongenními kmeny PD.SHR4. A. Glykemické křivky u samic kmene PD/Cub (bílé čtverce) a kongenních kmenů PD.SHR4a (černé čtverce) a PD.SHR4b (šedé trojúhelníky) na standardní dietě. B. Koncentrace inzulínu nalačno u kmene PD/Cub (bílý sloupec) oproti PD.SHR4a (černý sloupec) a PD.SHR4b (šedý sloupec). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (jednocestné analýzy rozptylu s faktorem KMEN) pro OGTT a lačnou inzulinémií znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; ***... $p < 0.001$.

Provedli jsme genotypizaci diferenciálního segmentu pomocí 54 polymorfních mikrosatelitních markerů u obou PD.SHR4 kongenních kmenů. 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. Celogenomová analýza sady markerů provedená u obou kmenů vyloučila přítomnost dalších alel, které by nebyly PD/Cub původu, kromě těch na chromozomu 4, což potvrzuje kongenicitu obou nových kmenů. Segmenty SHR původu na chromozomu 4 proto představují jediný genomický rozdíl mezi kmenem PD/Cub a kongenními kmeny PD.SHR4.

Při analýze morfometrického profilu nevykazovaly ani kmen PD/Cub, ani oba kmeny PD.SHR4 žádné rozdíly v hmotnosti, distribuci tukové tkáně nebo v relativní hmotnosti vnitřních orgánů. Jedinou výjimkou byla lehce snížená hmotnost jater u kmene

PD.SHR4a. Oba kongenní kmeny vykazovali signifikantně nižší hladiny lačné glukózy a inzulínu, stejně tak jako celkově lepší glukózovou toleranci ve srovnání s progenitorovým kmenem PD/Cub (Obrázek 20). Koncentrace plasmatického adiponektinu a volných mastných kyselin byly srovnatelné u všech tří kmenů, zatímco volný glycerol byl signifikantně nižší u obou kongenních kmenů, PD.SHR4a a PD.SHR4b.

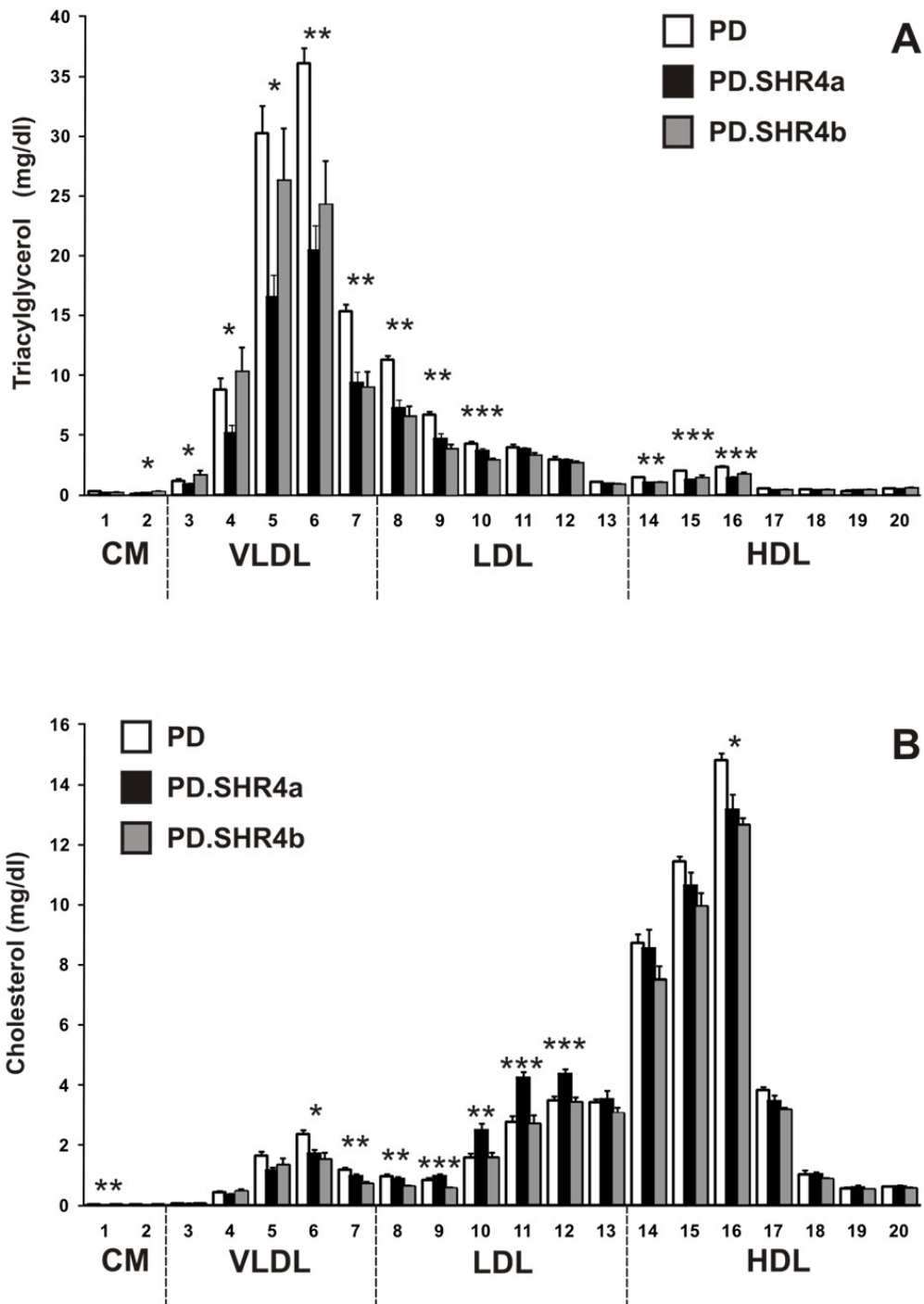
Zaznamenali jsme signifikantně nižší celkovou koncentraci triacylglycerolů u kmene PD.SHR4a ve srovnání s kmenem PD/Cub. Jednalo se především o snížení o 43% a 22% u frakcí VLDL a LDL. Podobný, ale méně výrazný trend byl zaznamenán i u kmene PD.SHR4b. Zde došlo k statisticky významnému snížení koncentrace triacylglycerolů pouze u LDL a HDL frakce (obrázek 21A). 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, především v důsledku nižší koncentrace HDL frakcí cholesterolu. Změněné velikosti lipoproteinových částic jsme zaznamenali pouze u kmene PD.SHR4b, který vykazoval větší VLDL částice při srovnání s oběma kmeny, PD/Cub a PD.SHR4a a menší LDL částice ve srovnání s kmenem PD.SHR4a (Obrázek 21B).

