

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**MECHANISMY REGULACE EXPRESE
MITOCHONDRIÁLNÍCH PROTEINŮ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2010

Eva Gabrielová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Eva Gabrielová

MECHANISMY REGULACE EXPRESE
MITOCHONDRIÁLNÍCH PROTEINŮ

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2006 - květen 2010.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 14. 6. 2010

.....

Ing. Eva Gabrielová

Děkuji pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Zvláště děkuji svému školiteli Doc. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti během mého doktorského studia, při výzkumné části i při vlastním sepsování disertační práce. Doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D. děkuji za cennou spolupráci a rady nejen při izolacích potkaních neonatálních kardiomyocytů.

Doc. RNDr. Haně Kolářové, CSc. z Ústavu lékařské biofyziky LF UP děkuji za zapůjčení fluorescenčního mikroskopu a spolupráci při řešení projektu FRVŠ.

Prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha) děkuji za spolupráci při přípravě polyfenolových látek a RNDr. Petrovi Doleželovi, CSc. z Biologického ústavu LF UP za měření vzorků na průtokovém cytometru.

Dále děkuji RNDr. Petrovi Ježkovi, DrSc. a Mgr. Martinovi Jabůrkovi, Ph.D. (Fyziologický ústav AV ČR, Praha) za spolupráci na publikacích a poskytnuté chemikálie.

Mgr. Janě Bělákové, Ph.D. a Mgr. MUDr. Milanovi Raškovi, Ph.D. z Ústavu imunologie LF UP děkuji za namnožení plasmidů.

Děkuji také MVDr. Daliborovi Doležalovi (Centrum pro práci s laboratorními zvířaty, LF UP) za poskytnuté pracovní prostředí pro izolaci potkaních kardiomyocytů.

Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP, děkuji za cenné rady a připomínky předané v průběhu celého mého působení na jejím pracovišti.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů MŠM 6198959216 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Děkuji také rodině a mému muži Lukášovi za pochopení, trpělivost a podporu při studiu.

SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá mitochondriálními proteiny, jejich funkcí, mechanismy regulace exprese a zapojením do signálních drah, včetně apoptosy. Zaměřili jsme se na odpřahující protein 2 (UCP2) a ovlivnění jeho exprese polyfenolickými látkami. Protože mitochondrie se významně podílí na apoptose, zajímali jsme se o DFFa podobný faktor indukující buněčnou smrt (CIDEa), a nakonec o možnostech ovlivnění apoptotických proteinů vlivem miRNA.

Odpřahující proteiny (UCP) patří do superrodiny metabolických přenašečů vnitřní mitochondriální membrány. Odpřahující proteiny a odpřažení respirace jsou pravděpodobně zapojeny v mnoha důležitých fyziologických i patologických procesech. Tento význam podporuje výčet funkcí odpřahujícího proteinu: adaptivní termogeneze, regulace oxidace mastných kyselin, podíl na zánětu, prevence tvorby reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), regulační funkce v diabetes mellitus 2. typu, regulace tělesné hmotnosti, prevence aterosklerózy a stárnutí. Zjistili jsme, že většina námi testovaných sloučenin signifikantně zvyšuje hladinu UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech. Protože kinasa p38 hraje významnou roli při ischemicko-reperfusionním poškození a ischemické prekondici, zajímali jsme se o její zapojení do regulace exprese UCP2 v kardiomyocytech. V našich experimentech vykazovala p38 jak negativní, tak i pozitivní vliv na expresi UCP2. Naše data naznačují, že exprese UCP2 regulovaná p38 je součástí srdeční odpovědi na extracelulární podněty, které se liší ve svých cílech.

SB a DHSB, dvě polyfenolové sloučeniny, vykazují velké množství biologických účinků. Při zkoumání kardioprotektivního působení těchto dvou látek v potkaních neonatálních kardiomyocytech vykázal DHSB schopnost deenergizovat buňky. V mitochondriích izolovaných z potkaních srdcí došlo ke změnám ve spotřebě kyslíku a membránovém potenciálu. Srovnatelný vzrůst respirace a pokles membránového potenciálu v případě DHSB je shodný s účinkem protonoforu FCCP, způsobující odpřažení od mitochondriální respirace. DHSB vykazoval vysokou schopnost potlačovat tvorbu ROS v izolovaných srdečních mitochondriích. DHSB také koncentračně závisle inhiboval produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) indukovanou rotenonem. Byla potvrzena schopnost SB a DHSB zabraňovat buněčné smrti kardiomyocytů vyvolané přídatkem extracelulární peroxidu vodíku. Na základě ochranného efektu polyfenolových látek byl sledován účinek SB a DHSB na srdeční bioenergetiku regulovanou thyroidními hormony, včetně hladiny exprese UCP2. Obě sloučeniny vykazovaly koncentračně

závislé snížení exprese UCP2 indukované T4. Testovali jsme, zda tento účinek můžeme připsat vlivu SB a DHSB na příjem hormonů do buňky nebo vlivu na transkripční aktivitu thyroïdního receptoru. Experimenty potvrdily, že ani jedna sloučenina nemá signifikantní vliv na příjem hormonů do buňky, ale prokázaly vliv na expresi řízenou thyroïdním receptorem.

Mitochondrie hrají důležitou roli v apoptose. Do těchto procesů zasahuje také rodina CIDE proteinů. CIDE proteiny jsou významné v kontrole různých metabolických procesů jako je lipolýza, oxidace mastných kyselin, aktivita mitochondrií, tvorba lipidových kapek a ukládání lipidů v adipocytech a játrech. CIDE proteiny mohou být využity pro vývoj nových terapeutických léčiv a k ověření jejich působení. DFFa podobný faktor indukující buněčnou smrt (*DNA Fragmentation Factor a-like Effector-a*; CIDEa) se nachází v mitochondriích, kde aktivuje apoptosu rozrušením komplexu DFF45-DFF40 a má funkci jako pozitivní efektor apoptotické dráhy. Byl zkoumán vliv indukované exprese CIDEa na buňky T-REx HeLa, které stabilně exprimují tertacyklinový represor. Provedli jsme imunodetekci CIDEa v celých buňkách a buněčných frakcích Hela buněk. S využitím imunocytochemie byla pozorována redistribuce CIDEa do jádra, která byla zvýšena působením valinomycinu a camptothecinu. V buňkách, ve kterých byla vyvolána apoptosa, jsme pozorovali nárůst CIDEa v jaderné frakci, zatímco v cytosolické frakci se množství CIDEa snížilo. Z našich výsledků vyplynulo, že CIDEa je rozdělena v mitochondriích, přičemž přenos tohoto potencionálně nebezpečného proteinu z mitochondrií do jádra zintenzivňuje nebo dokonce iniciuje apoptosu.

Důležitým krokem v apoptose závislé na mitochondriích je uvolnění proapoptoticky působících faktorů z mezimembránového prostoru, z nichž nejdůležitější je cytochrom *c*. Modulaci exprese cytochromu *c*, a potažmo spuštění apoptosy, může regulovat změna exprese některých mikroRNA. mikroRNA jsou velmi krátké endogenní RNA plnicí v buňce funkci negativního regulátoru genové exprese na posttranskripční úrovni. Provedli jsme průzkum databáze miRBase s cílem nalézt kandidátní miRNA, které mohou regulovat expresi cytochromu *c*. hsa-miR-29 byla jednou z prvních miRNA, pro níž byla identifikována cílová molekula mRNA, a to onkogen Tcl-1. Naše experimenty ukázaly, že miR-29c neovlivňuje expresi cytochromu *c*, ale potlačuje expresi proapoptotického proteinu Bak. Kromě Bak jsme zaznamenali výraznější úbytek DNMT3B po transfekci pre-miR-29-b1, -b2, -c, kdy DNMT3B je známým cílovým genem hsa-miR-29. Zatím všechny studie naznačovaly spojení miR-29 s různými druhy rakoviny

SOUHRN

nebo například infarktem myokardu, kde je exprese miR-29 snížena, ale doposud se žádná nezabývala funkcí miR-29 v normálních buněčných procesech.

Klíčová slova: CIDEa, miRNA-29, mitochondrie, mitochondriální protein, oxidativní fosforylace, p38, potkaní kardiomyocyty, UCP2.

SUMMARY

Dissertation thesis focuses on mitochondrial proteins, their function, mechanisms of expression regulation and involvement in signaling pathways, including apoptosis. Our focus was on the uncoupling protein 2 (UCP2) and its modulation by polyphenolic substances. Because mitochondria are known to play an important role in apoptosis, we took interest in cell death inducing DFFa-like factor (CIDEa), and finally we tested possible involvement of microRNA in regulating expression of apoptotic proteins.

Uncoupling proteins (UCP) are members of the inner mitochondrial membrane transporter protein superfamily. Uncoupling proteins and the uncoupling of respiration are probably involved in many physiological and pathological processes. It is supported by the list of putative functions of the uncoupling protein: adaptive thermogenesis, regulation of fatty acid oxidation, participation in inflammation, preventing the formation of reactive oxygen species (ROS), regulation function in diabetes mellitus type 2, regulation of body mass, preventing atherosclerosis and aging. We found that majority of substances we tested significantly up-regulated UCP2 in neonatal rat cardiomyocytes. Because p38 kinase participates in the events of ischemia-reperfusion injury and ischemia preconditioning, we explored whether the kinase is involved in regulation of UCP2 expression in cardiomyocytes. Our experiments demonstrated negative as well as positive effect of p38 on UCP2 expression. Our data suggest that p38-regulated expression of UCP2 is part of the heart response to extracellular signals/stresses that vary in their targets.

SB and DHSB, two polyphenolic compounds, show a plethora of biological effects. While testing the cardioprotective effects of the two substances in rat neonatal cardiomyocytes, DHSB displayed the ability to de-energize cells. Identical effect of the substance was observed in isolated rat heart mitochondria, where it induced changes in oxygen consumption and membrane potential. Moreover, comparable increase in respiration accompanied by a decrease in membrane potential is displayed by FCCP, a protonophore causing uncoupling of mitochondrial respiration. DHSB showed high potency in preventing ROS formation in isolated rat heart mitochondria. Moreover, the polyphenol caused concentration-dependent formation of ROS induced by rotenone and we verified ability of SB and DHSB to prevent cell death caused by addition of extracellular hydrogen peroxide. Because of the protective effect of both substances, we investigated their effect on myocardial bioenergetics, including UCP2 expression,

SUMMARY

governed by thyroid hormones. Both polyphenols displayed concentration-dependent down-regulation of T4-induced UCP2 expression. To uncover the possible mechanism, we explored effects of the substances on thyroid hormone entry into the cell and effect on thyroid receptor transcriptional activity. Our data showed no significant effect of SB and DHSB on thyroid hormone accumulation in the cell but demonstrated effect on thyroid receptor-driven gene expression.

Mitochondria are important players in the process of apoptosis, which also involves family of CIDE proteins. These proteins participate in the control of various metabolic processes such as lipolysis, fatty acid oxidation, activity of mitochondria, formation of lipid droplets and lipid deposition in adipocytes and liver. CIDE proteins appear to be novel targets for therapeutic approaches development and verification of their efficacy. Cell death inducing DNA Fragmentation Factor-like Effector-a (CIDE-a) is localized in mitochondria where it activates apoptosis via disrupting the DFF45-DFF40 complex and acts like a positive effector of the apoptotic pathway. We studied the effect of induced CIDEa expression on T-REx HeLa cells that stably express tetracycline repressor. Immunodetection of CIDEa was performed in whole cells as well as cell fractions isolated from HeLa cells. Redistribution of CIDEa into the nucleus, detected using immunocytochemistry, was enhanced by treating the cells with valinomycin and camptothecin. We noticed increase in CIDEa presence in the nucleus accompanied by decrease of CIDEa presence in the cytosolic fraction of cells in which apoptosis was initiated. Our results demonstrated that CIDEa is present in mitochondria while transfer or shuttling of this potentially dangerous protein from mitochondria to the nucleus enhances or even initiates apoptosis.

Important step in mitochondria-related apoptosis is release of pro-apoptotic factors from intermembrane space, of which the most important is cytochrome *c*. Modulation of cytochrome *c* expression, and thereby of apoptosis, may be regulated by a change in expression of certain microRNA. MicroRNA are very short endogenous RNA fulfilling the role of negative regulator of gene expression on posttranscriptional level. We performed a search in miRBase database with the aim of identifying candidate miRNA that may regulate expression of cytochrome *c*. hsa-miR-29 was one of the first miRNA for which a target mRNA was identified in the form of Tcl-1 oncogene. Our experiments demonstrated that miR-29c does not affect cytochrome *c* expression, but decreases the expression of pro-apoptotic protein Bak. Besides Bak we recorded a significant decrease in DNMT3B expression after transfection with pre-miR-29-b1, -b2, -c, where DNMT3B

SUMMARY

is a known target of hsa-miR-29. All of the studies to date suggested a connection between miR-29 and various types of cancer or for example myocardial infarction, in which expression of miR-29 is down-regulated, but none related the function of miR-29 with normal cellular processes.

Keywords: CIDEa, miRNA-29, mitochondria, mitochondrial protein, oxidative phosphorylation, p38, rat cardiomyocytes, uncoupling proteins, UCP2.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	3
2.1 <i>Mitochondrie.....</i>	3
2.1.1 Význam a složení.....	3
2.1.2 Oxidativní fosforylace	3
2.1.3 Mechanismus odpřažení	5
2.1.4 Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)	6
2.2 <i>Odpřahující proteiny (UCP).....</i>	8
2.2.1 Charakteristické znaky UCP proteinů	8
2.2.2 Lokalizace a funkce UCP proteinů	9
2.2.3 Fyziologická role a význam UCP2	9
2.2.4 Význam UCP2 v kardioprotekci.....	16
2.2.4.1 Polyfenoly - antioxidanty a odpřahovače.....	17
2.3 <i>Apoptosa</i>	19
2.3.1 Kaspasy.....	20
2.3.2 Mechanismy indukce apoptozy.....	21
2.3.2.1 Role proteinů rodiny Bcl-2.....	22
2.3.2.2 Vnitřní signalizace	22
2.3.2.3 Vnější signalizace.....	25
2.4 <i>CIDEa.....</i>	27
2.4.1 Tkáňová distribuce a transkripční regulace CIDEa proteinu.....	27
2.4.2 Subcelulární lokalizace CIDEa proteinu	29
2.4.3 CIDEa protein a vývoj metabolických onemocnění	29
2.4.4 Mechanismus CIDEa v regulaci metabolických onemocnění	30
2.4.5 CIDEa v apoptose	31
2.5 <i>miRNA.....</i>	32

2.5.1 Vlastnosti miRNA	32
2.5.1.1 Biogeneze miRNA	33
2.5.1.2 Funkce miRNA	34
2.5.2 Rodina hsa-miR-29.....	36
2.5.2.1 Cílové geny miR-29	36
2.5.3 Vliv miRNA na apoptosu	38
2.5.3.1 Vnitřní mitochondriální dráha apoptosu a miRNA.....	38
2.5.3.2 Vnější receptorová dráha apoptosu a miRNA.....	38
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	40
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
4.1 <i>Biologický materiál</i>	41
4.1.1 Buněčný materiál	41
4.2 <i>Chemikálie, roztoky a přístroje</i>	41
4.2.1 Chemikálie	41
4.2.1.2 <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	42
4.2.2 Roztoky.....	43
4.2.3 Přístroje.....	46
4.2.4 Ostatní materiál.....	48
4.3 <i>Izolace potkaních neonatálních kardiomyocytů</i>	48
4.4 <i>Izolace srdečních mitochondrií</i>	49
4.5 <i>T-REx systém</i>	49
4.6 <i>Kultivace buněk</i>	50
4.6.1 Kultivace kardiomyocytů.....	50
4.6.2 Kultivace buněčné linie T-REx HeLa.....	51
4.7 <i>Použité metody</i>	51
4.7.1 Transfekce.....	51
4.7.1.1 Transfekce potkaních neonatálních kardiomyocytů.....	51
4.7.1.2 Transfekce buněčné linie T-REx HeLa plasmidem pDEST- CIDEa a HepG2 plasmidem 1A1-luc.....	52

4.7.1.3 Transfekce buněčné linie HeLa syntetickou pre-miRNA	53
4.7.2 Izolace plasmidů	53
4.7.3 Stanovení specifických proteinů elektroforézou	54
4.7.3.1 Stanovení proteinů - UCP2, p38-P, CIDEa, Bak, DNMT3B, Mcl-1, aktin.....	55
4.7.4 RT-PCR	56
4.7.4.1 Izolace mRNA TRIZolovou metodou a stanovení celkové RNA.....	56
4.7.4.2 RT-PCR.....	57
4.7.5 Konfokální mikroskopie	57
4.7.6 Fluorescenční mikroskopie.....	57
4.7.7 Membránový potenciál	58
4.7.7.1 Membránový potenciál v potkaních neonatálních kardiomyocytech	58
4.7.7.2 Membránový potenciál v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce	58
4.7.8 Stanovení produkce ROS.....	59
4.7.8.1 Produkce ROS v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce	59
4.7.8.2 Produkce ROS v HL-60 a čistě chemickém systému.....	59
4.7.8.3 Produkce ROS v potkaních neonatálních kardiomyocytech	60
4.7.9 Respirimetrie s vysokou rozlišovací schopností.....	60
4.7.10 Hmotnostní spektrometrie v iontové pasti (ESI Ion-trap MS).....	60
4.7.11 HPLC separace	61
4.7.12 Detekce chemiluminiscence	61
4.7.13 In situ detekce apoptosy (TUNEL).....	62
4.7.14 Imunocytochemie	63
4.7.15 Příprava subcelulárních frakcí	63
4.7.16 Aktivita kaspasy 3.....	64
4.7.17 Stanovení koncentrace bílkovin.....	64
4.7.17.1 Metoda dle Bradfordové	64

4.7.18 Stanovení buněčného poškození.....	64
4.7.18.1 MTT test.....	64
4.7.18.2 LDH test.....	65
4.8 Statistická analýza.....	65
5. VÝSLEDKY	67
5.1 <i>Modulace exprese UCP2 v potkaních kardiomyocytech</i>	67
5.1.1 Exprese UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech.....	67
5.1.2 Zapojení p38 do exprese UCP2	70
5.1.3 Dehydrosilybin zeslabuje produkci ROS mechanismem podobným odpřažení.....	72
5.1.3.1 Účinek SB a DHSB na energetický status izolovaných potkaních kardiomyocytů.....	72
5.1.3.2 Účinek SB a DHSB na respiraci a membránový potenciál izolovaných potkaních kardiomyocytů	75
5.1.3.3 DHSB snižuje tvorbu ROS v izolovaných mitochondriích.....	76
5.1.3.4 DHSB a SB vykazují nízkou schopnost tlumit tvorbu superoxidu v modelových systémech	78
5.1.3.5 DHSB inhibuje poškození neonatálních potkaních kardiomyocytů způsobené peroxidem vodíku.....	81
5.1.3.6 Účinek DHSB na respiraci a tvorbu ROS je inhibován karboxyatraktylozidem a ATP	82
5.1.4 DHSB moduluje expresi UCP2 vyvolanou thyroidními hormony	83
5.1.4.1 Polyfenoly snižují expresi UCP2 v závislosti na jejich koncentraci	83
5.1.4.2 Příjem hormonů buňkou.....	84
5.1.4.3 Vliv DHSB na transkripční aktivitu thyroidního receptoru	87
5.1.4.4 Vliv DHSB na aktivitu nukleárních aryluhlovodíkových receptorů.....	88
5.2 <i>CIDEa</i>	89

5.2.1 Vliv exprese CIDEa na apoptosu v HeLa buňkách	89
5.2.2 Lokalizace proteinu CIDEa v buňce.....	90
5.2.3 Redistribuce proteinu CIDEa po inkubaci s induktory apoptosy	95
5.3 Vliv miR-29 na apoptotické proteiny v HeLa buňkách.....	97
5.3.1 Imunodetekce proteinů Bak, Mcl-1 a DNMT 3B.....	98
6. DISKUSE.....	101
6.1 Modulace exprese UCP2	101
6.2 Distribuce CIDEa ve vztahu k apoptose.....	107
6.3 Vliv miRNA-29 na apoptotické proteiny.....	109
7. ZÁVĚRY	111
8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	113
9. OSTATNÍ PRÁCE.....	115
10. LITERATURA.....	116

SEZNAM ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie	DFF	DNA fragmentační faktor
ALP	alkalická fosfatasa	DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem
ALT	alaninaminotransferasa	DMSO	dimethylsulfoxid
AMPK	mitogenem aktivovaná proteinová kinasa	DNMT 3B	DNA-methyltransferasa 3B
ANI	anisomycin	DNP	2,4-dinitrofenol
ANT	adenin nukleotidový translokátor	DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylový radikál
AST	aspartátaminotransferasa	DTT	D,L-dithiothreitol
ATP	adenosintrifosfát	EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Bak	Bcl-2 homologní antagonist, proapoptotický protein	EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
BAT	hnědá tuková tkáň	FAD	flavinadenindinukleotid
BMI	index tělesné hmotnosti	FADH ₂	redukovaný flavinadenindinukleotid
BSA	hovězí sérový albumin	FCCP	karbonylkyanid-p- trifluormethoxyfenylylhydrazon
CAT	karboxyatraktylosid	FBS	fetální hovězí sérum
CCCP	karbonylkyanid-m- chlorfenylhydrazon	FID	plamenový ionizační detektor
CIDEa	DFFa podobný faktor indukující buněčnou smrt	FLD	fluorescenční detektor
CLL-B	chronická lymfocytární leukémie typu B	fMLP	N- <i>formyl</i> - methionyl-leucyl- phenylalanin
CPT	camptothecin	FPD	plamenový fotometrický detektor
cJNK	c-Jun-N-terminální kinasa	Fsp27	specifický gen 27 pro tuky (CIDEc)
DAD	detektor diodového pole	GC	plynová chromatografie
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol		
DHSB	2,3-dehydrosilybin		

SEZNAM ZKRATEK

GTP	guanosintrifosfát	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
HeLa	buněčná linie odvozená od rakoviny děložního hrdla	NADH	redukovaný
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-etansulfonová kyselina	NADPH	redukovaný
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie		nikotinamidadenindinukleotid fosfát
HRP	křenová peroxidasa	NCS	telecí sérum
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu	NO	oxid dusnatý
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-karbokyaninjodid	NF-κB	jaderný faktor kappa B
L2K	Lipofectamin TM 2000	NBT	2,2'-di- <i>p</i> -nitrofenyl-5,5'-difenyl 3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]ditetrazolium chlorid (nitrotetrazoliová modř)
LCQ Fleet	hmotnostní spektrometr s 3 D iontovou pastí	p38	kinasa p38
LDH	laktátdehydrogenasa	PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
miRNA	mikroRNA	PBS	fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4
Mcl-1	protein myeloidní buněčné leukémie 1, antiapoptotický protein	PMA	forbol myristát acetát
MCLA	2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-on hydrochlorid	POL II	polymerasa II
MEM	minimální esenciální médium	PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina	QSAR	analýza kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou účinností
MS	hmotnostní spektrometrie	RNAi	RNA interference
		RNS	reaktivní formy dusíku
		ROS	reaktivní formy kyslíku

SEZNAM ZKRATEK

SAR	analýza vztahů mezi chemickou strukturou látek a jejich biologickou účinností
SB	silybin
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
<i>t</i> BH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
T3	3,5,3'-trijodo-L-thyronin
T4	3,5,3',5'-tetrajodo-L-thyronin
TBS	isotonický Tris pufr
TCA	trichloroctová kyselina
TBS/T	isotonický Tris pufr s přídavkem 0,05 % Tween-20
TEMED	tetramethylethyldiamin
Tet	tetracyklin
Tcl-1	protein chronické lymfoidní leukémie T-buněk 1
TMRE	tetramethylrhodamin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminometan
UCP	odpřahující protein
UV	ultrafialová oblast spektra
Val	valinomycin
VIS	viditelná oblast spektra
XIAP	inhibitor apoptotického proteinu vázaný na chromozom X, antiapoptotický protein

1. ÚVOD

Metabolická onemocnění zahrnující obezitu, hyperlipidemii, inzulinovou rezistenci, jaterní steatózu a hypertenzi patří do skupiny onemocnění spojených s metabolickou poruchou a nevyváženou energetickou homeostázou. Velký význam v těchto procesech mají mitochondrie. Mitochondrie jsou lokalizované v cytoplazmě všech eukaryotických buněk a jsou zapojeny v mnoha procesech nezbytných pro přežití a funkci buněk, zahrnující produkci energie, kontrolu redoxního stavu, udržení hladiny vápníku a jiné důležité metabolické a biosyntetické pochody. Navíc jsou mitochondrie zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) a mají význam v mechanismu buněčné smrti.

