

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Barbora Pospíšilová**

Energetický metabolismus a apoptotické markery v srdci potkana adaptovaného na chlad

Energy metabolism and apoptosis markers in cold heart acclimated rat

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Daniela Horníková, Ph.D.

Praha 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze dne

### **Poděkování:**

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a ochotu při zpracování mé diplomové práce, kdykoliv to bylo potřeba. Rovněž děkuji konzultantce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za cenné rady a připomínky.

Z řad svých kolegů bych chtěla poděkovat Mgr. Davidu Kolářovi a Mgr. Veronice Tibenské za pomoc a cenné rady, o které jsem je mohla kdykoliv požádat. Anetě Marvanové děkuji za provedení odběru srdcí. Celému osazenstvu naší laboratoře svalové fyziologie děkuji za podporu a vytvoření krásné pracovní atmosféry k mým pokusům.

Velmi děkuji celé své rodině a kamarádům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia a věděli, jak mě rozptýlit, když to bylo třeba.

## **Abstrakt**

Vliv chladové adaptace neboli otužování na organismus je znám už desetiletí. Její pozitivní nebo negativní vliv se odvíjí především od intenzity a doby trvání. Při nižších teplotách velmi často dochází k poškození organismu. Naproti tomu ve studiích s otužilci byl zjištěn pozitivní vliv na kardiovaskulární systém jedinců. Velmi málo literárních prací se věnuje energetickému metabolismu a apoptóze v srdeční tkáni za podmínek chladové adaptace. V této práci byl využit model s mírnějšími podmínkami chladové adaptace ( $10^{\circ}\text{C}\pm 1$ ), aby nedocházelo k poškození experimentálních zvířat a porovnání výsledků mezi kontrolní, chladovou a regresní skupinou potkanů. V pokusu byly využity metody elektroforézy a Western blotu. Cílem této práce bylo zjistit, zda můžeme pozorovat rozdíly hodnot u vybraných cílových genů HIF. Dalším cílem bylo zjistit a porovnat rozdíly zvolených pro-apoptotických a anti-apoptotických markerů.

Klíčová slova: chladová adaptace, srdce, energetický metabolismus, HIF, apoptóza

## **Abstract**

Cold adaptation and her effects has been known for many decates. Positive or negative impact depends especially on its length and strength. The lower temperature can very often cause the stress for organism. On the other hand in expereriment with long-term adapatation were found positive consequences on cardiovascular system. We found the lack of studies devoted to the energy metabolism and apoptosis in heart tissue during long-term cold adaptation. In this work we used a model with milder conditions of the adaptation ( $10^{\circ}\text{C}\pm 1$ ), so there wouldn't be damage of the experimental animals. We compared the results betwen control, cold and regressive group of rats. In this expereriment we used methods of electrophoresis and Western blot. The target of the work was found if we can find any differences betwen chosen HIF targeted genes. The next goal was to detect the differences betwen chosen pro-apoptotic and anti-apoptotic markers.

Keywords: cold adaptation, heart, energetic metabolism, HIF, apoptosis

## Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	3
<b>1. Úvod</b> .....	5
<b>2. Literární přehled</b> .....	6
2.1. Chlad.....	6
2.2. HIF.....	7
2.2.1. Kreatinkináza.....	9
2.2.2. Hexokináza.....	11
2.2.3. Laktátdehydrogenáza.....	12
2.3. Apoptóza.....	13
2.3.1. Kaspázy.....	16
2.3.2. Rodina Bcl-2.....	18
2.3.3. ASK1.....	20
<b>3. Cíle diplomové práce</b> .....	22
<b>4. Materiál a metody</b> .....	23
4.1. Chladová adaptace experimentálních zvířat, odběr srdce.....	23
4.2. Metody.....	24
4.2.1. Zpracování vzorků, homogenizace.....	24
4.2.2. Separace pomocí SDS-PAGE elektroforézy.....	24
4.2.3. Western blot.....	25
4.2.4. Imunodetekce.....	26
4.2.5. Statistické vyhodnocení.....	27
<b>5. Výsledky</b> .....	28
5.1. Cílové geny HIF.....	28
5.1.1. Kvantifikace kreatinkinázy.....	28
5.1.2. Kvantifikace hexokinázy.....	29
5.1.3. Kvantifikace oxphosu.....	30
5.1.4. Kvantifikace laktátdehydrogenázy.....	31
5.2. Apoptotické markery.....	32
5.2.1. Kvantifikace kaspáz.....	32
5.2.2. Kvantifikace členů rodiny Bcl-2.....	33
5.2.3. Kvantifikace ASK1.....	34
<b>6. Diskuze</b> .....	35
<b>7. Závěr</b> .....	40

<b>8. Literatura</b> .....	41
<b>9. Internetové zdroje</b> .....	49
<b>10. Přílohy</b> .....	50

## **Seznam zkratek**

ADP – adenosindifosfát  
AIF – apoptózu indukující faktor  
ANT – translokátor adeninových nukleotidů  
ARNT – aryl-hydrokarbonová jaderná translokáza  
ASK1 – kináza regulující apoptotický signál  
ATP – adenosintrifosfát  
Bad – z anglického Bcl-2 associated agonist of cell death  
Bak – z anglického Bcl-2 homologous antagonist/killer  
Bid – z anglického BH-3 interacting domain death agonist  
BAX - z anglického Bcl-2 associated death promoter  
Bcl-2 – z anglického B-cell lymphoma  
Bid - z anglického BH-3 interacting-domain death agonist  
CAD – kaspázou aktivovaná DNáza  
CARD – kaspázová aktivační doména  
CASP – kaspáza  
CED3 – protein smrti  
cFLIP – buněčný inhibitorový protein  
CK/PCr – fosfokreatinový shuttle  
CKB – kreatinkináza mozková  
CKM – kreatinkináza svalová  
Cr – kreatin  
DIABLO – z anglického direct IAP-binding protein with low PI  
DD – doména smrti  
DISC – smrt indukující signální komplex  
DED – efektorová doména smrti  
ER – endoplazmatické retikulum  
FADD – Fas asociovaná doména smrti  
G6P – glukóza-6-fosfát  
HIF – hypoxií indukovaný faktor  
HK – hexokináza  
JNK – z anglického c-Jun N-terminal kinase  
IAP – inhibitory apoptózy  
ICE - interleukin konvertující enzym



ILS – laktózový shuttle  
IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$   
I/R – ischemické-reperfuzní poškození  
KO – knockout  
LDHH/LDHB – laktátdehydrogenáza B  
LDHM/LDHA – laktátdehydrogenáza A  
MAPKKK – mitogen-aktivovaná kináza kináza kináza  
MCT – monokarbonátový transportér  
MEF 2 – specifický kardiogenní transkripční faktor (myocyte-specific enhancer binding faktor 2)  
MOMP – permeabilizace vnější mitochondriální membrány  
mPTP – mitochondriální pór přechodné propustnosti  
mtCK – mitochondriální kreatinkináza  
MyoD – myogenní faktor D  
NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát  
p38 – mitogen aktivovaná proteinkináza  
PAS - z anglického Per-Arnt-Sim  
PCr - fosfokreatin  
PHD – prolyl-hydroxyláza  
RIPK – receptor interagující proteinkináza  
ROS – reaktivní formy kyslíku  
SMAC – z anglického second mitochondria derived aktivator of caspases  
TNF $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$   
TNFR – receptor tumor nekrotizujícího faktoru  
TRADD – TNF $\alpha$  asociovaná doména smrti  
UCP – rozpřahující protein  
VDAC – potenciálně závislý aniontový kanál  
VHL - von Hippel-Lindau protein  
XIAP – X-vázaný inhibitor apoptózy

## 1. Úvod

Chladová adaptace budí zájem již celá staletí, především od znovuoobjevení vodoléčby Sebastianem Kneippem a Vincenzem Priessnitzem v 19. století. Její pozitivní účinky na imunitní a vaskulární systém jsou ovlivněny především intenzitou a dobou působení chladu. Studium buněčných a molekulárních mechanismů na srdeční tkáni vlivem chladové adaptace není v literatuře příliš zastoupeno, práce se začínají objevovat až v posledních letech. Na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy má studium chladové adaptace dlouhodobou tradici především díky doc. RNDr. Vybíralovi, CSc. a jeho práci na otužilcích. Při pokusech s chladovou adaptací kolem 0-4°C bylo ovšem u experimentálních zvířat pozorováno poškození vylučovací soustavy. Z tohoto hlediska byl hledán model, ve kterém by došlo k eliminaci těchto jevů. Pro tuto práci byl zvolen model s mírnějšími podmínkami chladové adaptace, který byl zpracovaný v diplomové práci Marvanové (Marvanová A., 2015). Vycházíme také z práce s využitím tohoto modelu, kde došlo ke snížení velikosti infarktu po ischemicko-reperfuzním zásahu (Vebr P., 2016).

Chladová adaptace má nepřehlédnutelný vliv na srdce a jeho činnost skrze aktivaci adrenergního systému (Šimečková et al., 2000). U akutní chladové expozice nalzááme zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob. S využitím chronické chladové adaptace předpokládáme zvýšení kardioprotektivních mechanismů. Tyto mechanismy většinou souvisí s aktivací hypoxií indukovaného faktoru (HIF). Předkládaná práce se zaměřuje jaký vliv má chladová adaptace na energetický metabolismus a apoptózu v srdeční tkáni. V první části sledujeme změny zastoupení u vybraných cílových genů HIF, který je hlavním regulátorem reakcí při sníženému přísunu kyslíku do tkáni. V druhé části se zaměříme na možné změny v množství pro-apoptotických a anti-apoptotických markerů v srdeční tkáni vystavené chladové adaptaci.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Chladová adaptace

Chladová adaptace neboli otužování a jeho příznivé účinky na zdraví člověka jsou známy již celá staletí. Průlomovým milníkem bylo především znovuobjevení vodoléčby Sebastianem Kneippem a Vincenzem Priessnitzem v 19. století. Udržování stálé tělesné teploty neboli homoiotermie patří k typickým znakům savců, kteří věnují spoustu energie na její udržení. Chladovou adaptaci můžeme rozdělit na akutní a chronickou. Při akutním poklesu teploty dochází ke zvýšení vasokonstričních, koagulačních a zánětlivých markerů (Cai et al., 2016). Chlad tedy působí jako stresor a je spojen se zvýšenou aktivitou sympatiku (Jánský et al., 2007), což má za následek zvýšení srdečního tepu a krevního tlaku (Jánský et al., 1996). Dlouhodobým vystavením chladu dochází ke spuštění morfologických a biochemických změn jako reakce na snahu udržet teplotu v normální hladině (Cadena and Tattersall, 2014). Tím také dochází ke zvýšení tolerance na chlad, postupem času jsou poplachové mechanismy nahrazovány adaptačními (Vybíral et al., 2000). U jedinců můžeme pozorovat zvýšení aktivity imunitního systému a celkovou odolnost (Jánský et al., 2007). Důsledky, ať už pozitivní nebo negativní, tedy záleží především na stupni chladové expozice, její délce a živočišném druhu (Cadena and Tattersall, 2014).

Na základě prací s otužilci lze obecně pozorovat tři mechanismy/úrovně podílející se na rozvoji chladové adaptace (Jánský et al., 1996). Izolační adaptaci, kde například dochází ke zvýšení tepelné ochrany vasokonstrikcí. Hypotermní adaptaci, kdy práh nástupu odezvy je oproti kontrolám snížen. A metabolickou adaptaci, kdy v bílé tukové tkáni můžeme pozorovat zvýšenou expresi rozpráhuujících proteinů (UCP), která je zodpovědná za tvorbu hnědé tukové tkáně. Při pokusech s otužilci (Vybíral et al., 2000) byla porovnávána kontrolní skupina se skupinou otužilců. Obě skupiny byly po dobu jedné hodiny v bazénu se studenou vodou o teplotě 13°C. U kontrolní skupiny byl naměřen prudký nárůst metabolismu, zvýšení srdečního tepu a třes byl pozorován téměř okamžitě. Naproti tomu u skupiny otužilců se třes dostavil až po 40 minutách pokusu, také došlo k mírnému postupnému zvýšení metabolismu (Vybíral et al., 2000a). V pokusech byla také naměřena zvýšená koncentrace antioxidantů v krvi a vyšší odolnost na oxidativní stres (Kralova, Lesna et al., 2015). Při experimentu produkovali otužilci mnohem méně tepla a nedošlo ke zvýšení srdečního tepu. To znamená, že srdce nepřispívá k teplu produkovaného netřesovou termogenezí. Jelikož člověk má jen minimální množství hnědé tukové tkáně, pravděpodobně je za to zodpovědný jiný orgán, jako například svaly nebo bílá tuková tkáň. Hnědou tukovou tkáň odpovědnou za netřesovou

termogenezi můžeme nalézt u novorozenců asi jen do 8 měsíců, poté dochází k jejímu vymizení. Ovšem podle pokusu byla tvorba aktivní hnědé tukové tkáně prokázána i u dospělého člověka přibližně po deseti dnech chladové expozice (Vybiral et al., 2000). U malých savců dochází díky molekulárním přestavbám ke zvýšení množství hnědé tukové tkáně (Himms-Hagen, 1990). Hlavní adaptací u malých savců je právě přechod z třesové termogeneze na netřesovou (Hart et al., 1956).

Chladová adaptace má zásadní vliv na srdce a jeho činnost skrze aktivaci adrenergního systému (Šimečková et al., 2000). Zatímco u akutní expozice bylo prokázáno zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob, včetně hypertenze, infarktu nebo srdečního selhání (Mavri et al., 2001), vlivem chronické expozice dochází ke zvýšení kardiovaskulární reaktivity (Menkes et al., 1989). Většina kardioprotektivních intervencí souvisí, ať už přímo nebo nepřímo, s aktivitou HIF. To můžeme pozorovat především u fyzické zátěže (Pinho et al., 2012), v hypoxii (Ong et al., 2014) nebo při ischemickém preconditioningu (Cai et al., 2013). Podrobnější informace o dlouhodobém působení chladové adaptace na buněčné úrovni jsou velmi omezené, až v posledních letech se objevují studie na toto téma. Dle současných poznatků tedy závisí především na stupni a délce chladu. S ohledem na negativní následky adaptace při nízkých teplotách jsme pro tento pokus zvolili model s vyšší teplotou (10°C). Vycházíme z prací, které s využitím tohoto modelu prokázaly sníženou velikost infarktu po ischemicko-reperfuzním (I/R) poškození (Vebr P., 2016).

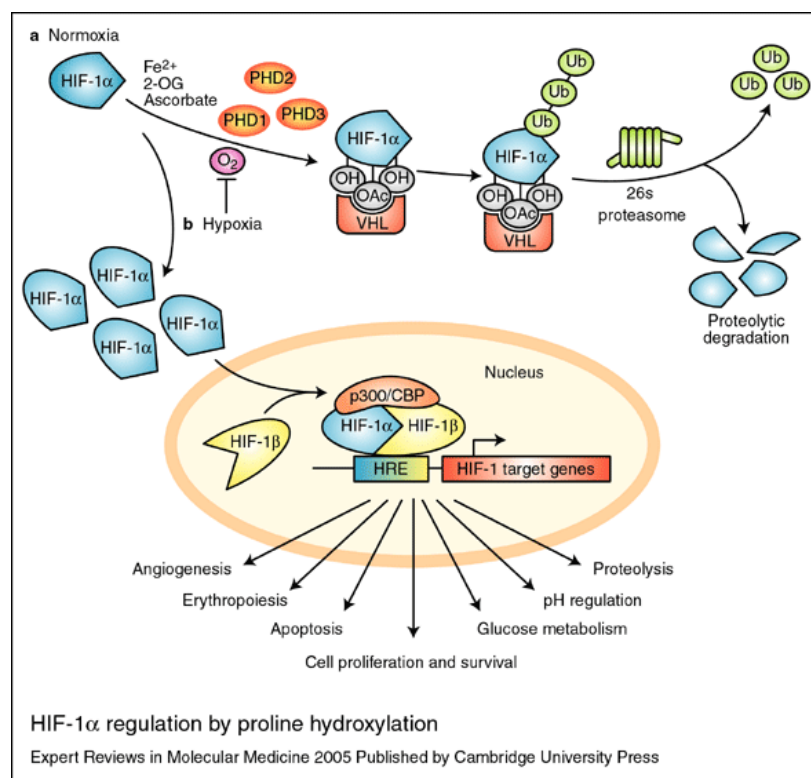
## **2.2. Hypoxií indukovaný faktor**

Kyslíková homeostáza případně její narušení a nedostatečné zásobení tkání kyslíkem je spojeno s fyziologickými a patofyziologickými stavy. Hlavním regulátorem a zprostředkovatelem prvotních transkripčních reakcí na snížený přísun kyslíku do buněk je hypoxií indukovaný faktor (HIF). Ten se skládá ze dvou podjednotek. Kyslík senzitivní podjednotka alfa, která se dále může vyskytovat ve třech izoformách HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  a HIF-3 $\alpha$  (Lisy and Peet, 2008) a konstitutivní jaderná podjednotka beta neboli aryl-hydrokarbonová jaderná translokáza (ARNT). Obě podjednotky společně tvoří heterodimer (Semenza, 2000). Obsahují základní helix-loop-helix doménu a PAS (z anglického Per-Arnt-Sim) motiv, které jsou nezbytné pro heterodimerizaci a vazbu na DNA (Yee Koh et al., 2008).