Jelikož kmen PD.SHR4a nese podstatně kratší diferenciální fragment ve srovnání s kmenem PD.SHR4b a přesto vykazuje větší posun metabolického profilu, rozhodli jsme se porovnat jaterní transkriptom tohoto kmene s transkriptomem kmene PD/Cub. Po filtraci výsledků pomocí filtrů kvality a adjustaci hladin statistické významnosti pro mnohonásobné srovnávání jsme našli 172 transkriptů diferencially exprimovaných mezi kmeny PD/Cub a PD.SHR4a, kdy 48 transkriptů vykazovalo více než dvojnásobný rozdíl v míře exprese. Počet transkriptů se sníženou nebo zvýšenou expresí u kmene PD.SHR4a oproti PD/Cub byl srovnatelný. Kromě očekávané redukce snížené 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. Ostatní diferencially exprimované geny byly rozprostřeny téměř na všech chromozomech. Z důvodu ověření výsledků byla provedena kvantitativní real-time PCR analýzy 9 reprezentativních genů : *Abcg5* (ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE) member 5); *Egr1* (early growth response 1); *Igfbp2* (insulin-like growth factor binding protein 2); *Per2* (period homolog 2 (drosophila)); *Nr1h3* (nuclear-receptor subfamily 1, group 1, member 3); *Apobec1* (apolipoprotein B mRNA editing

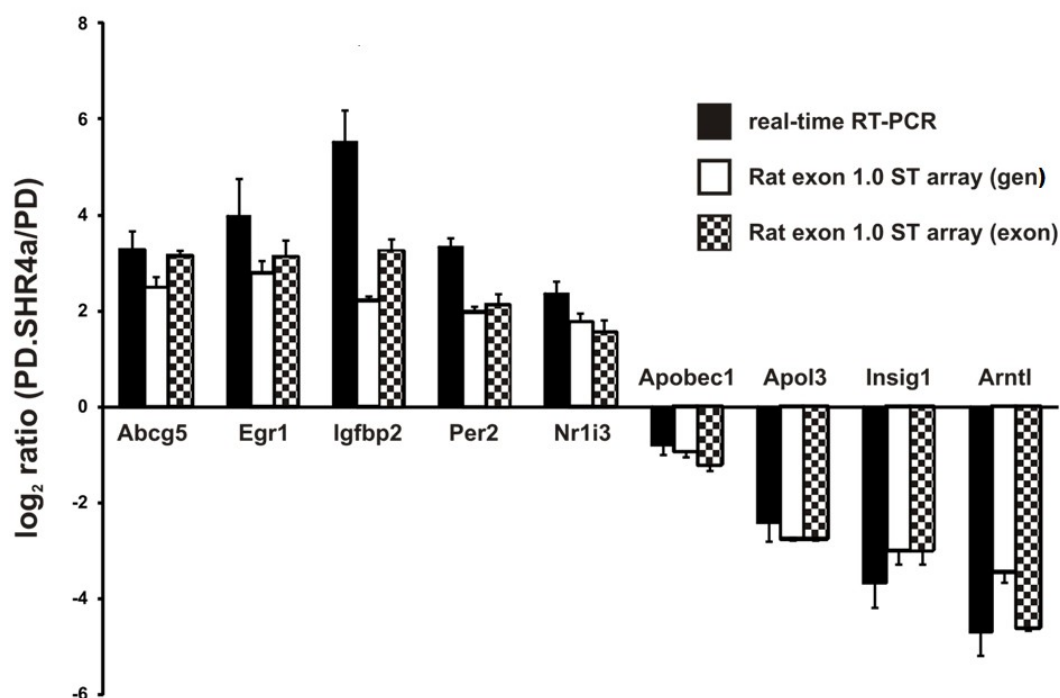
enzyme, catalytic polypeptide 1); *Apol3* (apolipoprotein L,3); *Insig1* (insulin induced gene 1); *Arntl* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like). Ve všech případech jsme byli schopni potvrdit expresní rozdíl mezi kmeny PD a PD.SHR4a (Obrázek 22).

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. Rovněž jsme pomocí metod mechanistických sítí (Krämer A. et al., 2014) modelovali potenciální vztahy mezi těmito geny. Nejdříve jsme určili zastoupení naší sady genů v kanonických drahách využitím příslušného modulu v softwaru Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Po korekci na mnohonásobné srovnávání (Benjamini-Hochbergova korekce, viz Metody) jsme identifikovali 4 dráhy signifikantně obohacené o geny se signifikantně rozdílnou expresí mezi kmeny PD/Cub a PD.SHR4a: dráha cirkadiálního rytmu, metabolismu xenobiotik, aktivace PXR/RXR a inhibice funkce RXR zprostředkovaná LPS/IL-1. Následně jsme použili „toxicity functions analysis“ (IPA), kdy pouze jaterní regenerace, steatóza a poranění renálních tubulů překonalo statistický práh významnosti jak v celkovém vzorku 172 genů, tak v genech se zvýšenou expresí u kmene PD.SHR4. Poté jsme pokračovali v posouzení potenciálních funkčních vztahů u genů diferenciatně exprimovaných mezi kongenním kmenem PD.SHR4a a progenitorovým kmenem PD/Cub využitím modelování mechanistických sítí. Aplikovali jsme jak přístup zaměřený na vyhledávání přímých interakcí mezi identifikovanými geny, tak algoritmus pro vyhledání nejkratšího možného propojení těchto transkriptů prostřednictvím dalších genů. Oba postupy vedly k identifikaci několika hlavních modulů, z nichž nejvýraznější obsahoval čtyři geny se zásadní rolí v regulaci cirkadiálního rytmu.

Přenos diferenciatního segmentu chromozomu 4 včetně mutovaného genu *Cd36* SHR původu na genetické pozadí kmene PD/Cub vyvolal zlepšení glukózové tolerance, snížení inzulinémie a posun v hladinách lipidů. Tyto změny jsou v přímém kontrastu s předchozími experimenty, ve kterých byl obdobný segment přenesen na genetické pozadí kmene BN (Šeda O. et al., 2003a; Šeda O. et al., 2002). Jak již bylo dříve ukázáno, koncentrace inzulínu, glukózy, volných mastných kyselin a cholesterolu se mezi kmeny SHR a PD/Cub neliší (Šedová L. et al., 2000). Současné výsledky ukazují přítomnost interakce mezi geny uvnitř vnesené oblasti a genetickým pozadím kongenních kmenů.



Obrázek 21: Koncentrace triacylglycerolů (A) a cholesterolu (B) ve 20 lipoproteinových frakcích u samců kmene PD/Cub (bílé sloupce) vs. PD.SHR4a (černé sloupce) a PD.SHR4b (šedé sloupce). Hladiny významnosti Tukeyho post-hoc testu (jednocestné analýzy rozptylu s faktorem KMEN) znázorněné v rámci grafů jsou následující: *... $p < 0.05$; **... $p < 0.01$; *... $p < 0.001$. Jednotlivé třídy lipoproteinů jsou řazeny podle velikosti od největších po nejmenší částice.**



Obrázek 22: 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*).