UCP2, odpřahující protein 2, je mitochondriální protein, který hraje důležitou roli v biochemických procesech. Odpřahující proteiny patří do superrodiny metabolických přenašečů vnitřní mitochondriální membrány. Zprostředkovávají a regulují uvolnění membránového potenciálu, který je generován dýchacím řetězcem. Tento mechanismus uvolňující energii slouží k termogenezi, udržení rovnováhy redoxního systému nebo k redukci produkce reaktivních forem kyslíku. Silybin a dehydrosilybin, dvě polyfenolové sloučeniny, vykazují mnoho biologických účinků, které se obecně přisuzují jejich známé antioxidační kapacitě.

Tzv. CIDE proteiny jsou proteiny indukující buněčnou smrt pomocí tzv. DFF45 efektoru, mezi něž patří CIDEa, CIDEb a Fsp27 a jsou převážně exprimované v játrech a v hnědé a bílé tukové tkáni. Studie, která využila CIDEa protein deficientní zvířata, prokázala důležitost této třídy proteinů při ukládání tuků, tvorbě lipidových kapiček, lipolýze a při vývoji obezity, diabetes a jaterní steatózy. CIDEa protein a jeho redistribuce v buňce má velký význam pro apoptosu.

Mitochondrie jsou zapojeny také v apoptose, při níž vlivem změněného poměru pro- a antiapoptotických proteinů ztrácejí membránový potenciál a uvolňují z mezimembránového prostoru řadu proapoptoticky působících faktorů, z nichž nejdůležitější je cytochrom *c*. Za úbytek cytochromu *c* může být odpovědná změna exprese některých mikroRNA. mikroRNA jsou krátké nekódující RNA, plnící v buňce funkci negativního regulátoru genové exprese na posttranskripční úrovni. hsa-miR-29 byla jednou z prvních mikroRNA, pro níž byla identifikována cílová molekula mRNA,

a to onkogen Tc1-1. Zatím všechny studie naznačovaly na spojení miR-29 s různými druhy rakoviny nebo například infarktem myokardu, kde je exprese miR-29 snížena. Doposud se žádná studie nezabývala funkcí miR-29 v normálních buněčných procesech.

Ve své disertační práci jsem se věnovala studiu mitochondriálních proteinů, zapojených v metabolických procesech, jejich významem a modulací jejich exprese v buněčných liniích a potkaních kardiomyocytech. Tyto proteiny jsou v současné době velmi intenzivně studovány, jelikož není znám přesný mechanismus jejich působení. U proteinu UCP2 nás zajímalo, jaká je jeho exprese v potkaních kardiomyocytech, jakým způsobem je do regulace exprese UCP2 zapojena kinasa p38 a jakým mechanismem působí polyfenolové látky v potkaních neonatálních kardiomyocytech. V případě CIDEa jsme se zaměřili na stanovení exprese na úrovni proteinu, lokalizace CIDEa proteinu v buňce a jaký vliv má distribuce CIDEa v buňce na apoptosu. Za účelem ověření utlumení exprese proteinu Bak jsme transfekovali syntetickou miR-29 do buněčné linie HeLa. Dále jsme ověřili vliv miR-29 na expresi DNA-methyltransferasy, důležitého markeru prognózy a šance přežití u karcinomu plic. Provedli jsme imunodetekci antiapoptotického proteinu Mcl-1, který se řadí mezi cílové geny miR-29.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1 Mitochondrie

2.1.1 Význam a složení

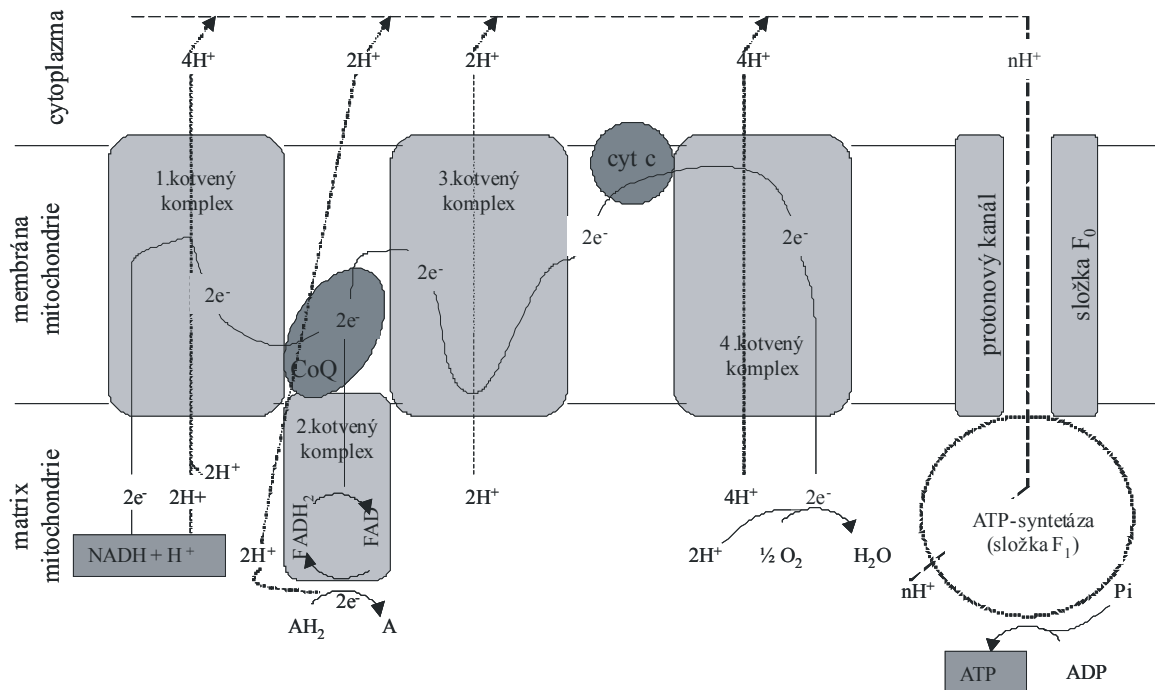
Mitochondrie se nacházejí v cytoplazmě všech eukaryotických buněk a jsou zapojené v mnoha procesech, které jsou nezbytné pro přežití buňky. Tyto procesy zahrnují produkci energie, kontrolu stavu redoxního systému, homeostázy vápníku a jiné důležité metabolické a biosyntetické dráhy. Navíc jsou mitochondrie hlavním zdrojem reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a hrají často významnou roli ve fyziologických procesech mechanismu buněčné smrti. Proto jsou mitochondrie důležité pro patologické podmínky, jako je rakovina, diabetes mellitus, obezita, ischemicko-reperfusní poškození a neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba a stárnutí)¹.

Mitochondrie obsahují dvě části spojené vnitřní a vnější membránou. Vnější membrána je permeabilní pro většinu metabolitů, zatímco vnitřní membrána je selektivně permeabilní. Propustnost vnitřní membrány je kontrolována udržováním vysokého elektrochemického gradientu. Tento gradient, tvořený dýchacím řetězcem, je nezbytný pro uložení energie a syntézu ATP.

2.1.2 Oxidativní fosforylace

Mezi mnoha funkcemi, které byly u mitochondrií popsány, je z důvodu produkce buněčné energie nejdůležitější oxidativní fosforylace^{2,3}. Oxidativní fosforylace zahrnuje spřažení transportu elektronů prostřednictvím elektronového transportního řetězce s aktivním pumpováním protonů přes vnitřní mitochondriální membránu a tvorbou ATP pomocí F_1F_0 -ATP syntasy. Respirační řetězec se skládá z většího počtu redoxních přenašečů, které tvoří řadu od NAD-dependentních dehydrogenáz přes flavoproteiny a cytochromy k molekulárnímu kyslíku. Mitochondriální elektronový transport je tedy tvořen převážně z proteinů, které sestávají z pěti komplexů vytvořené právě pro produkci buněčné energie (obr. 1). Jedná se o komplex I (NADH dehydrogenasa), komplex II (sukcinátdehydrogenasa), komplex III (ubichinon cytochrom *c* oxidoreduktasa),

komplex IV (cytochrom *c* oxidasa) a komplex V (F_1F_0 -ATP syntasa). Vodík či elektrony postupují řetězcem v krocích od elektronegativních komponent k elektropozitivnějšímu kyslíku v rozmezí redox potenciálu 1,1 V mezi $NAD^+/NADH+H^+$ a O_2/H_2O .



Obr. 1. Dýchací řetězec (upraveno podle Karlsona a kol.⁴).

Oxidace molekul jakými jsou sacharidy, lipidy a proteiny, prostřednictvím buněčného metabolismu, poskytuje elektrony ve formě redukováných protonových přenašečů NADH a $FADH_2$, které se nazývají redukované kofaktory. Tyto koenzymy generované v citrátovém cyklu během oxidace jsou reoxidovány průchodem elektronů přes elektronový transportní řetězec. Každý z respiračních komplexů I, III a IV funguje jako protonová pumpa. Pumpují protony přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix vně do mezimembránového prostoru průběžně, jakmile jsou dodány do dýchacího řetězce. Vnitřní membrána je nepropustná pro ionty obecně, především však pro protony, které se hromadí vně membrány. Elektrochemický potenciál ($\Delta\psi$), vznikající podél celého řetězce asymetrickou distribucí vodíkových iontů, je využit k pohonu mechanismů zodpovědných za tvorbu ATP. Tento děj je známý jako protonmotivní síla, Δp , skládající se převážně z elektrického gradientu (membránový potenciál, $\Delta\psi$) a malého chemického gradientu (ΔpH). Energie, která je uložena v protonovém gradientu napříč vnitřní

mitochondriální membránou, je využívána komplexem V k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu (P_i). Protony jsou transportovány zpět z mezimembránového prostoru do mitochondriálního matrix. Konečným cílem pro elektrony je kyslík, který je redukován na vodu komplexem IV v posledním kroku elektronového transportního řetězce. Jakmile vzniká elektrochemický potenciál napříč membránou, inhibuje se další transport redukčních ekvivalentů respiračním řetězcem, dokud není vybit zpětným průchodem protonů přes ATP-syntasu. Její funkce závisí také na dostupnosti ADP a P_i (cit.⁵).

2.1.3 Mechanismus odpřažení

Veškerá energie dostupná v elektrochemickém gradientu není nutně spřažená se syntézou ATP. Mitochondriální odpřažení je tok protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix mimo ATPasu a projevuje se změnou energie uložené v potenciálu membrány přímo na teplo^{6,7}. Odpráhovače oxidativní fosforylace v mitochondriích inhibují spojení mezi transportem elektronů a fosforylací, tím inhibují syntézu ATP bez ovlivnění dýchacího řetězce a ATP-syntasy. Odpráhovač zvyšuje propustnost membrány pro protony a odpráhuje transport elektronů od fosforylace tak, že umožní disipaci gradientu protonů bez syntézy ATP⁸. Je známo velké množství látek způsobujících odpřažení jako například 2,4-dinitrofenol (DNP), karbonylkyanid-*p*-trifluormethoxyfenylhydrazon (FCCP) nebo karbonylkyanid-*m*-chlorfenylhydrazon (CCCP). Disipace protonového gradientu chemickými odpráhovači, což jsou obecně velmi slabé kyseliny, mezi které můžeme zařadit i polyfenolové sloučeniny, má za následek zrychlení přenosu elektronů ve snaze vyrovnat způsobené odpřažení. Tvorba ROS předčasným přenosem elektronů z komplexů I a III na kyslík je tak minimalizována.

Tok protonů je základní biofyzikální vlastnost lipidové dvojvrstvy udržující protonmotivní sílu. Tento průtok velmi závisí na složení fosfolipidů v membráně⁹ a může být specificky regulován přirozenými odpráhujícími proteiny (UCPn). Odpráhující proteiny část energie získávané ze substrátů dýchacího řetězce převádějí na teplo za mírného urychlení respirace, přispívajícího ke snížené tvorbě radikálů¹⁰. Tato dráha neprodukuje protony, je fyziologicky významná a odpovídá za 20 - 25 % bazálního

metabolického energetického výdeje. Uvolnění protonů má několik odlišných funkcí. Jedná se o termogenezi, regulaci energetického metabolismu nebo transport malých uhlíkových molekul, kontrolu tělesné hmotnosti a snižování produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Zatímco neúčinné cyklování protonů je jasně termogenní, bazální vodivost protonů je přítomna v mitochondriích izolovaných z ektotermních a endotermních živočichů¹¹. Což znamená, že energetická rovnováha mezi tokem protonů a jinými kyslík využívajícími procesy je stejná jak v jaterních buňkách z potkanů, tak i z ještěrek¹². Primárním cílem uvolnění protonů tedy není regulace tělesné teploty.

2.1.4 Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)

Reaktivní formy kyslíku zahrnují různé molekuly a volné radikály uvolňované z metabolismu molekulárního kyslíku. Anion superoxidu (O_2^-), produkt jednoelektronové redukce kyslíku, je prekurzorem mnoha ROS a mediátorem v reakcích dýchacího řetězce. Dismutace superoxidu O_2^- poskytuje peroxid vodíku (H_2O_2), který může být postupně plně redukován až na vodu nebo v přítomnosti železnatých či měďnatých iontů vytváří vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($OH\cdot$; cit.¹³). Navíc může superoxid neenzymaticky reagovat s jinými radikály, např. oxidem dusnatým (NO) v reakcích kontrolovaných tokem difúze obou radikálů. Produkt, peroxynitrit ($ONOO^-$), je velmi silný oxidant¹⁴. Oxidanty odvozené od NO se nazývají reaktivní formy dusíku (RNS).

Buňky si na obranu proti škodlivým účinkům ROS vyvinuly obranný mechanismus, který jim umožňuje detoxikovat nebo „vychytávat“ reaktivní částice. Tento ochranný systém je složen z enzymů, které jsou především intracelulární, a z nízkomolekulárních antioxidantů, které jsou lokalizovány uvnitř i vně buňky (tab. I.; cit.¹⁵).

Tabulka I. Antioxidační systémy buňky¹⁵

1. Enzymy (převážně intracelulární)
Superoxid dismutasa: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Glutathion peroxidasa: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Glutathion reductasa: $\text{GSSG} + \text{NAPDH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
Katalasa (lokalizována převážně v peroxizomech): $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
2. Nízkomolekulární antioxidanty (intra- a extracelulární)
Glutathion
Kyselina askorbová
α -Tokoferol
Kyselina močová
3. Ochrana vazbou přechodných kovových iontů
Plasmový transferrin (Fe^{3+}), ferritin (Fe^{3+}), ceruloplasmin (Cu^{2+}),
Intracelulární metalothioneiny (Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+})

Superoxid je reaktivní molekula, která může být přeměněna na peroxid vodíku působením superoxid dismutasy (Mn-SOD v matrix a Cu/Zn-SOD v cytosolu), dále na kyslík a vodu působením katalasy nebo glutathion peroxidasy. Tyto antioxidační systémy ale nejsou perfektní. Superoxidy, které obchází tento systém, poškozují proteiny, lipidy a také přímo DNA. Přestože je peroxid vodíku produkován superoxid dismutasou poměrně nereaktivní, v přítomnosti měďnatých iontů vytváří vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které pak iniciují kaskádu peroxidace lipidů v membránách. Navíc produkty oxidace sacharidů, proteinů a lipidů často působí sekundární poškození proteinů, které tak ztrácí katalytickou funkci a podléhají selektivní degradaci¹⁶. Mitochondriální produkce superoxidů je hlavním zdrojem buněčného poškození (oxidativní stres). Význam produkce superoxidu v mitochondriální matrix byl jasně demonstrován ve dvou různých modelech Mn-SOD knokoutovaných myší, kdy v obou případech došlo po vyřazení Mn-SOD k výraznému zkrácení délky života na 10 dní¹⁷ nebo 3 týdny¹⁸.

Existuje mnoho onemocnění spojených s oxidativní stresem: ateroskleróza, hypertenze, ischemie-reperfuse, zánět, cystická fibróza, rakovina, cukrovka, neurodegenerativní onemocnění. Podle teorie stárnutí působení volných radikálů¹⁹, je postupný pokles buněčné funkce s rostoucím věkem následek poškození buněčných součástí.

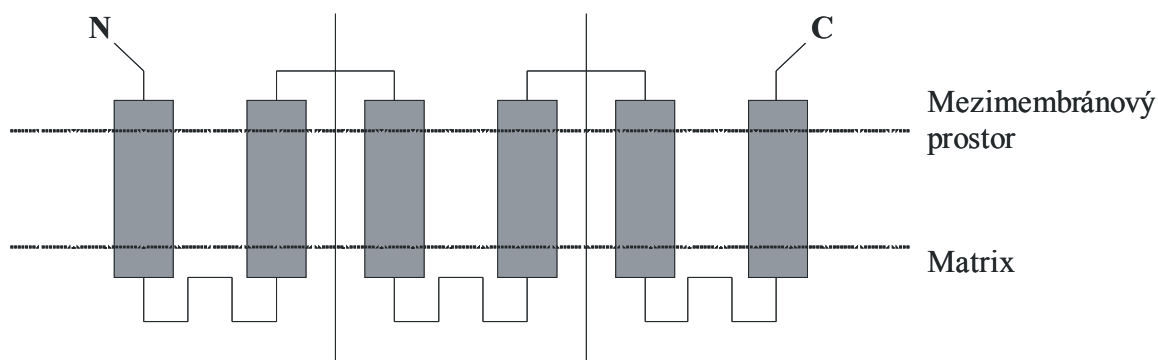
2.2 Odpřahující proteiny (UCP)

Odpřahující proteiny (*uncoupling proteins; UCP*) patří do superrodiny metabolických přenašečů vnitřní mitochondriální membrány²⁰. Zprostředkovávají a regulují uvolnění membránového potenciálu, který je generován dýchacím řetězcem. Tento mechanismus uvolňuje energii a může sloužit k termogenezi, udržení rovnováhy redoxního systému, nebo k redukci produkce ROS.

Odpřahující proteiny jsou přítomné nejen u zvířat a rostlin, ale také u hub a protozoí²¹. Tato široká distribuce naznačuje, že regulace účinnosti oxidativní fosforylace prostřednictvím fyziologického odpřažení může být obecná strategie ochrany buňky.

2.2.1 Charakteristické znaky UCP proteinů

ADP/ATP přenašeč, fosfátový přenašeč, oxoglutarát/malát přenašeč a odpřahující proteiny jsou integrální membránové přenašeče, které patří do stejné superrodiny²⁰. Odpřahující proteiny jsou bazické proteiny s izoelektrickým bodem kolem 9 a molekulovou hmotností 31 - 34 kDa. Jeden z nejcharakterističtějších znaků je jejich trojdílná struktura, přičemž v každé části této struktury se nachází tři stejné oblasti složené ze sta aminokyselin. Všechny oblasti obsahují dva hydrofobní úseky spojené jednou dlouhou hydrofilní smyčkou (obr. 2). Polypeptidový řetězec kříží lipidovou dvojvrstvu šestkrát a amino- a karboxykonec vyčnívají do mitochondriálního mezimembránového prostoru. Dva helixy uvnitř každé oblasti jsou spojené dlouhou hydrofilní smyčkou, která se nachází v matrixové části mitochondrie. Funkční jednotkou je dimer tvořený dvěma identickými podjednotkami²².



Obr. 2. Uspořádání UCP napříč membránou. Šest α -helikálních regionů roztahujících se v lipidové dvojvrstvě, s amino- a karboxykoncelem orientovaným do cytosolu membrány a dlouhá hydrofilní smyčka v matrix. Svislé čáry oddělují části trojdílné struktury (upraveno podle Ledesma a kol.²²).

Mitochondriální transportéry, k nimž se řadí odpřahující proteiny, vykazují obecné vlastnosti typické pro přenašeče: vysoká substrátová specifita a nízké číslo přeměny. Arechaga a kol.²³ zjistili, že odpřahující proteiny mohou působit jako kanály i jako přenašeče. Toto duální chování bylo pozorováno u mnoha jiných přenašečů, což vede k domněnce, že přenašeče a kanály mají společný původ a sdílí základní mechanismus transportu.

2.2.2 Lokalizace a funkce UCP proteinů

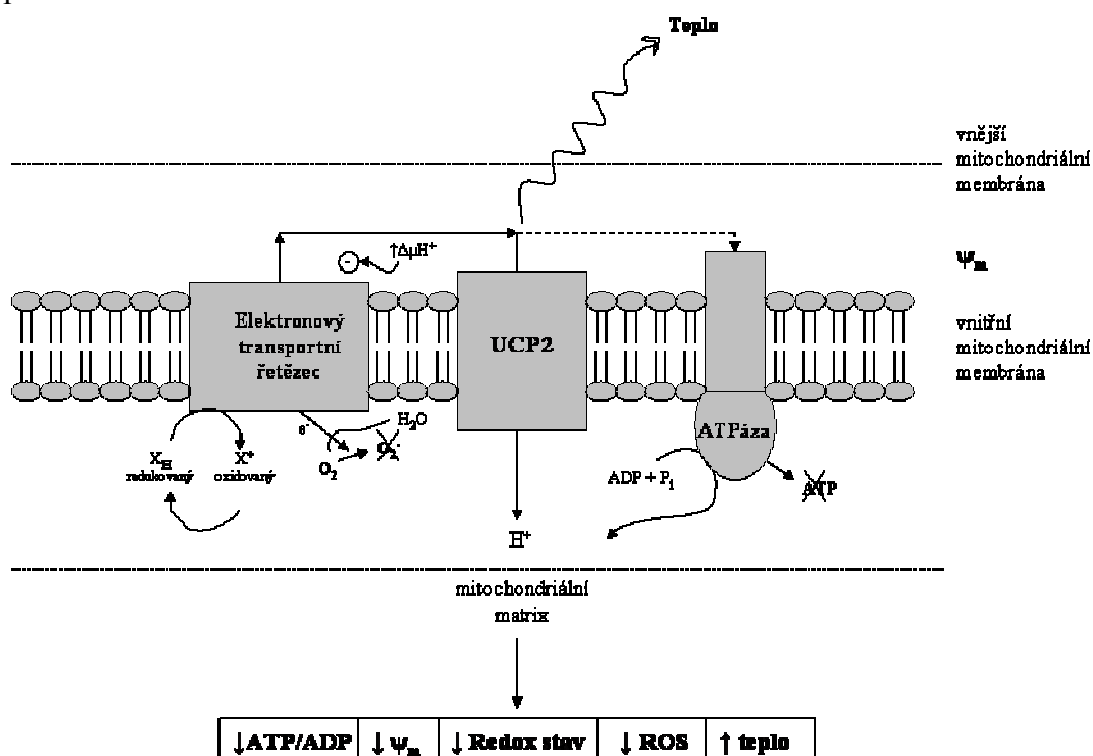
Název rodiny odpřahujících proteinů je odvozen od funkcí prvního známého člena, UCP1, odpřahujícího proteinu z hnědé tukové tkáně. UCP1 byl objeven před čtyřiceti lety a byl dlouhou dobu považován za výsledek unikátní adaptace savčí tkáně na produkci tepla netřesovou termogenezí. K pochopení molekulárního základu termogenetické aktivity je nezbytný proces oxidativní fosforylace (viz. kap. 2.1.3). Termogeneze v hnědé tukové tkáni je dosaženo tím, že UCP1 umožňuje vstup protonů do matrix, čímž odpřáhne dýchání od syntézy ATP (cit.²⁴).