V případě, že je v buňkách dostatečné množství kyslíku, je podjednotka HIF- $\alpha$  konstitutivně hydroxylována enzymy z rodiny kyslík senzitivních prolyl-hydroxyláz (PHD) (Semenza, 2001) a následně degradována specifickým proteinovým komplexem von Hippel-

Lindau tumor supresorem (VHL). Ubiquitinace je katalyzována a podjednotka HIF- $\alpha$  je následně rozštěpána v proteasomu. Hydroxylace je kyslík dependentní enzymatická reakce, tudíž je regulována právě množstvím kyslíku (Kaelin, 2002). Ke správné funkci hydroxyláz jsou potřeba jako kofaktory železité ionty a také 2-oxoglutarát, jelikož se jedná o reakci spřaženou s dekarboxylací a konverzí na sukcinát jako akceptor pro kyslík. Dalším regulačním faktorem je tedy také aktivita Krebsova cyklu, který poskytuje již zmíněný intermediát 2-oxoglutarát (Lisy and Peet, 2008). Zatímco podjednotka HIF- $\beta$  je konstitutivně exprimována v jádře a její aktivita není ovlivněna hypoxií (Li et al., 1996).

V případě nedostatečného zásobení kyslíkem klesá aktivita hydroxyláz a HIF- $\alpha$  podjednotka není degradována. Je transportována do jádra, kde dimerizuje s podjednotkou HIF- $\beta$ . Za účasti transkripčních koaktivátorů se váží na hypoxia response element v promotorové oblasti cílových genů, čímž dochází ke zvýšení transkripce těchto genů (Nguyen et al., 2013) (Obr. 1).



Obr. 1 Proces přeměny a interakce podjednotek HIF  $\alpha$  a  $\beta$  za normoxických a hypoxických podmínek a rozsáhlé pole působení cílových genů HIF (Carroll and Ashcroft, 2006)

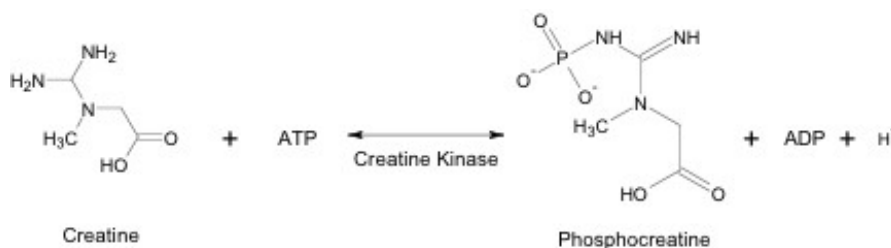
Geny, které jsou regulované HIF, se účastní velkého množství procesů, včetně glukózového a energetického metabolismu, proliferace, erytropoézy, apoptózy, angiogeneze

(Semenza et al., 2006), a dále například i diferenciace rakovinných buněk (Rankin and Giaccia, 2008). Nedávné studie s využitím genetických nebo farmakologických stabilizátorů HIF za normoxických podmínek nebo inhibitorů PHD také naznačují úlohu HIF při kardioprotektivních procesech. Experimentální studie potvrdily jeho benefiční úlohu zejména při ochraně myokardu proti hypoxickému stresu (Eckle et al., 2008). Významnou roli také hraje při pokusech s využitím preconditioningu (Cai et al., 2008) a jako ochrana před detrimetálními následky I/R poškození. I přesto, že mechanismus zůstává detailněji neobjasněný, je přičítán transkripční aktivitě genů asociovaných s kardioprotekcí (Ong and Hausenloy, 2012).

Skupina cílových genů HIF v dnešní době čítá více než sto zástupců a stále roste. Část genů je aktivovaná ve všech hypoxických buňkách, zatímco další cílové geny HIF, se vyskytují jen v některých specializovaných buňkách (Kaluz et al., 2008). Následně pak proteiny kódované těmito geny, hrají ústřední roli v adaptaci na hypoxii (Semenza, 2001). Do této skupiny můžeme právě zařadit geny rozhodující o fungování buňky za stresových podmínek, jako jsou například hexokináza 2 (HK2) nebo laktátdehydrogenáza A (LDHA). Mezi stresové podmínky můžeme v tomto případě zařadit i chlad.

### 2.2.1. Kreatinkináza

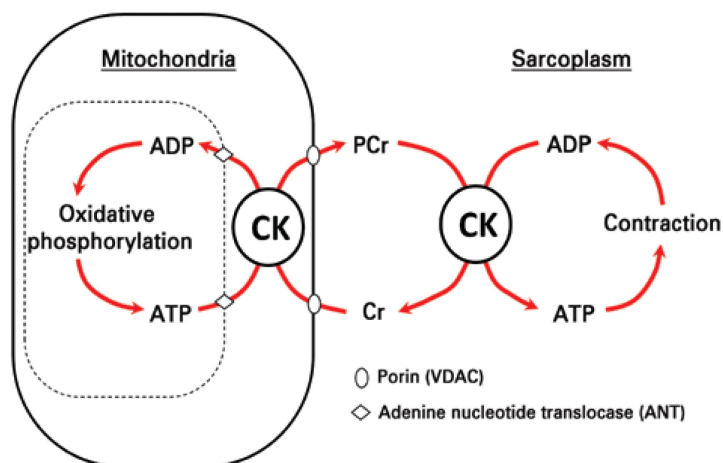
Kreatinkináza (CK) je enzym, který katalyzuje reverzibilní reakci, při níž dochází k přenosu fosfátu z ATP (adenosintrifosfát) na kreatin (Cr) za vzniku vysokoenergetického fosfokreatinu (PCr) a ADP (adenosindifosfát) (Obr. 2). Tato látka hraje klíčovou roli v udržování energetické homeostáze a jako energetický zásobník především v energeticky náročných tkáních (Vohánka, 2012).



Obr. 2 Reakce Cr a ATP za vzniku PCr a ADP, katalyzovaná enzymem CK (Young, 2002).

Fosfokreatinový shuttle (CK/PCr) je důležitým především v rychlé resyntéze ATP pomocí CK (Soboll et al., 1997). Zároveň ale udržuje rovnováhu, bez které by po hydrolýze ATP

rostlo množství ADP, fosfátu a  $H^+$ , čímž by došlo k okyselení cytosolu. Tento jev by následně vedl k inhibici svalové kontrakce a dalších buněčných procesů (Bertin et al., 2007). Zodpovědným enzymem k udržení této rovnováhy je právě CK (Obr. 3). U obratlovců můžeme nalézt její čtyři izoformy, které najdeme ve svalové tkáni, v ledvinách, v mozku, v retině, v nervových buňkách nebo ve spermatozích (Wallimann et al., 1992). Cytosolické formy CKM a CKB vznikají kombinací dvou podjednotek jako homo- nebo heterodimery. CKM se exprimuje především v kosterních svalech, CKB v mozku, v ledvinách, ve spermatozích a dalších tkáních. V srdeční tkáni můžeme nalézt oba podtypy (Wallimann et al., 2011). Mitochondriální kreatinkináza (mtCK) existuje ve dvou podtypech. Sarkomerická, která se vyskytuje v kosterních svalech a myokardu a ubiquitární, kterou můžeme nalézt ve všech tkáních, kromě příčně pruhovaných svalů. Obě mají asi z 80 % homologní strukturu (Anflous et al., 1997) a vyskytují se ve formě homodimeru nebo homooktameru (Wallimann et al., 2011). Můžeme je nalézt v intermembránovém prostoru mitochondrií (Jacobs et al., 1964). Na jedné straně sousedí s voltage-dependentním aniontovým kanálem (VDAC) lokalizovaným na vnější mitochondriální membráně a na druhé straně s adenin nukleotidovým translokátorem (ANT) (Schlattner et al., 2006). Transkripce jednotlivých izoform je regulována řadou faktorů, mezi které patří například myogenní faktor D (MyoD) (Lassar et al., 1989), myocyte-specific enhancer binding faktor 2 (MEF 2) (Buskin and Hauschka, 1989) a HIF (Glover et al., 2013).

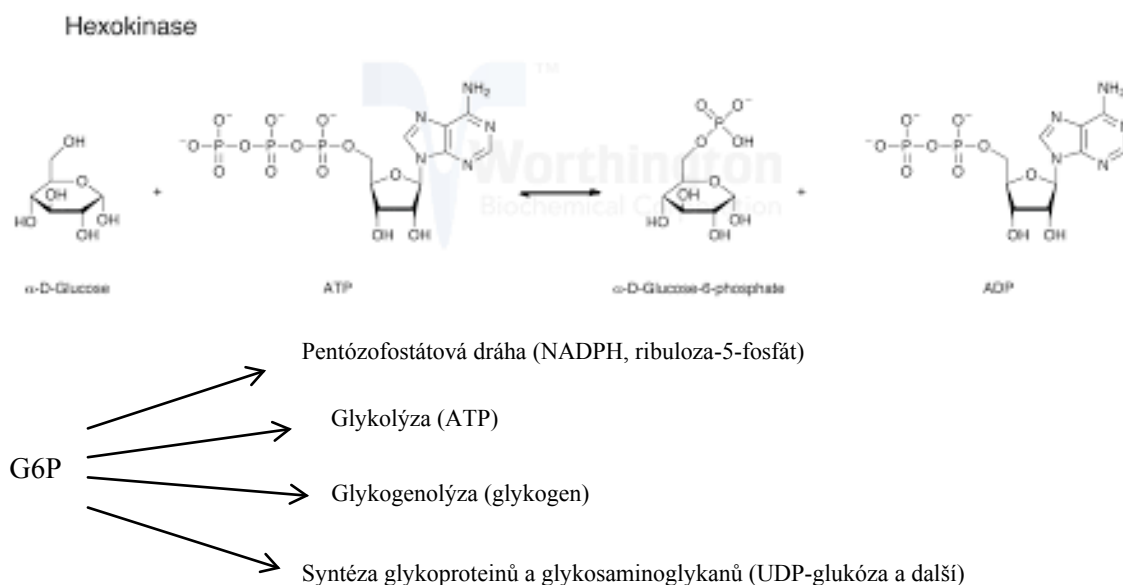


Obr. 3 V mitochondriích dochází díky mtCK k reakci kreatinu s ATP generovaného oxidativní fosforylací. Toto funkční spojení mtCK a produkce ATP díky blízké lokalizaci ANT je klíčový element přenosu energie na PCr (Schlattner et al., 2006). Toto spojení také redukuje produkci volných radikálů ROS a inhibuje průchod látek přes mitochondriální membránu v počátku apoptózy

(Wallimann et al., 2011). V cytosolu je rovnováha PCr/Cr a poměru ATP/ADP udržována cytosolickou frakcí CK. Další část je také spojena s glykolytickými enzymy a ATP z glykolýzy. Tento cyklus CK/PCrshuttle spojuje vysokoenergetické látky PCr a Cr, produkci ATP a jeho následnou spotřebu a využití pomocí ATPáz v iontových pumpách nebo ATP závislých procesech (Wallimann et al., 2011) (Neubauer, 1998).

## 2.2.2. Hexokináza

Glukóza je základním metabolitem všech organismů. Glykolytický metabolismus je hlavním generátorem energie ve formě ATP a metabolity, které vznikají v průběhu sledu reakcí, slouží dále jako prekurzory biosyntézy dalších buněčných složek (Wilson, 2003). Prvotním ireverzibilním krokem v metabolismu glukózy je fosforylace na glukózu-6-fosfát (G6P). Ta dále může vstupovat do glykolýzy, pentózofosfátové dráhy, syntézy glykogenu nebo poskytuje prekurzory pro biosyntézu glykoproteinů a glykosaminoglykanů. Tato reakce je katalyzována enzymem hexokinázou (HK). Tento enzym se tedy účastní velkého množství procesů jako je organizace katabolických a anabolických využití glukózy, modulace buněčných apoptotických procesů interakcí s VDAC a je také regulačním komponentem mPTP. Hraje tedy ústřední roli nejen v buněčném metabolismu, ale i v buněčném přežívání, které je s tím úzce spojeno (Calmettes et al., 2015) (Obr. 4).



Obr. 4. Reakce glukózy s ATP katalyzovaná HK. Využití G6P v buňkách (Hexokinase - Worthington Enzyme Manual).

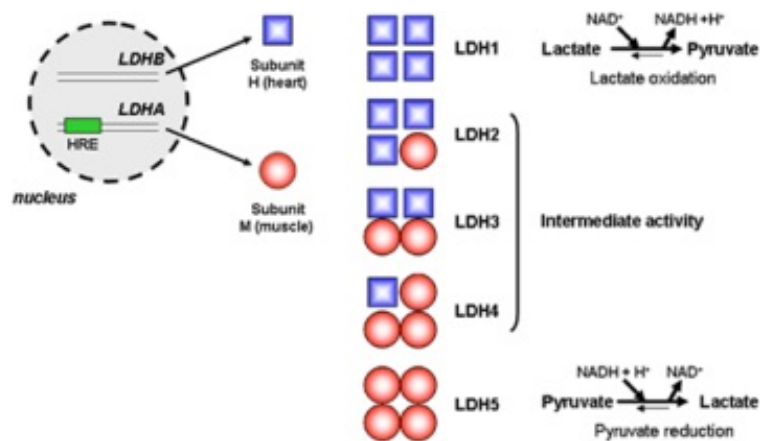


HK můžeme v organismech nalézt ve čtyřech izoformách s různou lokalizací. HK1 je asociována s vnější mitochondriální membránou. Kontakt je zprostředkovaný díky hydrofobní N-terminální doméně, která je insertovaná do vnější hydrofobní mitochondriální membrány (Kropp and Wilson, 1970). Zde HK interaguje s mitochondriálním VDAC kanálem, který slouží k průchodu metabolitů skrz vnější membránu. Díky tomu mohou HK ovlivňovat vnitřní apoptotickou dráhu (Azoulay-Zohar et al., 2004). HK1 můžeme nalézt především v mozkové tkáni, lymfocytech, fibroblastech a erytrocytech. HK2 se exprimuje především v cytosolu v kosterních a srdečních svalech, v tukové tkáni a rychle rostoucích tumorech (Katzen and Schimke, 1965), kde hraje důležitou roli v rezistenci tumorů k apoptóze (Pastorino and Hoek, 2003). HK2 stejně jako HK1, tedy na rozdíl od dalších podtypů, interaguje na vnější mitochondriální membráně s VDAC, který je v kontaktu s adeninovým nukleotidovým translokátorem (ANT), čímž je dosaženo propojení vnější a vnitřní membrány (Robey and Hay, 2006). Tím pádem se jedná také o spojení glykolýzy s oxidativní fosforylací. ADP generované katalytickou aktivitou HK se vrací zpět do mitochondrie (Nelson and Kabir, 1986). G6P katalyzovaný HK1 vstupuje primárně do glykolýzy, naproti tomu HK2 translokuje mezi mitochondriální a cytosolickou frakcí. G6P vzniklý v cytoplazmě působením HK2 se využívá především k syntéze glykogenu a lipidů (Wilson, 2003). HK je také jedním z enzymů, která je zpětně alostericky regulována množstvím svého produktu, tedy G6P. Zároveň navázání HK na mitochondriální membránu pravděpodobně brání nasednutí pro-apoptotických markerů BAX/Bak, a tím brání vylití cytochromu c z mitochondrie a spuštění apoptotické kaskády (Pastorino and Hoek, 2003). Další izoformy HK3 a HK4 neobsahují hydrofobní N-terminální sekvenci, tudíž je nalezneme v cytoplazmě. HK3 můžeme nalézt například v krvi. V posledních studiích byla demonstrována její asociace s jadernou membránou. Čtvrtý podtyp HK4 se exprimuje především ve slinivce a v játrech (Katzen and Schimke, 1965) a účastní se hlavně anabolických dějů.

### 2.2.3. Laktátdehydrogenáza

Laktátdehydrogenáza (LDH) je intracelulární enzym, který konvertuje pyruvát na laktát v procesu glykolýzy. Zahrnuje přitom také oxidaci/redukci NADH na NAD<sup>+</sup> (Everse and Kaplan, 1973). Ve tkáních se vyskytuje v pěti izoformách LDH1-5. Každá z nich je složena ze čtyř podjednotek a tvoří homo- nebo heterotetramery (Cahn et al., 1962). Její různé formy jsou produktem tří různých genů: *Ldh-a*, *Ldh-b* a *Ldh-c*, které kódují jednotlivé podjednotky (Li, 1989) (Obr. 5).