Ačkoliv řada studií včetně té naší demonstrovala asociaci chybění genu *Cd36* s rysy metabolického syndromu jako je inzulinová rezistence nebo dyslipidémie (Aitman T.J. et al., 1997; Aitman T.J. et al., 1999; Febbraio M. et al., 1999; Pravenec M. et al., 2001; Šeda O. et al., 2002; Šeda O. et al., 2003b), jsou zde také zprávy potvrzující, že za určitých podmínek expresní úroveň *Cd36* skutečně koreluje pozitivně s nepříznivým metabolickým profilem. Bylo zjištěno, že v afroamerické populaci varianty v *CD36*, které redukuje expresi proteinu, podporují protektivní metabolický profil, zvláště z hlediska HDL a VLDL hladin lipidů (Love-Gregory L. et al., 2011). Také *Cd36* „knockout“ myši na standardní dietě vykazovaly ve srovnání s „wildtype“ kontrolami nižší lačné koncentrace glukózy a inzulinu (Hajri T. et al., 2002), podobně jako PD.SHR4 kongenní kmeny v této studii. Na druhou stranu autoři

zaznamenali u myši s chybějícím *Cd36* zvýšenou hladinu triacylglycerolů a volných mastných kyselin, což je v kontrastu k poklesu nebo nulovým změnám, které jsme pozorovali. Absence *Cd36* chrání myši před inzulinovou rezistencí spojenou s obesitou a hyperlipidémií indukovanou vysokotukovou dietou (Kennedy D.J. et al., 2011). Naopak vzestup exprese jaterního *Cd36* jako odpověď k obesitě indukované vysokotukovou dietou vede ke zhoršení ukládání a sekrece triacylglycerolů v játrech (Koonen D.P.Y. et al., 2007).

Kromě genu *Cd36* představuje signifikantně zvýšená exprese *Igfbp2* u kmene PD.SHR4a možný mediátor zvýšené inzulinové senzitivity, jak bylo zjištěno například u *Igfbp2* transgenních myši (Wheatcroft S.B. et al., 2007). Pozorování souběžné zvýšené exprese *Abcg5* a snížené exprese *Insig1* u kongenních kmenů PD.SHR4 odpovídá předpokládané roli těchto genů v cholesterolovém efluxu a jejich buněčné zpětnovazebné regulaci. Tento posun, zaznamenaný i u *Insig1*^{-/-} *Insig2*^{-/-} myši (Engelking L.J. et al., 2005), může potvrzovat tendenci směrem k steatóze jater, ačkoliv jsme tento parametr nehodnotili přímo.

Jedním z významných výsledků v této studii byla identifikace diferenciatně exprimované sady genů cirkadiálního rytmu. Základní provázanost cirkadiálního rytmu, inter a intra-orgánové desynchronizace s metabolickými a signalizačními drahami zahrnutými v patogenezi kardiometabolických onemocnění byla podpořena rostoucí řadou důkazů (Eckel-Mahan K. a Sassone-Corsi P., 2009; Maury E. et al., 2010). Nejvíce sníženou expresi u kmene PD.SHR4a v játrech ve srovnání s kmenem PD/Cub byl gen *Arntl* (také známý jako *Bmal1*), což je důležitá složka „master circadian pacemaker“ (Bunger M.K. et al., 2000), společně se zvýšenou expresí genů *Per2* a *Per3*, které tvoří přirozené inhibitory genu *Bmal1* a části jeho negativní zpětnovazebné smyčky. Zaznamenali jsme určitou podobnost ke studiím u jaterně specifických „knockoutovaných“ myši genu *Bmal1*, které vykazují hypoglykémii omezenou na lačnou fázi denního cyklu a zvýšenou glukózovou clearance po celonočním hladovění (Lamia K.A. et al., 2008), ale nedocházelo k redukci hladin inzulinu nalačno, které byly zjištěny u obou PD.SHR4 kongenních kmenů a kompletních *Bmal1* „knockoutů“ (Lamia K.A. et al., 2008). Nejsme si vědomi žádné předchozí publikace, která by funkčně propojila polymorfismy genu *Cd36* a dráhy cirkadiálního rytmu.

V neposlední řadě jsme pozorovali několik rozdílů v hladinách lipidů a hmotnosti jater mezi oběma kongenními kmeny. Je zde několik pravděpodobných kandidátů uvnitř tří

oblastí, které oba kmeny PD.SHR4a a PD.SHR4b odlišují. Jedná se o gen *Insig1*, serotoninový receptor *Htr5a* nebo karnitin O-oktanoyltransferázu (*Crot*). Nemůžeme úplně vyloučit možnost, že některé z dalších genů SHR původu, které jsou přítomny v diferenciálním segmentu kongenních kmenů PD.SHR4, přispěly k pozorovanému metabolickému účinku přítomnému u obou kongenních kmenů PD.SHR4 a u kmene SHR. Nicméně analýza transkriptomu a funkční anotace všech genů v segmentu spíše svědčí pro vliv mutace genu *Cd36*. Uvnitř diferenciálního segmentu kmene PD.SHR4a je 58 dobře definovaných protein-kódujících genů z okolo 120 transkriptů. Z těchto genů pouze *Cd36* byl diferenciálně exprimován mezi kmeny PD a PD.SHR4a.

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 (Tabulka 4).

	BN.SHR4 vs. BN	PD.SHR4 vs. PD	Cd36 -/- myši vs. WT
Glykémie	↑	↓	↓
Inzulínémie	↑	↓	↓
Triacylglycerolémie	↑	↓ ↔	↑
Neesterifikované mastné kyseliny	↑	↔	↑

Tabulka 4: Porovnání efektu deficience *Cd36* v různých genetických modelech.

↑...vzestup; ↓...pokles; ↔...žádná změna.

5. 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 (kapitola 4.1. Farmakogenetické interakce kyseliny all-*trans* retinové a diferenciálního segmentu chromozomu 8 u kongenního kmene SHR-*Lx* PD5, str.30) 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-HT_{3A} a 5-HT_{3B} 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-HT_{3A} a 5-HT_{3B} 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 (viz. kapitola 4.2. Farmakogenetická interakce ondansetronu a diferenciálního segmentu chromozomu 8 kongenního kmene SHR.(PD/BN)8) 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 (*SIGMAR1*) 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 (viz. kapitola 4.3. Gen *Plzf* jako kandidátní gen predisponující spontánně hypertenzní kmen potkana k rozvoji hypertenze, hypertrofie levé komory a intersticiální fibrózy) 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 fibrózy, 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 disproporční. 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 delecí v intronu 2, potvrzuje, že deletovaná konzervovaná nekódující oblast může plnit roli enhanceru (Liška F. et al., 2009). Původ této delece 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 delece intronu v genu *Plzf* unikátní pro kmen PD/Cub a není přítomna u žádných dalších normotenzních nebo hypertenzních potkaních kmenů.

Cílem čtvrtého projektu (viz. kapitola 4.4. Farmakogenetická interakce diferenciálního segmentu chromozomu 4 u kongenních kmenů potkana BN.SHR4 a PD.SHR4) 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 eventuelní

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.

6. 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 ustanovení kongenního kmene SHR-*Lx* PD5 jako vhodného modelu pro hyperlipidémii a glukózovou intoleranci indukovanou kyselinou retinovou a rovněž k ustanovení farmakogenomické charakterizace 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. Farmakogenomika a farmakogenetika jsou úzce svázány s technologickým vývojem v oblastech transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky. Získaná data lze využít pro porozumění interakcím a pro optimalizaci terapie nových nebo již zavedených léčiv a v konečném důsledku vede k rozvoji personalizované medicíny.