2.2.3 Fyziologická role a význam UCP2

Odpřahující proteiny a odpřažení respirace jsou podle nejnovějších poznatků zapojené v mnoha důležitých fyziologických i patologických procesech (obr. 3). Toto tvrzení podporuje výčet funkcí odpřahujícího proteinu: adaptivní termogeneze^{25,26}, regulace oxidace mastných kyselin^{27,28}, podíl na zánětu²⁹, prevence tvorby ROS^{8,30},

regulační funkce v diabetes mellitus 2. typu³¹, regulace tělesné hmotnosti³², prevence aterosklerózy³³ a stánutí⁸.

UCP2 je homolog velmi dobře známého UCP1 (zvaného také termogenin), který je exprimován především v hnědé tukové tkáni. Tkáňová exprese UCP2 je mnohem širší. Zahnuje pankreatické β -buňky, bílý tuk, srdce, mozek a makrofágy. U fyziologické aktivity UCP2 se uvádí schopnost zprostředkovat transport aniontu volné mastné kyseliny přes membránu³⁴.



Obr. 3. Funkce UCP2 v elektronovém transportním řetězci (upraveno podle Richard a kol.³⁵)

Zapojení UCP2 v zánětu

Zánět je jeden z nejdůležitějších buněčných patofyziologických procesů, do kterého jsou zapojené volné radikály tvořené mitochondriemi. Podle stavu respirace tvoří dýchací řetězec anionty superoxidu, které jsou přeměňovány na peroxid vodíku nebo hydroxylové radikály. Tento proces je podrobně shrnut v kapitole 2.1.4, o reaktivních formách kyslíku³⁶. Dosud publikované výsledky naznačují, že odpřahující proteiny (především UCP2) jsou schopné modulovat mitochondriální produkci ROS³⁷. Expese UCP2 je robustní ve slezině, plicích a v izolovaných makrofázích, což naznačuje význam

UCP2 v imunitních a zánětlivých reakcích²⁹. Výzkum, který se zabýval odpovědí na infekci myši *Toxoplasma gondii* s cíleně vypnutým genem UCP2 (UCP2^{-/-}) prokázal jejich celkovou rezistenci na infekci oproti úmrtím pozorovaným u nemutovaných myší. Makrofágy z UCP2^{-/-} myší produkovaly více kyslíkových radikálů než nemutované myši v reakci na infekci a měli 5 × větší toxoplazmatickou aktivitu *in vitro* ve srovnání s nemutovanými myši. To podporuje význam UCP2 v limitaci produkce ROS a v makrofágy zprostředkované imunitě. Molekulární mechanismus této zvýšené imunitní odpovědi UCP2^{-/-} myší byl navržen na základě nápadně zvýšené aktivace kaskády nukleárního faktoru kappaB, zahrnující I kappaB kinasovou aktivitu a nukleární translokaci jednotky jaderného faktoru kappa B (cit.³⁸). Z těchto výsledků vyplývá, že mitochondriální reaktivní kyslík odvozený od UCP2^{-/-} buněk výrazně aktivuje jaderný faktor kappa B, čímž vzniká „připravený“ stav potenciovat a znásobit zánětlivou reakci na následnou stimulaci. Kromě toho byla zaznamenána snížená exprese UCP2 v imunitních buňkách během jejich aktivace v raném období odpovědi na bakteriální lipopolysacharidy. Během pozdní fáze následovala zvýšená exprese UCP2. Oba tyto kroky nastaly za účelem ochrany všech buněk proti oxidativnímu stresu³⁹. Stejně byl popsán i pokles hladin UCP2 ve vaječnicích během folikulárního růstu, ale zvýšená exprese během předovulačního období. U tohoto procesu jsou známy aspekty zánětlivého procesu⁴⁰, které jsou podloženy experimenty, naznačující přímé spojení přítomnosti a působení UCP2 a regulace zánětlivých případů.

Preventivní funkce UCP2 v ateroskleróze

U pacientů s diabetes mellitus nasvědčuje zvýšený oxidativní stres, především v hladkém svalstvu cév, jeho zapojení v patogenezi intenzivní aterosklerózy. Hlavním faktorem na ROS závislé patogenezi aterosklerózy při diabetických podmínkách a při hypertenzi jsou vysoké hladiny krevní glukosy. Mitochondriální nadprodukce superoxidu indukovaná hyperglykemií, mezi jinými, inhibuje aktivitu eNOS (cit.⁴¹), hlavního regulátoru krevního tlaku. UCP2 je popisován jako důležitý regulátor intracelulární produkce ROS (cit.²⁹), a pravděpodobně by mohl fungovat i jako inhibitor procesu aterosklerózy. Park a kol. (cit.⁴²) potvrdili možnost modifikace aterosklerotických procesů

v hladké svalovině cév ovlivněním vysoké hladiny glukosy po přenosu UCP2 genu adenovirem. Autoři navrhli činitele zvyšující expresi UCP2 ve vaskulárních buňkách jako potencionální preventivní nástroje, které působí proti vývoji a progresi aterosklerózy u pacientů s diabetes a hypertenzí. Protože mechanismus spojení mezi hypertenzí a inzulínovou rezistencí není zcela znám, byl proveden jiný postup: křížení transgenních myší exprimujících UCP1 v kosterních buňkách s letálními žlutými myšmi, označovanými (A(y)/a), geneticky obézními zvířaty známými zvýšeným krevním tlakem⁴³. Krevní tlak a sérový leptin byli nižší u odvozených potomků než u rodičovských myší (A(y)/a). Vysvětlením může být odpřažení respirace, které je za určitých podmínek schopné změnit inzulínovou rezistenci a snížit krevní tlak u geneticky podmíněné obezity. *In vivo* experimenty ukazují, že kontrolované odpřažení respirace by mohlo snížit riziko aterosklerózy u diabetu 2. typu předcházením hypertenze způsobené inzulínovou rezistencí. Pokud byla nediabetickým myším s deficientním receptorem pro LDL (LDLR^{-/-}) transplantována kostní dřev z jiných UCP2 deficientních myší (UCP2^{-/-}) nebo geneticky neupravených (UCP2^{+/+}) myší, bylo zjištěno významné zvýšení aterosklerotického poškození v hrudní aortě i dutině srdeční UCP2^{-/-} transplantovaných myší ve srovnání s kontrolními UCP2^{+/+} transplantovanými myšmi. To koreluje se zvýšeným oxidativním stresem UCP2^{-/-} transplantovaných myší. Tyto výsledky velmi podporují protektivní roli UCP2 proti ateroskleróze³³.

Regulující funkce UCP2 u diabetes mellitus 2. typu

Během oxidace substrátů dochází působením odpřahujících proteinů k redukcí množství ATP. Proto byly UCP proteiny navrhnuty jako kandidátní geny pro lidskou obezitu a diabetes mellitus 2. typu^{31,44}. Kromě velkého množství funkcí navrhovaných pro UCP2 (kontrola syntézy ATP, regulace metabolismu mastných kyselin, kontrola produkce ROS) se o tomto odpřahujícím proteinu hovoří jako o regulátoru sekrece inzulínu v pankreatických ostrůvcích. Při mapování genu UCP2 bylo zjištěno spojení mezi obezitou a hyperinsulinemií. UCP2 gen je *in vivo* pod kontrolou mastných kyselin a thyroidních hormonů, což vede ke ztrátě funkce β -buněk u diabetes^{45,46}. Hyperlipidemie navozená podáváním stravy s vysokým obsahem tuku ovlivňovala sekreci inzulínu

v ostrůvcích mechanismem, což následně může modulovat expresi UCP2⁴⁷. Další experimenty prokázaly rezistenci vůči obezitě navozené dietou u geneticky upravených myší nadprodukujících různé typy UCP homologů³². Navíc polymorfismus -866G/A v genu UCP2 zvyšující jeho transkripci, byl spojen se zvýšeným rizikem diabetes mellitus 2. typu u obézních subjektů. Expresie mRNA UCP2 signifikantně korelovala s inzulínovou rezistencí^{48,49}. V případě UCP2 knokautovaných myší byla exprese UCP2 v β -buňkách za lipotoxických podmínek zvýšena, což dokazuje snížení sekrece inzulínu^{31,50}.

UCP2 a vznik ROS, buněčné stárnutí a apoptosa

Oxidativní stres a mitochondriální dysfunkce jsou spojené s onemocněním a stárnutím. Oxidativní stres, nebo-li peroxidace fosfolipidů membrán a produkce reaktivních aldehydů, je výsledek zvýšené produkce ROS pocházejících z dýchacího řetězce³⁰. Podle teorie stárnutí je oxidativní poškození mitochondriálními ROS hlavní příčinou buněčného rozpadu, apoptosy, během stárnutí. Ve starých buňkách je mitochondriální membránový potenciál nižší z důvodu pomalejší respirace a tyto změny navozují apoptosu⁵¹. UCP proteiny stimulují respiraci snížením potenciálu membrány, což vede přímo k úbytku tvorby ROS a ke snížení frekvence vzniku apoptosy^{30,51}. Tento ochranný proces zprostředkovaný UCP proteiny je znám jako „mírné odpražení“ oxidativní fosforylace. V dostupné literatuře je UCP2 popsán jako potencionální modulátor mitochondriální tvorby ROS (H_2O_2 a OH^- radikálů)³⁷. To podporuje protektivní roli UCP2 v buněčných patofyziologických procesech způsobených volnými radikály, jako je oxidativní poškození, zánět nebo apoptosa^{8,52}. Všechna aktuální data potvrzují fakt, že UCP proteiny samy o sobě nemohou způsobit apoptosu. Mezi jednotlivými typy UCP proteinů existují specifické rozdíly vedoucí buď k protektivním účinkům, nebo účinkům vyvolávajícím buněčnou smrt. Například neurony a jejich synaptická zakončení jsou chráněna specifickým UCP4. Neuronální exprese UCP2 naopak způsobuje dysfunkci a apoptotickou smrt mechanismem potlačení produkce oxyradikálů a stabilizace homeostasy buněčných hladin vápníku^{53,54}. Buněčná linie transfekovaná UCP byla citlivější na stimulaci apoptosy vyšším poměrem Bax/Bcl-2,

významným apoptotickým ukazatelem. Přítomnost UCP proteinů, v tomto případě UCP3, zvyšuje citlivost buněk k apoptotickým stimulům zahrnujícím mitochondriální dráhy⁵⁵.

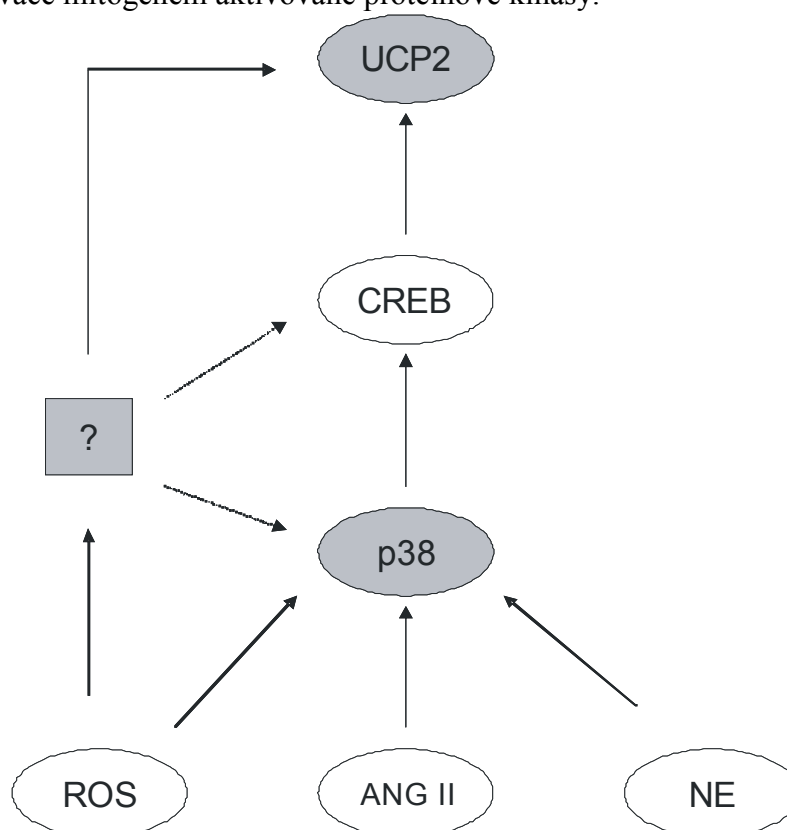
Ve studii, která se zabývala detekcí výskytu změn exprese UCP2 ve vztahu k věku, byly nalezeny tkáňově specifické změny genové exprese proteinů UCP2 a UCP3⁵⁶. Pozorovaná zvýšená exprese UCP2 ve stárnoucích játrech limitovala produkci ATP a byla spojena se změnami mitochondriální genové exprese u starších zvířat. *In vivo* pozorovaný pokles aerobní kapacity kosterního svalstva s pokročilým věkem u lidí byl interpretován jako následek dramatické redukce obsahu UCP3 spojené s poklesem odprážené respirace mitochondrií kosterního svalstva⁵⁷. Zvýšená produkce volných radikálů může přispívat k metabolické úlevě při stárnutí. Data naznačují potencionální roli UCP proteinů jako tkáňově specifických regulátorů tvorby mitochondriálních ROS a producentů ATP během apoptotického procesu a buněčného stárnutí.

Zapojení p38 do regulace exprese UCP2

Současná literatura přisuzuje mitogenem aktivované proteinové kinase p38 (*MAPK, mitogen activated protein kinase*) významnou roli. Tato dráha je velmi dobře charakterizovaná jako kaskáda postupných fosforylací proteinu vedoucí ke zvýšené expresi různých genů jako odpověď na působení růstových faktorů a mitogenů. Aktivita p38 je spojována se srdeční odpovědí na ischemicko-reperfusní poškození a ischemickou prekondíci. Závěry prací, které se touto otázkou zabývají, jsou ovšem velmi rozporuplné. Dřívější studie prokázaly přínos aktivace p38^{58,59}, zatímco pozdější práce pravý opak^{60,61}.

Byl předložen návrh regulace exprese UCP2 kinasou p38, která je zprostředkovaná přes CREB - faktor přežití kardiomyocytů po ischemické epizodě (obr. 4; cit.⁶²). Zatímco p38 odpovídá na širokou škálu stimulů, je pravděpodobné, že UCP2 má v pro/anti-apoptické signalizaci mnohem obecnější roli. Zapojení p38 v regulaci UCP2 je zřejmé ze stimulů způsobujících fosforylací p38 a její následnou aktivaci, kterými jsou angiotensin II a norepinefrin. Angiotensin II nepodněcuje pouze vznik apoptosy v kardiomyocytech, ale vykazuje širší škálu protektivních funkcí⁶³. Norepinefrin je známý induktor exprese UCP2⁶⁴. Aktivace p38 je rozhodující pro přežití buněk v hybernujícím myokardu u modelu prasete⁶⁵.

Spojení mezi p38, UCP2 a ROS prokázaly dvě studie. Selimovic a kol.⁶⁶ potvrdili zapojení mitochondrií v taxolem indukované signalizaci ROS. V buňkách melanomu byla exprese proteinu UCP2 snížena taxolem prostřednictvím aktivace MAP kinásových drah JNK a p38. Emre a kol.⁶⁷ navrhli model, ve kterém je exprese UCP2 snížena reakcí s lipopolysacharidem (LPS) v kultuře makrofágů odvozených od kostní dřeně, a to přes dráhy JNK a p38. Byl předložen důkaz o významné roli UCP2 jako regulátoru mitochondriální produkce ROS, přičemž tato signalizace vede v časném stádiu k aktivaci makrofágů. Snížená exprese UCP2 je nezbytná ke zvýšení mitochondriální produkce ROS a znásobení aktivace mitogenem aktivované proteinové kinasy.



Obr. 4 Návrh zapojení p38 do regulace exprese UCP2. Kinasa p38 je aktivována mnoha stresy a zánětlivými cytokiny. Angiotensin II (ANG II) aktivuje p38 kinasu a zvyšuje tvorbu ROS. p38 kinasa je aktivovaná norepinefrinem (NE) v cévách. Transkripční faktor cAMP responsivní element vázající protein (CREB) váže DNA a aktivuje transkripci v reakci na extracelulární stimuly. Aktivace p38 je nepostradatelným krokem v transkripci UCP2 genu.

2.2.4 Význam UCP2 v kardioprotekci

Ischemicko-reperfusní poškození srdce vede ke strukturním změnám v srdečním svalu později následované funkčním selháním v důsledku postupného nahrazení myocytů fibroblasty. Ochrana proti ischemickému poškození je v současné době intenzivně studována v srdci a mozku. Jedním z účinných endogenní způsobů ochrany je ischemická prekondice. V srdci i mozku je ischemická tolerance indukovaná prekondíci spojená s mírným odpřažením mitochondriálního dýchacího řetězce. UCP2 byl navržen jako fyziologický analog chemických odpřahovačů v procesu kardioprotekce. Morfologické změny v mitochondriální síti pravděpodobně doprovází odpřažení s mitochondriálním štěpením tlumící signály vedoucí ke smrti kardiomyocytů.

Existují četné důkazy, že UCP2 zmírňuje mitochondriální produkci ROS¹⁰. Toto snížení doprovázené zvýšenou expresí UCP2 je považováno za základ ischemické tolerance pozorované u kardiomyocytů vystavených ischemické prekondíci⁶⁸. V potkaních kardiomyocytech, zvýšená exprese UCP2 poskytuje toleranci k oxidativnímu stresu zredukováním mitochondriálního přehlcení Ca²⁺ a redukcí vzniku ROS⁶⁹. Navíc může být UCP2 zapojeno přímo v regulaci mitochondriálního příjmu Ca²⁺, čímž usnadňuje vnímavost buňky k signalizaci vápníku⁷⁰. UCP2 má rovněž cytoprotektivní účinky v mozku, kde hraje významnou roli v modulaci neuronální tolerance k ischemickému stresu (shrnutí v Andrews a kol.⁷¹).

Mírné odpřažení způsobené UCP2 je pravděpodobně určené ke snížení produkce ROS velkým zvýšením protonového gradientu, v případě nedostupnosti ADP (podmínky vysokého poměru ATP/ADP). Vysoké hladiny ROS byly pozorovány v makrofázích myši bez přítomného genu UCP2 (UCP2^{-/-}). Došlo ke zvýšení mitochondriálního poškození v důsledku oxidativního stresu a naopak ke zlepšení antibakteriálních vlastností²⁹. Vystavení oxidativnímu stresu zvyšovalo regulaci UCP2 v klonálních β-buňkách⁷². To koresponduje s pozorováními snížené exprese UCP2 při snížení oxidativního stresu.

Hladina proteinu UCP2 je zvýšena v selhávajícím lidském srdci⁷³. UCP2 zvyšuje citlivost dospělých potkaních kardiomyocytů k ischemicko-reperfusnímu poškození⁷⁴ a je kandidátním genem korelujícím s vývojem β-adrenergní stimulací indukovanou kardiomyopatií⁷⁵. Antioxidanty mohou snížit expresi UCP2 limitací oxidativního stresu,

ale mohou mít i opačný účinek. Tempol, zástupce nitrooxidů a účinný antioxidant, zvyšuje hladiny UCP2 v srdci⁷⁶, zatímco ederavon, silný vychytávač volných radikálů, brání zvýšené expresi UCP2 působením isopropanolu⁷⁷.

2.2.4.1 Polyfenoly - antioxidanty a odpřahovače

Polyfenoly jsou skupinou látek obsahující několik hydroxylových skupin navázaných na aromatický kruh, čímž vytváří velmi rozličnou skupinu sloučenin přítomných v naší stravě⁷⁸. Různorodost polyfenolů spočívá v rozličné biologické aktivitě. Obecně však platí, že většina polyfenolů vykazuje antioxidantní aktivitu⁷⁹.

Do organismu se polyfenoly vstřebávají v tenkém (aglykony) nebo tlustém střevě (polyfenoly ve formě esterů, glykosidů nebo polymerů), kde jsou předtím hydrolyzovány enzymy nebo střevní mikroflórou. Většina polyfenolů prochází stěnou střevní sliznice pasivní difúzí a některé jsou transportovány ve formě glykosidů membránovými přenašeči. Rychlost a rozsah intestinální absorpce je závislá na jejich chemické struktuře. Nepřímým důkazem jejich absorpce v organismu je antioxidantní kapacita plasmy a přímým je stanovení koncentrace polyfenolů v plazmě a moči po jejich podání⁸⁰.

Polyfenoly působí jako antioxidanty různými mechanismy a mají schopnost vychytávat ROS/RNS jako OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO^\cdot nebo OONO^\cdot . Jedná se o:

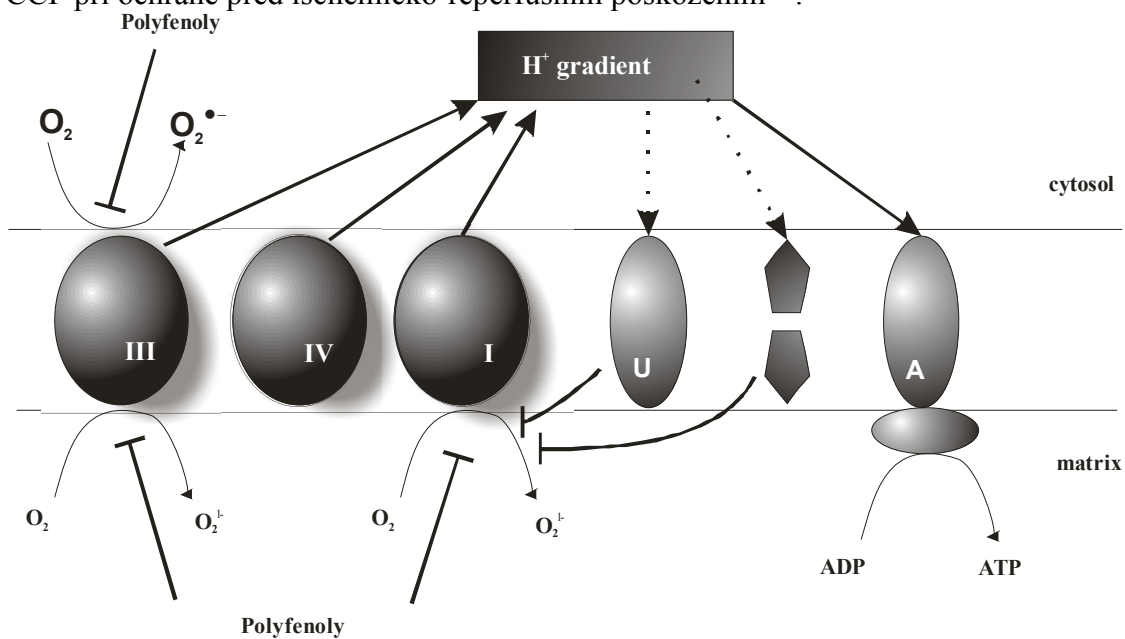
1. Zejména flavonoidy, ale i jiné polyfenoly, inhibují aktivitu enzymů produkujících volné radikály (proteinkinasa C, xantinoxidasa, cyklooxygenasa, lipoxygenasa, cit.⁷⁹).

2. Mnohé polyfenoly (např. katechol, galol) mají schopnost chelatovat kovy (měď a dvojmocné železo), které se účastní tvorby ROS ve Fentonově reakci⁸¹.