Podjednotku LDHM (LDHA), kódovanou genem *Ldh-a*, nalezneme především v kosterních svalech a játrech. Druhá podjednotka LDHH (LDHB), kódovaná genem *Ldh-b*, převažuje v srdci (Spriet et al., 2000). Podjednotka, kódovaná genem *Ldh-c*, byla nalezena pouze ve varlatech (Coonrod et al., 2006). Konverze laktátu na pyruvát je také nazýváno laktátový shuttle. Dříve se předpokládalo, že se nachází přilehlý na mitochondrii. V pozdějších studiích byla vyslovena hypotéza o intracelulárním laktózovém shuttle (ILS), který bychom našli pravděpodobně v intracelulárním prostoru mitochondrií (Hashimoto and Brooks, 2008). Laktát je ve tkáních transportován rodinou monokarbonátových transportérů (MCT) (Hashimoto et al., 2006). Vzhledem k dostupným informacím je možné, že se směr reakce vztahuje k jednotlivým izoformám enzymů v různých tkáních. S tím, že LDHA primárně katalyzuje reakce směru tvorby laktátu a LDHB katalyzuje obrácenou reakci (Cruz et al., 2012).



Obr. 5 Laktátdehydrogenáza a geny kódující její izoformy LDH1-5. LDH katalyzují přeměnu laktátu na pyruvát a zpět (Porporato et al., 2011)

### 2.3. Apoptóza

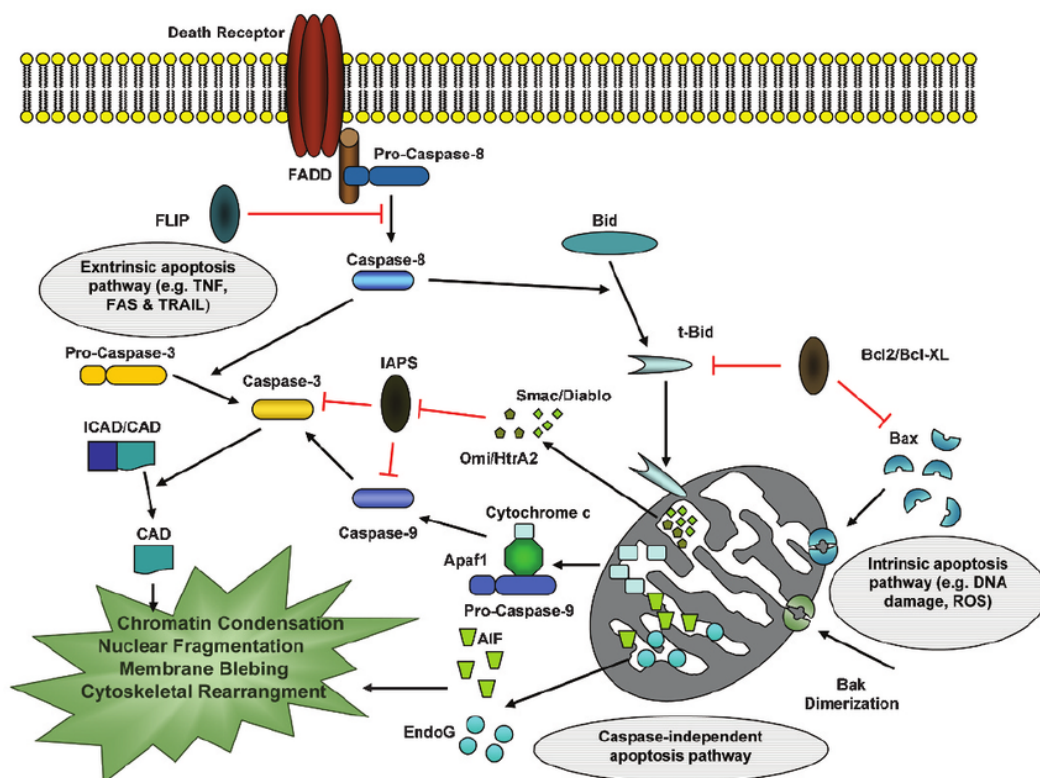
Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je jedním z typů buněčné smrti. Poprvé byl koncept apoptózy popsán v 60. letech 20. století, a i přesto, že od té doby došlo ke klasifikaci a identifikaci specifických procesů, kompletní mechanismus je stále nejasný (Kerr et al., 1972). Jedná se o komplex biochemických dějů zprostředkovaný kaspázami z rodiny cysteinových proteáz (CASP) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Kaspázami indukované apoptotické děje zahrnují celou škálu událostí, od fragmentace DNA, dekonenzace chromozomů, až po smršťování buňky a odštěpování apoptotických tělísek. Apoptóza může být indukována dvěma cestami. Vnější apoptotická dráha zahrnuje vazbu ligandu na receptor

smrti a následnou aktivaci kaspázové kaskády. Spuštění vnitřní apoptotické dráhy pochází z nitra buňky, z mitochondrie. Od prvního signálu, až po smrt samotné buňky, můžeme počítat minuty, ale také dny (Green, 2005) (Obr. 6).

Vnější dráha začíná signálem z vnějšího prostředí. Nejprve dochází k navázání ligandu na receptor smrti, tím může být, jednak Fas receptor nebo TNFR (receptor tumor nekrotizujícího faktoru). Fas ligand i členové TNF rodiny patří do proteinové skupiny cytokininů, které ovlivňují buněčnou diferenciaci a proliferaci tím, že se váží na specifické transmembránové receptory cílových buněk (Nagata, 1997). Po jejich navázání na receptor dochází k příchodu adaptorových molekul. Receptor obsahuje takzvanou doménu smrti (DD) a dochází k interakci s adaptorovými proteiny FADD (z anglického FAS-associated DD protein) nebo TRADD (z anglického TNFR-associated DD protein). Dohromady formují takzvaný receptor indukující signální komplex smrti (DISC) (Roy and Nicholson, 2000). Následně dochází k navázání a aktivaci kaspázy 8 (CASP8). Ta poté aktivuje výkonné kaspázy 3 (CASP3) nebo 7 (CASP7). Jako mezikrok některé buňky využívají aktivaci BH-3 proteinu Bid (z anglického BH-3 interacting-domain death agonist). Ten poté, co je rozštěpen CASP8, je schopen aktivovat pro-apoptotické děje, které indukují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, čímž dochází k propojení s vnitřní apoptotickou dráhou (Chipuk and Green, 2006).

Vnitřní neboli mitochondriální apoptotická dráha je spuštěna v reakci na stres, způsobený například oxidativním stresem, poškozením DNA nebo dalšími faktory. Proces vyústí v permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (MOMP). K tomu může dojít dvěma způsoby. V prvním případě jsou za to odpovědné pro-apoptotické faktory z rodiny Bcl-2 (z anglického B-cell lymphoma). Právě BAX (z anglického Bcl-2-associated X protein) a Bak (z anglického Bcl-2-associated death promoter) vytvářejí ve vnější mitochondriální membráně póry. Druhá možnost může být iniciována různými intracelulárními signály, například  $\text{Ca}^{2+}$  ionty nebo reaktivními formami kyslíku (ROS), které otevírají malé kanály vnitřní mitochondriální membrány, čímž umožňují vstup také vodě. Díky tomu dochází k bobtnání mitochondriální matrix a následnému prasknutí vnější mitochondriální membrány (Hao et al., 2005). V obou případech dochází k uvolnění proteinů z intermembránového prostoru do cytosolu. Hlavním z nich je cytochrom c, který indukuje oligomerizaci Apaf-1 a společně aktivují kaspázu 9 (CASP9) a formují apoptozom (Danial and Korsmeyer, 2004). Tím opět dochází k aktivaci výkonných CASP3 a CASP7 (Chipuk and Green, 2005). Ve hře jsou také inhibitory kaspáz (IAPs), které se snaží zastavit kaspázovou kaskádu. Do rodiny inhibitorů apoptózy řadíme například XIAP (X-vázaný inhibitor apoptózy) nebo cIAP1

(buněčný inhibitor apoptózy 1). Další proteiny jako jsou SMAC/DIABLO (z anglického second mitochondria-derived aktivator of caspases), uvolněné z mitochondrie se současně váží k IAPs a inaktivují je (Favaloro et al., 2012). I přesto, že záleží na poměru pro-apoptotických (Bak, BAX) a anti-apoptotických (Bcl-2, Bcl-xL) faktorů, v případě narušení integrity mitochondrie, by ke smrti buňky došlo v každém případě, s ohledem na toxické látky uvolněné z mitochondrie a ztrátu nepostradatelné funkce mitochondrie samotné (Chipuk and Green, 2005). Morfologické změny charakteristické pro apoptózu následně vyústí až ve formování apoptotických tělísek (Hengartner, 2000).



Obr. 6 Vnitřní a vnější apoptotická dráha. Vnější apoptotická dráha zahrnuje vazbu ligandu na receptor, aktivaci CASP8 a následně výkonné CASP3. Vnitřní apoptotická dráha je charakteristická permeabilizací vnější mitochondriální membrány, formováním apoptozomu a aktivací CASP3. Výkonné kaspázy následně přes další mediátory iniciují kondenzaci chromozomů, fragmentaci DNA a vznik apoptotických tělísek (Ghavami et al., 2009).

Apoptóza má i svou klíčovou roli v různých onemocněních. Počínaje rakovinou, kde právě defekty apoptotických drah jsou odpovědné za rezistenci buněk k terapii a nádory jsou díky tomu schopny vyhnout se imunitní reakci (Burz et al., 2009). Nezastupitelnou roli má

apoptóza také například ve vývoji centrální nervové soustavy. V dospělosti je ovšem její význam spíše spojen s patologickým působením. Typickým příkladem jsou akutní onemocnění jako mrtvice nebo neurodegenerativní nemoci jako Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Hengartner, 2000). Stejně tak i v akutní i chronické patologii srdce dochází ke zvýšenému výskytu apoptózy. Tu můžeme pozorovat především u infarktu, ischemicko-reperfučního poškození a srdečního selhání (Whelan et al., 2010). Detailnější popsání procesu apoptózy samozřejmě vede k vývoji nových terapeutických léků, které jsou a budou využity při terapii a léčbě těchto onemocnění.

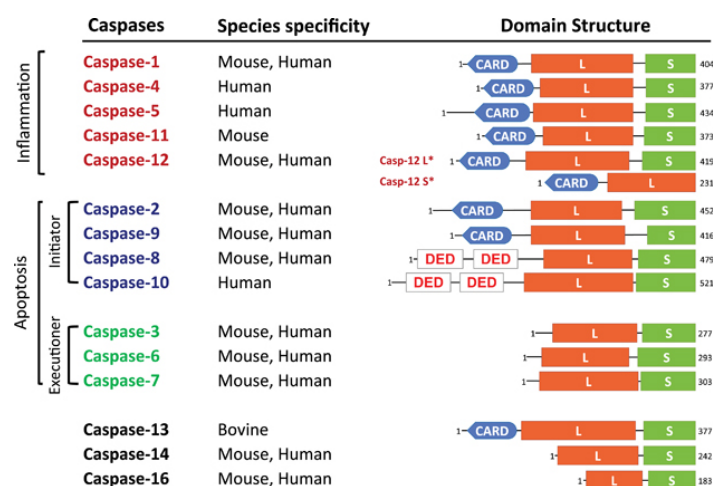
### 2.3.1. Kaspázy

Kaspázy patří do rodiny cysteinových proteáz a jsou hlavními regulátory programované buněčné smrti a zánětu. První byla objevena koncem minulého tisíciletí jako proteáza odpovědná za maturaci interleukinu - 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Cerretti et al., 1992). Kaspáza, zpočátku pojmenována podle své funkce interleukin konvertující enzym (ICE), je dnes kaspáza 1. O několik měsíců později byl u *Caenorhabditis elegans* nalezen enzym se stejnou funkcí. Začal se nazývat CED3 (Yuan et al., 1993). Postupem času byly objeveny další kaspázy a jejich funkce a zapojení do procesů apoptózy. V živočišných druzích bylo zatím identifikováno 18 různých kaspáz (Eckhart et al., 2008). V buňkách se za normálních podmínek vyskytují ve formě inaktivních proenzymů a až v případě iniciace dochází k přeměně na aktivní formu. Obsahují malou (10-12 kDa) a velkou (17-20kDa) podjednotku a další specifickou doménu (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Jejich zastoupení se ovšem v různých živočišných druzích může lišit. Kaspázy bychom mohli rozdělit na dvě skupiny, na zánětlivé (CASP1, 4, 5, 11 a 12), které hrají roli při iniciaci procesů vedoucích k zánětu, a apoptotické, účastníci se buněčných pochodů končících smrtí. Druhou skupinu dále dělíme na kaspázy iniciační (CASP8, 9 a 10), které nalezneme na začátku apoptotické kaskády a výkonné neboli efektorové kaspázy (CASP3, 6 a 7). Ty jsou poté koncovým bodem předcházející smrti buňky, degradují strukturální proteiny, signální molekuly a následně i DNA (Obr. 7). I přesto, že hrají klíčovou roli v apoptóze, jsou nedílnou součástí i velké řady dalších buněčných procesů jako je diferenciace, remodelace, tumorogeneze, synaptická plasticita, metabolismus a stárnutí (Shalini et al., 2015).

Jednou z výkonných kaspáz je právě CASP3. Může být aktivována na základě podnětů vedoucích ve vnější i vnitřní apoptotické dráze CASP8 a 9. Jakmile je tato kaspáza aktivována, spouští řetězec nevratných dějů vedoucích ke smrti buňky. Následkem toho dochází ke kondenzaci chromozomů a fragmentaci DNA. Jedním z mediátorů je například

CAD (Caspase-activated DNase) endonukleáza, která degraduje DNA (Porter et al., 1999). Mimo jiné ovšem hraje i klíčovou roli v neuronální apoptóze, synaptické aktivitě a je nedílnou součástí vývoje centrální nervové soustavy (Snigdha et al., 2012). Myši s knockoutem genu pro CASP3 umíraly velmi brzy po narození, ztráta má tedy fatální důsledky (Su et al., 2001). Naproti tomu její zvýšená aktivita ve stárnoucím mozku má detrimetální důsledky, které ústí v degenerativní onemocnění jako je například Alzheimerova choroba (Su et al., 2001).

Do protilehlé skupiny iniciačních kaspáz můžeme zařadit CASP8. Právě ona stojí na začátku kaspázové kaskády a je aktivátorem výkonných kaspáz. CASP8 se účastní vnější apoptotické dráhy a je aktivována po navázání ligandu na receptor. Tím dochází k formování smrt indukujícího signálního komplexu (DISC), který obsahuje mimo adaptorový protein i CASP8 (Kischkel et al., 1995). Její aktivací se spouští apoptotické procesy zahrnující aktivaci CASP3, 6 a 7 a poškození mitochondrií. Dochází k bobtnání, poškození vnější mitochondriální membrány a vylití cytochromu c do cytosolu (Salvesen and Dixit, 1997). CASP8 je také nedílnou součástí procesů nekrózy, regulovaných kinázami z rodiny receptor interagujících proteinkináz (RIPK) (Feltham et al., 2017). Mimo účasti v apoptotických procesech má CASP8 nezastupitelnou roli i v zabezpečení přežívání buněk. Odlišná funkce je regulována interakcí se specifickým inhibujícím proteinem (cFLIP). Přesný mechanismus interakce a přepínání mezi apoptotickou a přeživací funkcí je zatím nejasný (Salvesen and Walsh, 2014). Během savčího vývoje její koncentrace roste, vysoké zastoupení můžeme nalézt především v srdci, v žaberních obloucích a v zárodcích končetin (Cohen, 1997). V případě mutace je tato ztráta letální již u embrya (Varfolomeev et al., 1998).



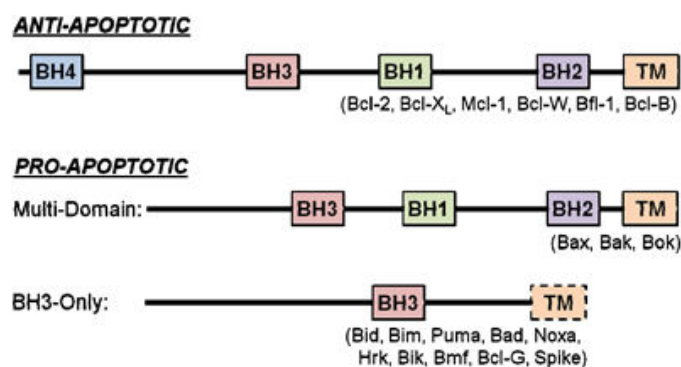
Obr. 7 Klasifikace kaspáz podle funkce, druhové specifity a strukturální domény. U iniciační skupiny můžeme nalézt velkou N-terminální doménu a domény DED u CASP8 a 10, a doménu CARD u CASP2

a 9. Tato skupina je exprimována jako monomer a k aktivaci je nutná dimerizace. Naproti tomu u efektorové skupiny nalezneme kratší N-terminální doménu a inaktivní kaspázy se vyskytují ve formě dimerických zymogenů. K jejich aktivaci je nutné proteolytické štěpení mezi malou a velkou podjednotkou (Shalini et al., 2015).

### 2.3.2. Rodina Bcl-2

Proteiny rodiny Bcl-2 (z anglického B-cell lymphoma) patří ke klíčovým regulátorům vnitřní mitochondriální apoptotické dráhy (Danial and Korsmeyer, 2004) První člen byl identifikován v B-lymfocytech v 80. letech 20. století jako protoonkogen Bcl-2, který nečekaně blokoval apoptotické procesy (Bakhshi et al., 1985). Rozdělit je dnes můžeme do tří skupin podle funkce a specifické domény: anti-apoptotická (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL), multidoménová pro-apoptotická (BAX, Bak) a pro-apoptotická s BH3-doménou (Bid, Bad, NOXA). Jejich aktivace může být odpovědí na velké množství signálů jako je poškození DNA, nedostatek růstových faktorů nebo aktivace onkogenů. Aktivace nastává transkripční nebo posttranskripční modifikací (Nakano and Vousden, 2001).