7. 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.
- Ahmed B.A., Seda O., Lavoie J.L. (2011): (Pro)renin receptor as a new drug target. *Curr Pharm Des.* 17(33):3611-21.
- Aitman T.J., Gotoda T., Evans A.L., Imrie H., Heath K.E., Trembling P.M., Truman H., Wallace C.A., Rahman A., Doré C., Flint J., Kren V., Zidek V., Kurtz T.W., Pravenec M., Scott J. (1997). Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 16(2): 197-201.
- Aitman T.J., Glazier A.M., Wallace C.A., Cooper L.D., Norsworthy P.J., Wahid F.N., Al-Majali K.M., Trembling P.M., Mann C.J., Shoulders C.C., Graf D., St.Lezin E., Kurtz T.W., Křen V., Pravenec M., Ibrahim A., Abumrad N.A., Stanton L.W., Scott J. (1999). Identification of Cd36 (FAT) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 21, 76-83.
- 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.
- Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C. Jr. (2009): Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640-5.
- 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.
- Barabási A.L., Oltvai Z.N. (2004): Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet.* 5(2):101-13.

- Bell J.T., Pai A.A., Pickrell J.K., Gaffney D.J., Pique-Regi R., Degner J.F., Gilad Y., Pritchard J.K. (2011): DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol.* 12(1):R10.
- Bernal-Mizrachi C., Weng S., Feng C., Finck B.N., Knutsen R.H., Leone T.C., Coleman T., Mecham R.P., Kelly D.P., Semenkovich C.F. (2003): Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice. *Nature medicine.* 9:1069–1075.
- Berry D.C., Noy N. (2009): All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 29: 3286-3296.
- Berry D.C., DeSantis D., Soltanian H., Croniger C.M., Noy N. (2012): Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 61: 1112-1121.
- Bílá V., Křen V. (1996): The teratogenic action of retinoic acid in rat congenic and recombinant inbred strains. *Folia Biol (Praha)* 42: 167-173.
- Bílá V., Křen V., Liška F. (2000): The influence of the genetic background on the interaction of retinoic acid with Lx mutation of the rat. *Folia Biol (Praha).* 46(6):264-72.
- Bokor S., Legry V., Meirhaeghe A., Ruiz J.R., Mauro B., Widhalm K., Manios Y., Amouyel P., Moreno L.A., Molnár D., Dallongeville J. (2010): Single-nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 18(7): 1398-1403.
- Bonen A., Han X.X., Tandon N.N., Glatz J.F., Lally J., Snook L.A., Luiken J.J. (2009): FAT/CD36 expression is not ablated in spontaneously hypertensive rats. *J Lipid Res* 50(4): 740-748.
- Breitling R., Li Y., Tesson B.M., Fu J., Wu C., Wiltshire T., Gerrits A., Bystrykh L.V., de Haan G., Su A.I., Jansen R.C. (2008): Genetical genomics: spotlight on QTL hotspots. *PLoS Genet.* 4(10):e1000232.
- Brelsford M., Beute T.C. (2008): Preventing and managing the side effects of isotretinoin. *Semin Cutan Med Surg.* 27(3):197-206.
- Briones A.M., Nguyen Dinh Cat A., Callera G.E., Yogi A., Burger D., He Y., Corrêa J.W., Gagnon A.M., Gomez-Sanchez C.E., Gomez-Sanchez E.P., Sorisky A., Ooi T.C., Ruzicka M., Burns K.D., Touyz R.M. (2012): Adipocytes produce aldosterone through

calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension* 59(5):1069-78.

- Brotman D.J., Girod J.P., Garcia M.J., Patel J.V., Gupta M., Posch A., Saunders S., Lip G.Y., Worley S., Reddy S. (2005): Effects of short-term glucocorticoids on cardiovascular biomarkers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 90:3202–3208.
- Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A. (2000): Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103(7): 1009-1017.
- Burešová M., Zidek V., Musilová A., Šimáková M., Fučíková A., Bílá V., Křen V., Kazdová L., Di Nicolantonio R., Pravenec M. (2006): Genetic relationship between placental and fetal weights and markers of the metabolic syndrome in rat recombinant inbred strains. *Physiol Genomics*. 26(3):226-31.
- Cameron A.J., Shaw J.E., Zimmet P.Z. (2004): The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 33, 2: 351-375.
- Carbone M.A., Jordan K.W., Lyman R.F., Harbison S.T., Leips J., Morgan T.J., DeLuca M., Awadalla P., Mackay T.F. (2006): Phenotypic variation and natural selection at *catsup*, a pleiotropic quantitative trait gene in *Drosophila*. *Curr Biol*. 16(9):912-9.
- Carvalho F., Macedo D., Bandeira I., Maldonado I., Salles L., Azevedo M.F., Rocha M.A. Jr, Fregoneze J.B., De Castro-e-Silva E. (2002): Central 5-HT₃ receptor stimulation by m-CBPBG increases blood glucose in rats. *Horm Metab Res* 34: 55-61.
- 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.
- Castoldi G., di Gioia C.R., Bombardi C., Perego C., Perego L., Mancini M., Leopizzi M., Corradi B., Perlini S., Zerbini G., Stella A. (2010): Prevention of myocardial fibrosis by N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in diabetic rats. *Clin Sci (Lond)*. 118(3):211-20.
- Cecchi F., Sgalambro A., Baldi M., Sotgia B., Antonucci D., Camici P.G., Sciagrà R., Olivotto I. (2009): Microvascular dysfunction, myocardial ischemia, and progression to heart failure in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res*. 2(4):452-61.

- Civelek M., Lusk A.J. (2014): Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nature Review Genetics* 15; 1: 34-48.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999): Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:399-430.
- de Leon J., Diaz F.J. (2007): Planning for the optimal design of studies to personalize antipsychotic prescriptions in the post-CATIE era: the clinical and pharmacoepidemiological data suggest that pursuing the pharmacogenetics of metabolic syndrome complications (hypertension, diabetes mellitus and hyperlipidemia) may be a reasonable strategy. *Schizophr Res* 96: 185-197.
- Degner J.F., Pai A.A., Pique-Regi R., Veyrieras J.B., Gaffney D.J., Pickrell J.K., De Leon S., Michelini K., Lewellen N., Crawford G.E., Stephens M., Gilad Y., Pritchard J.K. (2012): DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature*. 482(7385):390-4.
- Desphande A., Xia G., Boerma L.J., Vines K.K., Atigadda V.R., Lobo-Ruppert S., Grubbs C.J., Moeinpour F.L., Smith C.D., Christov K., Brouillette W.J., Muccio D.D. (2014): Methyl-substituted conformationally constrained retinoid agonists for the retinoid X receptors demonstrate improved efficacy for cancer therapy and prevention. *Bioorg Med Chem* 22: 178-185.
- Eckel-Mahan K., Sassone-Corsi P. (2009): Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat Struct Mol Biol* 16(5): 462-467.
- Engelking L.J., Liang G., Hammer R.E., Takaishi K., Kuriyama H., Evers B.M., Li W.P., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2005): Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* 115(9): 2489-2498.
- Evans W.E., Hon Y.Y., Bomgaars L., Coutre S., Holdsworth M., Janco R., Kalwinsky D., Keller F., Khatib Z., Margolin J., Murray J., Quinn J., Ravindranath Y., Ritchey K., Roberts W., Rogers Z.R., Schiff D., Steuber C., Tucci F., Kornegay N., Krynetski E.Y., Relling M.V. (2001): Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 19(8):2293-301.