3. Některé polyfenoly snadno podléhají oxidaci (látky s nízkou hodnotou redoxního potenciálu) a redukují superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový radikál⁸². Při reakci poskytují vodík přičemž samy tvoří málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury.

Lze očekávat, že polyfenoly mohou pronikat nejen do buňky, ale i do mitochondriální matrix a zde se podílet na odstraňování ROS z membrány.

Polyfenoly jsou slabé kyseliny a v závislosti na struktuře se mohou chovat jako chemické odpřahovače (obr. 5). Např. galangin, 3,5,7-trihydroxyflavon, se chová jako odpřahovač⁸³. V ochraně před peroxidací lipidů byla efektivnější nižší koncentrace galanginu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) než koncentrace vyšší ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), což připomíná efektivitu FCCP při ochraně před ischemicko-reperfusním poškozením⁸⁴.



Obr. 5. Návrh funkce polyfenolů - odpřahovače oxidativní fosforylace⁸⁵. Schématické znázornění dýchacího řetězce ukazuje tvorbu protonového gradientu ve vnitřní mitochondriální membráně. Komplexy I, II a IV vystřelují protony do mezimembránového prostoru, odkud vstupují zpět přes ATP-asu za vzniku ATP. Alternativním vstupem je odpřahující protein 2 (označen U). Dalším alternativním vstupem protonů jsou chemické odpřahovače, kam zahrnujeme i polyfenoly (zde znázorněné dvěma pětiúhelníky).

Polyfenoly jsou také schopné inhibovat tvorbu superoxidů díky jejich antioxidační aktivitě.

Polyfenoly však mohou ovlivňovat tvorbu ROS také nepřímo modulací signálních a metabolických drah v buňce. Protože jsou polyfenoly velmi slabými kyselinami, pronikají mitochondriální membránou ve formě iontu nebo neiontové sloučeniny, podobně jako je tomu u DNP a jeho derivátů⁸⁶. V tom případě se polyfenoly chovají jako odpřahovače a ovlivňují membránový potenciál. Vliv na membránový potenciál mitochondrií už byl zaznamenán u galanginu⁸³ a kvercetinu⁸⁷. Kromě antioxidačních a odpřahujících vlastností ovlivňují polyfenoly mitochondriální retikulární morfologii. Resveratrol zvyšuje počet mitochondrií, které mohou podporovat vyšší

rezistenci mitochondriálního retikula tím, že jej brání před ischemicko-reperfusioním poškozením⁸⁸. Přítomnost nízké koncentrace polyfenolů ve stravě vede k odprážení oxidativní fosforylace. Tím dojde k ovlivnění hladiny ROS a zvyšuje se četnost přežití kardiomyocytů po ischemicko-reperfusioní příhodě. Mechanismus působení však může být velmi odlišný počínaje cyklováním v membráně, jako je tomu u mastných kyselin s dlouhým řetězcem⁸⁹, nebo působením na některé z mitochondriálních proteinů⁸⁷. Celkově vznikla hypotéza o duálním působení některých polyfenolů, které kromě přímé interakce s ROS (vychyťování) způsobují mírné odprážení oxidativní fosforylace, přičemž této biologické aktivity mohou dosahovat v nízkých koncentracích detekovaných v lidské plasmě⁸¹.

2.3 Apoptosa

Vyvážený vývoj mnohobuněčného organismu vyžaduje nejen genetický program regulace buněčného dělení a buněčné proliferace, ale i buněčné smrti. Vedle patologické buněčné smrti, označované nekrosa, existuje i taková smrt buňky, ke které dochází za zcela fyziologických podmínek prostředí. V případě této fyziologické buněčné smrti se jedná o apoptosu neboli programovanou buněčnou smrt. Vyplývá z potřeb organismu na eliminaci příslušné buňky a buňka se při tomto procesu aktivně účastní svého zániku - sebevraždy na základě genetické informace. Apoptosa je evolučně zakonzervovaný mechanismus, vzniklý za účelem odstranění buněk, které jsou nadbytečné nebo které ukončily svou základní úlohu. Apoptosa může být spuštěna genetickým programem buňky nebo mezibuněčnými signály (proteiny, cytokiny a hormony). Rovněž ji mohou vyvolat faktory prostředí, které buňku poškozují, např. záření, oxidativní stres, hypoxie a viry⁹⁰.

Kombinace apoptosy a buněčné proliferace je odpovědná za formování tkání a orgánů ve vývoji embryí. Vedle účasti při zajišťování tkáňové homeostázy se podílí i na eliminaci buněk, které jsou potencionálně nebezpečné, poškozené, nefunkční nebo abnormální (s poškozenou DNA, infikované viry, atd.). Apoptosa je považována za důležitý mechanismus obrany organismu proti proliferaci nežádoucích buněk⁹¹.

Významnou úlohu má apoptosa v imunitním systému. T-lymfocyty jsou buňky imunitního systému odpovědné za destrukci infikovaných nebo poškozených buněk v těle. Apoptosa se zde uplatňuje při negativní selekci B- i T-buněk včetně indukce

a udržování imunologické tolerance. Cytotoxické T-lymfocyty a nukleové kyseliny buňky používají indukci apoptosy při usmrcování cílových buněk. Některé patologické stavy jsou spojené s apoptosou (Alzheimerova choroba, infarkt myokardu). Deregulace apoptosy je spojována se vznikem některých typů nádorových onemocnění, přičemž indukce apoptosy zde má rozhodující úlohu při terapii nádorových onemocnění⁹².

Apoptosa se vyznačuje charakteristickými morfologickými rysy. Oproti nekrose je charakteristickým rysem apoptosy časná degradace DNA, zatímco plazmatická membrána zůstává intaktní. Dochází ke srašťování buněk, změně tvaru plasmatické membrány, kondenzaci chromatinu a fragmentaci jaderné DNA. V závěrečné fázi pak z apoptotické buňky vznikají plazmatickou membránou ohraničené váčky, které obsahují cytoplazmu, intaktní organely a rozporcovaný jaderný materiál. Tyto vezikuly se označují jako apoptotická tělíška. V organismu jsou apoptotická tělíška rychle rozpoznána a dochází k jejich fagocytóze makrofágy i jinými buňkami. Z tohoto důvodu není apoptosa na rozdíl od nekrosy doprovázena zánětlivou reakcí⁹³.

2.3.1 Kaspasy

Klíčovou událostí spouštěcího mechanismu apoptosy je aktivace cytoplazmatických proteas - kaspas. Kaspasy patří do rodiny enzymů známých jako cysteinové proteasy a v buňce se vyskytují jako inaktivní proformy nebo zymogeny. Tyto zymogeny mohou být štěpeny na aktivní enzymy vyvolávající indukci apoptosy. Všechny obsahují vysoce homologní proteasovou doménu a také NH₂ terminální prodoménu (podjednotku). Proteasová doména je složena ze dvou podjednotek, které asociují a tvoří heterodimer vstupující do proteolytického procesu. Dva heterodimery tvoří tetramer, což je aktivní forma kaspasy⁹⁴. NH₂ koncová doména má různou délku podle funkce dané kaspasy.

Termín kaspasa označuje dvě klíčové charakteristiky těchto proteas: jsou to cysteinové proteasy využívají cystein jako nukleofilní skupinu pro odštěpení substrátu a jsou to ASPasy, které štěpí peptidovou vazbu na C-konci zbytku kyseliny asparagové⁹⁵. Fakt, že kaspasy hrají esenciální roli v apoptose, je založeno na třech poznacích. Za prvé, syntetické nebo přirozené inhibitory kaspas efektivně zabraňují apoptose indukované rozličnými apoptotickými stimulanty. Za druhé, nepřítomnost některých živočišných kaspas vede k vážným defektům v apoptose. A za třetí, kaspasy jsou odpovědné za většinu proteolytických štěpení, které vedou k apoptose⁹³.

Dnes je známo nejméně čtrnáct savčích kaspas (kaspasa 1 až 14), u člověka zatím nejsou známy všechny homology. Jejich přesný cíl a fyziologická role zatím není ve všech případech objasněna. Z funkčního hlediska lze kaspasy rozdělit do tří skupin: iniciační, efektorové a zánětlivé. Do skupiny iniciačních kaspas patří kaspasa 2, 8, 9 a 10. Do skupiny efektorových kaspas patří 3, 6 a 7. Aktivace kaspas má většinou charakter aktivační kaskády. Efektorové kaspasy štěpí substráty smrti.

Iniciační a zánětlivé kaspasy mají prodoménu dlouhou (více než 100 aminokyselin), zatímco efektorové kaspasy ji mají krátkou (méně než 30). Dlouhé prodomény obsahují specifické motivy nezbytné pro kaspasovou aktivitu. Mohou to být DED (*death effector domains*) u kaspas 8 a 10, nebo CARD (*caspase recruitment domains*) u kaspas 1, 2, 4, 5, 9, 11, 13 a 14 (cit.⁹³). Kaspasy obsahující DED (8 a 10) jsou iniciační, CARD kaspasy jsou iniciační (2 a 9) i efektorové (ostatní).

2.3.2 Mechanismy indukce apoptosy

Existuje mnoho mechanismů, kterými může být apoptosa indukovaná. Citlivost buněk na některé z těchto stimulů závisí na mnoha faktorech včetně exprese pro- nebo antiapoptotických proteinů (Bcl-2 proteiny, inhibitory proteinů apoptosy), na vlastnostech stimulů a fázi buněčného cyklu. Apoptotické signály lze rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenní apoptotické signály představují působení reálných signálních molekul. Hlavním endogenním apoptotickým signálem je aktivace proteinu p53 v důsledku poškození DNA⁹⁶.

V některých případech zahrnují apoptotické stimuly signály způsobující navázání ligandů indukujících smrt na receptory buněčného povrchu (tzv. receptory smrti - DR receptory). Tyto ligandy mohou být buď rozpustnými faktory nebo mohou být exprimovány na povrchu buňky jako jsou cytotoxické T-lymfocyty⁹⁷.

V jiném případě může být apoptosa iniciována vnějšími signály, které jsou produkovány dalšími buněčnými stresy. Mezi tyto stresy patří vystavení radiaci nebo chemikáliím nebo virové infekci. Stres může být i následkem nedostatku růstových faktorů nebo oxidativního stresu vzniklého působením volných radikálů. Obecně vnější signály iniciují apoptosu zapojením mitochondrií⁹⁸.

2.3.2.1 Role proteinů rodiny Bcl-2

Členové rodiny Bcl-2 intracelulárních proteinů patří mezi esenciální zprostředkovatele buněčného přežití a apoptosy. Jejich klasifikace je spojena s přítomností či absencí BH (*Bcl-2 homology*) domén, které umožňují jejich vzájemnou vazbu a tvorbu homo- a heterodimerů. Byly popsány čtyři domény, BH1 až BH4. Některé proteiny jsou antiapoptotické (Bcl-2 a Bcl-XL), jiné jsou proapoptotické (Bad, Bax nebo Bid). Homodimery Bcl-2 brání spuštění apoptosy, zatímco homodimery Bax-Bax ji spouštějí^{99,100}. Citlivost buněk na apoptotické stimuly závisí na rovnováze mezi pro- a antiapoptotickými Bcl-2 proteiny. Jestliže je přebytek proapoptotických proteinů, buňky jsou citlivější k apoptose. V případě přebytku antiapoptotických proteinů jsou buňky rezistentnější. Přebytek proapoptotických Bcl-2 proteinů na povrchu mitochondrií je důležitý pro tvorbu PT (*permeability transition*) pórů^{101,102}.

Proapoptotické Bcl-2 proteiny se často nacházejí v cytosolu, kde působí jako senzory buněčného poškození nebo stresu. Působením buněčného stresu se rozmístí po povrchu mitochondrií, kde se nachází antiapoptotické proteiny. Tato interakce mezi pro- a antiapoptotickými proteiny přeruší normální funkci antiapoptotických Bcl-2 proteinů, což vede k tvorbě pórů v mitochondriích a k uvolnění cytochromu *c* a jiných proapoptotických molekul z mezimembránového prostoru. Důsledkem je tvorba apoptosomu a aktivace kaspasové kaskády¹⁰³.

Uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií je důležité zejména v případě indukce apoptosy. Jakmile dojde k uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, je schopný interagovat s proteinem Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*). Následuje převedení prokaspasy 9 na multiproteinový komplex s cytochromem *c* a Apaf-1, tzv. apoptosom. Tvorba apoptosomu vede k aktivaci kaspasy 9 a indukci apoptosy (obr. 7; cit.¹⁰⁴).

2.3.2.2 Vnitřní signalizace

Mitochondrie hrají významnou roli v regulaci buněčné smrti. Obsahují mnoho proapoptotických proteinů jako je AIF (*apoptosis inducing factor*), Smac/DIABLO a cytochrom *c*, které se po určitém stimulu následně uvolňují. Jeden z rozhodujících kroků v mitochondriích je změna permeability mitochondriálních membrán.

a cytochromu *c* z mitochondrií⁹⁸. Cytochrom *c*, lokalizovaný v mezimembránovém prostoru, je uvolněn do cytosolu, kde interaguje s Apaf-1, ATP/dATP a kaspasou 9 a vytváří spolu apoptosom¹⁰⁶. Apaf-1 je normálně vázán v komplexu s antiapoptotickým proteinem rodiny Bcl-2 ukotveným na mitochondriální membráně. Apaf-1 obsahuje CARD doménu, která zprostředkuje interakci s kaspasou 9¹⁰⁷.

Zároveň má doménu WD-40, která zajišťuje inaktivitu proteinu v nepřítomnosti cytochromu *c*¹⁰⁸. V přítomnosti cytochromu *c* a ATP/dATP se Apaf-1 agreguje a váže kaspasu 9, ta proteolyticky aktivuje prokaspasu 9 a dále pak aktivuje kaspasy 3 a 7. Jejich dalším působením dochází k buněčné smrti (obr. 7.; cit.^{96,105}).

Inhibitory apoptotických proteinů (IAP), jako je XIAP, c-IAP1 a c-IAP2, se mohou efektivně vázat a inhibovat procesy kaspasy 3 a 9. Funkční jednotkou uvnitř každého inhibitoru IAP je tzv. BIR doména (*baculovirus IAP repeat*). XIAP, třetí BIR doména (BIR3), silně inhibuje aktivitu kaspasy 9, zatímco spojená oblast mezi doménami BIR1 a BIR2 je selektivně zaměřená na kaspasu 3¹⁰⁹. V buňkách, které podléhají apoptose, jsou kaspasy uvolněny z IAP blokády v procesu, který je pravděpodobně proveden proteinem nazývaným Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases/ direct IAP-binding protein of low isoelectric point*; cit.^{110,111}). Smac/DIABLO je syntetizován jako prekurzor o 239 aminokyselinách, který se váže na mitochondrie svou N-terminální doménou. V reakci na různé stimuly je tento protein uvolněn do cytosolu, kde se váže k BIR doménám proteinů IAP, čímž odstraní jejich inhibiční účinek na aktivitu kaspas¹¹². Např. když se Smac váže na XIAP, předchází vazbě na kaspasu 9, a tak napomáhá smrti po UV ozáření¹¹³.

Krátce před tím, než byl cytochromem *c* identifikován jako mitochondriální aktivátor cytosolických kaspas, Zamzami a kol.¹¹⁴ popsali bioaktivitu faktoru AIF (*apoptosis-inducing factor*), který indukuje apoptosu nezávisle na kaspasách¹¹⁵. Prekurzor AIF je protein o velikosti 67 kDa tvořený třemi doménami: N koncovou doménou (nese doménu MLS sekvenci), centrální oddělovací sekvencí a C koncovou částí (podobnost k bakteriálním oxidoreduktasám). Po apoptotickém stimulu se AIF translokuje do cytosolu a jádra, kde indukuje kondenzaci chromatinu a částečnou fragmentaci DNA.

Protože dokáže trvale vázat FAD, spadá AIF do kategorie flavoproteinů. V kooperaci s dalšími faktory pravděpodobně spouští apoptosu nezávisle na kaspasách^{105,96}.

2.3.2.3 Vnější signalizace

Receptory smrti

DR receptory buněčného povrchu (*death receptors*) patří do superrodiny receptorů tumor nekrotizujícího faktoru. Přenášejí jejich apoptotický signál vazbou smrtících ligandů. Tyto receptory, komplexy ligandů, iniciují apoptotickou kaskádu během vazby sekundárního ligandu a mohou vyvolat apoptotickou buněčnou smrt během několika hodin¹¹⁶. Nejlépe jsou charakterizovaní členové rodiny Fas (známé také jako Apo1 a CD95)¹¹⁷ a TNFR1¹¹⁸. Dalšími členy superrodiny TNFR jsou DR3, DR4, DR5 a DR6. Tyto transmembránové receptory typu 1 jsou charakteristické extracelulárními doménami bohatými na cystein (CRD) a intracelulárními doménami smrti (DD; *death domains*). Vážou příslušné ligandy a tyto komplexy pak spouští velmi rychlou apoptotickou kaskádu.

Fas/FasL indukovaná apoptosa

Pro determinaci a realizaci imunitní odpovědi má zásadní význam intercelulární reakce zprostředkovaná ligandem Fas (FasL) a specifickými transmembránovými receptory Fas.

Protein Fas (APO-1 nebo CD95) je zastoupen v řadě tkání. Nejvíce je exprimován v srdci, brzlíku, játrech a ledvinách¹¹⁹. Patří do rodiny receptorů TNF, které mají v extracelulární části 3 - 6 opakování vysoce konzervované domény bohaté na cystein. Ligand pro Fas (FasL nebo CD95L), exprimovaný takřka výhradně v aktivovaných T-buňkách¹²⁰, aktivuje apoptosu podobně jako TNF receptor. Vazba ligandu podporuje shlukování receptoru, tvorbu DISC, smrt-indukujícího signálního komplexu (*death inducing signaling complex*), obsahující Fas, FasL, FADD a kaspasu 8 nebo 10, a aktivaci apoptotické signální dráhy¹²¹. Signalizace přes Fas je poněkud jednodušší než přes TNF receptor. Spojení Fas a FasL navozuje vazbu cytosolového adaptačního proteinu FADD (*Fas-associated death domain protein*; také zvaný MORT1), který může být na Fas

receptoru přímo změněn na doménu smrti, aniž by vyžadoval předchozí přeměnu TRADD (*TNFR-associated death domain*)¹²². Fas receptor je navíc schopný aktivovat pouze apoptosu a nemá význam v jiných aspektech buněčné signalizace jako TNF receptor.

Signalizace receptorem TNF

Buněčná signalizace zprostředkovaná tumor nekrotizujícím faktorem představuje druhou hlavní dráhu DR receptoru. TNF je produkován převážně T-buňkami a aktivován makrofágy jako reakce na infekci^{123,124}. Signální transdukce je zprostředkována pomocí dvou povrchových receptorů, TNFR1 zprostředkovává cytotoxicitu a TNFR2 proliferaci T buněk¹²⁵.

Membránově vázaný TNF se váže preferenčně na TNFR2, nicméně bylo prokázáno, že ligand přechází z TNFR2 na TNFR1¹²⁶. Aktivace jeho receptoru TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) může mít několik účinků. V některých buňkách vede k aktivaci NF- κ B a AP-1, které indukují široké spektrum genů. V jiných buňkách může TNF také indukovat apoptosu, ačkoli vazba ligandu na receptor je jen vzácně schopna sama iniciovat apoptosu, jako v případě vazby na Fas ligand. Vazba TNF α na TNFR1 receptor má za následek trimerizaci a uzavření intracelulární domény smrti. Následuje vazba na intracelulární adapter tzv. TRADD doménu interakcí mezi doménami smrti¹²⁷. TRADD má schopnost měnit mnoho proteinů na aktivní receptory a může se spojovat s FADD, TRAF2 (*TNF receptor associated factor-2*) a RIP (*receptor interacting protein*). Interakce s FADD vede k indukci apoptosy přeměnou a štěpením prokaspasy 8. Přeměna TRAF2 působením TRADD může způsobit aktivaci nukleárního faktoru κ B (NF κ B) a JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). K této aktivaci dochází interakcí s TNFR2 nezávislou na TRADD. Oproti aktivaci JNK působením Fas, není tato aktivace spojená s indukci apoptosy. Aktivace NF κ B vyžaduje interakci mezi RIP a TRAF2. RIP interaguje s esenciálním modulátorem NF κ B (NEMO), komponentou inhibitoru komplexu kinasy κ B (IKK; cit.¹²⁸).

Indukce apoptosy TRAIL

V mnoha ohledech je TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*; také *Apo2L*) podobný FasL. Jedná se o transmembránový protein typu II exprimovaný ve většině lidských tkání¹²⁹. Na TRAIL se specificky vážou 4 DR receptory: DR4, DR5, DcR1 a DcR2¹³⁰. Tyto receptory jsou stejně jako TRAIL exprimovány v mnoha tkáních. I přes toto zjištění se ukázalo, že TRAIL vykazuje selektivní toxicitu k rakovinným buňkám¹³¹. Vazba TRAIL na jeho receptory DR4 nebo DR5 spouští rychlou apoptosu v mnoha buňkách. Existují zde také tzv. receptory „návnady“ (*decoy receptors*), DcR1 a DcR2, které soutěží s DR4 a DR5 o vazbu na TRAIL. Oba tyto receptory jsou sice schopné kompetice, ale vazba ligandů těchto receptorů neinicuje apoptosu¹³¹.

2.4 CIDEa

Metabolická onemocnění zahrnující obezitu, hyperlipidemii, inzulinovou rezistenci, jaterní steatózu a hypertenzi patří do skupiny onemocnění spojených s metabolickou poruchou a nevyváženou energetickou homeostázou. Velký význam v těchto procesech hrají mitochondrie. Tzv. CIDE proteiny jsou proteiny indukující buněčnou smrt pomocí tzv. DFF45 efektorů, mezi které patří CIDEa, CIDEb a Fsp27 (také CIDEc). Jsou převážně exprimované v hnědé tukové tkáni¹³², játrech¹³³ a bílé tukové tkáni^{132,134,135}. U CIDE protein deficientních zvířat bylo prokázáno, že tato třída proteinů hraje významnou roli při ukládání tuků, tvorbě lipidových kapiček, lipolýze a při vývoji obezity, diabetes a jaterní steatózy¹³⁶.

2.4.1 Tkáňová distribuce a transkripční regulace CIDEa proteinu

CIDE proteiny obsahují evolučně zakonzervovanou CIDE-N doménu, která sdílí homologii k DNA fragmentačnímu faktoru 40/45 (DFF40/45; cit.¹³⁷) a CIDE-C doménu, která je mezi CIDE proteiny unikátní (obr. 8; cit.¹³⁸). Na rozdíl od DFF40/45 proteinů, které jsou exprimovány ve všech tkáních, CIDEa se u hlodavců nejvíce vyskytuje v hnědé tukové tkáni¹³² a u lidí v bílé tukové tkáni¹³⁹. CIDEa a Fsp27 jsou také detekovány

v tučných játrech, ve kterých je akumulován přebytek lipidů a tvoří se zde velké lipidové kapky¹⁴⁰.



* oblast specifická pro CIDEa

Obr. 8. Schématická struktura CIDEa (upraveno podle Wu a kol.¹³⁸)

CIDEa je pravděpodobně distribuována v mitochondriích a hypoteticky tvoří komplex s proteinem specifickým pro hnědý tuk, s mitochondriálním odpráhujícím proteinem UCP1. Tato spekulace byla založena na pozorování, že koexprese těchto dvou proteinů v kvasinkách snižuje odpráhující schopnost UCP1¹⁴¹.