Většina členů obsahuje 4 specifické BH domény, které tvoří přibližně stejné alfa helixy, predikující tvar i funkci proteinu. Anti-apoptotická skupina jako jediná obsahuje všechny čtyři domény. Naproti tomu multidoménová pro-apoptotická skupina obsahuje BH-domény 1-3. Ta také ke své aktivaci a následné interakci s Bcl-2 nebo Bcl-X potřebuje aktivační podnět. Přesný mechanismus není popsán, ale pravděpodobně je zprostředkovan díky aktivaci členů s BH-3 doménou (Kim et al., 2006). Třetí pro-apoptotická skupina je specifická právě tím, že obsahuje pouze BH-3 doménu. Právě ona je většinou prvotním přijímačem signálu a přes ni dochází ke spojení s BAX/Bad, což způsobí jejich transformaci a aktivaci (Letai et al., 2002) (Obr. 8).

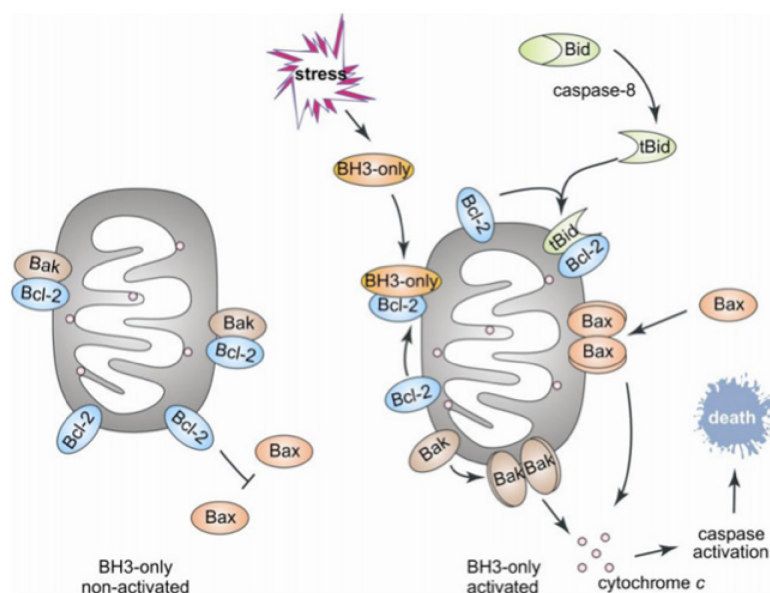


Obr. 8 Srovnání jednotlivých skupin proteinů rodiny Bcl-2. Zastoupení charakteristických BH-domén (Yip and Reed, 2008).



Bcl-2 je inhibítozem apoptotických dějů. Vyskytuje se na mitochondriální membráně, endoplasmatickém retikulu a jaderné membráně (Lithgow et al., 1994). Jeho hlavním úkolem je především bránit uvolnění apoptogenních faktorů jako je cytochrom c (Liu et al., 1996) nebo apoptózu indukující faktor (AIF) z intermembránového prostoru mitochondrií do cytosolu (Susin et al., 1996). Jejich uvolněním totiž okamžitě dochází k aktivaci kaspázové kaskády. Při pokusech se zvýšenou expresí Bcl-2 došlo k blokadě uvolnění cytochromu c do cytosolu v reakci na apoptotické stimuly (Kluck et al., 1997).

Ze skupiny pro-apoptotických faktorů byl jako první identifikován BAX (odvozeno z anglického Bcl-2 associated death promoter), právě díky své interakci s Bcl-2 (Oltvai et al., 1993). Při pokusech s využitím lidských buněk s KO pro oba geny BAX i Bak byla zjištěna naprostá rezistence na podněty vnitřní apoptotické dráhy (Wei et al., 2001). Jsou tedy nutnou branou ke spuštění apoptózy. V buňkách se vyskytují ve formě monomerů. Inaktivní BAX nalezneme především v cytosolu, případně malé množství v kontaktu s vnější mitochondriální membránou (Suzuki et al., 2000). Po prvotním signálu vedoucímu k apoptóze se BAX vsune do mitochondriální membrány, kde dochází k aktivaci, změně konformace a oligomerizaci. Následná kaskáda vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (Cartron et al., 2004), pravděpodobně vznikem pórů (Muchmore et al., 1996). Dále k uvolnění proteinů z intermembránového prostoru mitochondrií, včetně cytochromu c do cytosolu. Následuje formování apoptozomu a aktivace kaspázové kaskády (Obr. 9).



Obr. 9 Zobrazení situace buňky za normálních podmínek, kdy pro-apoptotické a anti-apoptotická faktory jsou v rovnováze. Naproti tomu pokud je buňka vystavena stresovému stimulu, dochází

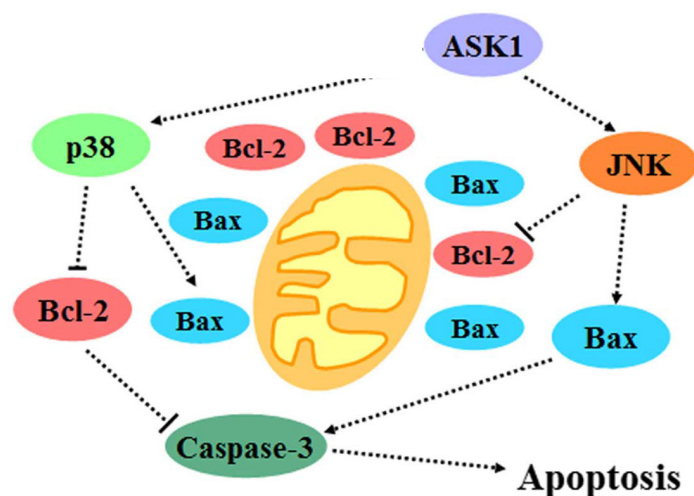


k porušení rovnováhy, aktivaci pro-apoptotických faktorů, výlevu cytochromu c a spuštění kaspázové kaskády (Clark, 2012).

Poměr mezi pro- a anti-apoptotickými faktory jako je BAX/Bcl-2 vytváří takzvaný reostat, který určuje hranici přežití buňky při vnitřní apoptotické dráze (Danial and Korsmeyer, 2004). Osud buňky i celých buněčných linií je daný právě tímto poměrem, zastoupením pro-apoptotických a anti-apoptotických markerů.

### 2.3.3. Kináza regulující apoptotický signál

Kináza regulující apoptotický signál (ASK1) je další z členů pro-apoptotických markerů zapojených v apoptotických kaskádách. Patří do rodiny mitogen-aktivovaných proteinkináz kináz kináz (MAPKKK). Její aktivace může být spuštěna skrze množství signálů jako je lipopolysacharidový septický šok, ER indukovaný stres, zvýšená hladina ROS, přetížení  $Ca^{2+}$  a další molekuly jako je  $TNF\alpha$  nebo FAS ligand (Hayakawa et al., 2006). Signál ASK1 je následně aktivován skrze aktivaci mitogen-aktivované proteinkinázy p38 nebo kinázy JNK (z anglického c-Jun N-terminal kinase) (Hayakawa et al., 2006). Aktivovaná dráha ASK1-JNK vede ke ztrátě potenciálu mitochondriální membrány (Furuhata et al., 2009). JNK následně inaktivuje Bcl-2 a indukuje přesun BAX z cytosolu do mitochondrie a tím ovlivňuje MOMP a aktivaci kaspázové kaskády (Takada et al., 2006). V pokusech s využitím ASK1 deficientních myší byl pozorován snížený rozsah infarktu a zvýšená rezistence myokardiálních buněk k apoptóze (Hayakawa et al., 2012). V poslední době se také objevují podklady pro předpoklad, že ASK1 působí i jako aktivátor CASP11 (Choi et al., 2009) (Obr. 10).



Obr. 10 ASK1 a spuštění apoptotických drah skrze aktivaci kináz JNK/p38 (Guo et al., 2016).

Mimo to je také schopna regulovat další buněčné procesy jako diferenciaci keranocytů (Sayama et al., 2001) a zároveň hraje důležitou roli ve vrozené imunitě skrze kinázu p38 (Matsuzawa et al., 2005). Její role je v současné době také spojována Alzheimerovou a Huntingtonovou chorobou, kdy její zvýšená koncentrace souvisí se stresem z ER způsobujícím smrt neuronálních buněk (Cho et al., 2009). Aktivace osy ASK1-JNK/p38 indukuje apoptózu v neuronových buňkách a v kardiomyocytech. To může být do budoucna terapeutický cíl v léčbě neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění (Hayakawa et al., 2006).

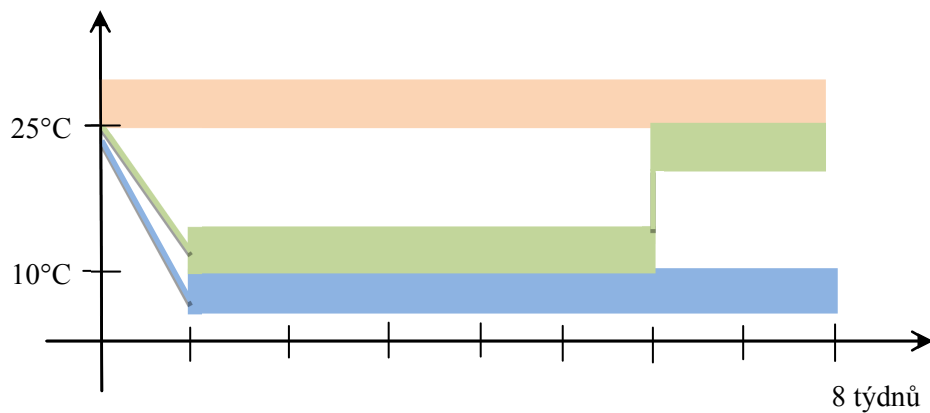
### **3. Cíle diplomové práce**

1. Zjistit, zda protektivní režim chladové adaptace souvisí s aktivací HIF cílových proteinů (CKB, HK2, LDHA, OXPHOS).
2. Zjistit, zda při chladové adaptaci dochází k aktivaci pro-apoptických a anti-apoptických drah (Bcl-2, BAX, CASP3, CASP8, ASK1).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Chladová adaptace experimentálních zvířat

Pro chladovou adaptaci byli využiti potkaní samci kmene Wistar, chovné jádro Charles River. V experimentu bylo 22 zvířat rozděleno do tří skupin. Kontrolní skupina (6 jedinců) byla chována v místnosti s teplotou  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Chladové (10 jedinců) a regresní (6 jedinců) skupiny byly chovány po dobu jednoho týdne s postupnou adaptací snížením teploty na  $10\pm 1^\circ\text{C}$ . Následně zde byly chladová i regresní skupina chovány při této teplotě po dobu 5-ti týdnů. Po 5-ti týdnech byla regresní skupina následně ještě přemístěna na další 2 týdny do místnosti se stejnou teplotou, ve které byla uchována kontrolní skupina ( $26\pm 1^\circ\text{C}$ ) (Obr. 1). Po adaptaci byla potkanům odebrána srdce. Před odběrem byla potkanům peritoneálně podána anestezie thiopentalu v dávce 100 mg na kg tělesné váhy. Potkanovi poté bylo vyjmuto srdce a hned ponořeno do vychlazeného fyziologického roztoku na ledu. Následně bylo srdce rozděleno na jednotlivé části: pravá komora, levá komora a septum. Všechny části byly přeneseny do tekutého dusíku a zamraženy ( $-196^\circ\text{C}$ ), kde byly uchovány až do zpracování. Odběr srdcí provedla Mgr. Aneta Marvanová.



Obr. 1 Rozvržení adaptace potkanů. Oranžově kontrolní skupina v  $25^\circ\text{C}$ . Zeleně regresní skupina po 5-ti týdnech v  $10^\circ\text{C}$  přenesena do  $25^\circ\text{C}$ . Modře chladová skupina chována při  $10^\circ\text{C}$ .

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Zpracování vzorků, homogenizace

V dalším kroku byly vzorky za sterilních podmínek a při zachování nízké teploty zhomogenizovány. Levé komory srdce byly vybrány z tekutého dusíku a přeneseny do připravených vychlazených třecích misek s tloučkem, kde byly rozdraceny na jemný prášek. Rozdracenou tkáň jsme následně přenesli do zkumavek se třemi skleněnými kuličkami a 300  $\mu\text{l}$  homogenizačního média HM1 (Příloha 1B). Zkumavky byly zcentrifugovány a do každé z nich bylo přidáno HM1 na finální poměr média:tkáň 8:1. Následně byly vzorky zhomogenizovány v homogenizátoru (MIXER MM200 Retch) po dobu 10 min při frekvenci 30 Hz.

Ve vzorcích byla změřena koncentrace proteinů metodou Bradfordové s využitím komerčního setu (dodáno společností BioRad) na přístroji Varioscan (Thermo Scientific). Byla vytvořena kalibrační křivka s roztoky o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,6; 0,8 a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  rozředěných ze zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) (dodané společností BioRad). Malá část homogenátů byla naředěna na koncentraci 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Do 96 jamkové destičky byly nanášeny roztoky kalibrační křivky i naředěné homogenáty v objemu 10  $\mu\text{l}$  na jamku. Vše jsme nechali inkubovat s 250  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové po dobu 10 min při pokojové teplotě. Poté bylo provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance při vlnové délce 595 nm.

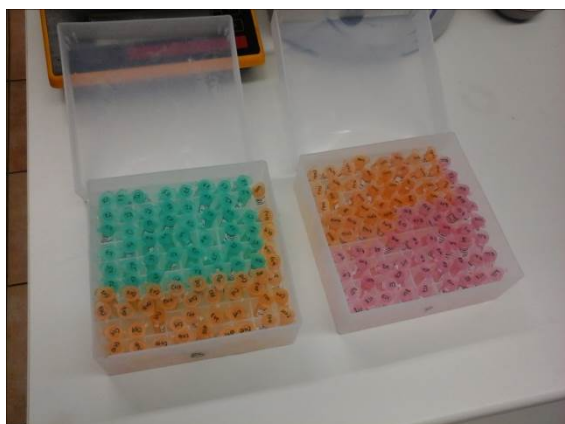
Po změření koncentrace bylo ke vzorkům přidáno homogenizační médium HM2 s vysokým obsahem močoviny (Příloha 1B) v poměru 1:1. Ve všech vzorcích byla opět změřena koncentrace proteinů metodou Bradfordové. Jednotlivé vzorky byly poté rozděleny do mikrozkušavek a uschovány v  $-80^{\circ}\text{C}$  pro elektroforézu, Western blot a pro měření enzymatické aktivity byly odebrány aliquoty před přidáním HM2.

### 4.2.2. Separace pomocí SDS-PAGE elektroforézy

Elektroforéza je separační metoda, která se používá k dělení proteinů. Využívá přitom jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli. Jako nosiče se využívají zejména agarózové, v tomto případě polyakrylamidové gely. Trojrozměrná síť gelu tvoří póry, které slouží jako molekulové síto. Rychlost pohybu je závislá na velikosti náboje a molekulové hmotnosti daného proteinu, ale také na intenzitě elektrického pole a porositě gelu. Při SDS-PAGE elektroforéze (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) se vzorky připravují s přídavkem SDS, čímž získají záporný náboj. Proto se pohybují od záporného pólu

ke kladnému. Malé proteiny se gelem pohybují rychleji, proteiny o vyšší molekulové hmotnosti naopak neprocházejí gelem tak snadno a pohybují se pomaleji.

Ke každému z 22 vzorků – 6 kontrol, 10 chladů, 6 regresí – bylo přidáno SLB, DTT, HM:UREA (Příloha 1A). Na elektroforézu byl připraven nejprve rychle tuhnoucí 10 % dělicí gel (Příloha 1B). Po 40 min tuhnutí byl přidán 5 % zaostřovací gel a opět nechán 40 min tuhnout (Příloha 1B). Mezitím byly vzorky umístěny na 5 min do termostatu a povařeny při teplotě 100°C a tím došlo k denaturaci proteinů. Po vytuhnutí gelů bylo nanášeno všech 22 vzorků v koncentraci 20 µg na jamku, vždy pod elektrodový pufr. Na každý gel byl přidán molekulový standard Precision plus protein standard (dodáno společností BioRad) o objemu 1,5 µl pro správné určení daného proteinu na membráně podle molekulové hmotnosti. Po sestavení celé aparatury a zalití elektrodovým pufrem (Příloha 1B) byla spuštěna elektroforéza. Program začínal na konstantním napětí 100 V a po přechodu čela elektroforézy do zaostřovacího gelu bylo zvýšeno napětí na konstantních 150 V. Zhruba 10 min před koncem elektroforézy bylo napětí zvýšeno na 200 V konst, kvůli lepšímu zaostření proteinů. Elektroforéza trvala 60-90 min podle velikosti sledovaných proteinů (Obr. 2).