- 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.
- Felipe F., Bonet M.L., Ribot J., Palou A. (2004): Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes*. 53(4):882-9.
- Felipe F., Mercader J., Ribot J., Palou A., Bonet M.L. (2005): Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim Biophys Acta*. 1740(2):258-65.
- Flint J., Eskin E. (2012): Genome-wide association studies in mice. *Nature Reviews Genetics* 13; 11: 807-817.
- Flügel D., Görlach A., Kietzmann T. (2012): GSK-3 β regulates cell growth, migration, and angiogenesis via Fbw7 and USP28-dependent degradation of HIF-1 α . *Blood*. 119(5):1292-301.
- Foss E.J., Radulovic D., Shaffer S.A., Ruderfer D.M., Bedalov A., Goodlett D.R., Kruglyak L. (2007): Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nat Genet*. 39(11):1369-75.
- Gaffney D.J., Veyrieras J.B., Degner J.F., Pique-Regi R., Pai A.A., Crawford G.E., Stephens M., Gilad Y., Pritchard J.K. (2012): Dissecting the regulatory architecture of gene expression QTLs. *Genome Biol*. 13(1):R7.
- Ghazalpour A., Bennett B., Petyuk V.A., Orozco L., Hagopian R., Mungrue I.N., Farber C.R., Sinsheimer J., Kang H.M., Furlotte N., Park C.C., Wen P.Z., Brewer H., Weitz K., Camp D.G. 2nd, Pan C., Yordanova R., Neuhaus I., Tilford C., Siemers N., Gargalovic P., Eskin E., Kirchgessner T., Smith D.J., Smith R.D., Lusis A.J. (2011): Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. 27(6):e1001393.
- Ghosh D., Skinner M.A., Laing W.A. (2007): Pharmacogenomics and nutrigenomics: synergies and differences. *European Journal of Clinical Nutrition* 61: 567-574.
- Gibbs R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S., Scott G., Steffen D., Worley K.C., Burch P.E., Okwuonu G., Hines S., Lewis L., DeRamo C., Delgado O., Dugan-Rocha S., Miner G., Morgan M., Hawes A., Gill R., Celera, Holt R.A., Adams M.D., Amanatides P.G., Baden-Tillson H., Barnstead M., Chin S., Evans C.A., Ferriera S., Fosler C., Glodek A., Gu Z., Jennings D., Kraft C.L., Nguyen T.,

Pfannkoch C.M., Sitter C., Sutton G.G., Venter J.C., Woodage T., Smith D., Lee H.M., Gustafson E., Cahill P., Kana A., Doucette-Stamm L., Weinstock K., Fechtel K., Weiss R.B., Dunn D.M., Green E.D., Blakesley R.W., Bouffard G.G., De Jong P.J., Osoegawa K., Zhu B., Marra M., Schein J., Bosdet I., Fjell C., Jones S., Krzywinski M., Mathewson C., Siddiqui A., Wye N., McPherson J., Zhao S., Fraser C.M., Shetty J., Shatsman S., Geer K., Chen Y., Abramzon S., Nierman W.C., Havlak P.H., Chen R., Durbin K.J., Egan A., Ren Y., Song X.Z., Li B., Liu Y., Qin X., Cawley S., Worley K.C., Cooney A.J., D'Souza L.M., Martin K., Wu J.Q., Gonzalez-Garay M.L., Jackson A.R., Kalafus K.J., McLeod M.P., Milosavljevic A., Virk D., Volkov A., Wheeler D.A., Zhang Z., Bailey J.A., Eichler E.E., Tuzun E., Birney E., Mongin E., Ureta-Vidal A., Woodwark C., Zdobnov E., Bork P., Suyama M., Torrents D., Alexandersson M., Trask B.J., Young J.M., Huang H., Wang H., Xing H., Daniels S., Gietzen D., Schmidt J., Stevens K., Vitt U., Wingrove J., Camara F., Mar Albà M., Abril J.F., Guigo R., Smit A., Dubchak I., Rubin E.M., Couronne O., Poliakov A., Hübner N., Ganten D., Goesele C., Hummel O., Kreitler T., Lee Y.A., Monti J., Schulz H., Zimdahl H., Himmelbauer H., Lehrach H., Jacob H.J., Bromberg S., Gullings-Handley J., Jensen-Seaman M.I., Kwitek A.E., Lazar J., Pasko D., Tonellato P.J., Twigger S., Ponting C.P., Duarte J.M., Rice S., Goodstadt L., Beatson S.A., Emes R.D., Winter E.E., Webber C., Brandt P., Nyakatura G., Adetobi M., Chiaromonte F., Elnitski L., Eswara P., Hardison R.C., Hou M., Kolbe D., Makova K., Miller W., Nekrutenko A., Riemer C., Schwartz S., Taylor J., Yang S., Zhang Y., Lindpaintner K., Andrews T.D., Caccamo M., Clamp M., Clarke L., Curwen V., Durbin R., Eyras E., Searle S.M., Cooper G.M., Batzoglou S., Brudno M., Sidow A., Stone E.A., Venter J.C., Payseur B.A., Bourque G., López-Otín C., Puente X.S., Chakrabarti K., Chatterji S., Dewey C., Pachter L., Bray N., Yap V.B., Caspi A., Tesler G., Pevzner P.A., Haussler D., Roskin K.M., Baertsch R., Clawson H., Furey T.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kent W.J., Rosenbloom K.R., Trumbower H., Weirauch M., Cooper D.N., Stenson P.D., Ma B., Brent M., Arumugam M., Shteynberg D., Copley R.R., Taylor M.S., Riethman H., Mudunuri U., Peterson J., Guyer M., Felsenfeld A., Old S., Mockrin S., Collins F.; Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004): Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428(6982):493-521.

- Gill H., Mugo M., Whaley-Connel A., Stump C., Sowers J.R. (2005): The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences* 330, 6: 290-294.

- Glazier A.M., Scott J., Aitman T.J. (2002): Molecular basis of the Cd36 chromosomal deletion underlying SHR defects in insulin action and fatty acid metabolism. *Mamm Genome* 13(2): 108-113.
- González A., López B., Díez J. (2004): Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Med Clin North Am.* 88(1):83-97.
- Gounarides J.S., Korach-Andre M., Killary K., Argentieri G., Turner O., Laurent D. (2008): Effect of Dexamethasone on Glucose Tolerance and Fat Metabolism in a Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Endocrinology.* 149:758–766.
- Gradman A.H., Wilson J.T. (2009): Hypertension and diastolic heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 11(6):422-9.
- Guidez F., Parks S., Wong H., Jovanovic J.V., Mays A., Gilkes A.F., Mills K.I., Guillemain M.C., Hobbs R.M., Pandolfi P.P., de Thé H., Solomon E., Grimwade D. (2007): RARalpha-PLZF overcomes PLZF-mediated repression of CRABPI, contributing to retinoid resistance in t(11;17) acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18694-9.
- Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Poellinger L., Okret S., Wikstrom A.C., Bronnegard M., Gillner M., Dong Y., Fuxe K., Cintra A. (1987): Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev.* 8:185–234.
- Gyermek L. (1995): 5-HT₃ receptors: pharmacologic and therapeutic aspects. *J Clin Pharmacol.* 35(9):845-55.
- 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.
- Halberg N., Wernstedt-Asterholm I., Scherer P.E. (2008): The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37, 3: 753-768.
- Hales C.N., Barker D.J.P. (1992): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 7: 595-601.
- Haluzík M., Mráz M., Lacinová Z. (2014): Jak tuková tkáň přispívá ke vzniku metabolických komplikací obesity? *DMEV* 17, 2:65-70.
- Hamet P., Merlo E., Šeda O., Broeckel U., Tremblay J., Kaldunski M., Gaudet D., Bouchard G., Deslauriers B., Gagnon F., Antonioli G., Pausová Z., Labuda M., Jomphe M.,