Vysoké hladiny exprese CIDEa byly detekovány v hnědé tukové tkáni (BAT), což je asi 50 - 100 × více než v jiných tkáních. U 15 dnů starého embrya myši byla CIDEa detekována v interskapulární oblasti stejně jako UCP1. Ve stejné oblasti byly oba proteiny exprimovány i u týden starých myši. Nízké hladiny mRNA byly detekovány i v srdci, mozku, svalu, kostní dřeni a thymu myši. CIDEa byla stanovena v srdci, nižší hladiny v kosterním svalu, mozku, lymfatických uzlinách, thymu, appendixu a kostní dřeni člověka jako 1,3 kb transkript. Další transkript o velikosti 1kb byl detekován v nižší hladině v placentě. Dále byl detekován i transkript o velikosti 7kb v ledvinách a v nižší koncentraci v srdci, plicích, mozku a placentě. CIDEa byla nalezena v embryonálních ledvinných buňkách 293T, buňkách karcinomu prsu MCF-7, buňkách neuroblastomu SHEP a v bílé tukové tkáni^{132,137}. CIDEa je exprimována v játrech dospělých starých a diabetických myši¹⁴².

CIDE proteiny podléhají přesné regulaci na transkripční i posttranslační úrovni. CIDEa region promoteru obsahuje PPAR α i PPAR γ responsivní elementy (*peroxisome proliferator-activated receptor*) a může být aktivován agonisty PPAR¹⁴⁰. Navíc PGC-1 α může aktivovat CIDEa expresi vazbou na ERRA (*estrogen-related receptor α*) a NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*), zatímco RIP140 (*receptor interacting protein*), korepresor nukleárních receptorů, interaguje s PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator*) a potlačuje její transkripční aktivitu na CIDEa promoteru^{143,144}.

Výzkum nádorových buněk naznačuje, že CpG metylace na CIDEa promotorovém regionu hraje významnou roli v ustavení a udržení tkáňově a buněčně specifické exprese CIDEa. TNF α negativně reguluje transkripci CIDEa prostřednictvím aktivace NF- κ B¹⁴⁵.

Na posttranslační úrovni je CIDEa v adipocytech degradována přes proteasom prostřednictvím ubikvitinu¹⁴⁶. CIDEa je modifikována O-glykosylací, která může kontrolovat její subcelulární lokalizaci i aktivitu indukce buněčné smrti¹⁴⁷.

2.4.2 Subcelulární lokalizace CIDEa proteinu

Při zvýšené expresi proteinů CIDEa a CIDEb v heterologních buňkách bylo zjištěno, že rozložení těchto proteinů se podobá distribuci fluorescenční sondy MitoTracker, která se specificky akumuluje v mitochondriích^{132,148}. Později se ukázalo, že tento model je specificky spojen s pozdní fází buněčné smrti. V současnosti byla CIDEa lokalizována v endoplazmatickém retikulu (ER)¹⁴⁹ a lipidových kapičkách¹⁵⁰. Lipidové kapičky jsou vysoce funkční orgány, které jsou v blízkém kontaktu s mnohačetnými subcelulárními strukturami jako jsou ER, endosomy, mitochondrie a plasmatická membrána¹⁵¹. Vysvětlení tohoto pozorování může spočívat ve zvýšené expresi proteinů v heterologních buňkách, které podléhají specifickým morfologickým změnám během apoptosy, nebo v různé lokalizaci lipidových kapek.

2.4.3 CIDEa protein a vývoj metabolických onemocnění

Vzhledem k sekvenci CIDE proteinů, která je homologní k DFF40/45, jsou studie na této rodině proteinů zaměřené především na jejich aktivitu při indukci buněčné smrti.

Gong a kol.¹³⁶ využili CIDEa deficientní myši a nepozorovali rozdíly v apoptose mezi standardními a CIDEa^{-/-} myšmi v adipocytech hnědé tukové tkáně. Překvapivě u těchto CIDEa^{-/-} myši byla pozorována změna fenotypu s hubeností, sníženými hladinami leptinu a plasmatických lipidů a s rezistencí k dietou indukované obezitě. Především u CIDEa^{-/-} myši byl výrazně snížen obsah lipidů během vystavení chladu, což naznačuje význam CIDEa při kontrole energetického výdeje v tukových tkáních. Navíc CIDEa^{-/-} myši měly vyšší metabolický oběh a lepší citlivost k inzulinu. V práci Gong

a kol.¹³⁶ je důležité srovnání jednotlivých CIDE proteinů s návaznou odlišností ve fenotypu myši, které měly geny těchto proteinů nefunkční (knokautované).

CIDEa hraje významnou roli jako regulátor tělesné hmotnosti u myši i lidí, a proto je kandidátním genem pro vznik lidské obezity. Několik zjištění podporuje fakt, že CIDEa je zapojena v regulaci tělesné hmotnosti. Myši bez CIDEa jsou rezistentní na dietou indukovanou obezitu a diabetes, a vykazují vyšší metabolický oběh a lipolýzu v hnědé tukové tkáni než standardní myši¹³². U obézních žen, které podstoupily redukční nízkokalorickou dietu, byla mRNA pro CIDEa nejvíce zvýšena v subkutánní tukové tkáni v porovnání s dalšími osmi tisíci vyšetřovanými geny¹⁵². Kromě toho CIDEa mRNA je snížena v subkutánní tukové tkáni u obézních subjektů¹³⁹.

Expresí CIDEa nepřímo koreluje s bazálním metabolickým oběhem¹⁵³. V souladu s pozorováním, že CIDEa reguluje lipolýzu v hnědé tukové tkáni, se ukázalo, že CIDEa kontroluje lipolýzu v lidských adipocytech¹³⁹. Zvýšená CIDEa byla pozorována i v játrech diabetických myši¹⁴². V bílé tukové tkáni lidí označených jako obézní na základě BMI, korelovaly hladiny CIDEa a CIDEb pozitivně s citlivostí na insulin, což naznačuje jejich působení v kontrole lipolýzy v adipocytech a tedy cirkulaci mastných kyselin¹⁵⁰. CIDE proteiny tak mohou být novými regulátory vývoje metabolických onemocnění jako je obezita, diabetes mellitus 2. typu a jaterní steatóza. Obezita je nejrizikovějším faktorem pro vývoj diabetes 2. typu, přičemž výskyt těchto onemocnění vzrůstá ve většině rozvinutých zemí. Přestože je genetický vliv na obezitu stanovený, geny podléhající tomuto mechanismu regulace jsou z velké části neznámé.

2.4.4 Mechanismus CIDEa v regulaci metabolických onemocnění

Přestože role CIDE proteinů ve vývoji metabolických onemocnění je přibližně známa, molekulární mechanismus, kterým CIDE proteiny kontrolují metabolismus v adipocytech a hepatocytech, ještě objasněn není. Bylo prokázáno, že CIDEa kontroluje hladiny proteinu a aktivitu proteinové kinasy aktivované AMP (AMPK), klíčový enzym regulující energetickou homeostázu v hnědé tukové tkáni¹³². CIDEa je schopna specificky interagovat s β - podjednotkou AMPK a napomáhat degradaci AMPK komplexu proteasomem zprostředkovanou ubikvitinem. Současně byly signifikantně zvýšeny

hladiny AMPK proteinu a enzymatická aktivita v hnědé tukové tkáni CIDEa^{-/-} myší a diferenciovaných myších embryonálních fibroblastech odvozených od CIDEa^{-/-} myší (MEFs). Proto zvýšené hladiny a jejich enzymatická aktivita vedou k signifikantně zvýšené β -oxidaci mastných kyselin v CIDEa^{-/-} adipocytech. To poskytuje molekulární vysvětlení pro zvýšené energetické výdaje a hubený fenotyp CIDEa^{-/-} myší. Fyziologická role CIDEa v kontrole stability a aktivity AMPK může být rozšířena i do jiných tkání než jen do hnědé tukové tkáně. Bylo publikováno, že resveratrol zmírňuje důsledky ztučnělých jater indukovaných vysokokalorickou dietou a prodlužuje životnost u myší částečnou aktivací jaterní AMPK. Resveratrol také výrazně snižuje hladinu CIDEa mRNA v játrech⁸⁸.

2.4.5 CIDEa v apoptose

CIDEa indukovala v buňkách 293T fragmentaci DNA, a ta byla inhibována proteinem DFF45. To naznačuje, že DFF45 ruší apoptotické vlivy CIDE proteinů pravděpodobně interakcí DFF45 s CIDE nebo jinými proteiny s homologií k N konci DFF45, například s proteinem DFF40. CIDEa byla negativně regulována skrze svou N koncovou oblast¹³⁷. Inhibitory kaspas zVAD-fmk a CrmA neovlivňovaly CIDEa dependentní apoptosu, přičemž CIDEa působila na apoptotickou signální dráhu CD95/Fas tak, že posilovala apoptosu zprostředkovanou Fas a CLARP (*caspase-like protein*, interaguje s kaspasou-8, která je komponentou dráhy CD95/Fas). Oproti tomu protein DFF45 inhiboval apoptosu indukovanou CLARP a Fas¹⁵⁴.

Pokusy s delečními mutanty ukázaly, že C koncová oblast proteinu je nezbytná pro zabíjení buněk, zatímco N konec proteinu, homologní k DFF45, je důležitý pro interakci s DFF45, a tím inhibici apoptosy¹³⁷.

Dále byl zjištěn vliv TGF β 1 na glykosylaci proteinu CIDEa. TGF β 1 je regulátor buněčného růstu, diferenciace a apoptosy. TGF β 1 neovlivňoval expresi proteinu, ale inhiboval jeho glykosylaci. Deglykosylace proteinu CIDEa korelovala s posíleným nukleárním exportem proteinu a vysoké hladiny neglykosylované CIDEa inhibovaly TGF β 1 řízenou buněčnou smrt. Inhibice glykosylace CIDEa může tedy být mechanismem chránícím buňky před apoptosou¹⁴⁷.

2.5 *miRNA*

Představy o komplexnosti regulace genové exprese byly nedávno rozšířeny o vliv molekul mikroRNA (miRNA). miRNA jsou vysoce konzervované RNA tvořící 3 - 5 % ze všech genů v lidském genomu (tj. cca 1000 genů). Ovlivňují stabilitu a translaci mRNA cílových genů a mají zásadní funkce v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptose¹⁵⁵.

Krátké řetězce miRNA jsou buňkami tvořeny v obrovském množství a jsou jedním z nástrojů buňky pro řízení složitých dějů. Mohou regulovat funkci genů, a to až do jejich praktického „vymazání“. Cílem miRNA, respektive partnerskou makromolekulou, se kterou asociují, jsou molekuly mRNA. Pro výsledek vzájemné interakce je důležitá míra komplementarity mezi miRNA a cílovou sekvencí mRNA, přičemž klíčovou je komplementarita v přední části miRNA. Jedná se o sekvenci prvních 7 - 8 nt, která nejspíše určuje, na jakou mRNA se bude vázat a expresi jaké skupiny genů bude utlumovat¹⁵⁶. Pokud zbývající část nemá plnou komplementaritu, vytváří se dočasné spojení a mRNA za těchto podmínek není schopna zajistit syntézu proteinu. Jakmile se miRNA od cílové sekvence mRNA odpojí, schopnost syntézy proteinu je obnovena. Pokud je ale komplementarita mezi miRNA a cílovou sekvencí mRNA dokonalá, je nastartován jev zvaný RNA interference (RNAi), což je umlčování genů prostřednictvím dvouvláknové RNA (dsRNA - *double stranded RNA*).

2.5.1 *Vlastnosti miRNA*

miRNA patří mezi členy rodiny malých RNA, kam dále náleží malá jaderná RNA (snRNA - *small nuclear RNA*), účastníci se sestřihu mRNA, malá jadéřková RNA (snoRNA - *small nucleolar RNA*), která přímo modifikuje rRNA, a krátká interferující RNA (siRNA - *small interfering RNA*), jež je produkována z dlouhého dvouvláknového RNA prekurzoru (dsRNA - *double stranded RNA*). K těmto malým nekódujícím RNA se v poslední době řadí i druhy jako piRNA (*Piwiinteracting RNA*, RNA interagující s Piwi, podrodinou proteinů Argonaut), mtRNA (*mitochondrial RNA*) nebo rasiRNA (*repeat-associated small interfering RNA*, malá interagující RNA vázaná na repetice ve složení DNA). Těchto přibližně deset typů molekul RNA hraje tak významnou roli při regulaci

pochodů v organismu, že si vydobyla vlastní pojmenování lincRNA (*large intervening non-coding RNA*)¹⁵⁷.

miRNA jsou velmi malé endogenní RNA, ~ 18 - 24 nt dlouhé jednovláčkové RNA molekuly, které byly poprvé identifikovány roku 1993 genetikem Victorem Ambrosem¹⁵⁸. Plní v buňce funkci negativního regulátoru genové exprese na posttranskripční úrovni, tj. na úrovni molekul mRNA (obr. 9). Molekulu miRNA lze definovat na základě několika kritérií: (1) přítomnost specifické ~ 22 nt dlouhé RNA detekovatelné pomocí Northern blottingu, RT-PCR, RNase protection assay, analýzou prodloužení primeru a microarray, (2) přítomnost této malé RNA v komplementární části jejího ~ 70 nt dlouhého prekurzoru, (3) fylogeneticky konzervovaná zralá RNA a prekurzor, ačkoli toto nemusí zcela platit pro druhově specifickou miRNA, (4) signifikantní pokles navržených miRNA a následně akumulace jejich prekurzoru po odstranění majoritního enzymu odpovědného za zpracování miRNA.

Většina miRNA (70 %) je lokalizována v intronech a/nebo exonech, a ~ 30 % je lokalizováno v mezigenových oblastech¹⁵⁹. První skupina miRNA z intronů a/nebo exonů je orientována ve směru transkripce exonu kódujícího “hostitelský” gen, a proto může být transkribována jako část anotovaných genů. Druhá skupina miRNA je transkribována z mezigenových oblastí¹⁶⁰, což znamená, že vytvářejí nezávislé transkripční jednotky¹⁶¹. Třetí skupina miRNA pochází z intronů a/nebo exonů anotovaných genů, ale jsou přepisovány v orientaci opačné oproti genu. To může opět znamenat vytváření vlastních transkripčních jednotek.

2.5.1.1 Biogeneze miRNA

miRNA geny jsou transkribovány RNA polymerasou II stejně jako protein kódující geny do dlouhého polycistronního primárního transkriptu. Primární transkript (pri-miRNA) má na 3' konci polyA zakončení a na 5' konci čepičku podobně jako mRNA, což jsou obvyklé ochranné prvky před působením exonukleáz. Délka pri-miRNA není přesně známá (pravděpodobně přes 1 kb). Často obsahuje několik zralých miRNA, které tvoří klastr. Molekuly pri-miRNA jsou v jádře štěpeny enzymem Drosha (RNasa typu III, endonukleasa), který nemůže fungovat bez svého partnera, se kterým tvoří

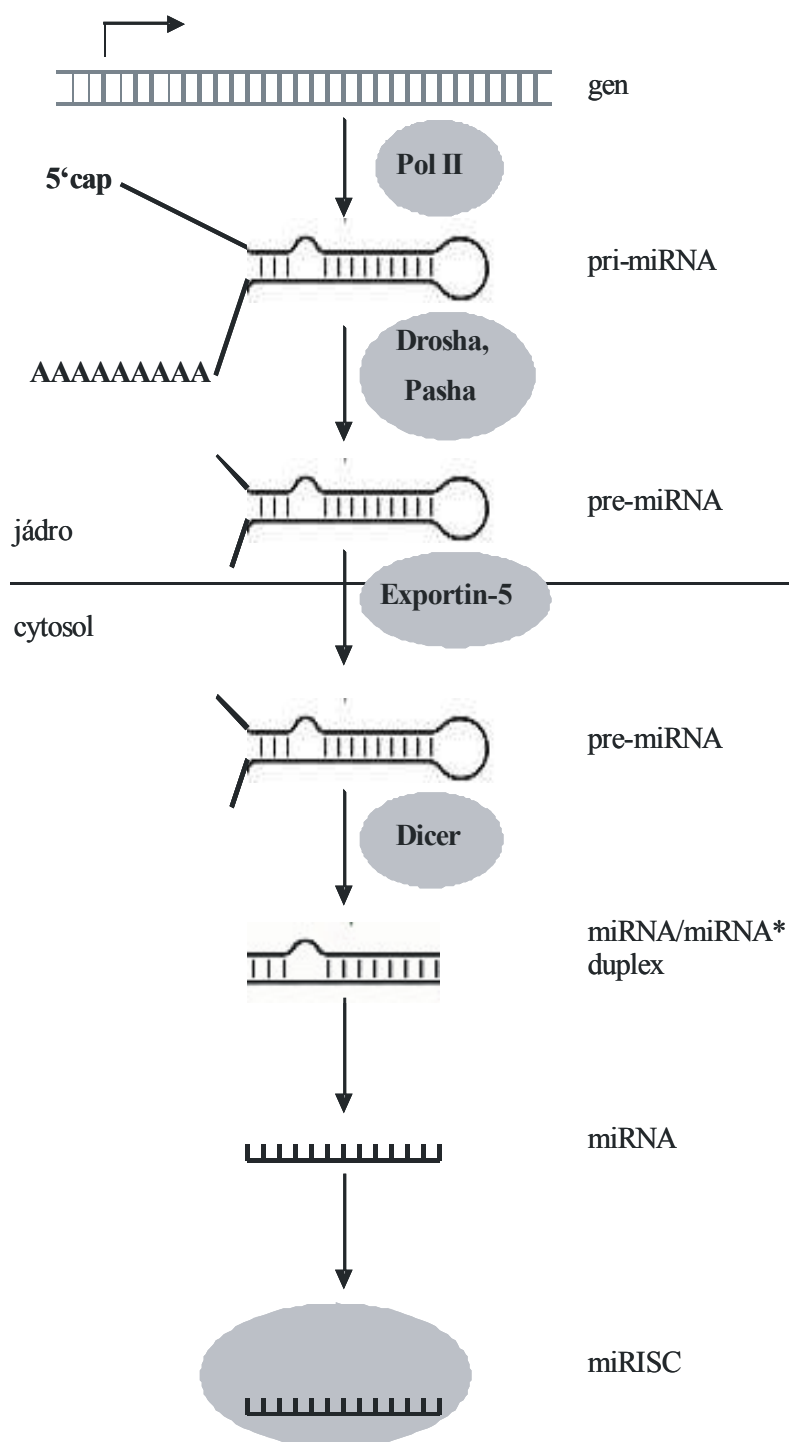
komplex Drosha-DGCR8 (produkt *DiGeorge syndrome critical region gene 8*)^{162,163}. Produktem štěpení je buď jeden či více (v případě klastru) inaktivních prekurzorů miRNA (pre-miRNA). Jedná se o přibližně 70 - 90 nt dlouhou molekulu s vlásenkovou strukturou se smyčkou, která je transportována z jádra do cytoplasmy jaderným proteinem Ran-GTP a jaderným transportním receptorem Exportin-5, kde je dále upravena enzymem RNasa III Dicer¹⁶¹. Ten štěpí prekurzor pre-miRNA ve fixní vzdálenosti 21 nt od konce vytvořeného enzymem Drosha a vytváří tak miRNA/miRNA* duplex. Oba řetězce duplexu jsou separovány komplexem Dicer-TRBP a jeden řetězec duplexu (mature - zralá miRNA) je inkorporován do proteinového komplexu RISC (*RNA induced silencing komplex*), na rozdíl od druhého řetězce, který je degradován¹⁶⁴. Do komplexu RISC se převážně začleňuje ten řetězec, jehož 5' konec je termodynamicky méně stabilní¹⁶⁵.

Komplex RISC obsahuje členy proteinové rodiny Argonaute, kteří jsou důležité při umlčování genů (gene silencing) u *Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa* a *Arabidopsis thaliana*¹⁶⁶. Součástí lidského RISC komplexu jsou ještě helikasy Gemin 3, Gemin 4 a eIF2C2 (lidský homolog proteinu Argonaute). RISC umožňuje vazbu zralé miRNA na 3'UTR oblast cílové mRNA a tím sekvenčně specifickou represi translace nebo štěpení cílové mRNA (obr. 9).

2.5.1.2 Funkce miRNA

Ačkoliv je biologická funkce většiny miRNA stále neznámá, miRNA svou aktivitou zasahuje do mnoha biologických procesů u virů, hub, rostlin i živočichů a odhaduje se, že reguluje přibližně 30 % protein kódujících genů lidského genomu. Ke známým funkcím miRNA molekul patří kontrola proliferace buněk, buněčné smrti (*bantam* miRNA) a metabolismu tuků (miR-14) u *Drosophily*^{167,168}, neuronální patterning u nematod¹⁶⁹, modulace diferenciací hematopoetické vývojové linie u savců (miR-181)¹⁷⁰ nebo kontrola vývoje listů a květů u rostlin (konkrétně u *Arabidopsis thaliana*), kde je zapojena miR-JAW, miR-159 a miR-172¹⁷¹. Molekuly miRNA jsou i důležitými regulátory v mnoha fyziologických procesech, např. v sekreci insulinu (miR-375), vývoji kardiovaskulárního systému a vývoji nervové soustavy (miR-430). miRNA také hraje rozhodující roli v iniciaci a rozvoji lidské rakoviny. Téměř všechny miRNA vykazují

různou úroveň aberantní exprese v různých typech rakoviny, protože více než polovina lidských miRNA genů je lokalizována v místech zapojených do rozvoje rakoviny a na místech citlivých na zlomy (fragilní místa)¹⁷².



Obr. 9 Biogeneze miRNA (upraveno podle Lee a kol.¹⁷³)

2.5.2 Rodina *hsa-miR-29*

U člověka nalzáme miRNA geny ve všech chromosomech kromě chromosomu Y. Rozmístění miRNA genů není náhodné, ale přibližně 50 % známých miRNA se vyskytuje ve shlucích neboli klastrech a ty jsou transkribovány jako polycistronní primární transkript. miRNA klastry mají většinou podobnou sekvenci a obvykle obsahují dva nebo tři miRNA geny. Rozdělení klastrů však není úměrné velikosti chromosomů. Například malé chromosomy 17 a 19 obsahují více miRNA než by se dalo očekávat. Jedna studie uvádí, že se jedná o 16 z 90 prozkoumaných miRNA genů nalézajících se v klastrech, což tvoří 5 % celého genomu¹⁷². Objev uspořádání miRNA do klastrů ukazuje, že miRNA může pracovat ve spojení s dalšími molekulami a tím se ukazují její další role v mnoha biologických procesech.

Rodina miR-29 je složena ze dvou vysoce homologních klastrů, a to klastru 29c, obsahujícího miR-29c a miR-29b-2, a klastru 29a složeného z miR-29a a miR-29b-1. Klaster 29c se nachází na chromosomu 1 (1q32.2) a klaster 29a na chromosomu 7 (7q32.3). Ve studii sledující expresní profily mnoha leukemických linií se ukázalo, že rodina miR-29 vykazuje nejvyšší expresi v liniích Jurkat a CMK (*human megakaryoblastic leukemia cell line*). Nejvyšší hladinu exprese vykazovala miR-29a, naopak u miR-29b-1a miR-29b-2 byla detekována zanedbatelná až nulová exprese¹⁷⁴.

2.5.2.1 Cílové geny miR-29

hsa-miR-29 byla jednou z prvních miRNA, pro níž byla identifikována cílová molekula mRNA, a to onkogen *Tcl-1*¹⁷⁵. Od té doby byly odhaleny další cílové geny, které mohou být spojeny s apoptosou a fibrotickými procesy. Ve vysoce invazivním typu rakoviny, karcinomu nosohltanu, byla microarray metodou po biopsii tkáně zjištěna snížená exprese miR-29c. Cílovými pro tuto miRNA se ukazuje být několik mRNA kódujících proteiny extracelulární matrix spojených s metastázemi. Mezi tyto proteiny se řadí sedm typů kolagenu, laminin, fibrin a jiné. V mnoha nádorových buňkách zvýšení extracelulární hladiny kolagenu a lamininu indukuje zvýšení invazivnosti a tvorbu metastáz¹⁷⁶.