*Obr. 2 Vzorky*



*SDS-PAGE elektroforéza*

#### **4.2.3. Western Blot**

Western blot je analytická technika používaná k detekci specifického proteinu. Tato metoda, využívá blotovacího zařízení, soustavy anody a katody. Působením elektrického proudu dochází k přenosu separovaných proteinů z gelu na PVDF nebo nitrocelulózové membrány. Záporně nabitě proteiny jsou přitahovány k anodě a přenesou se z gelu na povrch membrány.

Před koncem elektroforézy byly nejprve PVDF membrány asi 2 min aktivovány v MetOH. V případě použití nitrocelulózových membrán se aktivace v MetOH neprováděla.

Následně byly membrány ekvilibrovány v blotovacím pufru (Příloha 1B) po dobu 10 min v lednici spolu s filtračními polštářky a gely po skončení elektroforézy. Při sestavování blotovacího „sendwiche“ byly vytlačeny všechny bubliny mezi membránou a gelem a zahájeno blotování při konstantním napětí 100 V po dobu 60 min.

#### 4.2.4. Imunodetekce

Po skončení blotovacího programu byly membrány promyty 15 min v TBS (Příloha 1B). Následně bylo nutné povrch membrány zablokovat. V tomto případě bylo využito 5% nízkotučné sušené mléko rozpuštěné v TTBS, které se navázalo na všechna místa, kde nebyly přeneseny proteiny z gelu na membránu v průběhu blotování. Tím se zabránilo nespecifickému navázání primární protilátky. Blokováním také dochází ke snížení negativních efektů, jako je šum v pozadí. Po promytí membrán v TBS byly tedy membrány umístěny do 5 % mléka v TTBS po dobu 1 hod při pokojové teplotě.

Po blokaci byly opět membrány promývány 15 min v TTBS. Po promytí byly membrány umístěny do primární protilátky, vůči danému proteinu přes noc v lednici za stálého pomalého houpání. (Tabulka 1)

Tabulka 1:

	Primární protilátka	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění
CKmt	CKmt sc15168 goat	1:400	Sc 2033 anti-goat	1: 40 000
CKM	CKM mbs248823 goat	1:1000	Sc 2033 anti-goat	1: 20 000
CKB	CKB aa 100-150 rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
HK1	HK1 ab78420 rabbit	1:4000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 40 000
HK2	HK2 ab78259 rabbit	1:5000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 40 000
LDHA	LDHA 2012S rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
LDHB	LDHB EP1566Y rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
CASP3	CASP3 ab4051 rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
CASP8	CASP8 ab25901 rabbit	1:500	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
ASK1	ASK1 ab131506 rabbit	1:500	A9169-2ML anti-rabbit	1: 20 000
Oxphos	OXPHOS ab 110413 Rovent	1:250	32430 anti-mouse	1: 10 000
Bcl-2	Bcl-2 sab4500003 rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 40 000
BAX	BAX ab7977 rabbit	1:1000	A9169-2ML anti-rabbit	1: 10 000

Po inkubaci v primární protilátce byly membrány opět promývány 3x15 min v TTBS. Poté byly inkubovány v sekundární protilátce 1 hod při pokojové teplotě (Tabulka 1). Po hodinové inkubaci byly membrány promyty 3x10 min v TTBS a následovala detekce proteinů. Detekce probíhala pomocí konjugace sekundární protilátky s enzymem umožňujícím vizualizaci. Pomocí enzymu peroxidázy dochází k přeměně chemiluminiscenčního substrátu na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením kvanta světla. Uvolňování světla je poté detekováno přiložením světlocitlivého filmu nebo s použitím CCD kamer.

V tomto pokusu byly využity obě metody. V prvním případě došlo k nanesení 300  $\mu$ l chemiluminiscenčního barviva (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce) na každou membránu. Ty byly poté umístěny do světlu-vzdorné kazety a v temné místnosti vyvolány na film na přístroji Optimax X-Ray Film Processor. V druhém případě byly membrány opět po nanáše 300  $\mu$ l barviva vyvolány pomocí programu Image-reader LAS 4000 (Genetica, FujiFilm) (Obr. 3).



Obr 3. LAS 4000

Pro kvantifikaci dat z filmů či Image-reader LAS 4000 byla využita densitometrie a následně byla všechna výstupní data zpracována v programu QuantityOne (BioRad). Všechny vzorky byly pro jednotlivé protilátky analyzovány několikrát a vzniklý průměr byl využit do statistického hodnocení.

#### 4.2.5. Statistické hodnocení

Získané hodnoty byly následně statisticky zpracovány v programu GraphPadPrism 5. Pro hodnocení byla použita ANOVA, post test Dunnett dle rozložení hodnot, hladina významnosti  $p < 0,05$  pro  $n=6$  a  $n=10$ .



## 5. Výsledky

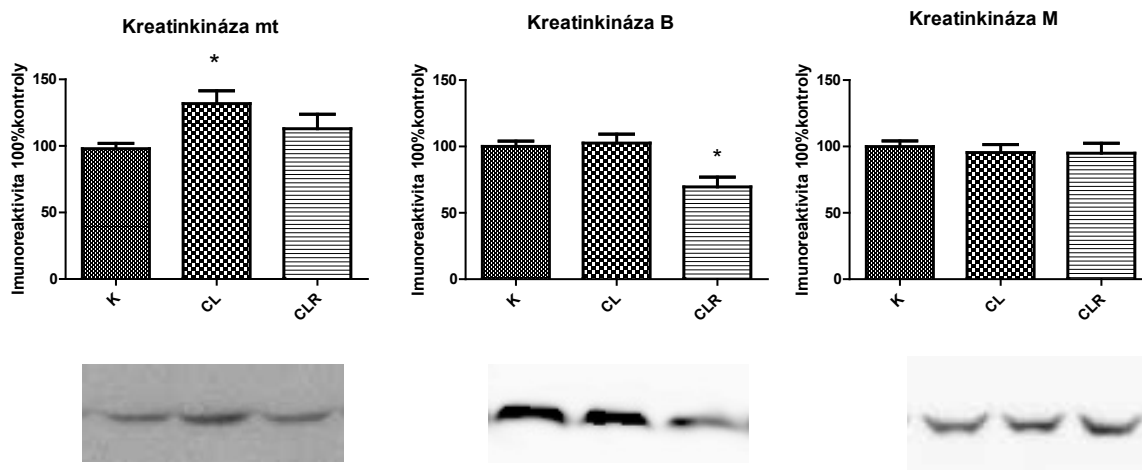
V této práci byl použit model chladově adaptovaných zvířat při teplotě  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ . Experimentální zvířata byla rozdělena do tří skupin – kontrolní (n=6), chladová (n=10) a regresní (n=6). Cílem diplomové práce bylo pomocí metody elektroforézy, Western blotu a imunodetekce zjistit relativní expresi vybraných proteinů a postihnout rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

### 5.1. Cílové geny HIF

V první části jsme zjišťovali množství cílových genů HIF, a zda má chladová adaptace vliv na energetický metabolismus skrze tyto proteiny.

#### 5.1.1. Kvantifikace kreatinkinázy

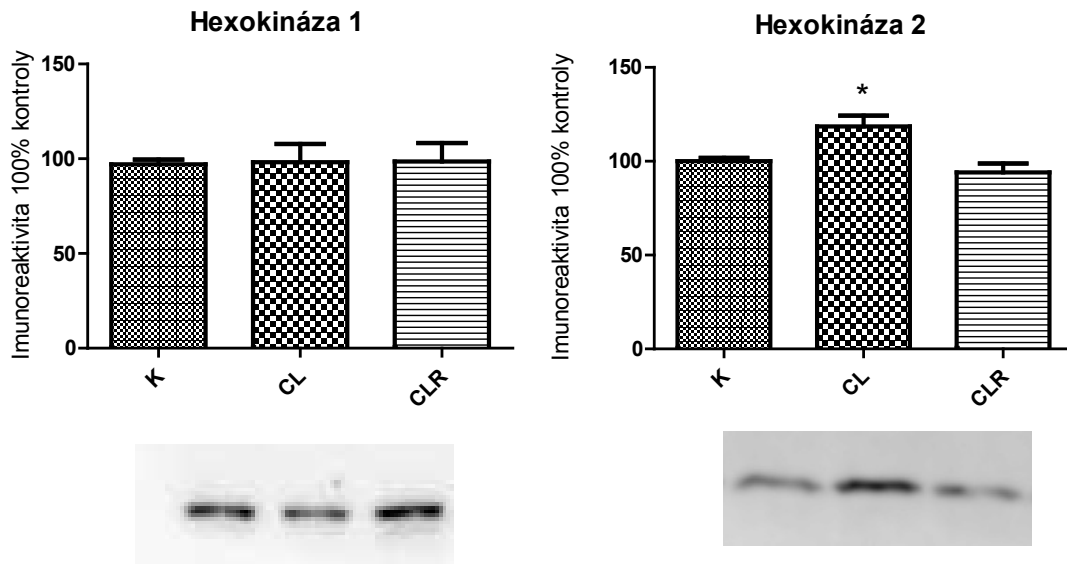
Zjistili jsme signifikantní nárůst exprese proteinu CKmt o 31 % (n=10) po 5-ti týdenní chladové adaptaci (Graf 1a), zatímco u zvířat regresní skupiny došlo k poklesu, který se od kontroly již nelišil. Exprese CKB se vlivem chladové adaptace u chladové skupiny nezměnila. U regresní skupiny signifikantně poklesla o 30 % (n=6). (Graf 1b). U izofomy CKM nedochází k žádným změnám (Graf 1c).



**Graf 1a, 1b, 1c:** Relativní hladiny proteinu izoforem CKmt, CKB a CKM vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ , n=6-10.

### 5.1.2. Kvantifikace hexokinázy

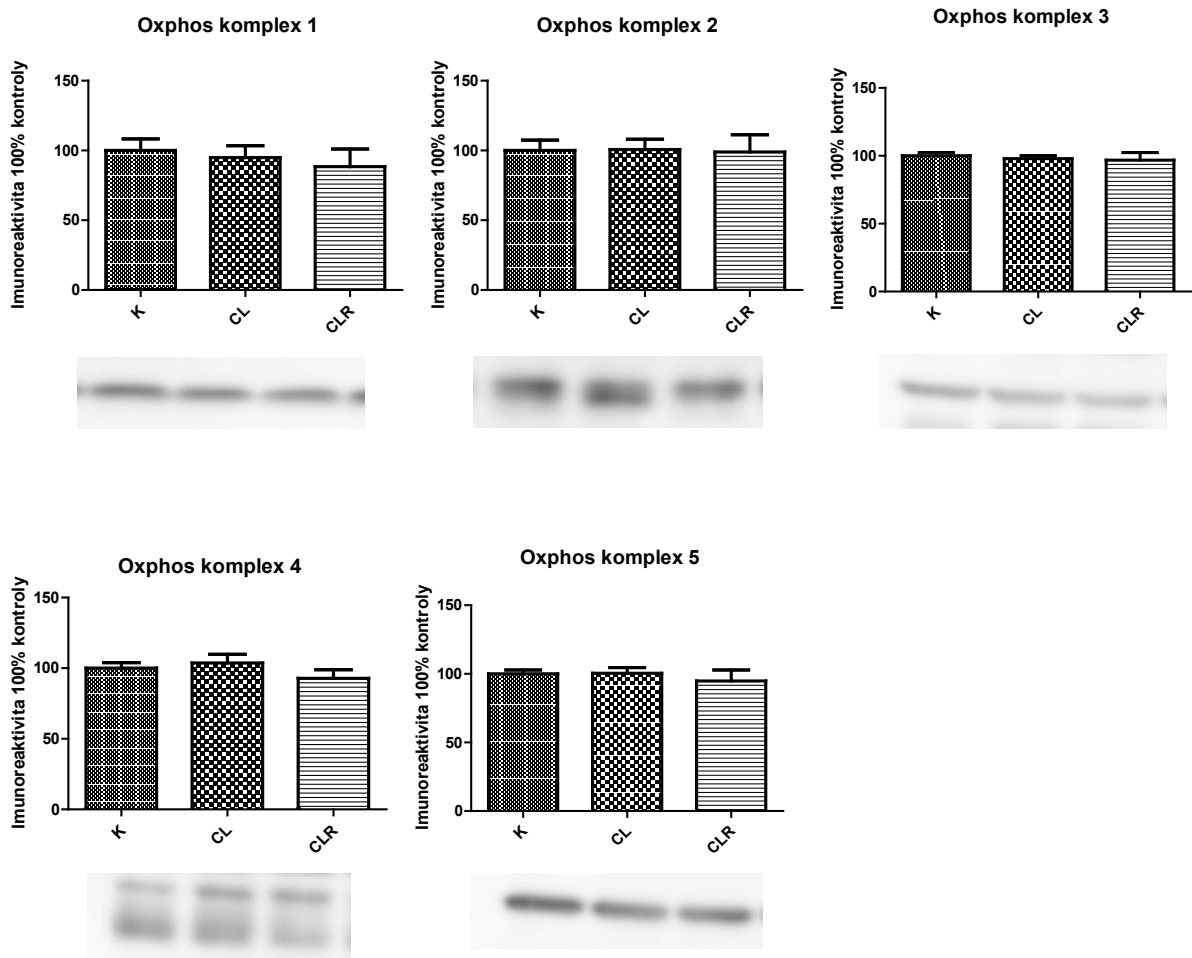
U naměřených hodnot exprese HK1 se neprojevil žádný rozdíl u chladové skupiny nebo regresní skupiny (Graf 2a). Z grafu pro HK2 můžeme z naměřených hodnot vyčíst signifikantní nárůst u chladové skupiny o 18 % (n=10). U regresní skupiny jsme zjistili mírný pokles o 5 % (n=6) oproti kontrole (Graf 2b).



**Graf 2a, 2b:** Relativní hladiny proteinu izoforem HK1 a HK2 vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$ .

### 5.1.3. Kvantifikace Oxphosu

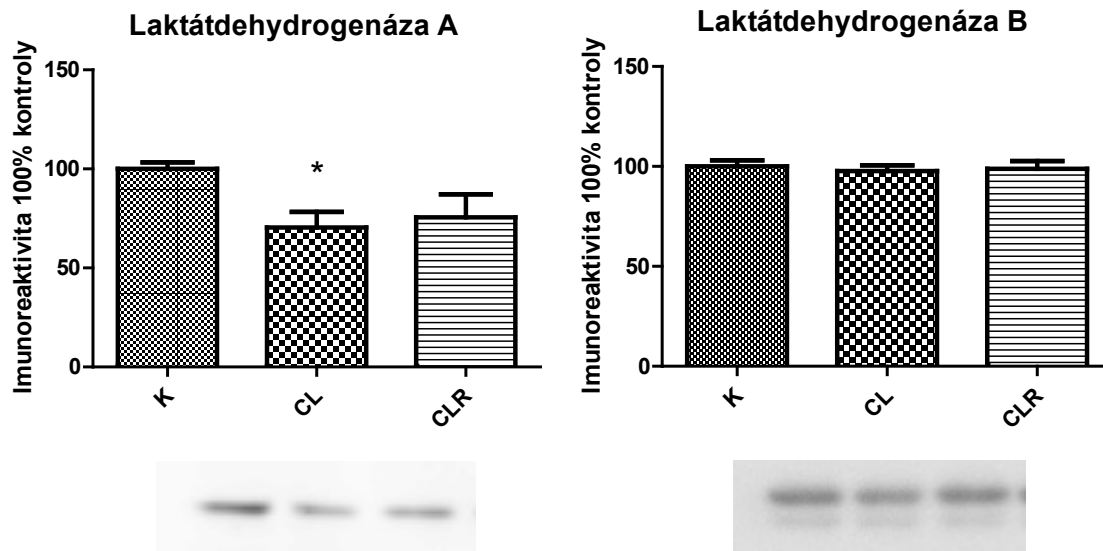
V reakci na zvyšující se hladinu HK2 u chladově adaptované skupiny byla změřena ještě exprese všech pěti komplexů oxidativní fosforylace. Zde z naměřených hodnot nepozorujeme žádný rozdíl mezi kontrolní, chladovou a regresní skupinou (Graf 3a, 3b, 3c, 3d, 3e).



**Graf 3a, 3b, 3c, 3d, 3e: Graf 1a, 1b, 1c:** Relativní hladiny proteinu Oxphos komplexů 1-5 vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$ .

#### 5.1.4. Kvantifikace laktátdehydrogenázy

U izoformy LDHA pozorujeme u chladové skupiny signifikantní pokles o 29 % (n=10). U regresní skupiny byl také zaznamenán pokles o 24 % (n=6) oproti kontrolám (Graf 4a). V případě izoformy LDHB nepozorujeme mezi skupinami žádné rozdíly (Graf 4b).