- Gossard F., Tremblay G., Kirova R., Tonellato P., Orlov S.N., Pintos J., Platko J., Hudson T.J., Rioux J.D., Kotchen T.A., Cowley A.W. Jr. (2005): Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am J Hum Genet.* 76(5):815-32.
- Hayes M.R., Moore R.L., Shah S.M., Covasa M. (2004): 5-HT₃ receptors participate in CCK-induced suppression of food intake by delaying gastric emptying. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R817-823.
 - Hegele R.A. (2009): Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews Genetics* 10, 2: 109-121.
 - Ho K.Y., Gan T.J. (2006): Pharmacology, pharmacogenetics, and clinical efficacy of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists for postoperative nausea and vomiting. *Curr Opin Anaesthesiol* 19: 606-611.
 - Hunter D.J. (2005): Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet.* 6(4):287-98.
 - Chan G.K., Jablonski S.A., Starr D.A., Goldberg M.L., Yen T.J. (2000): Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol.* 2(12):944-7.
 - Ichihara A., Kaneshiro Y., Takemitsu T., Sakoda M., Suzuki F., Nakagawa T., Nishiyama A., Inagami T., Hayashi M. (2006): Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension.* 47(5):894-900.
 - Jacob H.J., Lazar J., Dwinell M.R., Moreno C., Geurts A.M. (2010): Gene targeting in the rat: advances and opportunities. *Trends Genet.* 26(12):510-8.
 - Jellis C., Martin J., Narula J., Marwick T.H. (2010): Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 56(2):89-97.
 - Jensen M.D., Haymond M.W., Rizza R.A., Cryer P.E., Miles J.M. (1989): Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *Journal of Clinical Investigation* 83, 4: 1168-1173.
 - Kashiwagi H., Tomiyama Y., Nozaki S., Honda S., Kosugi S., Shiraga M., Nakagawa T., Nagao N., Kanakura Y., Kurata Y., Matsuzawa Y. (1996): A Single Nucleotide Insertion in Codon 317 of the CD36 Gene Leads to CD36 Deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(8): 1026-1032.

- Kaur J. (2014): A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014:943162. Epub 2014 Mar 11.
- 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.
- Klein C., Brin M.F., Kramer P., Sena-Esteves M., de Leon D., Doheny D., Bressman S., Fahn S., Breakefield X.O., Ozelius L.J. (1999): Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(9):5173-6.
- Koistinen H.A., Remitz A., Gylling H., Miettinen T.A., Koivisto V.A., Ebeling P. (2001): Dyslipidemia and a reversible decrease in insulin sensitivity induced by therapy with 13-cis-retinoic acid. *Diabetes Metab Res Rev.* 17(5):391-5.
- 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.
- Kraja A.T., Vaidya D., Pankow J.S., Goodarzi M.O., Assimes T.L., Kullo I.J., Sovio U., Mathias R.A., Sun Y.V., Franceschini N., Absher D., Li G., Zhang Q., Feitosa M.F., Glazer N.L., Haritunians T., Hartikainen A.L., Knowles J.W., North K.E., Iribarren C., Kral B., Yanek L., O'Reilly P.F., McCarthy M.I., Jaquish C., Couper D.J., Chakravarti A., Psaty B.M., Becker L.C., Province M.A., Boerwinkle E., Quertermous T., Palotie L., Jarvelin M.R., Becker D.M., Kardina S.L., Rotter J.I., Chen Y.D., Borecki I.B. (2011): A Bivariate Genome-Wide Approach to Metabolic Syndrome: STAMPEED Consortium. *Diabetes* 60(4): 1329-1339.
- Krämer A., Green J., Pollard J. Jr., Tugendreich S. (2014): Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics.* 30(4):523-30.
- Krishna R.G., Wold F. (1993): Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 67:265-98.
- Kruglyak L. (2008): The road to genome-wide association studies. *Nature Review Genetics* 9; 4: 314-318.
- Křen V. (1975): Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ. Carol. Med. Praha (Monogr.)* **68**, 1-103.

- Křen V., Křenová D., Pravenec M., Zdobinská M. (1995): Chromosome 8 congenic strains: tools for genetic analysis of limb malformation, plasma triglycerides, and blood pressure in the rat. *Folia Biol (Praha)* 41, 284-293.
- Křen V., Křenová D., Bílá V., Zdobinská M., Zídek V., Pravenec M. (1996): Recombinant inbred and congenic strains for mapping of genes that are responsible for spontaneous hypertension and other risk factors of cardiovascular disease. *Folia Biol (Praha)* 42, 155-158.
- 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.
- Křenová, D., Šoltysová, L., Pravenec, M., Moisan, M.P., Kurtz, T.W., Křen, V. (2000): Putative candidate genes for blood pressure control in the SHR.BN-RNO8 congenic substrains. *J. Exp. Anim. Sci.* 41, 51-53.
- Kwitek A.E., Jacob H.J., Baker J.E., Dwinell M.R., Forster H.V., Greene A.S., Kunert M.P., Lombard J.H., Mattson D.L., Pritchard K.A. Jr, Roman R.J., Tonellato P.J., Cowley A.W. Jr. (2006): BN phenome: detailed characterization of the cardiovascular, renal, and pulmonary systems of the sequenced rat. *Physiol Genomics.* 25, 303-13.
- Kylin E. (1923): Studien ueber das hypertonie-hyperglyca "mie-hyperurika" miesyndrom. *Zentralblatt fuer innere Medizin* 44, 105-127.
- Lamia K.A., Storch K.F., Weitz C.J. (2008): Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 15172-15177.
- Lau D.C.W., Dhillon B., Yan H., Szmitko P.E., Verma S. (2005): Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 288, 5: 2031-2041.
- Li J.Y., English M.A., Ball H.J., Yeyati P.L., Waxman S., Licht J.D. (1997): Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* 272(36):22447-55.
- Li Y., Wong K., Walsh K., Gao B., Zang M. (2013): Retinoic acid receptor beta stimulates hepatic induction of fibroblast growth factor 21 to promote fatty acid oxidation and control whole-body energy homeostasis in mice. *J Biol Chem* 288: 10490-10504.