Nedávnými studii byla prokázána regulace exprese Bcl-2 prostřednictvím miRNA. Byla navržena hypotéza o možné regulaci antiapoptotického proteinu Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1 protein*) z Bcl-2 rodiny také prostřednictvím miRNA. Mcl-1 je exprimován v mnoha tkáních a buňkách, včetně nádorových. Pro své vlastnosti je Mcl-1 vhodný k poskytnutí krátkodobé ochrany buňky před smrtí. Zvýšená exprese proteinu Mcl-1 tlumí apoptotický signál, který byl indukován například působením cytotoxických látek, jako je etoposid nebo UV záření. Studie ukázaly, že Mcl-1 funguje jako regulátor apoptosy indukované přes mitochondrie. Další látkou schopnou ovlivnit translaci proteinu Mcl-1 je staurosporin. Staurosporin je inhibítoem proteinkinas, který převážně působí na proteinkinazu C a indukuje apoptosu u mnoha buněčných typů. Redukuje hladinu Mcl-1 proteinu a Mcl-1 mRNA¹⁷⁷. Regulace hladiny Mcl-1 na úrovni mRNA a proteinu je velmi důležitá v ochraně buňky před nastupující apoptosou. Ve studii srovnávající maligní (KMCH) a nemaligní (H69) cholangiocyty bylo stanoveno, že exprese proteinu Mcl-1 je regulována miRNA, konkrétně rodinou miR-29. V maligních buňkách byla v porovnání s nemaligní linií zvýšená exprese Mcl-1 a snížená exprese miR-29b. Transfekce pre-miR-29 do KMCH měla za následek sníženou regulaci Mcl-1. K ověření tohoto předpokladu byla inhibována funkce miR-29b pomocí LNA oligonukleotidů. Výsledkem bylo zvýšení hladiny Mcl-1 a ochrana buněk před aktivací kaspasy 3 a 7 u nemaligních buněk¹⁷⁸.

Epigenetická regulace obecně spadá do dvou kategorií, a to modifikace histonů a DNA methylace, což je přenos methylové skupiny z S-adenosylmethioninu na cytosin v poloze 5' DNA-methyltransferasou (DNMT). U savců existují tři katalyticky aktivní formy DNMT: DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. U nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), nejčastějšího typu rakoviny plic, byla nalezena téměř o 60 % zvýšená hladina DNMT3A a 3B¹⁷⁹. Expresе všech izoforem miR-29 je snížena v NSCLC. Jako cílové geny byly identifikovány DNMT3A a 3B. Právě zvýšená hladina DNMT3A u NSCLC je spojena s nižší šancí přežití a horší prognózou. Po transfekci pre-miR-29 došlo ke snížení hladiny DNMT3A a 3B. Nejzřetelnější výsledek byl u miR-29b, kdy byla exprese obou proteinů snížena o 40 % již po 72 hodinách od transfekce¹⁸⁰.

2.5.3 Vliv miRNA na apoptosu

Přestože role miRNA v apoptose není dosud plně objasněna, v poslední době přibývají důkazy, že v tomto procesu je nezbytná. Dysregulace některých miRNA zapojených v apoptose může být jedním ze základních mechanismů rozvoje rakoviny a resistance na chemoterapii.

2.5.3.1 Vnitřní mitochondriální dráha apoptosy a miRNA

Antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 působí jako stěžejní regulátory mitochondriální dráhy¹⁸¹, která je vyvolána různými vnitrobuněčnými podněty, jako je poškození DNA, oxidativní stres nebo nedostatek růstových faktorů. Zvýšená exprese Bcl-2 se vyskytuje v rakovině prsu, Hodgkinově lymfomu¹⁸² a B-CLL. V těchto typech rakoviny je častá chromozomální translokace Bcl-2. miR-15 a miR-16 byly identifikovány jako regulátory antiapoptotického faktoru Bcl-2, kdy jejich snížená exprese v leukemických buňkách koreluje se zvýšenou expresí Bcl-2, zatímco opak byl viditelný v normálních CD5+ lymfoidních buňkách. Indukce apoptosy regulací Bcl-2 *in vitro* naznačuje, že dysregulace těchto miRNA je důležitým bodem v obcházení apoptosy, což může nakonec vést až k tumorogenezi.

2.5.3.2 Vnější receptorová dráha apoptosy a miRNA

Několik studií z poslední doby naznačuje^{183,184}, že miRNA je součástí i receptorové dráhy apoptosy spouštěné vazbou TNF α , TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) a Fas-ligandů na jejich receptory lokalizované na povrchu buňky. Signalizace pomocí TRAIL vyvolává apoptosu v řadě transformovaných buněk *in vivo* a *in vitro*. Nicméně některé nádorové buňky se vyznačují TRAIL resistantním fenotypem¹⁸³. miR-221 a miR-222 byly identifikovány jako regulátory citlivosti TRAIL v nemalobuněčném karcinomu plic. Analýza těchto dvou miRNA ukazuje rozdílnou expresi v TRAIL resistantních (CALU-1) v porovnání s TRAIL citlivými (H460) buněčnými liniemi. Zvýšená hladina exprese miR-221 a miR-222 v TRAIL citlivých buňkách zvyšuje odolnost vůči apoptose spuštěné vazbou TRAIL přibližně o 40 % a redukuje aktivaci kaspasy 3 a 8. Tyto miRNA mohou sloužit jako nové markery určující

citlivost buněk na TRAIL. Možnými cílovými geny jsou protoonkogen *Kit* a nádorový supresor *p27^{Kip1}*¹⁸⁴, zapojený do buněčném cyklu. Ukázala se jejich snížená regulace v buňkách rezistentních k TRAIL.

Další studie prokázaly negativní regulaci *p27^{Kip1}* miR-221 a miR-222 v rakovině prsu, která souvisela s resistencí na chemoterapeutikum Tamoxifen¹⁸⁵. Antiapoptotický protein Mcl-1, člen rodiny Bcl-2, který vazbou na proapoptotické proteiny Bim a Bid brání apoptose spuštěné prostřednictvím TRAIL, byl identifikován jako cílový gen miR-29 v cholangiokarcinomové buněčné linii (KMCH). Byla prokázána komplementarita mezi počáteční sekvencí miR-29 a 3'-UTR oblastí Mcl-1. Transfekce pre-miR-29 do KMCH měla za následek sníženou regulaci Mcl-1, pouze na úrovni proteinů, naznačující posttranskripční regulaci. Byla demonstrována schopnost miR-29 zvýšit citlivost buněk na apoptosu vyvolanou TRAIL, přičemž inhibice miR-29 vyvolala resistenci. miR-29 má také sníženou expresi v rakovině plic a B-CLL. Možnou příčinou je poloha miR-29a a miR-29b v genomu na fragilním místě FRA7¹⁷².

Tyto studie nám poskytují důkaz, že miRNA má důležitou roli v regulaci proteinů zapojených do obou cest apoptosy.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Záměrem předkládané disertační práce bylo zjistit, jakým způsobem je možné regulovat expresi mitochondriálních proteinů za účelem ovlivnění mitochondriální energetiky (UCP2) a apoptosu závislé na mitochondriích (CIDEa a Bak).

Konkrétní cíle byly:

1. Studium exprese UCP2 v potkaních kardiomyocytech
 - Detekce UCP2 na úrovni proteinu a mRNA působením různých látek.
 - Vliv fosforylované p38 na expresi UCP2.
 - Vliv polyfenolů na expresi UCP2.

2. Studium exprese CIDEa v buněčné linii T-REx HeLa
 - Vliv exprese CIDEa na apoptosu.
 - Lokalizace proteinu CIDEa v buňce.
 - Redistribuce proteinu CIDEa působením induktorů apoptosu.

3. Ovlivnění exprese pro-apoptotických proteinů v buněčné linii HeLa transfekované miR-29

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Buněčný materiál

Lidská buněčná linie T-RexTM-HeLa (lidská buněčná linie karcinomu děložního čípku stabilně exprimující Tet represor z plasmidu pcDNA6/TR) byla zakoupena od firmy Invitrogen (katalogové číslo R714-07). Lidská hepatomová linie HepG2 (ECACC No. 8501143) a buňky HL-60 (ECACC No. 98070106) byly zakoupeny od ECACC (The European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK).

Primární potkaní neonatální kardiomyocyty a mitochondrie byly izolovány ze srdcí laboratorních potkanů kmene Wistar (250 - 275 g) zakoupených od firmy Biotest (ČR). Veškerá práce se zvířaty byla prováděna s povolením Etické komise FNOL a LF UP v Olomouci v souladu s mezinárodní legislativou.

4.2 Chemikálie, roztoky a přístroje

4.2.1 Chemikálie

Agaróza typ I a VII, bicinchoninová kyselina (BCA), sterilní dimethylsulfoxid (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), disodná sůl ethylen-diamintetraoctové kyseliny (Na₂EDTA), disodná sůl redukováného β-nikotinamidadeninukleotidu (NADH), dodecylsulfát sodný (SDS), ethidium bromid, ethylen-diamintetraoctová kyselina (EDTA), fetální hovězí sérum (FBS), fetální telecí sérum (FCS), K-EGTA, L-glutamin, hovězí albumin - frakce V (BSA), N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-etansulfonová kyselina (HEPES), malát, metanol (HPLC grade), Na₃VO₄, neesenciální aminokyseliny, penicilin (stabilizovaný roztok, 100 U·ml⁻¹), Ponceau S, pyruvát, sondy H₂DCFDA, JC-1 a DAPI, streptomycin (100 mg·ml⁻¹), sukcinát, telecí sérum (NCS), *tert*-butylhydroperoxid (*t*BH), tetrasodná sůl redukováného β-nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris), Triton X-100, TriZOL Reagent, 0,4% roztok trypanové modři, 0,25% roztok

trypsin-EDTA. Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) a minimální esenciální médium (MEM) bylo koupeno od firmy GIBCO - Life Technologies (USA).

Dále byly použity: primární kozí protilátky - aktin (Santa Cruz), Bak (Abcam), UCP2 (Santa Cruz), primární králičí protilátky - fosforylovaná p38 (Cell Signaling), Mcl-1 (Santa Cruz), DNMT3B (Abgent), sekundární kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (HRP), sekundární králičí protilátka konjugovaná s HRP, Western blotting luminol činidlo A a B pro chemiluminiscenční detekci HRP od Santa Cruz Biotechnology (USA). Proteasový inhibitor CompleteTM od firmy Roche Diagnostic GmbH (Německo), dithiotreitol (DTT), glycerol, 2-merkaptotetanol, roztok akrylamidu s N,N'-metylenbisakrylamidem (29:1, 40 %), sacharosa, standard molekulové hmotnosti Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas - Life Science), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), 10 × Tris-glycin pufr, 10 × Tris-glycin-SDS pufr a Tween[®] 20, vše od firmy Bio Basic Inc. (Kanada). Sušené mléko Laktino (1,3 % tuku) od firmy PML (ČR), ledová octová kyselina (HPLC gradient grades) společnosti Merck & Co Inc. (USA), BCATM kit pro stanovení proteinů od Pierce (USA), kolagenasa o aktivitě PZ 162 a 263 U/g od firmy Serva (Německo).

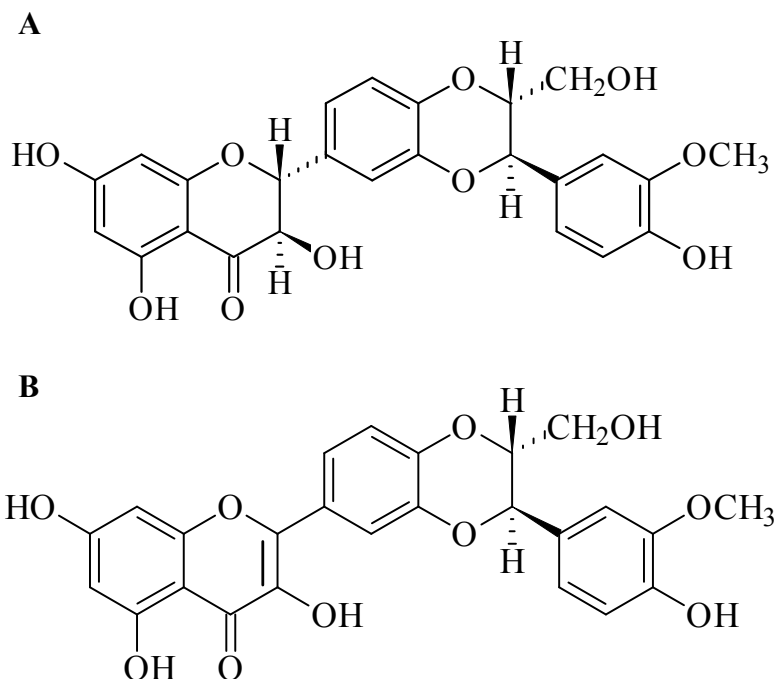
Pro práci s buněčnými kulturami byly použity kyslík a oxid uhličitý od firmy Linde Technoplyn (ČR).

Ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Pliva-Lachema (ČR).

4.2.1.2 *Silybum marianum* L. Gaertner

Silybum marianum L. Gaertner, ostropestřec mariánský, patří mezi nejstarší známé byliny, které byly vždy široce využívány v tradičním lékařství při léčbě jaterních onemocnění¹⁸⁶. Standardizovaná polyfenolová frakce extraktu ze semen se nazývá silymarin a obsahuje přibližně 70 - 80 % flavonolignanů a z 20 - 30 % chemicky nedefinovanou frakci, složenou převážně z polymerních a oxidovaných polyfenolových sloučenin. Flavonolignany jsou hlavně silybin (obr. 6. A), isosilybin, silychristin a silydianin. Další sloučeniny zastoupené v menším množství jsou 2,3-dehydrosilybin (obr. 6. B) a flavonoidy taxifolin a kvercetin¹⁸⁷. V dřívějších studiích byl zjištěno, že

silybin i silymarin jsou dobře snášeny a nezpůsobují žádné signifikantní nepříznivé účinky na zdraví¹⁸⁸. V naší práci jsme použili směsi dvou diasteromerů A a B přibližně v poměru 1:1.



Obr. 6. Chemická struktura silybinu (A) a 2,3-dehydrosilybinu (B).

4.2.2 Roztoky

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

10 × PBS: NaCl (0,137 mol·l⁻¹), KCl (0,00268 mol·l⁻¹), Na₂HPO₄ (0,00896 mol·l⁻¹), KH₂PO₄ (0,00147 mol·l⁻¹), pro experimenty byl zásobní roztok 10× zředěn.

Roztok fosfátového pufru (PBS+) pro detekci produkce ROS

PBS+: glukosa (30 mmol·l⁻¹), MgCl₂ (1 mmol·l⁻¹), CaCl₂ (0,5 mmol·l⁻¹), pH 7,4.

Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

Lyzační pufr: Tris (20 mmol·l⁻¹), EGTA (5 mmol·l⁻¹), NaCl (150 mmol·l⁻¹), glycerolfosfát (20 mmol·l⁻¹), Na₃VO₄ (1 mmol·l⁻¹), NaF (1 mmol·l⁻¹), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), pH 7,5.

Migrační pufr: Tris/HCl (1,5 mol·l⁻¹), pH 8,8.

Migrační gel: 10% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (24,7 %), deionizovaná voda (48,5 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát

sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethylendiamin (0,1 %); a 15% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (37,1 %), deionizovaná voda (36,1 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% amonium persulfát (1 %), tetramethylethylendiamin (0,1 %).

Zaostřovací pufr: Tris (0,5 mmol·l⁻¹), pH 6,8.

Zaostřovací gel: 10% polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (13,1 %), deionizovaná voda (60,6 %), zaostřovací pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (0,3 %), tetramethylethylendiamin (0,15 %).

Přenosový pufr: Tris (25 mmol·l⁻¹), glycin (0,192 mol·l⁻¹), metanol (20%, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3.

TBS (tris-buffered saline): Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6.

TBS/T: Tween 20 (0,05%, v/v) v TBS.

TBS/T/mléko: Tween 20 (0,05%, v/v), sušené mléko (5%, m/v) v TBS.

TBS/T/BSA: Tween 20 (0,05%, v/v), BSA (5%, m/v) v TBS.

Vzorkový pufr: Tris (0,125 mol·l⁻¹), pH 6,8; SDS (4%, m/v), glycerol (20%, v/v), DTT (0,2 mol·l⁻¹), bromfenolová modř (0,02%, m/v).

Barvicí roztok: kyselina octová (5%, v/v); Ponceau S (0,1% m/v).

„Stripping pufr“: Tris (62,5 mmol·l⁻¹), SDS (2%, v/v), 2-merkaptoetanol (0,1 mol·l⁻¹), pH 6,7.

Roztok pro respiometrii

Roztok: KCl (120 mmol·l⁻¹), K-MOPS (5 mmol·l⁻¹), K-EGTA (1 mmol·l⁻¹), K-fosfátu (0,5 mmol·l⁻¹), MgCl₂ (0,5 mmol·l⁻¹), pH 7,2.

Roztoky pro přípravu subcelulárních frakcí

Pufr A: HEPES (20 mmol·l⁻¹; pH 7,9), NaCl (420 mmol·l⁻¹), EDTA (0,2 mmol·l⁻¹), MgCl₂ (1,5 mmol·l⁻¹), DTT (0,5 mmol·l⁻¹), PMSF (0,5 mmol·l⁻¹), glycerol (25% (v/v)).

Pufr B: HEPES (10 mmol·l⁻¹; pH 7,9), KCl (10 mmol·l⁻¹), MgCl₂ (1,5 mmol·l⁻¹), DTT (0,5 mmol·l⁻¹), NP-40 (0,1% (v/v)).

Roztoky pro stanovení aktivity LDH

LDH pufr: Na₂HPO₄ (50 mmol·l⁻¹), pH 7,5; pyruvát sodný (1,22 mmol·l⁻¹).

Pracovní roztok: NADH (0,4 mmol·l⁻¹) v LDH pufru.

Roztoky pro stanovení aktivity kaspasy 3

Lyzační pufr: HEPES ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4; Triton X-100 (0,5 %, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT ($0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Reakční pufr: HEPES ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,1; EDTA ($0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT ($0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Zásobní roztok substrátu pro kaspasu 3: $0,010 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ac-DEVD-AMC v DMSO

Zásobní roztok inhibitoru pro kaspasu 3: $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ac-DEVD-CHO v DMSO

Reakční směs se substrátem: 995 μl vzorkového pufru a 5 μl substrátu ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Ac-DEVD-AMC v DMSO)

Reakční směs s inhibitorem: 995 μl vzorkového pufru, 5 μl substrátu (výsledná koncentrace $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,5 μl inhibitoru (výsledná koncentrace $0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Roztoky pro TUNEL

Permeabilizační roztok: 0,1% Triton X-100, 0,1% citrát sodný v PBS

Reakční směs TUNEL: terminální deoxynukleotidyl transferasa, roztok fluorescenčně značených nukleotidů, poměr 1:9

Roztoky pro stanovení bílkovin

Pracovní roztok pro stanovení dle Bradfordové: 0,01% (m/v) Coomassie Brilliantová modř v 50 ml 95% etanolu a 100 ml 85% H_3PO_4 doplněno do 1000 ml vodou.

Standardy bovinního sérového albuminu o koncentraci 0 - 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

Primární potkání kardiomyocyty:

Ads pufr: HEPES ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaH_2PO_4 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukosa ($5,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($5,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), MgSO_4 ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,3 – 7,4.

Vysévací médium: DMEM, Medium 199 (v poměru 4:1), NaHCO_3 ($42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), HS (10 %, v/v), FCS (5 %, v/v), pH 7,2.

Kultivační médium: DMEM, Medium 199 (v poměru 4:1), NaHCO_3 ($42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), pH 7,2.

Roztok kolagenu na potahování kultivačních desek: 0,2% sterilní roztok kolagenu (typ I) a 0,1% CH_3COOH v poměru 1:15

Potkaní srdeční mitochondrie:

Pufir A: KCl 180 mmol·l⁻¹, MOPS 5 mmol·l⁻¹, EGTA 2 mmol·l⁻¹, pH 7,2.

Pufir B: 200 ml pufiru A s přidavkem 0,5 mg·ml⁻¹ BSA

Buněčná linie T-Rex HeLa:

Kultivační médium: MEM, L-glutamin (2 mmol·l⁻¹), blasticidin S HCl (5 µg·ml⁻¹), FBS (10 %, v/v), penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹).

Bezsérové médium: MEM, L-glutamin (2 mmol·l⁻¹), penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹).

Rozmrazovací médium: MEM, L-glutamin (2 mmol·l⁻¹), FBS (10 %, v/v).

Buněčná linie HepG2:

Kultivační médium: Mem Eagle Médium, penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹), L-glutamin (2 mmol·l⁻¹), FBS (10 %, v/v), pyruvát sodný (1 mmol·l⁻¹).

Buněčná linie HL-60:

Kultivační médium: RPMI-1640, penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹), L-glutamin (2 mmol·l⁻¹), FBS (10 %, v/v).

4.2.3 Přístroje

Chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle Labortechnik, Německo)

Chlazená centrifuga *Mikro 22* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga *Rotina 38R* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Centrifuga *Labofuge 400* (Heraeus, Německo)

Centrifugy *MiniSpin*[®] (Eppendorf, Německo)

Fluorometr *Flourolog 322* (Spex-Jobin-Yvon-Horiba)

Konfokální mikroskop *Olympus IX80* (Olympus, Japonsko) s laserem *FluoView FV1000*

Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)

Laminární box pro RT-PCR (BioAir Instruments, ČR)

Luminometr *FB 12* pro měření chemiluminiscence (Berthold Detection System, Německo)

Luminometr Perkin-Elmer *LS50B* (Perkin-Elmer Corp., USA)

Fotometr pro měření absorpance v 96-jamkových deskách *Sunrise Remote* (Tecan, Švýcarsko)

UV-VIS spektrofotometr *UV-2401PC* (Shimadzu, Japonsko)

Hlubokomrazicí box *VX 380* (Jouan, Francie)

Homogenizátor *Ultra-Turax T 25 basic* (Ika Werte, Německo)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *PS 01000A* (Notus-Powersonic, Slovensko)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)

Mikroskop *CK40* (Olympus, Japonsko)

Inkubátor *Cellstar* (Queue System, USA)

Inverzní fluorescenční mikroskop *Olympus IX 70 S8F* (Olympus, Japonsko) s kamerou *PCO VC 45-CG-23* (CCD Imaging, Německo)

pH-metr *inoLab Level 1* (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou *SenTix41* (WTW, Německo)

Termocykler *MiniOpticon™* (BioRad, ČR)

Třepačka *OLS 200* (Grant Instruments, Velká Británie)

Třepačka *Duomax 1030* (Heidolph, Německo)

Třepačka *Reax top* (Heidolph, Německo)

Magnetická míchačka *IKA RH basic KT/C* (Slabo, ČR)

Respirometr *Oxygraph 2k* s vysokým rozlišením (Oroboros, Innsbruck, Rakousko) doplněný o analytický software *DatLab*

Systém pro elektroforézu *Mini-Protean® 3 Cell* se zdrojem *PowerPac 200*, *PowerPac 3000* nebo *PowerPac universal* (Bio-Rad Laboratories, USA)

Váhy *AX105 DeltaRange®* (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

Ultrazvuková sonda *UP200s* (Dr. Hielscher, GmbH, Německo)

Vakuové čerpadlo *Vacci-space* (Chromservis, Slovensko)

Systém pro LC *Shimadzu* (Shimadzu, Japonsko) byl vybaven řídicí jednotkou *SCL-10AVP*, odplyňovačem *DGU-14A*, ventilem kontroly průtoku *FCV-10A1VP*, pumpou *LC-*

10ADVP, autoinjektorem *SIL-10ADVP*, termostatem kolony *CTO-10AC*, UV detektorem *SPD-10AVP* a hmotnostním detektorem *LCQ Fleet*, software *Xcalibur*[®]. K měření byla využita chromatografická kolona RP-8e (125 mm × 4 mm, 5 μm) s předkolonou (4 mm × 4 mm, 5 μm) Purospher[®] STAR (Merck, Darmstadt, Německo).