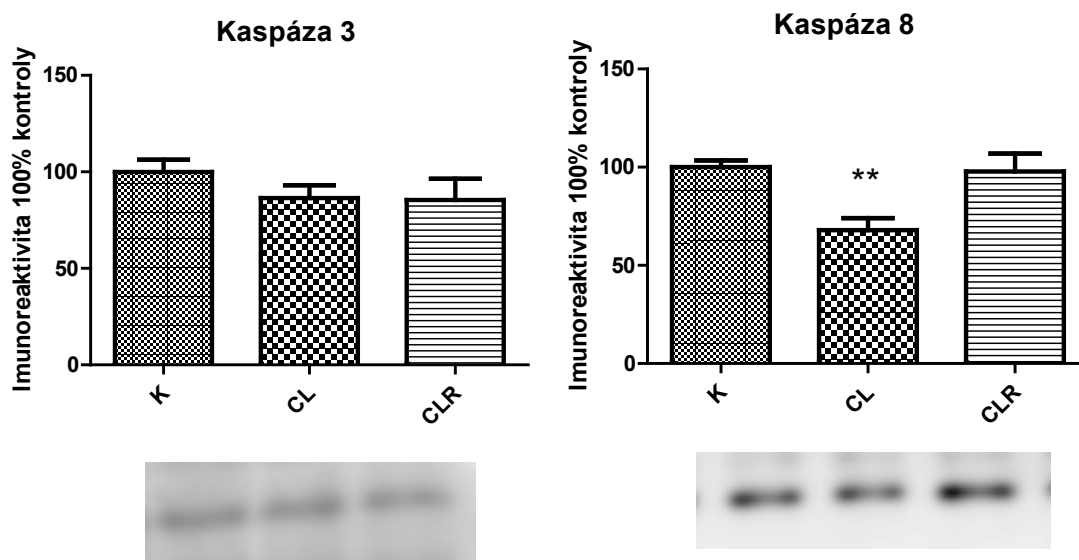
**Graf 4a, 4b:** Relativní hladiny proteinu izoform LDHA a LDHB vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$ .

## 5.2. Apoptotické markery

Druhým cílem této práce bylo zjistit množství pro-apoptotických a anti-apoptotických markerů a jejich vývoj v chladové, kontrolní a regresní skupině.

### 5.2.1. Kvantifikace kaspáz

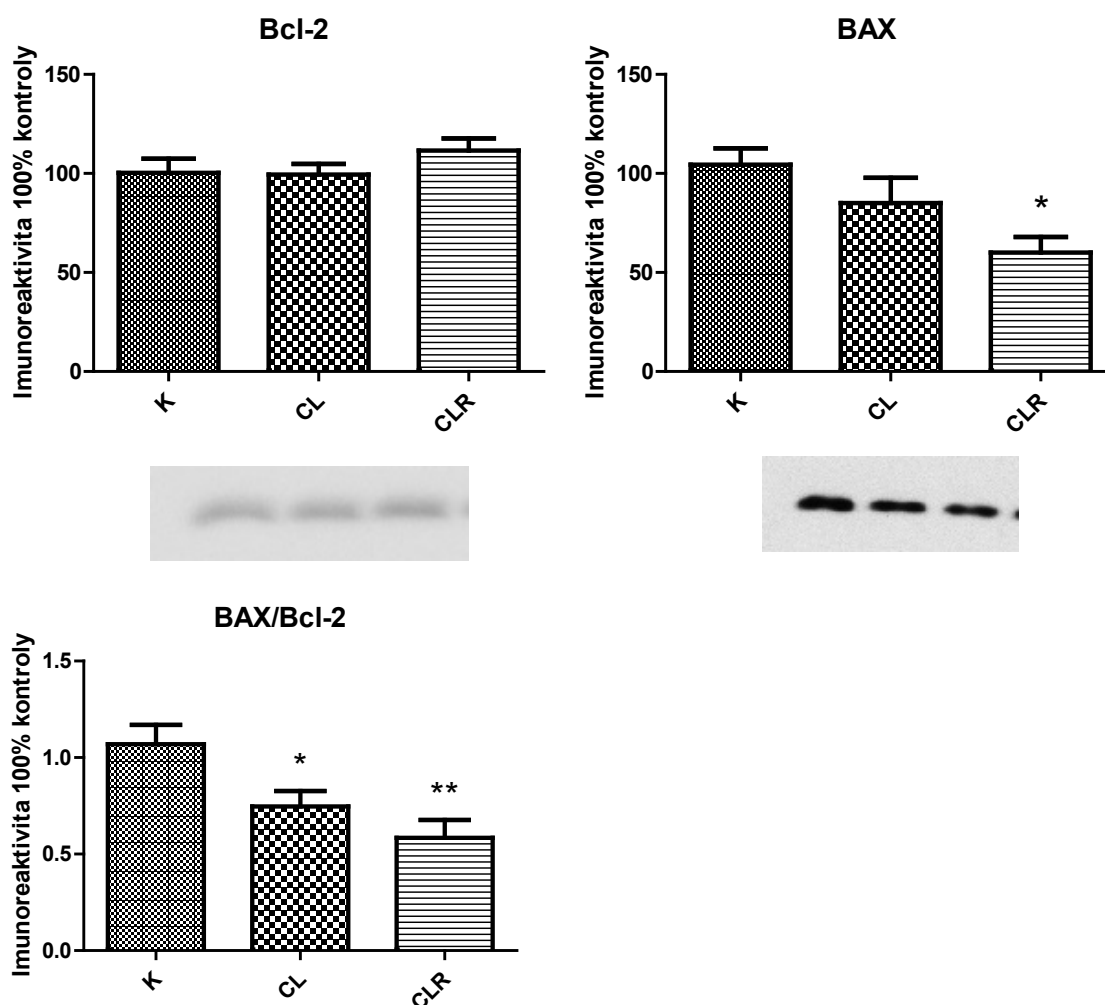
U CASP3 klesla hodnota exprese u chladové skupiny o 13 % (n=10) a u regresní o 14 % (n=6) (Graf 5a). U CASP8 jsme zaznamenali signifikantní pokles hodnot exprese u chladové skupiny o 32 % (n=10) a u regresní skupiny jsme nezaznamenali žádnou změnu (Graf 5b).



**Graf 5a, 5b:** Relativní hladiny proteinu CASP3 a CASP8 vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*\* $p < 0,01$ ,  $n = 6-10$ .

### 5.2.2. Kvantifikace členů rodiny Bcl-2

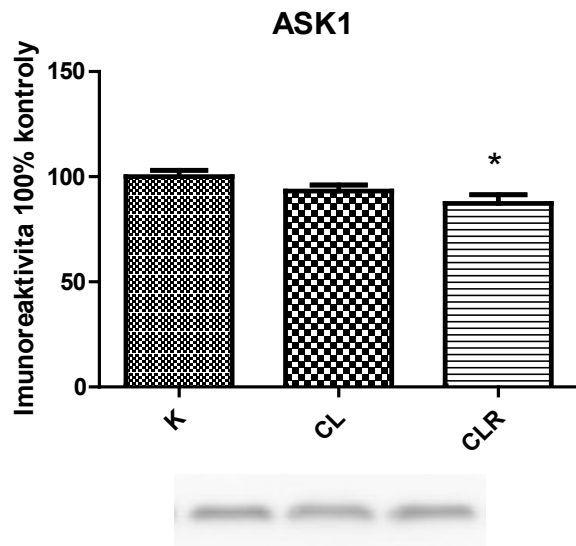
U antiapoptotického faktoru Bcl-2 jsme nezaznamenali prakticky žádné rozdíly mezi skupinami (Graf 6a). Naproti tomu u apoptotického faktoru BAX jsme zjistili pokles mezi kontrolní a chladovou skupinou o 15 % (n=10). Při porovnání kontrolní a regresní skupiny jsme zaznamenali signifikantní pokles až o 40 % (n=6) (Graf 6b). Při vynesení poměru BAX/Bcl-2 můžeme také sledovat signifikantní rozdíl mezi kontrolní a chladovou skupinou až o 30 % a mezi kontrolní a regresní skupinou až o 40 % (Graf 6c).



**Graf 6a, 6b, 6c:** Relativní hladiny proteinu faktorů Bcl-2 a BAX vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$ . Na grafu 6c je vyneseno poměru BAX/Bcl-2 vztažený na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;  $n = 6-10$ .

### 5.2.3. Kvantifikace ASK1

U ASK1 byl u chladové skupiny zjištěn pokles o 6 % (n=10). U regresní skupiny jsme zaznamenali signifikantní pokles o 12 % (n=6) v porovnání s kontrolou (Graf 7).



**Graf 7:** Relativní hladiny proteinu ASK1 vztažené na 100 % kontroly (K) u experimentálních skupin s 5-ti týdenní chladovou adaptací (CL) a následnou 2 týdenní regresí (CLR), \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$ .

## 6. Diskuze

Chladová adaptace je navozována opakovanými expozicemi chladu. V prvních fázích chladové adaptace dochází ke chladovému stresu, kdy organismus odpovídá zvýšenou adrenergní signalizací a kompenzuje tepelné ztráty svalovým třesem (Jánský et al., 1996). Následně dochází k plné adaptaci organismu, která je doprovázena tvorbou hnědé tukové tkáně u malých živočichů nebo tzv. hnědnutím růžového tuku („browning“) a následkem toho třesová termogeneze je nahrazena netřesovou termogenezí. Náhlý chladový stres se u člověka opakovaně prokázal jako detrimentální (Ronger D., 2012), naproti tomu můžeme poukázat na dlouhodobé zkušenosti s chladovou adaptací, která posiluje odolnost organismu (Vybíral et al., 2000b).

V literatuře nalezneme velké množství studií pracujících s chronickým chladem při teplotách 0-4°C, kdy byla zvířata bez podestýlky individuálně v klecích (Vybíral et al., 1985). Při těchto teplotách byl ovšem zjištěn negativní dopad na vylučovací soustavu a srážlivost krve (Fregly et al., 1989). U našeho modelu, kdy byly experimentální skupiny vystaveny 5-ti týdenní chladové adaptaci při teplotě 10°C s podestýlkou a v párech a s následnou 2 týdenní regresí při teplotě 25°C, nebyl zjištěn negativní dopad na krevní obraz a hmotnostní parametry srdce ani morfologii ledvin (Marvanová A., 2015). V mírnějších podmínkách také dochází k posílení endogenních protektivních mechanismů srdce a zvýšené odolnosti k ischemicko-reperfuznímu poškození. U diplomové práce Pavla Vebra (Vebr P., 2016), byl při pokusu s I/R poškozením potvrzen menší rozsah infarktem zasažené části tkáně u chladově adaptované skupiny oproti kontrolní skupině.

V této práci jsme sledovali expresi vybraných cílových proteinů HIF (CKB, HK2 a LDHA), jelikož zvýšení transkripční aktivity HIF bylo mnohokrát prokázáno jako protektivní (Rossignol et al., 2003; Semenza, 2003). Jedním z cílových genů HIF je LDH vyskytující se ve dvou izoformách. U izoformy LDHA, která katalyzuje především reakci ve směru tvorby laktátu (Cruz et al., 2012), byl u chladové skupiny pozorován signifikantní pokles o 30 % oproti kontrolní skupině. U regresní skupiny jsme zjistili pokles o 25 % v porovnání s kontrolní skupinou. Jelikož hladina laktátu v krvi odpovídá poměru mezi jeho tvorbou a odbouráváním, snížená exprese LDHA by tedy mohla přispět ke snížené tvorbě laktátu, což odpovídá práci, kde byly zjištěny klesající hodnoty hladiny laktátu u otužilců (Rossignol et al., 2003). Naproti tomu za podmínek hypoxie, je reakce přesně obrácená. V těchto pracích můžeme nalézt rostoucí hladiny exprese LDHA, což odpovídá faktu, že se



jedná o cílový gen HIF, který je v podmínkách hypoxie aktivován (Semenza, 2007). Přestože izoforma LDHB má v srdci větší zastoupení, nezaznamenali jsme zde prakticky žádný rozdíl. Z toho vyplývá, že i přesto, že LDHA má v srdci malé zastoupení, významně reaguje na podmínky chladové adaptace, a ovlivňuje tak metabolismus laktátu. Tento výsledek naznačuje vyšší míru oxidativního využití glukózy po adaptaci na chlad a dlouhodobé přetrvání této změny.

Dalším enzymem energetického metabolismu jsou izoformy kreatinkinázy. U CKB, jako u dalšího z řady cílových genů HIF, jsme zaznamenali pokles o 30 % až u regresní skupiny. U hodnot exprese CKM jsme změnu nezaznamenali a pravděpodobně není ovlivněna chladovou adaptací. Což je v souladu s ostatními pracemi, neboť exprese CKM je v srdci velmi stabilní (Fontanet HL., 1991). Pro porovnání při pokusech s I/R poškozením, dochází ke zvýšené expresi CKM a tedy ke zlepšení kinetiky ATP a mechanické funkce svalu (Akki et al., 2012). V případě mitochondriální izoformy CKmt jsme naměřili u chladové skupiny signifikantní nárůst až o 31 %, což je v přímém souladu s pozorovaným poklesem LDHA. V regresní skupině se hladina exprese CKmt vrátila na úroveň kontrolní skupiny. To koresponduje s výsledky z pokusu s chronickou hypoxií, kde byl také zaznamenán nárůst exprese CKmt (Waskova-Arnostova et al., 2014). To pravděpodobně tedy představuje kompenzační mechanismus zvyšující oxidativní metabolismus. Zvýšená hladina CKmt zvyšuje množství ADP pro komplex V respiračního řetězce, což pozitivně ovlivňuje mitochondriální membránový potenciál a snižuje tvorbu ROS (Saks V. A., 1991). Bylo ukázáno, že zvýšená aktivita CKmt snižuje pravděpodobnost otevření MPTP a pravděpodobnost aktivace apoptózy (Dolder M., 2001). Pokles hodnot exprese CK je také spojován se srdečním selháním, kde aktivita CK klesá (Fowler et al., 2015). Chladová adaptace tedy zachovává, případně zvyšuje hodnotu exprese CK, především CKmt, což podporuje případné zmírnění následků po srdečním selhání.

Dalším donorem ADP pro komplex V je izoforma HK1, která je v srdci lokalizována převážně na vnější mitochondriální membráně v asociaci s VDAC. V její expresi jsme žádné změny nezaznamenali. U izoformy HK2, která se nachází v cytosolu a za kritických podmínek translokuje na mitochondrie, jsme zaznamenali mírný nárůst o 18 % u chladové skupiny oproti kontrole. Nárůst exprese HK2 byl prokázán jako protektivní, neboť může zvyšovat vstup glukózy do kardiomyocytů a v součinnosti s transportéry GLUT (Abel ED., 2004), dochází ke zvýšené produkci G6P, jehož osud je v buňce velmi rozmanitý (Voet et

Voet, 2010). Některé dráhy jako aktivace pentozofosfátového cyklu a zvýšená syntéza hexosaminu, byly též prokázány jako kardioprotektivní. To koresponduje se zjištěním z pokusů s adaptací na hypoxii, kde také docházelo k nárůstu exprese HK2, způsobeného aktivací HIF, který umocnil transkripční aktivitu HK2 (Wasková-Arnoštová et al., 2014). Dále jsme stanovili exprese všech komplexů OXPHOS, kde jsme nepozorovali žádné rozdíly. Toto zjištění je v rozporu s výsledky diplomové práce E. Flégrové (Flégrová E., 2016), kde byla zjištěna snížená exprese komplexu I. na úrovni izolovaných mitochondrií, který se nejvíce podílí na tvorbě volných radikálů (Kussmaul and Hirst, 2006). Vzniklý rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišnými podmínkami chladové adaptace a jiným zpracováním tkáně. Téměř konstantní hladina exprese námi naměřených jednotlivých komplexů potvrzuje neměnné množství mitochondrií a stabilní mitochondriální biogenezi. Jelikož v srdci řídí dýchání právě dýchací řetězec, je neměnicí se hodnota komplexů pravděpodobně odrazem správné funkce mitochondrií i v podmínkách chladové adaptace (Rossignol et al., 2000).

Z výše uvedeného poklesu hladiny exprese LDHA a CKB vyplývá, že patrně nedochází k aktivaci HIF vlivem chladové adaptace, což je v souladu s údaji práce Marvanové (Marvanová A., 2015), která zjistila snížené hodnoty exprese NRF2, který je transkripčním faktorem pro antioxidanty. Současně se v její práci neměnily hodnoty mRNA HIF. Relativní hodnota mRNA HK2 v práci Marvanové mírně poklesla v regresní skupině, což ukazuje na odlišnou posttranslační regulaci proteinu. Chladová adaptace tedy vede k využití glukózy především oxidativní cestou, což by pravděpodobně mohlo korespondovat se sníženou produkcí ROS, která vede ke ztrátě redoxně závislých transkripčních faktorů.

V souvislosti s předchozím zjištěním jsme se ve druhé části práce zabývali problematikou, do jaké míry má chladová adaptace vliv na apoptotické děje v srdeční tkáni. Z toho důvodu jsme zjišťovali exprese kaspáz a dalších faktorů účastnících se apoptotických procesů.

Jedním z klíčových faktorů zahrnutých v mechanismu apoptózy je rodina cysteinových proteáz. Ať už je apoptóza aktivovaná vnější nebo vnitřní cestou, každopádně dochází k aktivaci výkonné CASP3, případně CASP7 (Grütter, 2000). Zjistili jsme tendenci k poklesu u exprese CASP3 přibližně o 13 % u chladové i regresní skupiny. U CASP8 jsme pozorovali signifikantní pokles o 32 % u chladové skupiny a následný návrat k hodnotám odpovídajícím kontrole u regresní skupiny. V porovnání s použitím I/R poškození na srdeční

tkáň můžeme u CASP8 pozorovat opačný trend. Ta v případě I/R poškození je totiž během ischemie neměnná a její hladina exprese roste až v reperfuzi (Scarabelli et al., 2002). To podporuje naši domněnku, že chladová adaptace mimo jiné snižuje pro-apoptotické markery a její indukce má na srdce protektivní vliv.