- 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.
- Liu F.C., Liou J.T., Liao H.R., Mao C.C., Yang P., Day Y.J. (2012): The anti-aggregation effects of ondansetron on platelets involve IP3 signaling and MAP kinase pathway, but not 5-HT3-dependent pathway. *Thromb Res* 130: e84-94.
- Livak K.J., Schmittgen TD. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.
- Love-Gregory L., Sherva R., Sun L., Wasson J., Schappe T., Doria A., Rao D.C., Hunt S.C., Klein S., Neuman R.J., Permutt M.A., Abumrad N.A. (2008): Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet* 17(11): 1695-1704.
- Love-Gregory L., Sherva R., Schappe T., Qi J.S., McCrea J., Klein S., Connelly M.A., Abumrad N.A. (2011): Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum Mol Genet* 20(1): 193-201.
- Ma X., Bacci S., Mlynarski W., Gottardo L., Soccio T., Menzaghi C., Iori E., Lager R.A., Shroff A.R., Gervino E.V. (2004): A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Hum Mol Genet.* 13:2197–2205.
- Mackay T. F.C., Stone E.A., Ayroles J.F. (2009): The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Review Genetics* 10; 8: 565-577.
- Machu T.K. (2011): Therapeutics of 5-HT3 receptor antagonists: current uses and future directions. *Pharmacol Ther* 130: 338-347.
- Malhotra A., Kang B.P.S., Cheung S., Opawumi D., Meggs L.G. (2001): Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes* 50, 8: 1918-1926.
- Mancini M., Petretto E., Kleinert C., Scavone A., De T., Cook S., Silhavy J., Zidek V., Pravenec M., d'Amati G., Camici P.G. (2013): Mapping genetic determinants of coronary microvascular remodeling in the spontaneously hypertensive rat. *Basic Res Cardiol.* 108(1):316.

- Mandhane S., Nayak P., Soni D., Jain S., Ashton J.C., Rajamannar T. (2012): Induction of glucose intolerance by acute administration of rimonabant. *Pharmacology* 89: 339-347.
- Marbach D., Costello J.C., Küffner R., Vega N.M., Prill R.J., Camacho D.M., Allison K.R.; DREAM5 Consortium, Kellis M., Collins J.J., Stolovitzky G. (2012): Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat Methods*. 9(8):796-804.
- Markel P., Shu P., Ebeling C., Carlson G.A., Nagle D.L., Smutko J.S., Moore K.J. (1997): Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet*. 17(3):280-4.
- Marshall A. (1997): Genset-Abbott deal heralds pharmacogenomics era. *Nat Biotechnol*. 15:829-30.
- Martin P.J., Delmotte M.H., Formstecher P., Lefebvre P. (2003): PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nucl Recept*. 1(1):6.
- Marx V. (2004): Pharmacogenomics shapes pediatrics' future. *Genomics and Proteomics* 4:12-18.
- Maury E., Ramsey K.M., Bass J. (2010): Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* 106(3): 447-462.
- McCarthy M.I., Abecasis G.R., Cardon L.R., Goldstein D.B., Little J., Ioannidis J.P., Hirschhorn J.N. (2008): Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 9(5):356-69.
- McDermott-Roe C., Ye J., Ahmed R., Sun X.M., Serafin A., Ware J., Bottolo L., Muckett P., Cañas X., Zhang J., Rowe G.C., Buchan R., Lu H., Braithwaite A., Mancini M., Hauton D., Martí R., García-Arumí E., Hubner N., Jacob H., Serikawa T., Zidek V., Papousek F., Kolar F., Cardona M., Ruiz-Meana M., García-Dorado D., Comella J.X., Felkin L.E., Barton P.J., Arany Z., Pravenec M., Petretto E., Sanchis D., Cook S.A. (2011): Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature*. 478(7367):114-8.
- Meani N., Minardi S., Licciulli S., Gelmetti V., Coco F.L., Nervi C., Pelicci P.G., Müller H., Alcalay M. (2005): Molecular signature of retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 24(20):3358-68.
- Mei H., Chen W., Dellinger A., He J., Wang M., Yau C., Srinivasan S.R., Berenson G.S. (2010): Principal-component-based multivariate regression for genetic association studies of metabolic syndrome components. *BMC Genet*. 11:100.

- Melnick A., Ahmad K.F., Arai S., Polinger A., Ball H., Borden K.L., Carlile G.W., Prive G.G., Licht J.D. (2000): In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol Cell Biol.* 20(17):6550-67.
- Mercader J., Ribot J., Murano I., Felipe F., Cinti S., Bonet M.L., Palou A. (2006): Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology.* 147(11):5325-32.
- Mercader J., Granados N., Bonet M.L., Palou A. (2008): All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem.* 22(1-4):363-72.
- Mesarwi O., Polak J., Jun J., Polotsky V.Y. (2013): Sleep disorders and the development of insulin resistance and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 42(3):617-34.
- Misra U.K. (1966): Lipid metabolism in hypervitaminosis A. *Nature.* 209(5026):910-1.
- Náray-Fejes-Tóth A., Boyd C., Fejes-Tóth G. (2008): Regulation of epithelial sodium transport by promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(1):F18-26.
- Noel S.E., Lai C.Q., Mattei J., Parnell L.D., Ordovas J.M., Tucker K.L. (2010): Variants of the CD36 gene and metabolic syndrome in Boston Puerto Rican adults. *Atherosclerosis* 211(1): 210-215.
- Okamoto K., Aoki K. (1963): Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 27:282-93.
- 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.
- Patel A., Mittal S., Manchanda S., Puliyl J.M. (2011): Ondansetron-induced dystonia, hypoglycemia, and seizures in a child. *Ann Pharmacother* 45: e7.
- Paterson J.M., Seckl J.R., Mullins J.J. (2005): Genetic manipulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289:R642–652.

- Patti G.J., Yanes O., Siuzdak G. (2012): Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 263-269.
- Peters L.L., Robledo R.F., Bult C.J., Churchill G.A., Paigen B.J., Svenson K.L. (2007): The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet.* 8(1):58-69.
- Petretto E., Sarwar R., Grieve I., Lu H., Kumaran M.K., Muckett P.J., Mangion J., Schroen B., Benson M., Punjabi P.P., Prasad S.K., Pennell D.J., Kiesewetter C., Tasheva E.S., Corpuz L.M., Webb M.D., Conrad G.W., Kurtz T.W., Kren V., Fischer J., Hubner N., Pinto Y.M., Pravenec M., Aitman T.J., Cook S.A. (2008): Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass. *Nat Genet.* 40(5):546-52.
- Popov N., Herold S., Llamazares M., Schüle C., Eilers M. (2007): Fbw7 and Usp28 regulate myc protein stability in response to DNA damage. *Cell Cycle.* 6(19):2327-31.
- Prada J., Shalpour S., Pfau M., Henze G., Seeger K. (2012): The serotonin receptor-antagonist ondansetron induces significant increases in the expression of interferon-gamma which correlate with antiproliferative properties in the acute lymphoblastic leukemia cell line REH. *Scand J Immunol.* 76(5):519-20.
- Pravenec M., Landa V., Zidek V., Musilová A., Křen V., Kazdová L., Aitman T.J., Glazier A.M., Ibrahimi A., Abumrad N.A., Qi N., Wang J.M., St Lezin E.M., Kurtz T.W. (2001). Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* 27(2): 156-158.
- Pravenec M., Zidek V., Landa V., Šimáková M., Mlejnek P, Kazdová L., Bílá V., Křenová D., Křen V. (2004): Genetic analysis of "metabolic syndrome" in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Res.* 53 Suppl 1:S15-22.
- Qi D., Pulinilkunil T., An D., Ghosh S., Abrahani A., Pospisilik J.A., Brownsey R., Wambolt R., Allard M., Rodrigues B. (2004): Single-Dose Dexamethasone Induces Whole-Body Insulin Resistance and Alters Both Cardiac Fatty Acid and Carbohydrate Metabolism. *Diabetes.* 53:1790–1797.
- Qi D., Rodrigues B. (2007): Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E654–667.