System pro zaznamenání chemiluminiscence *Perkin-Elmer LS50B* byl nastaven následovně: luminiscenční režim (lampa vypnuta), doba zpoždění 0,03 ms, doba cyklu 100 ms, doba průchodu 90 ms, počet záblesků 1. Emisní štěrba byla nastavena na 20 nm, emisní filtr 350 nm a fotoelektrický násobič na 775 V.

4.2.4 Ostatní materiál

Fotografický film *Kodak X-Omat AR Film XAR5*, fotografická vývojka a ustalovač *Kodak GBX* (Eastman Kodak, USA).

PVDF membrána *Immun-Blot*TM (0,2 μm; Bio-Rad Laboratories, USA).

Sterilizační filtry 0,22 μm *Millex*[®]-GS (Millipore, USA).

Kultivační láhve *Nunclon*TM, kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko).

Plastové injekční stříkačky (B. Braun, Německo)

Plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo)

Filtrační papír Whatman (Whatman, USA)

Aerosil[®] Rumec Silica (Evonik Industrie, Německo)

Zkumavky Na₂EDTA-Na₃ a Heparin-Lithium (Sarstedt, Německo)

4.3 Izolace potkaních neonatálních kardiomyocytů

Proces popsaný Chlopčíkovou a kol. je následující¹⁸⁹. Celá srdce byla izolována z 2 - 5 ti denních potkanů a rozstříhané malé kousky (1 mm) byly vloženy do vyváženého solného roztoku obsahujícího 20 mmol·l⁻¹ HEPES, 120 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄, 5,5 mmol·l⁻¹ glukosu, 5,4 mmol·l⁻¹ KCl a 0,8 mmol·l⁻¹ MgSO₄ (pH 7,3 - 7,4). Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány v médiu obsahujícím DMEM a médium 199 (v poměru 1:4) doplněné o HS sérum (10 %), FCS sérum (5 %), penicilin (100 U·ml⁻¹)

a streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Suspenze obohacená o neadhezivní myocyty byla přenesena na kultivační desky pokryté kolagenem o hustotě 5×10^4 na cm^2 . Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37°C a v atmosféře 5 % CO_2 . Médium bylo po 72 hod. odstraněno a vyměněno za kultivační médium obsahující DMEM a médium 199 (poměr 1:4), penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) a streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Před tím, než byly buňky využity k experimentu, byly kultivovány do dosažení konfluence. Po třech dnech kultivace bylo procento pulzujících buněk 85 - 90 %.

4.4 Izolace srdečních mitochondrií

Mitochondrie byly izolovány z potkaního srdce (samice 400 - 450 g). Potkani byli uspáni intramuskulárně podáním kombinací přípravků Narketan 10 (účinná látka ketamin $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) - celkové anestetikum dávkované $1,2 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$, a Xylazin 2 % (účinná látka xylazin hydrochlorid $23,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) - myorelaxant dávkovaný $0,8 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$. Srdce bylo po vyjmutí ihned vloženo do kádinky s 15 ml pufru A (500 ml; KCl $180 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, MOPS $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, EGTA $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7,2, alkalizace přidavkem KOH). Kádinka se srdcem byla udržována na ledu. Poté bylo srdce rychle pomocí nůžek rozstříháno na několik kousků a pufr byl slit. Bylo přidáno 10 ml pufru B (200 ml pufru A + $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA) a srdce bylo rozmělněno na velmi malé kousky. Rozsekaná suspenze byla homogenizována v ledu při $17\,500\times g$. Následně bylo přidáno 20 ml pufru B a znovu byla provedena homogenizace. Homogenizát byl slit do předchlazené 40 ml centrifugační kyvety a byl centrifugován 5 min při $500\times g$. Supernatant byl přelit přes jemnou gázu do jiné předchlazené 40 ml centrifugační kyvety a opět centrifugován 10 min při $8\,000\times g$. Poté byl supernatant vylit, sraženina byla resuspendována v přibližně 0,5 ml pufru A pomocí pipety a dolita do 40 ml pufru A a znovu centrifugována 5 min při $500\times g$. Supernatant (obsahující zlomky mitochondrií) byl opatrně slit do nové, předchlazené 40 ml centrifugační kyvety a centrifugován 10 min při $8\,000\times g$. Na závěr byl slit supernatant a usazenina byla resuspendována v 800 μl pufru A (cit.¹⁹⁰).

4.5 T-REx systém

Tento systém je založen na tetracyklinem regulované expresi u savců a využívá regulační elementy z *E. coli* operonu tetracyklinové resistance (tet). Regulace

tetracyklinem je založena na vazbě tetracyklinu k Tet represoru a odblokování promotoru kontrolujícího expresi sledovaného genu. Jde tedy o indukovanou expresi, která probíhá pouze v přítomnosti tetracyklinu v médiu¹⁹¹. Základními složkami jsou expresní plasmid, nesoucí dvě kopie sekvence tet operátoru, které slouží jako vazebná místa pro dvě molekuly Tet represoru (TetR), a regulační vektor, který exprimuje gen TetR. V nepřítomnosti tetracyklinu se represor váže ve formě homodimeru do operátorových sekvencí v promotoru sledovaného genu a blokuje jeho transkripci. Přidaný tetracyklin se váže na homodimery represoru a dochází k jejich konformační změně, která způsobí disociaci represoru z operátoru a umožní se tak exprese genu. Buněčné linie T-REx HeLa již nese regulační vektor jako stabilní linie rostoucí na selekčním antibiotiku blastidinu. Po transfekci expresním T-REx plasmidem, nesoucím zaklonovaný studovaný gen, dojde ke kompletaci systému a exprese daného genu se může kdykoliv indukovat přidáním tetracyklinu. Pro pěstování těchto buněčných linií je proto důležité, aby sérum dodávané do média neobsahovalo tetracyklin.

4.6 Kultivace buněk

4.6.1 Kultivace kardiomyocytů

Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂, médium bylo měněno každých 48 - 72 hod. Po dosažení konfluence byly buňky opláchnuty sterilním PBS (5 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 1 - 2 min.; 37 °C), přidáno 5 - 10 ml centrifugačního média a buňky centrifugovány (10 min., 152×g, 24 °C). Buňky byly resuspendovány v 10 ml kultivačního média a poté byly použity do experimentů.

Kultivační desky byly potaženy 0,2% želatinou (100 μl·cm⁻²). Po zatuhnutí želatiny (30 min., 37 °C) byl sterilně odsát nadbytek roztoku. Buňky byly vysety v koncentraci 3 × 10⁴ buněk·ml⁻¹ v růstovém médiu a uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C. Po dosažení konfluence (3 - 4 dny) bylo 16 hod. před zahájením pokusu kultivační médium vyměněno za stabilizační a následující den byly přidávány testované látky.

4.6.2 Kultivace buněčné linie T-REx HeLa

Kryoprezervované buňky byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu, vloženy do lázně 37 °C a poté byly sterilně přeneseny do 25 cm² láhve s 10 ml kultivačního média bez přítomnosti antibiotik. Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂, médium bylo vyměněno po 24 hod. za kultivační s obsahem antibiotik. Médium bylo měněno každých 24 - 72 hod. Po dosažení monovrstvy byly buňky pasážovány tak, že byly opláchnuty sterilním PBS (5 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 2 - 3 min.; 37 °C) a bylo přidáno 5 ml kultivačního média (inaktivace trypsinu). Buňky byly rozsuspendovány pipetou, bylo k nim přidáno 10 ml kultivačního média a poté byly přeneseny do 75 cm² kultivační láhve a dále kultivovány. Po dosažení monovrstvy byly buňky opláchnuty sterilním PBS (10 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztoku trypsinu s EDTA (1 ml; 2 - 3 min.; 37 °C) a resuspendovány v 10 ml kultivačního média. Následně byly buňky spočítány trypanovu modří s využitím Bürkerovy komůrky a použity do pokusů. Buňky byly v experimentech používány mezi 1 - 20 pasáží.

4.7 Použité metody

4.7.1 Transfekce

4.7.1.1 Transfekce potkaních neonatálních kardiomyocytů

Transfekce byla prováděna pomocí Amaxa[®] Nucleofector[®] technologie. Technologie Nucleofector[®] je vysoce účinná neviróvá metoda. Jedná se o kombinaci optimalizovaných elektrických parametrů a roztoků specifických pro buněčné typy. Tato kombinace umožňuje doručení DNA přímo do jádra. Buňky jsou pak připravené pro analýzu po krátké inkubační době trvající jen 2 - 4 hod.

Pro transfekci plasmidu pDR4-luc (1 µg·µl⁻¹), případně negativní kontroly pCIS-CK (1 µg·µl⁻¹) byl použit *cis*-reportérový systém pro detekce signálních transdukčních drah *in vivo* a nukleofekční kit pro potkaní neonatální kardiomyocyty. Plasmid pDR4-luc obsahuje přímá opakování transkripčních rozpoznávacích sekvencí pro aktivaci responsivního elementu thyroideálního receptoru (DR4/TR)^{192,193}. Plasmid pCIS-CK obsahuje luciferasový reportérový gen a neobsahuje žádný *cis*-aktivující

element DNA, proto se používá jako negativní kontrola *cis*-reportérového systému. Jako pozitivní kontrola účinnosti transfekce byl využit plasmid obsahující reportérový gen β -galaktosidasu (β -gal).

Čerstvě izolované potkaní neonatální kardiomyocyty (2×10^6) byly centrifugovány a buněčný pelet byl resuspendován ve 100 μ l roztoku Nucleofector[®]. Buněčná suspenze byla kombinována s plasmidem pDR 4 ($0,2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a β -gal ($0,05 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), přenesena do kyvety a provedena nukleofekce pomocí programu G-009. K suspenzi bylo přidáno 500 μ l předeřhřátého vysévacího média a takto připravený vzorek byl vyset na 24-jamkovou desku. Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂ po dobu 48 hod.

Buňky byly preinkubovány v přítomnosti silybinu a jeho derivátů 30 min. a následně inkubovány s thyroïdními hormony T3 a T4 po dobu 16 hod. Buňky byly promyty a lyzovány Tropix[®] roztokem. S využitím Dual-Light[®] luminescenčního kitu byla stanovena aktivita thyroïdního receptoru.

4.7.1.2 Transfekce buněčné linie T-REx HeLa plasmidem pDEST-CIDEa a HepG2 plasmidem 1A1-luc

Transfekce byla prováděna pomocí lipofekčního činidla Lipofectamine[™] 2000. Jedná se o směs lipidů a dalších komponent (v 80% etanolu), která vytváří komplexy s DNA (plasmid pDEST-CIDEa) a transportuje je do savčích buněk. Vykazuje minimální toxicitu a není tedy nutné po jeho přidání měnit médium. Pro účinnou transfekci je potřeba, aby buňky byly v dobré kondici, tedy bez kontaminací například mykoplasmou a nejlépe v růstové lag fázi. Důležitá je čistota použité plasmidové DNA (poměr absorbancí 260/280 nm je 1,8) a koncentrace plasmidu (rozmezí 0,1 - 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Během transfekce se nedoporučuje přidávat antibiotika, protože vyvolávají buněčnou smrt.

Postup zde uvedený je pro 1 jamku v 6-ti jamkové desce. HeLa buňky byly před transfekcí vysety do konfluence přibližně 80 %. Po 24 hod. stabilizaci byla provedena transfekce. Buňky HepG2 byly zpasážovány a transfekce byla provedena přímo do suspenze buněk.

Do kepu pipetováno 100 μ l média Opti-MEM[®] a do něho nakapán 1 μ l transfekčního činidla Lipofectamin[™] 2000. Do dalšího kepu byl na dno pipetován 1 μ l plasmidové DNA (pDEST-CIDEa; 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) v případě HeLa buněk nebo 0,5 μ l plasmidu 1A1-luc ($5,75 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Na něj bylo následně opatrně pipetováno 100 μ l média Opti-MEM[®]. Směsi byly promíchány opatrně poklepem a byly inkubovány 5 min při

laboratorní teplotě. V další fázi se tyto směsi smíchaly a to tak, že směs s obsahem lipofekčního činidla byla opatrně nakapána na směs obsahující plasmidovou DNA. Celková směs byla promíchána poklepem a byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 600 μl média Opti-MEM[®]. Mezitím bylo u HeLa buněk vyměněno růstové médium za čerstvé médium bez antibiotik a séra v jamce. V posledním kroku byla na jamku s HeLa buňkami nanášena připravená směs média OptiMEM[®] s lipofekčním činidlem a plasmidovou DNA a buněčná suspenze HepG2 buněk byla také smíchána s připraveným lipofekčním činidlem a plasmidem. Po 24 hod. stabilizaci byly buňky připraveny k experimentům (produkt je detekovatelný podle typu vneseného plasmidu od 5-ti hodin po transfekci). HeLa buňky byly preinkubovány v přítomnosti tetracyklinu ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) po dobu 8 hod. a inkubovány 24 hod. s vybranými látkami. HepG2 buňky byly vystaveny působení TCDD ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo TCDD v kombinaci s SB nebo DHSB ($15 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) po dobu 24 hod.. Buňky byly promyty a lyzovány Tropix[®] roztokem. S využitím Dual-Light[®] kitu byla stanovena luminiscence.

4.7.1.3 Transfekce buněčné linie HeLa syntetickou pre-miRNA

Transfekce byla prováděna pomocí lipofekčního činidla Lipofectamine[™] 2000. Princip je uveden v odstavci výše. Buňky HeLa byly po pasážování vysety na 24-jamkovou desku (8×10^5 buněk/jamka) a nechaly se stabilizovat 24 hod. při 37 °C a 5% CO₂. Následující den byla provedena transfekce pre-miRNA. Samotná transfekce byla prováděna následujícím způsobem. Ve sterilní zkumavce bylo smícháno 50 μl Opti-MEM média s 1,5 μl Lipofectaminu[™] 2000 a ve druhé bylo smícháno 50 μl Opti-MEM média s 2 μl příslušné pre-miRNA (finální koncentrace $20 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Směs Opti-MEMu a miRNA byla přepipetována do zkumavky s Opti-MEMem a transfekčním činidlem a vzniklá směs byla lehce promíchána a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 150 μl Opti-MEMu a tato směs miRNA: transfekční činidlo byla přidána ke kultuře předem připravených buněk s 250 μl kultivačního média. Následovala 48 hod. inkubace, po které byly buňky seškrábnuty a lyzovány za účelem imunodetekce proteinů Bak, Mcl-1 a DNMT3B.

4.7.2 Izolace plasmidů

Izolace plasmidů byla prováděna pomocí kitu Genopure Plasmid Midi Kit pro izolace většího množství DNA. Při izolaci bylo postupováno podle protokolu dodávaného

s kitem. V obou případech jde o izolaci z *E. coli* narostlých přes noc v LB médiu (živné médium - 1 % bacto-tryptone, 0,5 % bacto-yeast extrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0; sterilní) s antibiotikem a probíhá v krocích: lyzace buněk, pročištění lyzátu (přes filtr), vazba na kolonku, promytí a eluce ve vodě nebo Tris-EDTA, pH 8. Pro výpočet koncentrace byla změřena absorbance při 260 nm pomocí UV spektrometru.

4.7.3 Stanovení specifických proteinů elektroforézou

Proteiny jsou rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), přeneseny na membránu a následně detekovány pomocí specifických protilátek.

Buňky byly seškrábány do média a centrifugovány (5 min., 150×g, 4 °C). Pelet byl promyt vychlazeným roztokem PBS (1 ml) a opět centrifugován (10 min., 150×g, 4 °C). Supernatant byl odsát a pelet byl lyzován v lyzačním pufru (50 µl, 15 min., 4 °C). Poté byl lyzáat centrifugován (15 min., 11 400×g, 4 °C) a zamražen (-80 °C). Koncentrace bílkovin ve vzorcích byla stanovena metodou dle Bradfordové¹⁹⁴ (postup uveden v kapitole 4.7.17.1).

Vzorky byly naředěny 2× vzorkovým pufrem a denaturovány povařením (5 min., 95 °C). V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 10 % separační a 15 % zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm. Do jamek zaostřovacího gelu byly aplikovány vzorky s obsahem 20 - 30 µg bílkovin. Množství bílkovin bylo stanoveno pomocí metody Bradfordové (kap. 4.7.17.1). Elektroforéza byla provedena v migračním pufru při proudu 15 mA. Po dosažení separačního gelu byla hodnota proudu zvýšena na 30 mA. Po rozdělení proteinů následoval jejich přenos („western blotting“) na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu v tankovém uspořádání v přenosovém pufru (60 min., 400 mA, 4 °C).

Po ukončení přenosu byla membrána 3 × promyta (5 min., TBS) pro odstranění přenosového pufru, blokována (2 hod., TBS/T/mléko, 25 °C) a poté inkubována s primární protilátkou (TBS/T/mléko, 4 °C, 16 hod.). Po inkubaci byla membrána promyta (3 × 5 min., TBS/T) a následně inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 2 hod., 25 °C). Poté byla membrána

promyta (3×5 min., TBS/T) a následně detekována. Pro detekci byl použit chemiluminiscenční systém Western Blotting Luminol Reagent a vzniklá chemiluminiscence byla zaznamenána na fotografický film.

4.7.3.1 Stanovení proteinů - UCP2, p38-P, CIDEa, Bak, DNMT3B, Mcl-1, aktin

Stanovení UCP2

Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka (UCP2, TBS/T/mléko, 1:500, 4 °C, 16 hod.) a sekundární kozí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:7 500, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení fosforylované p38

Pro stanovení proteinu byla použita primární králičí protilátka p38 fosforylovaná na Thr180/Tyr182 (TBS/T/albumin, 1:500, 4 °C, 16 hod.) a sekundární králičí protilátka značenou křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/albumin, 1:5 000, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení CIDEa

Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka (CIDEa, TBS/T/mléko, 1:1 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární kozí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení Bak

Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka (Bak, TBS/T/mléko, 1:1 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární kozí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení DNMT3B

Pro stanovení proteinu byla použita primární králičí protilátka (Dnmt3B, TBS/T/mléko, 1:1 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení Mcl-1

Pro stanovení proteinu byla použita primární králičí protilátka (Mcl-1, TBS/T/mléko, 1:500, 4 °C, 16 hod.) a sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:7 500, 2 hod., 25 °C). Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin.

Stanovení aktinu

Po stanovení daného proteinu byla membrána zbavena navázaných proteinů aplikací „stripping“ pufru (60 °C; 30 min) a promyta 500 ml deionizované vody. Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka aktin I-19 (TBS/T/BSA, 1:2 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou (kozí IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:15 000, 2 hod., 25 °C).

4.7.4 RT-PCR

4.7.4.1 Izolace mRNA TRIzolovou metodou a stanovení celkové RNA

Pro izolaci celkové RNA byl využit TRIzol reagent. Buňky (5×10^4 buněk·cm⁻²) byly promyty PBS a následně lyzovány přímo na jamkách přidáním 1 ml TRIzol reagentu. Následně bylo postupováno podle protokolu vytvořeného Chomczynskim a kol.^{195,196}. RNA pelet získaný podle postupu byl vysušen a rozpuštěn ve 20 μ l deionizované vody neobsahující RNasy.

Míra čistoty vyizolované RNA byla určena spektrofotometrickým stanovením celkové RNA při 260 a 280 nm. Byla-li hodnota $A_{260/280} \geq 1,8$, byla čistota vzorku uspokojivá a hodnotu A_{260} bylo možno použít pro výpočet koncentrace RNA.

4.7.4.2 RT-PCR

cDNA byla syntetizována z 1 µg celkové RNA s využitím vysokokapacitního kitu pro transkripci cDNA při 25 °C 10 min a následně při 37 °C 120 min.

Směs pro RT-PCR reakci obsahovala 5 µl cDNA (150 ng na vzorek), 45 µl transkripční směsi (obsahující sondu SYBR Green[®]) a 200 ng forward a reverse primerů (*forward*: GAGAGTCAAGGGCTAGCGC; *revers*: GCTTCGACAGTGCTCTGGTA; připravené na Fyziologickém ústavu AV ČR, Praha). Amplifikace a vyhodnocení bylo provedeno v termocykleru MiniOpticon[™] a pomocí softwaru pro MiniOpticon[™]. Pro detekci UCP2 mRNA byl použit následující program: aktivační krok při 95 °C 10 min., následován 40 cykly PCR (denaturace 95 °C 15 s, annealing 60 °C 60 s, elongace 60 °C 60 s). Měření bylo prováděno v tripletech pro každý experiment. Expres UCP2 byla vypočítána pomocí komparativní delta-delta C_T metody, kdy GAPDH byl využit jako referenční gen.

4.7.5 Konfokální mikroskopie

Pro jednoduchou fotonovou mikroskopii byl využit inverzní fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s laserovou skenovací jednotkou FluoView FV1000 s argonovým laserem (457, 488, 515 nm; celkový výkon 30 mW) pro excitaci (Olympus). K nastavení konfokálních jednotek byl využit otvor velikosti 50 - 800 µm.

4.7.6 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence byla pozorována pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX80 a analyzována softwarem Olympus *MicroImage*. K zachycení obrazu byla využita zabudovaná kamera Camedia C-3030 (Olympus).

Pomocí sondy JC-1 (excitace 488 nm) byl sledován potenciál membrány, zelená fluorescence při 535 nm a následně červená fluorescence při 595 nm v potkaních neonatálních kardiomyocytech.

Po zafixování byly jádra HeLa buněk barveny sondou Hoechst 33258. Tato sonda je excitována v oblasti UV při 350 nm a emituje modrou fluorescenci při 461 nm.

S využitím protilátky anti-CIDE byla pozorována lokalizace proteinu CIDEa v buňce (zelená fluorescence).

Pro složení obrazů byl využit program Olympus *MicroImage*.

4.7.7 Membránový potenciál

4.7.7.1 Membránový potenciál v potkaních neonatálních kardiomyocytech

K potvrzení změn membránového potenciálu byla využita sonda JC-1. Jedná se o kationaktivní sondu, která se akumuluje v mitochondriích v závislosti na potenciálu. Následkem je posun fluorescence ze zelené (525 nm) na červenou (590 nm). Změna fluorescence je následkem tvorby J-agregátů v přítomnosti vysokého potenciálu, depolarizace membrány je spojena s poklesem poměru červené/zelené fluorescence. JC-1 vykazuje vyšší specifitu pro mitochondriální membránový potenciál než plasmatický membránový potenciál ve srovnání s DiOC₆ a rhodaminem¹⁹⁷.

Kardiomyocyty byly 2 × promyty vychlazeným PBS a inkubovány 30 min. při 37 °C v růstovém médiu obsahující fluorescenční sondu JC-1 (0,5 μmol·l⁻¹). Při excitaci 488 nm sonda emituje zelenou fluorescenci (535 nm) při nízkém potenciálu membrány a červenou (595 nm) při vysokém potenciálu membrány. Fluorescence byly změřeny zvlášť pomocí UV-VIS spektrofotometru. Mitochondriální depolarizace byla stanovena jako pokles intenzity fluorescence poměru červená/zelená.

Po inkubaci byly kardiomyocyty promyty 1 × PBS a překryty vrstvou čerstvého růstového média. Tento postup poskytuje lepší fotografie, přičemž zamezuje buněčné smrti způsobené vysušením. Pro stanovení fluorescence *in situ* byl využit fluorescenční mikroskop Olympus IX80 vybavený digitální kamerou Camedia C-3030 (Olympus C&S, Praha).

4.7.7.2 Membránový potenciál v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce

Změny ve vnitřním potenciálu membrány, $\Delta\psi_m$, byly stanoveny pomocí sondy TMRE (2 μmol·l⁻¹) při excitační vlnové délce 556 nm (šířka štěrbin 4 nm) a emisní

vlnové délce 577 nm (šířka štěrby 4 nm; cit.¹⁹⁸) na fluorometru Flouolog 322. Experimentální podmínky byly stejné jako v případě respirometrie (viz. kap. 4.7.9).