Stejně tak můžeme pozorovat pokles hodnot u pro-apoptotického faktoru BAX u chladové skupiny o 15 % a s výraznějším signifikantním poklesem až o 40 % po 2 týdenní regresi. Stejný trend můžeme nalézt i v pokusech s I/R poškozením, kde dochází k poklesu exprese BAX a snížení následků I/R poškození (Dong et al., 2003). Naopak rozdílný trend ve změnách hladiny hodnot nalezneme při srovnání s pokusy, využívající chronickou hypoxii. V těchto pokusech můžeme pozorovat zvýšenou hladinu exprese genu pro BAX u chronicky adaptované skupiny v kontrastu s kontrolní (Aliparasti et al., 2015). Hladina anti-apoptotického faktoru Bcl-2 zůstala u chladové skupiny nezměněna. Mírný nárůst o 12 % můžeme pozorovat až u regresní skupiny, což koresponduje s prací Zhang a spol. (Zhang et al., 2015). Snížení pro-apoptotických genů aktivovaných oxidativním stresem potvrzuje sníženou produkci ROS a ukazuje na pozitivní vliv chladové adaptace. Další klíčový ukazatel procesů směřujících k apoptóze je poměr pro- a anti-apoptotických faktorů BAX/Bcl-2. Ten v našem provedeném pokusu taktéž vykazoval klesající tendenci. To tedy také podporuje naše tvrzení, že adaptace na chlad po 5-ti týdnech snižuje pravděpodobnost apoptózy. A tato adaptace přetrvává ještě následující dva týdny.

Dalším z pro-apoptických faktorů je ASK1, která může být v apoptotických procesech aktivována skrze velké množství podnětů (Hayakawa et al., 2006). U chladové skupiny jsme zjistili pokles o 6 % ve srovnání s kontrolní skupinou. U regresní byl detekován signifikantní pokles o 12 %. To opět značí kardioprotektivní účinek a snížení rizika apoptózy. To souhlasí i s pokusy s ischemií, kde byla detekována její zvýšená aktivita (Watanabe et al., 2005).

Podle dostupných studií dochází při akutním vystavení chladu u savců ke změnám v metabolické rychlosti, disbalanci antioxidantního systému, zvýšení oxidativního stresu a ROS (Kaushik and Kaur, 2003). K tomu si organismy vyvinuly množství obranných a adaptačních strategií (Marinho et al., 2016). V kontrastu s aplikací chronické chladové adaptace získáváme dle dostupných studií odlišné výsledky. V pokusu s použitím akutní a chronické chladové adaptace ( $12^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) na skupiny kuřat byl zjištěn signifikantní pokles celkové antioxidantní kapacity u akutního chladu. Avšak u chronicky chladově adaptované

skupiny celková antioxidační kapacita roste (Zhao et al., 2014). Při pokusech s otužilci byla zjištěna zvýšená koncentrace antioxidačních markerů v krvi. Při pokusu s potkany dlouhodobě adaptovanými na chlad byl také zjištěn nárůst antioxidantů jako superoxid dismutáza nebo glutathion peroxidáza. Naopak při akutnímu vystavení chladu byl detekován mírný pokles superoxid dismutázy a signifikantní pokles glutathion peroxidázy (Ohno et al., 1991). Podle práce Marvanové ovšem u chronicky adaptované skupiny nedocházelo ke změnám hodnot naměřených mRNA (Marvanová A., 2015). Podle dostupných zjištění by tedy v chladové adaptaci pravděpodobně mohl oxidativní stres klesat.

Ze získaných poznatků tedy vyplývá, že vlivem dlouhodobé chladové adaptace dochází k posílení oxidativního metabolismu glukózy, aniž by došlo ke zvýšené biogenezi mitochondrií. Současně můžeme pozorovat snížení exprese vybraných pro-apoptotických faktorů, což potvrzuje protektivní vliv chladové adaptace na srdeční tkáň. Do budoucna budeme pokračovat v ověřování vlivu HIF a aktivaci dalších transkripčních faktorů v modelu chladové adaptace s mírnějšími podmínkami.

## 7. Závěr

Chladová adaptace a její vliv na organismus mají nezastupitelné místo na poli vědeckého výzkumu. Na toto téma bylo vypracovaných mnoho prací lišících se především podmínkami chladové adaptace. My jsme v tomto pokusu využili adaptaci s mírnějšími podmínkami ( $10\pm 1^\circ\text{C}$ ), vycházející z práce Marvanové, kde nebylo zjištěno poškození experimentálních zvířat. Za těchto podmínek bylo také zjištěno posílení endogenních mechanismů srdce.

V první části našeho výzkumu jsme zjišťovali hodnoty exprese vybraných cílových genů HIF. U hodnot CKB a LDHA jsme zaznamenali výrazný pokles oproti kontrolním skupinám, což potvrzuje náš předpoklad, že v chladové adaptaci nedochází k aktivaci HIF. Výsledek také naznačuje především oxidativní využití glukózy. U izoformy CKmt jsme naopak zaznamenali nárůst hodnot, z čehož můžeme usuzovat, že buňka má dostatek ADP pro dýchací řetězec, který tedy není chladovou adaptací ovlivněn. Naopak zvýšené hladiny CKmt ukazují nižší pravděpodobnost otevření MPTP, což značí snížené riziko indukce apoptózy. I u izoformy HK2 jsme zaznamenali signifikantní nárůst hodnot, který pravděpodobně působí protektivně, neboť zvyšuje vstup glukózy do buněk. Následně při přeměření exprese všech komplexů dýchacího řetězce nebyly zjištěny žádné rozdíly, z čehož můžeme usuzovat, že se nemění množství mitochondrií v buňkách a jejich biogeneze.

V druhé části jsme poté měřili hodnoty proteinové exprese pro-apoptotických a anti-apoptotických faktorů, jelikož jsme předpokládali protektivní vliv chladové adaptace na srdeční tkáň a tedy snížení aktivace apoptotických drah. Tento předpoklad se nám potvrdil, neboť z naměřených hodnot můžeme u pro-apoptotických faktorů (CASP3, CASP8, BAX a ASK1) pozorovat pokles u chladově adaptované skupiny. Stejně tak poměr BAX/Bcl-2, který je hlavním indikátorem spuštění apoptózy, také klesal. Naopak anti-apoptotický faktor Bcl-2 nezaznamenal žádné rozdíly mezi skupiny.

Závěrem můžeme říct, že chladová adaptace s mírnějšími podmínkami nesouvisí s aktivací HIF, ale zároveň pozitivně ovlivňuje aktivaci apoptózy, snížením aktivity pro-apoptotických faktorů. Do budoucna si kardioprotektivní mechanismy vznikající působením chladu rozhodně zaslouží naši pozornost a další studium.

## 8. Literatura

- Abel ED., 2004. Glucose transport in the heart. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766360> (accessed 8.12.17).
- Akki, A., Su, J., Yano, T., Gupta, A., Wang, Y., Leppo, M.K., Chacko, V.P., Steenbergen, C., Weiss, R.G., 2012. Creatine kinase overexpression improves ATP kinetics and contractile function in postischemic myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H844-852. doi:10.1152/ajpheart.00268.2012
- Aliparasti, M.R., Alipour, M.R., Almasi, S., Feizi, H., 2015. Ghrelin Administration Increases the Bax/Bcl-2 Gene Expression Ratio in the Heart of Chronic Hypoxic Rats. *Adv. Pharm. Bull.* 5, 195–199. doi:10.15171/apb.2015.027
- Anflous, K., Veksler, V., Mateo, P., Samson, F., Saks, V., Ventura-Clapier, R., 1997. Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action. *Biochem. J.* 322, 73–78.
- Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., Shoshan-Barmatz, V., 2004. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* 377, 347–355. doi:10.1042/BJ20031465
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., Korsmeyer, S.J., 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899–906.
- Bertin, M., Pomponi, S.M., Kokuhuta, C., Iwasaki, N., Suzuki, T., Ellington, W.R., 2007. Origin of the genes for the isoforms of creatine kinase. *Gene* 392, 273–282. doi:10.1016/j.gene.2007.01.007
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., Irimie, A., 2009. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.* 48, 811–821. doi:10.1080/02841860902974175
- Buskin, J., Hauschka, S., 1989. Identification of a Myocyte Nuclear Factor That Binds to the Muscle-Specific Enhancer of the Mouse Muscle Creatine-Kinase Gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2627–2640.
- Cadena, V., Tattersall, G.J., 2014. Body temperature regulation during acclimation to cold and hypoxia in rats. *J. Therm. Biol.* 46, 56–64. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.10.007
- Cahn, R.D., Zwilling, E., Kaplan, N.O., Levine, L., 1962. Nature and Development of Lactic Dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science* 136, 962–969. doi:10.1126/science.136.3520.962
- Cai, J., Meng, X., Wang, C., Chen, R., Zhou, J., Xu, X., Ha, S., Zhao, Z., Kan, H., 2016. The cold effects on circulatory inflammation, thrombosis and vasoconstriction in type 2 diabetic patients. *Sci. Total Environ.* 568, 271–277. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.030
- Cai, Z., Luo, W., Zhan, H., Semenza, G.L., 2013. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17462–17467. doi:10.1073/pnas.1317158110
- Cai, Z., Zhong, H., Bosch-Marce, M., Fox-Talbot, K., Wang, L., Wei, C., Trush, M.A., Semenza, G.L., 2008. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 $\alpha$ . *Cardiovasc. Res.* 77, 463–470. doi:10.1093/cvr/cvm035
- Calmettes, G., Ribalet, B., John, S., Korge, P., Ping, P., Weiss, J.N., 2015. Hexokinases and cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 107–115. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.020
- Carroll and Ashcroft, 2006. HIF-1 regulation, [WWW Document]. URL [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_06/S1462399405009117sup007.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_06/S1462399405009117sup007.htm) (accessed 7.15.17).
- Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., Juin, P., 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.028

- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Ness, K.V., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, Druck, T., Cannizzaro, L.A., Et, A., 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97–100. doi:10.1126/science.1373520
- Chipuk, J.E., Green, D.R., 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 994–1002. doi:10.1038/sj.cdd.4401908
- Chipuk, J.E., Green, D.R., 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 268–275. doi:10.1038/nrm1573
- Cho, K.J., Lee, B.I., Cheon, S.Y., Kim, H.W., Kim, H.J., Kim, G.W., 2009. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces endoplasmic reticulum stress and nuclear huntingtin fragments in a mouse model of Huntington disease. *Neuroscience* 163, 1128–1134. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.048
- Choi, J.-R., Heo, H., Lang, Y., Shin, K.S., Kang, S.J., 2009. Apoptosis signal-regulating kinase 1 regulates the expression of caspase-11. *FEBS Lett.* 583, 3016–3020. doi:10.1016/j.febslet.2009.08.014
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1–16. doi:10.1042/bj3260001
- Coonrod, S., Vitale, A., Duan, C., Bristol-Gould, S., Herr, J., Goldberg, E., 2006. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Androl.* 27, 502–509. doi:10.2164/jandrol.05185
- Cruz, R.S. de O., de Aguiar, R.A., Turnes, T., Penteado Dos Santos, R., de Oliveira, M.F.M., Caputo, F., 2012. Intracellular shuttle: the lactate aerobic metabolism. *ScientificWorldJournal* 2012, 420984. doi:10.1100/2012/420984
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell Death. *Cell* 116, 205–219. doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7
- Dolder M., 2001. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sens... - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223643> (accessed 8.12.17).
- Dong, J.W., Zhu, H.F., Zhu, W.Z., Ding, H.L., Ma, T.M., Zhou, Z.N., 2003. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 13, 385–391. doi:10.1038/sj.cr.7290184
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., Tschachler, E., 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 25, 831–841. doi:10.1093/molbev/msn012
- Eckle, T., Köhler, D., Lehmann, R., Kasmi, K.C.E., Eltzschig, H.K., 2008. Hypoxia-Inducible Factor-1 Is Central to Cardioprotection. *Circulation* 118, 166–175. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758516
- Everse, J., Kaplan, N.O., 1973. Lactate dehydrogenases: structure and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 37, 61–133.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012. Role of Apoptosis in disease. *Aging* 4, 330–349.
- Feltham, R., Vince, J.E., Lawlor, K.E., 2017. Caspase-8: not so silently deadly. *Clin. Transl. Immunol.* 6, e124. doi:10.1038/cti.2016.83
- Fontanet HL., 1991. Regulation of expression of M, B, and mitochondrial creatine kinase mRNAs in the left ventricle after pressure overload in rats. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2009604> (accessed 8.12.17).
- Fowler, E.D., Benoist, D., Drinkhill, M.J., Stones, R., Helmes, M., Wüst, R.C.I., Stienen, G.J.M., Steele, D.S., White, E., 2015. Decreased creatine kinase is linked to diastolic dysfunction in rats with right heart failure induced by pulmonary artery hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 86, 1–8. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.06.016
- Fregly, M.J., Kikta, D.C., Threatte, R.M., Torres, J.L., Barney, C.C., 1989. Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 66, 741–749.

- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201–232. doi:10.1042/BJ20041142
- Furuhata, M., Takada, E., Noguchi, T., Ichijo, H., Mizuguchi, J., 2009. Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1 mediates apoptosis through activation of JNK1 following engagement of membrane immunoglobulin. *Exp. Cell Res.* 315, 3467–3476. doi:10.1016/j.yexcr.2009.09.007
- Ghavami et al., 2009, n.d. Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes (PDF Download Available) [WWW Document]. ResearchGate. URL [https://www.researchgate.net/publication/26275602\\_Apoptosis\\_and\\_cancer\\_Mutations\\_within\\_caspase\\_genes](https://www.researchgate.net/publication/26275602_Apoptosis_and_cancer_Mutations_within_caspase_genes) (accessed 7.28.17).
- Glover, L.E., Bowers, B.E., Saeedi, B., Ehrentraut, S.F., Campbell, E.L., Bayless, A.J., Dobrinskikh, E., Kendrick, A.A., Kelly, C.J., Burgess, A., Miller, L., Kominsky, D.J., Jedlicka, P., Colgan, S.P., 2013. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19820–19825. doi:10.1073/pnas.1302840110
- Green, D.R., 2005. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell* 121, 671–674. doi:10.1016/j.cell.2005.05.019
- Grütter, M.G., 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 649–655.
- Guo, Y., Lin, D., Zhang, M., Zhang, X., Li, Y., Yang, R., Lu, Y., Jin, X., Yang, M., Wang, M., Zhao, S., Quan, C., 2016. CLDN6-induced apoptosis via regulating ASK1-p38/JNK signaling in breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 48, 2435–2444.
- Hao, Z., Duncan, G.S., Chang, C.-C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W.-C., Ohashi, P., Wang, X., Mak, T.W., 2005. Specific Ablation of the Apoptotic Functions of Cytochrome c Reveals a Differential Requirement for Cytochrome c and Apaf-1 in Apoptosis. *Cell* 121, 579–591. doi:10.1016/j.cell.2005.03.016
- Hart, J.S., Heroux, O., Depocas, F., 1956. Cold Acclimation and the Electromyogram of Unanesthetized Rats. *J. Appl. Physiol.* 9, 404–408.
- Hashimoto, T., Brooks, G.A., 2008. Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 486–494. doi:10.1249/MSS.0b013e31815fcb04
- Hashimoto, T., Hussien, R., Brooks, G.A., 2006. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E1237-1244. doi:10.1152/ajpendo.00594.2005
- Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K., Ichijo, H., 2012. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 434–453.
- Hayakawa, T., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H., 2006. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect.* 8, 1098–1107. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.001
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776. doi:10.1038/35037710
- Hexokinase - Worthington Enzyme Manual [WWW Document], n.d. URL <http://www.worthington-biochem.com/hk/> (accessed 8.5.17).
- Himms-Hagen, J., 1990. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 4, 2890–2898.
- Jacobs, H., Heldt, H.W., Klingenberg, M., 1964. High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 516–521. doi:10.1016/0006-291X(64)90185-8
- Jansky, L., Pospisilova, D., Honzova, S., Ulicny, B., Sramek, P., Zeman, V., Kaminkova, J., 1996. Immune system of cold-exposed and cold adapted humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72, 445–450. doi:10.1007/BF00242274