- 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.
- Quere R., Baudet A., Cassinat B., Bertrand G., Marti J., Manchon L., Piquemal D., Chomienne C., Commes T. (2007): Pharmacogenomic analysis of acute promyelocytic leukemia cells highlights CYP26 cytochrome metabolism in differential all-trans retinoic acid sensitivity. *Blood.* 109(10):4450-60.
- Reaven G. M. (1988): Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 12: 1595-1607.
- Rodondi N., Darioli R., Ramelet A.A., Hohl D., Lenain V., Perdrix J., Wietlisbach V., Riesen W.F., Walther T., Medinger L., Nicod P., Desvergne B., Mooser V. (2002): High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann Intern Med.* 136(8):582-9.
- Rogner U.C., Avner P. (2003): Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nature Reviews Immunology* 3, 243-252.
- Ross J.S. (2008): Co-development of drugs and pharmacogenomics-based diagnostics in oncology. *Pharmacogenomics and personalized medicine.* Cohen N (Ed.). Humana Press, NY, USA, 285.
- Rummel-Kluge C., Komossa K., Schwarz S., Hunger H., Schmid F., Lobos C.A., Kissling W., Davis J.M., Leucht S. (2010): Head-to-head comparisons of metabolic side effects of second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 123: 225-233.
- Sandberg A.A., Slaunwhite W.R. Jr, Carter A.C. (1960): Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. III. The effects of various steroids. *J Clin Invest.* 39:1914–1926.
- 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.
- 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.
- Scheffe 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.
 - Schindler K.M., Pato M.T., Dourado A., Macedo A., Azevedo M.H., Kennedy J.L., Pato C.N. (2002): Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population. *Mol Psychiatry.* 7(9):1002-5.
 - Schug T.T., Berry D.C., Shaw N.S., Travis S.N., Noy N. (2007): Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell.* 129(4):723-33.
 - Schwartzkopff B., Mundhenke M., Strauer B.E. (1995): Remodelling of intramyocardial arterioles and extracellular matrix in patients with arterial hypertension and impaired coronary reserve. *Eur Heart J.* 16 Suppl I:82-6.
 - Simonis M, Atanur SS, Linsen S, Guryev V, Ruzius FP, Game L, Lansu N, de Bruijn E, van Heesch S, Jones SJ, Pravenec M, Aitman TJ, Cuppen E. Genetic basis of transcriptome differences between the founder strains of the rat HXB/BXH recombinant inbred panel. *Genome Biol.* 2012 Apr 27; 13(4): r31.
 - Slama M., Susic D., Varagic J., Frohlich E.D. (2002): Diastolic dysfunction in hypertension. *Curr Opin Cardiol.* 2002 Jul; 17(4):368-73.
 - 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. (2005a): Dynamic genetic architecture of metabolic syndrome attributes in the rat. *Physiol Genomics* 21: 243-252.
- Šeda O., Liška F., Šedová L., Kazdová L., Křenová D., Křen V. (2005b): A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. *Folia Biol (Praha)* 51: 53-61.
- Šeda O., Kazdová L., Šedová L., Liška F., Křenová D., Křen V. (2006): Region of rat chromosome 8 determines complex nutrigenetic interactions under conditions of sucrose and cholesterol diets. *Prague Med Rep.* 2006; 107(2):251-60.
- 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.
- Šedová L., Kazdová L., Šeda O., Křenová D., Křen V. (2000). Rat inbred PD/cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biol (Praha)* 46(3): 99-106.
- Šedová L., Šeda O., Křenová D., Křen V., Kazdová L. (2004). Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *International Journal of Obesity* vol. 28, no.5 , p.719-725.
- Šedová L., Šeda O, Kazdová L, Chyliková B, Hamet P, Tremblay J, Křen V, Křenová D. (2007): Sucrose feeding during pregnancy and lactation elicits distinct metabolic response in offspring of an inbred genetic model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(5): 1318-24.
- 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.
- Tecott L.H. (2007): Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metab* 6: 352-361.
- Topol E.J. (2014): Individualized medicine from prewomb to tomb. *Cell.* 157(1):241-53.
- Usui S., Hara Y., Hosaki S., Okazaki M. (2002): A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *Journal of Lipid Research*, 43(5), 805-814.

- van Bruggen I.T., Straumfjord J.V. (1948): High vitamin A intake and blood levels of cholesterol, phospholipids, carotene, and vitamins C, A, and E. *J Lab Clin Med.* 33(1):67-74.
- van Nas A., Ingram-Drake L., Sinsheimer J.S., Wang S.S., Schadt E.E., Drake T., Lusis A.J. (2010): Expression quantitative trait loci: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics.* 185(3):1059-68.
- Vrána A., Kazdová L. (1970): Insulin sensitivity of rat adipose tissue and of diaphragm in vitro: effect of the type of dietary carbohydrate (starch-sucrose). *Life Sci II.* 9(5):257-65.
- Vrána A., Kazdová L., Dobešová Z., Kuneš J., Křen V., Bílá V., Štolba P., Klimeš I. (1993): Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates. *Ann NY Acad Sci* 683, 57-68.
- Wang N., Frank G.D., Ding R., Tan Z., Rachakonda A., Pandolfi P.P., Senbonmatsu T., Landon E.J., Inagami T. (2012): Promyelocytic leukemia zinc finger protein activates GATA4 transcription and mediates cardiac hypertrophic signaling from angiotensin II receptor 2. *PLoS One.* 7(4):e35632.
- Weinshilboum R., Wang L. (2004): Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 739-748.
- Wheatcroft S.B., Kearney M.T., Shah A.M., Ezzat V.A., Miell J.R., MODO M., Williams S.C., Cawthorn W.P., Medina-Gomez G., Vidal-Puig A., Sethi J.K., Crossey P.A. (2007): IGF-Binding Protein-2 Protects Against the Development of Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56(2): 285-294.
- Yamaguchi T., Watanabe Y., Tanaka M., Nakagawa M., Yamaguchi N. (2008): cAMP-dependent regulation of spinesin/TMPRSS5 gene expression in astrocytes. *J Neurosci Res.* 86(3):610-7.
- Yamamoto N., Akamatsu N., Sakuraba H., Yamazaki H., Tanoue K. (1994): Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood* 83(2): 392-397.
- 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.
- Yildirim M.A., Goh K.I., Cusick M.E., Barabasi A.L., Vidal M. (2007): Drug-target network. *Nat Biotechnol.* 25:1119–1126.
- Young H.S., Summers A.M., Read I.R., Fairhurst D.A., Plant D.J., Campalani E., Smith C.H., Barker J.N., Detmar M.J., Brenchley P.E., Griffiths C.E. (2006): Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 126(2):453-9.
- Zhang P., Mende U. (2011): Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res.* 109(3):320-33.
- Ziouzenkova O., Orasanu G., Sharlach M., Akiyama T.E., Berger J.P., Viereck J., Hamilton J.A., Tang G., Dolnikowski G.G., Vogel S., Duyster G., Plutzky J. (2007): Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med.* 13(6):695-702.

8. 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 (viz. příloha I.). **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* (viz. příloha II.). (*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 (viz. příloha III.). **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 (viz. příloha IV.). **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 (viz. příloha V.). **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 (viz. příloha VI.). **IF = 4,110**