- Janský, L., Vybíral, S., Trubačová, M., Okrouhlík, J., 2007. Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104, 131–135. doi:10.1007/s00421-007-0627-0
- Kaelin, W.G., 2002. How oxygen makes its presence felt. *Genes Dev.* 16, 1441–1445. doi:10.1101/gad.1003602
- Kaluz, S., Kaluzová, M., Stanbridge, E.J., 2008. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 395, 6–13. doi:10.1016/j.cca.2008.05.002
- Katzen, H.M., Schimke, R.T., 1965. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1218–1225.
- Kaushik, S., Kaur, J., 2003. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 333, 69–77.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., Cheng, E.H.-Y., 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 8, 1348–1358. doi:10.1038/ncb1499
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.
- Kralova Lesna, I., Rychlikova, J., Vavrova, L., Vybiral, S., 2015. Could human cold adaptation decrease the risk of cardiovascular disease? *J. Therm. Biol.* 52, 192–198. doi:10.1016/j.jtherbio.2015.07.007
- Kropp, E.S., Wilson, J.E., 1970. Hexokinase binding sites on mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 74–79. doi:10.1016/0006-291X(70)91085-5
- Kussmaul, L., Hirst, J., 2006. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7607–7612. doi:10.1073/pnas.0510977103
- Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823–831. doi:10.1016/0092-8674(89)90935-5
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J., 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192.
- Li, H., Ko, H.P., Whitlock, J.P., 1996. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J. Biol. Chem.* 271, 21262–21267.
- Li, S.S.-L., 1989. Lactate dehydrogenase isoenzymes A (muscle), B (heart) and C (testis) of mammals and the genes coding for these enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 304–307. doi:10.1042/bst0170304
- Lisy, K., Peet, D.J., 2008. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* 15, 642–649. doi:10.1038/sj.cdd.4402315
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F., Strasser, A., 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 411–417.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Marinho, R.A., Beserra, E.B., Bezerra-Gusmão, M.A., Porto, V. de S., Olinda, R.A., Dos Santos, C.A.C., 2016. Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti*

- (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraiba, Brazil. *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* 41, 1–10. doi:10.1111/jvec.12187
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., Ichijo, H., 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* 6, 587–592. doi:10.1038/ni1200
- Mavri, A., Guzic-Salobir, B., Salobir-Pajnic, B., Keber, I., Stare, J., Stegnar, M., 2001. Seasonal variation of some metabolic and haemostatic risk factors in subjects with and without coronary artery disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 12, 359–365.
- Menkes, M.S., Matthews, K.A., Krantz, D.S., Lundberg, U., Mead, L.A., Qaqish, B., Liang, K.Y., Thomas, C.B., Pearson, T.A., 1989. Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* 14, 524–530. doi:10.1161/01.HYP.14.5.524
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., Fesik, S.W., 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335–341. doi:10.1038/381335a0
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by Death Factor. *Cell* 88, 355–365. doi:10.1016/S0092-8674(00)81874-7
- Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
- Nelson, B.D., Kabir, F., 1986. The role of the mitochondrial outer membrane in energy metabolism of tumor cells. *Biochimie* 68, 407–415.
- Neubauer, S., 1998. Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. *Basic Res. Cardiol.* 93, s102–s107. doi:10.1007/s003950050231
- Nguyen, L.K., Cavadas, M.A.S., Scholz, C.C., Fitzpatrick, S.F., Bruning, U., Cummins, E.P., Tambuwala, M.M., Manresa, M.C., Kholodenko, B.N., Taylor, C.T., Cheong, A., 2013. A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) network. *J Cell Sci* 126, 1454–1463. doi:10.1242/jcs.119974
- Ohno, H., Kondo, T., Fujiwara, Y., Tagami, S., Kuroshima, A., Kawakami, Y., 1991. Effects of cold stress on glutathione and related enzymes in rat erythrocytes. *Int. J. Biometeorol.* 35, 111–113.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619.
- Ong, S.-G., Hausenloy, D.J., 2012. Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol. Ther.* 136, 69–81. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.005
- Ong, S.-G., Lee, W.H., Theodorou, L., Kodo, K., Lim, S.Y., Shukla, D.H., Briston, T., Kiriakidis, S., Ashcroft, M., Davidson, S.M., Maxwell, P.H., Yellon, D.M., Hausenloy, D.J., 2014. HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Res.* 104, 24–36. doi:10.1093/cvr/cvu172
- Pastorino, J.G., Hoek, J.B., 2003. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr. Med. Chem.* 10, 1535–1551.
- Pinho, C.A., Tromm, C.B., Tavares, A.M.V., Silva, L.A., Silveira, P.C.L., Souza, C.T., Benetti, M., Pinho, R.A., 2012. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci.* 90, 553–559. doi:10.1016/j.lfs.2012.01.018
- Porporato, P.E., Dadhich, R.K., Dhup, S., Copetti, T., Sonveaux, P., 2011. Anticancer Targets in the Glycolytic Metabolism of Tumors: A Comprehensive Review. *Front. Pharmacol.* 2. doi:10.3389/fphar.2011.00049
- Porter et al., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Publ. Online* 28 January 1999 Doi101038sjcdd4400476 6. doi:10.1038/sj.cdd.4400476
- Rankin, E., Giaccia, A., 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678–685. doi:10.1038/cdd.2008.21
- Robey, R.B., Hay, N., 2006. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25, 4683–4696. doi:10.1038/sj.onc.1209595

- Ronger D., 2012. Changes in extreme cold tolerance, membrane composition and cardiac transcriptome during the first day of thermal acclimation in the porcelain crab... - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573761> (accessed 8.12.17).
- Rossignol, F., Solares, M., Balanza, E., Coudert, J., Clottes, E., 2003. Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. *J. Cell. Biochem.* 89, 67–79. doi:10.1002/jcb.10484
- Rossignol, R., Letellier, T., Malgat, M., Rocher, C., Mazat, J.P., 2000. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 45–53.
- Roy, S., Nicholson, D.W., 2000. Cross-Talk in Cell Death Signaling. *J. Exp. Med.* 192, f21–f26.
- Saks, V.A., 1991. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065083> (accessed 8.12.17).
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1997. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell* 91, 443–446. doi:10.1016/S0092-8674(00)80430-4
- Salvesen, G.S., Walsh, C.M., 2014. Functions of Caspase 8: the Identified and the Mysterious. *Semin. Immunol.* 26, 246–252. doi:10.1016/j.smim.2014.03.005
- Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., Ichijo, H., Hashimoto, K., 2001. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 999–1004. doi:10.1074/jbc.M003425200
- Scarabelli, T.M., Stephanou, A., Pasini, E., Comini, L., Raddino, R., Knight, R.A., Latchman, D.S., 2002. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 90, 745–748.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T., 2006. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 164–180. doi:10.1016/j.bbadis.2005.09.004
- Semenza, G.L., 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007, cm8. doi:10.1126/stke.4072007cm8
- Semenza, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732. doi:10.1038/nrc1187
- Semenza, G.L., 2001. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1–3.
- Semenza, G.L., 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983–1991. doi:10.1101/gad.14.16.1983
- Semenza, G.L., Shimoda, L.A., Prabhakar, N.R., 2006. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found. Symp.* 272, 2-8-14, 33–36.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S., 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22, 526–539. doi:10.1038/cdd.2014.216
- Šimečková, M., Janský, L., Lesná, I., Vybíral, S., Šrámek, P., 2000. Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *J. Therm. Biol.* 25, 437–442. doi:10.1016/S0306-4565(00)00007-3
- Snigdha, S., Smith, E., Prieto, G., Cotman, C., 2012. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci. Bull.* 28. doi:10.1007/s12264-012-1057-5
- Soboll, S., Conrad, A., Eistert, A., Herick, K., Krämer, R., 1997. Uptake of creatine phosphate into heart mitochondria: a leak in the creatine shuttle. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 27–33.
- Spriet, L.L., Howlett, R.A., Heigenhauser, G.J., 2000. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 756–763.
- Su, J.H., Zhao, M., Anderson, A.J., Srinivasan, A., Cotman, C.W., 2001. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res.* 898, 350–357. doi:10.1016/S0006-8993(01)02018-2

- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G., 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184, 1331–1341.
- Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Takada, E., Hata, K., Mizuguchi, J., 2006. Requirement for JNK-dependent upregulation of BimL in anti-IgM-induced apoptosis in murine B lymphoma cell lines WEHI-231 and CH31. *Exp. Cell Res.* 312, 3728–3738. doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.036
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: Enemies Within. *Science* 281, 1312–1316. doi:10.1126/science.281.5381.1312
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D., 1998. Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally. *Immunity* 9, 267–276. doi:10.1016/S1074-7613(00)80609-3
- Voháňka, S., 2012. Zvýšená hladina kreatinkinázy. *Interní Medicína Praxi* 14, 322–326.
- Vybíral, S., Andrews, J.F., Bostík, J., Langer, P., Janský, L., 1985. Thyroid hormones in rats during long-term cold exposure and hypometabolic effect of reverse triiodothyronine on adrenaline induced thermogenesis. *Endocrinol. Exp.* 19, 179–185.
- Vybíral, S., Lesná, I., Jansky, L., Zeman, V., 2000a. Thermoregulation in Winter Swimmers and Physiological Significance of Human Catecholamine Thermogenesis. *Exp. Physiol.* 85, 321–326. doi:10.1111/j.1469-445X.2000.01909.x
- Vybíral, S., Lesná, I., Jansky, L., Zeman, V., 2000. Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human catecholamine thermogenesis. *Exp. Physiol.* 85, 321–326. doi:10.1017/S0958067000019096
- Vybíral, S., Lesná, I., Jansky, L., Zeman, V., 2000b. Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human catecholamine thermogenesis. *Exp. Physiol.* 85, 321–326.
- Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U., 2011. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40, 1271–1296. doi:10.1007/s00726-011-0877-3
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H.M., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281, 21.
- Waskova-Arnostova, P., Kasparova, D., Elsnicova, B., Novotny, J., Neckar, J., Kolar, F., Zurmanova, J., 2014. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 33, 310–320. doi:10.1159/000356671
- Watanabe, T., Otsu, K., Takeda, T., Yamaguchi, O., Hikoso, S., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Taniike, M., Nakai, A., Matsumura, Y., Nishida, K., Ichijo, H., Hori, M., 2005. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 562–567. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.151
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730. doi:10.1126/science.1059108
- Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., Kitsis, R.N., 2010. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 19–44. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163111
- Wilson, J.E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049–2057.
- Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T.R., Powis, G., 2008. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* 33, 526–534. doi:10.1016/j.tibs.2008.08.002

- Yip, K.W., Reed, J.C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398–6406. doi:10.1038/onc.2008.307
- Young, 2002, n.d. Writing: The Synthesis and Mechanism of Creatine in Human Muscle Tissue // Shawn Young [WWW Document]. URL <http://shawnyoung.com/writing/synthesis-and-mechanism-of-creatine-in-human-muscle-tissue.php> (accessed 8.5.17).
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R., 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641–652.
- Zhang, H.-T., Xue, J.-H., Zhang, Z.-W., Kong, H.-B., Liu, A.-J., Li, S.-C., Xu, D.-G., 2015. Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res.* 1622, 474–483. doi:10.1016/j.brainres.2015.07.004
- Zhao, F.Q., Zhang, Z.W., Qu, J.P., Yao, H.D., Li, M., Li, S., Xu, S.W., 2014. Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. *Cell Stress Chaperones* 19, 635–648. doi:10.1007/s12192-013-0489-9

## **9. Internetové zdroje**

<https://blogs.biochem.ncsu.edu/the-bcl-2-family-of-proteins-a-life-or-death-situation/>

<http://www.genecards.org>

<http://www.worthington-biochem.com/hk/>

[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_06/S1462399405009117sup007.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_06/S1462399405009117sup007.htm)

## 10. Přílohy:

### 1A Příprava vzorků

vzorek	2 týdny regrese		chlád		kontroly		DTT IM (final 50mM) uL	homogenát: urea(1:1) uL	final. konc. ug/uL	final. Objem uL	load/gel uL	protein na line
	konc. ug/uL	ředění Vz x-krát	objem Vz uL	SLB 4x uL	objem Vz uL	SLB 4x uL						
1	8,36	4,18	2,4	2,5	2,4	2,5	0,5	4,6	2,00	10	10	20
2	8,74	4,37	2,3	2,5	2,3	2,5	0,5	4,7	2,00	10	10	20
3	11,86	5,93	1,7	2,5	1,7	2,5	0,5	5,3	2,00	10	10	20
4	7,45	3,73	2,7	2,5	2,7	2,5	0,5	4,3	2,00	10	10	20
5	8,64	4,32	2,3	2,5	2,3	2,5	0,5	4,7	2,00	10	10	20
6	12,56	6,28	1,6	2,5	1,6	2,5	0,5	5,4	2,00	10	10	20
7	10,68	5,34	1,9	2,5	1,9	2,5	0,5	5,1	2,00	10	10	20
8	10,08	5,04	2,0	2,5	2,0	2,5	0,5	5,0	2,00	10	10	20
9	10,60	5,30	1,9	2,5	1,9	2,5	0,5	5,1	2,00	10	10	20
10	10,59	5,29	1,9	2,5	1,9	2,5	0,5	5,1	2,00	10	10	20
11	10,81	5,41	1,8	2,5	1,8	2,5	0,5	5,2	2,00	10	10	20
12	12,28	6,14	1,6	2,5	1,6	2,5	0,5	5,4	2,00	10	10	20
13	9,89	4,94	2,0	2,5	2,0	2,5	0,5	5,0	2,00	10	10	20
14	9,73	4,86	2,1	2,5	2,1	2,5	0,5	4,9	2,00	10	10	20
15	8,25	4,13	2,4	2,5	2,4	2,5	0,5	4,6	2,00	10	10	20
16	9,35	4,68	2,1	2,5	2,1	2,5	0,5	4,9	2,00	10	10	20
17	8,90	4,45	2,2	2,5	2,2	2,5	0,5	4,8	2,00	10	10	20
18	9,40	4,70	2,1	2,5	2,1	2,5	0,5	4,9	2,00	10	10	20
19	8,56	4,28	2,3	2,5	2,3	2,5	0,5	4,7	2,00	10	10	20
20	7,91	3,96	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5	4,5	2,00	10	10	20
21	7,64	3,82	2,6	2,5	2,6	2,5	0,5	4,4	2,00	10	10	20
22	7,19	3,59	2,8	2,5	2,8	2,5	0,5	4,2	2,00	10	10	20

## 1B Složení roztoků

### Složení homogenizačního média HM1, 10 ml pH 7,4:

1. 16,04 mg TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 9,52 mg EDTA (dodané společností SIGMA)
3. 2,92 mg EDTA (dodané společností SIGMA)
4. 0,86 g sacharóza
5. 1 tableta inhibitory proteáz
6. 200 µl complete inhibitors 50x koncentrované
7. 7,71 mg DTT (dithiotreitol)

### Složení homogenizačního média HM2, 10 ml:

1. 3 g močoviny
2. 1,55 g thiomčoviny
3. 45 mg tetrasodium pyrofosfátu dekahydrátu

Všechny komponenty byly smíchány a doředěny 2-merkaptoethanolem na 10 ml mQ H<sub>2</sub>O.

### Složení gelů:

Na 2 gely	10% dělicí gel	5% zaostřovací gel
H <sub>2</sub> O	3,57 ml	2,62 ml
AA	3,34 ml	0,83 ml
Tris 8,9	2,5 ml	0
Tris 6,9	0	1,25 ml
SDS	0,1 ml	0,05 ml
APS	0,5 ml	0,25 ml

AA – 30% akrylamigový roztok (dodané společností SIGMA)

TRIS pufr pH 8,9

1. 9,1 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA) + 345 µl TEMED (dodané společností SIGMA) bylo rozpuštěno v mQ H<sub>2</sub>O. Následně bylo upraveno pH pomocí HCl na hodnotu 8,8 a doplněno na 100 ml.

TRIS pufr pH 6,8

1. 10,462 g BIS-TRIS (dodané společností SIGMA) + 345 µl TEMED (dodané společností SIGMA) bylo rozpuštěno v mQ H<sub>2</sub>O. Následně bylo upraveno pH pomocí HCl na hodnotu 6,8 a doplněno na 100 ml.



SDS – sodium dodecyl sulfát (dodané společností SERVA)

APS – ammonium persulfat 60 mg do 5 ml mQ H<sub>2</sub>O (dodané společností P-lab)

DTT - dithiotreitol

#### **Složení elektrodového pufru, 1l:**

1. 30,3 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 144 g Glycin (dodané společností SIGMA)
3. 10 g SDS (dodané společností SERVA)

Navážené množství bylo rozpuštěno v 1l mQ H<sub>2</sub>O. Před použitím byl roztok naředěn v poměru 1:9 – pufr: mQ H<sub>2</sub>O.

#### **Složení Towbin pufru – blotovací pufr, 1l:**

1. 3,03 g TRIS (25mM) - (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 14,4 g Glycin (192mM) - (dodané společností SIGMA)

Navážené množství bylo rozpuštěno v 500 ml mQ H<sub>2</sub>O. Následně přidáno 200 ml methanolu (dodané společností PENTA) a doplněno do 1 l mQ H<sub>2</sub>O.

#### **Složení TBS, 5l:**

1. 12,1 g TRIS (20mM) - (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 146,2 g NaCl (500mM) - (dodáno společností PENTA)

Navážené množství bylo rozpuštěno ve 4 l mQ H<sub>2</sub>O. Poté bylo upraveno pH na 7,5 a doplněno mQ H<sub>2</sub>O do 5 l.

#### **Složení TTBS, 1l:**

Před použitím bylo do 1 l TBS přidáno 500 µl Tween 20 (dodáno společností SIGMA)