4.7.8 Stanovení produkce ROS

4.7.8.1 Produkce ROS v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce

Produkce H_2O_2 izolovanými mitochondriemi byla měřena pomocí fluorescence sledováním oxidace Amplex Red ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) křenovou peroxidasou ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; cit.¹⁹⁹). Fluorescence byla pozorována pomocí fluorometru Floolog 322 s excitací při 570 nm (šířka štěrby 8 nm) a emisí při 585 nm (šířka štěrby 2 nm). Pro kalibraci byly použity alikvoty H_2O_2 a míra oxidace byla sledována lineární regresí. Experimentální podmínky byly stejné jako v případě respirometrie (viz. kap. 4.7.9).

4.7.8.2 Produkce ROS v HL-60 a čistě chemickém systému

Buněčná linie HL-60 diferencovaná po 7 dní v přítomnosti 1,25% DMSO (finální koncentrace při stanovení 10^6 buněk $\cdot\text{ml}^{-1}$) byla přenesena do fluorescenční kyvety obsahující PBS+ pufr předehřátý na 37 °C. Vodný roztok SB nebo DHSB (finální koncentrace $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo SOD ($100 \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) byl přidán 5 min. před buněčnou stimulací. MCLA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl přidán 30 s. před začátkem měření. Nejdříve bylo získáno pozadí chemiluminiscence a následně automaticky odečteno z měření. Tvorba superoxidu byla iniciována přidávkem PMA ($62,5 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) 60 s. po začátku měření. Konečný objem vzorku byl 2 ml a koncentrace organického rozpouštědla DMSO a/nebo etanolu nepřekročila 0,5 %. Průběh chemiluminiscence navozené působením MCLA byl monitorován pomocí luminometru vybaveném emisním zrcadlem a rotačním kyvetovým držákem, který udržuje stabilní teplotu 37 °C a průběžně míchá vzorek (Perkin-Elmer LS50B).

Metoda využívající NADPH: MnCl_2 :2-merkaptetanol systém, který vyvinuli a publikovali Paoletti a Mocali²⁰⁰, byla využita jako nebuněčný systém generující superoxid. 5 min. před přidávkem 2-merkaptetanolu, který startuje reakci, byl do pufru trietanolaminu-dietanolaminu (pH 7,4) vyhřátého na 37 °C přidán DMSO roztok SB

a DHSB (konečná koncentrace 1 - 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo SOD (10 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pokles absorbance při 340 nm, tj. oxidace NADPH, byl sledován průběžně 20 min. pomocí UV-VIS spektrofotometru.

4.7.8.3 Produkce ROS v potkaních neonatálních kardiomyocytech

Potkaní kardiomyocyty ($0,5 \times 10^5$ buněk $\cdot\text{cm}^{-2}$) byly vysety na 6-jamkovou desku a kultivovány v růstovém médiu 72 hod. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami při 37 °C po dobu 1, 3 a 24 hod. Polární prefluorescenční sonda H₂DCFDA (2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetát) podléhá deacetylaci cytosolickými esterasami za vzniku dichlorodihydrofluoresceinu, který reaguje s ROS a vzniká fluorescein. Po experimentu byly buňky inkubovány 15 min. se sondou H₂DCFDA (15 μl , 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ve tmě při 37°C. Buňky byly promyty roztokem PBS, shrábnuty do 2 ml PBS a sonikovány²⁰¹. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí Bradfordové metody¹⁹⁴. Fluorescence byla monitorována při specifické excitační/emisní vlnové délce 488/525 nm. Mitochondrie byly vizualizovány po excitaci při 543 nm a emisi 590 - 650 nm²⁰¹.

4.7.9 *Respirometrie s vysokou rozlišovací schopností*

S využitím respirometru *Oxygraph 2k* s vysokým rozlišením doplněným softwarem DatLAB byla simultánně měřena mitochondriální koncentrace kyslíku a jeho spotřeba. Ke stanovení mitochondriální spotřeby kyslíku byly jako respirační substráty zvoleny pyruvát (5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) s malátem (1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a sukcinátem (5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V dalších experimentech, zaměřených na podporu zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů, byl použit pouze sukcinát (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). U mitochondrií byla stanovena respirace při 30 °C v roztoku pro respirometrii. K definování nefosforylovaných podmínek stavu 4 byl využit oligomycin (1 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.7.10 *Hmotnostní spektrometrie v iontové pastí (ESI Ion-trap MS)*

Pro analýzu hormonů T3 a T4 byl využit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí, který je plně integrován s moderní HPLC. Vyniká vysokou citlivostí v MSⁿ, poskytuje

vysoké rozlišení a široký rozsah m/z . LCQ Fleet je určen pro náročné analýzy komplexních vzorků. Parametry analýzy byly následující: el. napětí nánosu (4,5 kV), teplota v transportní kapiláře (300 °C) a el. napětí kapiláry (34 V). Dusík byl použit jako proudový, přídavný a nosný plyn, hélium bylo použito jako nástřikový plyn. Rychlost toku proudového, přídavného a nosného plynu byla 50, 5 a 7 (arbitární jednotky). Hmotnostní spektra byla získána v rozmezí 50 - 1000 m/z .

Výtěžnost a reproducibilita byly potvrzeny pomocí modelových standardních roztoků hormonů (8, 80, 800 a 8000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pro vyhodnocení výtěžnosti byly homogenáty potkaních kardiomyocytů ($n = 6$) před analýzou obohaceny o standardy. Denní a mezidenní HPLC/MS reproducibilita byla testována se standardními roztoky naředěnými v HPLC mobilní fázi. Série analýz ($n = 6$) byly měřeny po dobu 6 následných pracovních dní pro stanovení mezidenní reproducibility.

4.7.11 HPLC separace

K separaci byl využit chromatografický systém HPLC Shimadzu vybavený SCL-10Avp kontrolou, vakuovačem, binární pumpou, autodávkačem, kolonovým termostatem a UV-detektorem. Systém byl propojen s detektorem pro hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí.

K měření byla využita RP-8e chromatografická kolona (125 mm \times 4 mm, 5 μm) s předkolonovým systémem (4 mm \times 4 mm, 5 μm) Purospher[®] STAR. Nastříkované množství bylo 10 μl a mobilní fáze byla složená z vodného roztoku metanol/2% octové kyseliny (63 %/37 %, v/v). Tok mobilní fáze byl 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota kolonového termostatu byla nastavena na 30 °C.

4.7.12 Detekce chemiluminiscence

Chemiluminiscence je citlivá analytická metoda, která se uplatňuje jako samostatná metoda nebo ve spojení s jinou analytickou metodou jako detektor. Při chemiluminiscenční reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Proto musí být reakce exotermní a obvykle se jedná o oxidaci. Musí existovat způsob jak tuto energii usměrnit do excitace elektronů. Jestliže se chemická energie ztrácí ve formě

tepla, pak se chemiluminiscence neobjevuje. Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise. Chemická reakce zodpovědná za vznik světelného záření může být vyvolána činidlem (luminol) nebo biologickou cestou (enzym luciferasa a luciferin)²⁰².

Ke stanovení chemiluminiscence byl využit protokol od firmy Lonza. Extrakty z buněk byly izolovány pomocí lyzačního roztoku Tropix[®]. Chemiluminiscence byla stanovena s využitím pufru A a pufru B v kombinaci se substrátem Galacton-Plus[®]. Po 1 hod. byla pomocí akcelérátoru Tropix[®] Accelerator-II změřena aktivita kontrolní β -galaktosidasy (Dual-Light luciferase- β -galactosidase assay kit) na luminometru Berthold FB12.

4.7.13 *In situ* detekce apoptosy (TUNEL)

Byl sledován časový interval indukce tetracyklinem v buněčné linii T-REx HeLa metodou TUNEL (fragmentace jaderné DNA).

Detekce apoptosy pomocí metody TUNEL byla připravena podle instrukcí v manuálu (Roche). Metoda využívá vazby enzymu terminální deoxynukleotidyl transferasy (TdT), která se specificky váže na volné 3'OH-konce DNA, kde tento TdT syntetizuje polymer obsahující fluorescenčně značený deoxynukleotid. Vazba fluorescenčně značeného enzymu je detekována mikroskopicky²⁰³.

Buňky byly 3 × promyty roztokem PBS, 10 min fixovány chlazeným roztokem aceton-metanol (1:1) a uloženy při -20 °C. Buňky zafixované na sklíčku byly převrstveny roztokem PBS (2 × 2 min., 4 °C) a poté permeabilizačním roztokem (2 min., 4 °C). Sklíčka byla opláchnuta PBS a inkubována ve vlhké komůrce (60 min., tma, 37 °C) s reakční směsí (20 μ l/sklo). Poté byla skla převrstvena PBS (3 × 3 min.) a následně byla jádra buněk obarvena fluorescenčním barvivem DAPI (100 μ l /sklo, 1:100 v PBS, 10 min., tma), následoval rychlý oplach deionizovanou vodou. Nakonec byla obarvená sklíčka zamontována do vodného média Moviolu 4-88 (polyvinylalkohol) a analyzována na fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX 80).

Fragmentace DNA (apoptotické buňky) byla hodnocena na 200 jádrech/sklíčko. Množství apoptotických buněk (%) bylo stanoveno s použitím následujícího vztahu:

$$\text{Množství apoptotických buněk (\%)} = 100 \cdot \left(\frac{N_P}{N_C} \right)$$

N_C ... celkový počet buněk (obarvené DAPI)

N_P ... počet apoptotických buněk (TUNEL pozitivní buňky)

4.7.14 *Imunocytochemie*

Byla sledována lokalizace proteinu CIDEa v buňce s využitím buněčné linie T-REx HeLa metodou imunocytochemie.

Buňky byly fixovány přidáním vychlazeného metanolu a celá deska byla umístěna přes noc do $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Po rozmrazení byly buňky $2 \times$ opláchnuty PBS a zprůchodněny inkubací s 0,2% Tritonem TX-100/PBS (v/v) na 30 min. při laboratorní teplotě. Blokování bylo provedeno inkubací v 3% roztoku BSA/PBS (w/v) 15 min. při laboratorní teplotě. Následovala inkubace s anti-CIDEa primární protilátkou (ProSci) ředěnou 1:100 v 3% BSA/PBS (w/v) 45 min. při $37\text{ }^\circ\text{C}$. Po opláchnutí $3 \times$ roztokem PBS byly buňky inkubovány 30 min. při laboratorní teplotě v králíčí sekundární protilátce suspendované v 2% BSA/PBS (w/v). Buňky byly $3 \times$ opláchnuty PBS a na sklíčkách pozorovány s využitím fluorescenčního média (Dako cytometry). K pozorování byl využit mikroskop Olympus IX 80.

4.7.15 *Příprava subcelulárních frakcí*

K přípravě subcelulárních frakcí byl použit mírně modifikovaný postup uvedený v publikaci Carcamo a kol.²⁰⁴ T-REx HeLa buňky byly promyty 2×2 ml vychlazeného PBS a shrábnuty do 1 ml PBS. Suspenze byla centrifugována ($1\ 500 \times g/5$ min./ $4\text{ }^\circ\text{C}$), pelet byl jemně resuspendován pipetováním v $300\ \mu\text{l}$ vychlazeného pufru A, inkubovány 10 min. na ledu a centrifugovány ($5\ 500 \times g/10$ min./ $4\text{ }^\circ\text{C}$). Následně byl odebrán supernatant, který obsahuje cytosolickou a mitochondriální frakci, pelet byl rázně resuspendován stříkačkou v trojnásobném objemu vychlazeného pufru B a inkubován 30 min. na ledu. Po centrifugaci ($12\ 000 \times g/20$ min./ $4\text{ }^\circ\text{C}$) byl odebrán supernatant,

obsahující nukleární extrakt. Oba extrakty byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do použití. Obsah proteinu byl detekován Bradfordovou metodou¹⁹⁴.

4.7.16 Aktivita kaspasy 3

S využitím buněčné linie T-REx HeLa byla sledována redistribuce proteinu CIDEa v jaderné a cytosolické frakci buňky a míra apoptosy pomocí aktivity kaspasy 3.

Buňky byly opláchnuty PBS a lyzovány v 50 μl vychlazeného lyzačního pufru při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min. Lyzát byl vyčištěn centrifugací ($14\ 000\times g/15\text{ min.}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a celkový protein v supernatantu byl stanoven Bradfordovou metodou¹⁹⁴. Lyzát byl stanoven v reakčním pufru inkubací při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 min. Pozadí bylo získáno při paralelním měření s inhibítorem kaspasy 3 (Ac-DEVD-CHO; $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Fluorescence byla měřena při 380/450 nm s využitím spektrofluorometru (Tecan Magelan).

4.7.17 Stanovení koncentrace bílkovin

4.7.17.1 Metoda dle Bradfordové

Stanovení je založeno na tvorbě komplexu mezi barvivem (Coomassie brilliant blue G-250) a proteiny ve vzorku. Barvivo se vyskytuje ve třech formách: kation (470 nm ; červený), neutrální molekula (650 nm ; zelená) a anion (595 nm ; modrý). Vazba proteinu stabilizuje aniontovou formu a vyvolává změnu zbarvení, které je změřeno fotometricky při 595 nm (cit.¹⁹⁴).

K 10 μl standardu / vzorku bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku a po promíchání byla měřena absorbance. Hodnota byla odečtena z kalibračního grafu.

4.7.18 Stanovení buněčného poškození

4.7.18.1 MTT test

Žlutá tetrazoliová sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) je redukována mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk

na fialové, ve vodě nerozpustné formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm (cit.²⁰⁵).

Buňky byly opláchnuty sterilním roztokem PBS a následně bylo aplikováno 100 μl čerstvého bezsérového média a 10 μl roztoku MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; PBS). Po 3 hod. inkubaci (37 °C; 5 % CO_2) bylo médium s MTT odsáto a do jamek bylo aplikováno 200 μl DMSO s 1 % amoniaku. Po 5 min (rozpuštění krystalů) byla změřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku při 540 nm.

Životnost buněk byla počítána ze vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{A_v}{A_s} \cdot 100$$

A_v ... absorbance vzorku; A_s ... absorbance kontroly.

4.7.18.2 LDH test

Buňky s porušenou integritou membrány uvolňují laktátdehydrogenasu do média. Působením LDH v reakční směsi obsahující pyruvát dochází k přeměně NADH na NAD^+ , a tím k poklesu absorbance, měřeného kineticky spektrofotometricky při 340 nm po dobu 4 min. (cit.²⁰⁶).

Aktivita LDH v médiu byla stanovena v 50 μl vzorku po přidání 150 μl pracovního roztoku. Aktivita LDH byla vypočítána ze vztahu:

$$\text{Aktivita } (\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}) = \frac{\Delta A_{\text{min}}}{\varepsilon \cdot L} \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{min} ... změna absorbance (min) při 340 nm; ε ... molární absorpční koeficient ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$); L ... délka optické dráhy (cm).

Životnost buněk byla počítána ze vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{A_s}{A_v} \cdot 100$$

A_v ... absorbance vzorku, A_s ... absorbance kontroly

4.8 Statistická analýza

Všechny experimenty *in vitro* byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($p < 0,05$).

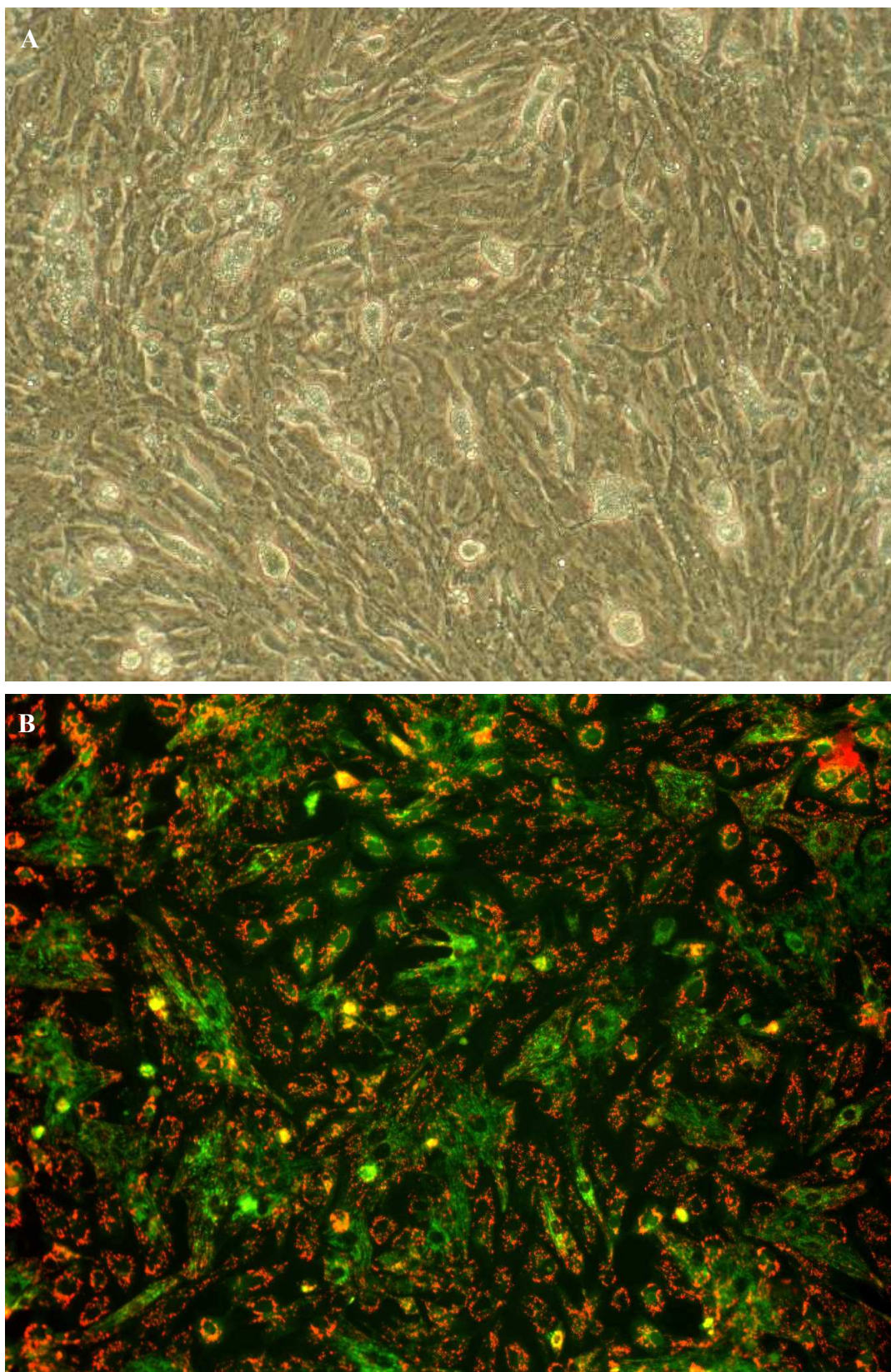
Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2000 (Microsoft, USA) s nástavbou Life Science Workbench (LSW) Data Analysis Toolbox (MDL Information Systems, Inc., USA) nebo Studentovým t -testem.

5. VÝSLEDKY

5.1 Modulace exprese UCP2 v potkaních kardiomyocytech

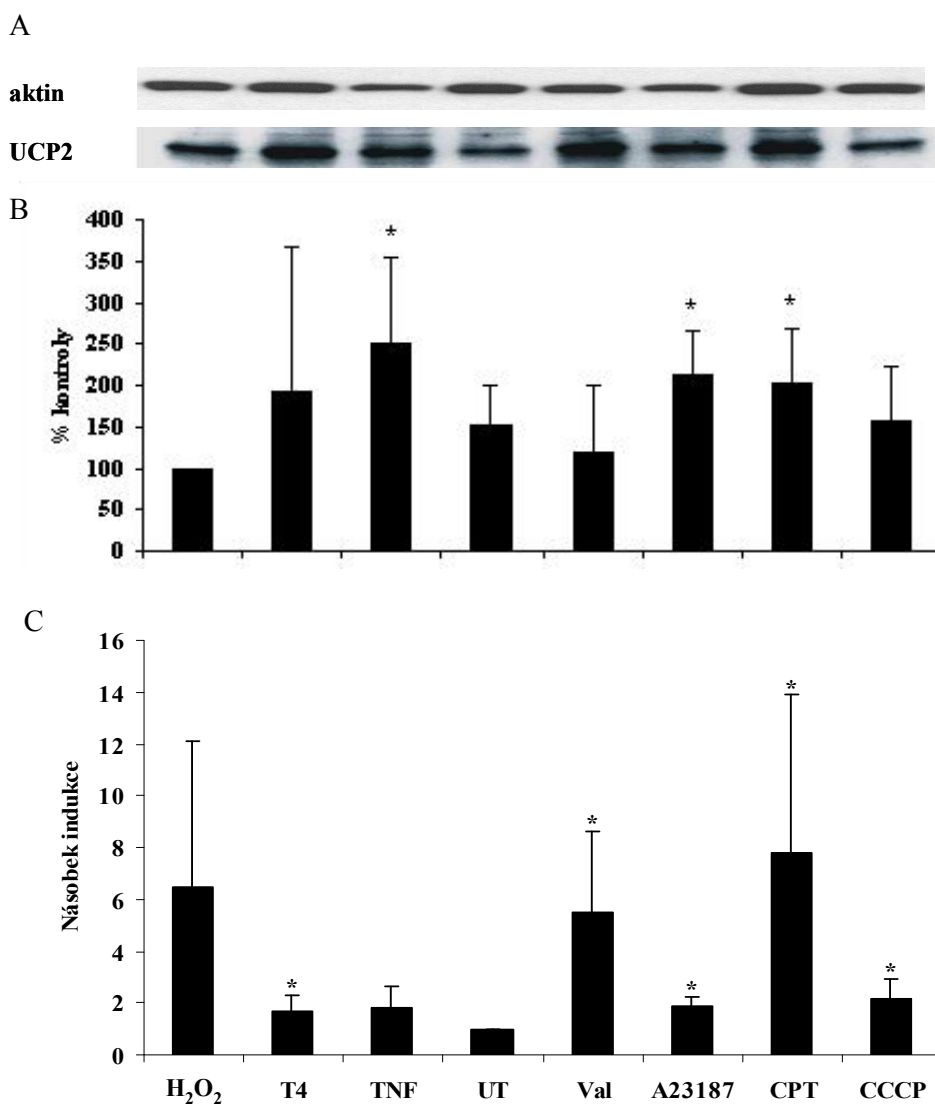
5.1.1 *Expresa UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech*

Kardiomyocyty (obr. 10), které patří mezi dobře zavedené modely pro studium transportu a toxicity léčiv, byly kultivovány s valinomycinem (Val, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), TNF α (25 ng), L-thyroxinem (T4, $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), camptothecinem (CPT, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), CCCP ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), A23187 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a H_2O_2 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 hod., za účelem zjištění, zda tyto sloučeniny ovlivňují expresi UCP2. Tyto sloučeniny byly vybrány z důvodu jejich účinku na potenciál membrány, iontový gradient a apoptotickou dráhu. Expresa UCP2 byla ověřena na hladině proteinu i na úrovni mRNA.



Obr. 10 Buněčná kultura kardiomyocytů. *A*, neonatální potkaní kardiomyocyty byly po 72 hod. stabilizace po vysetí pozorovány pomocí mikroskopu *Olympus IX80* při viditelném záření a pomocí programu *Olympus MicroImage*, zvětšeno 100 ×. *B*, neonatální potkaní kardiomyocyty byly po 72 hod. stabilizace po vysetí inkubovány se sondou JC-1 po dobu 30 min a pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu *Olympus IX80* a pomocí programu *Olympus MicroImage* při emisní vlnové délce 535/590 nm, zvětšeno 100 ×.

Několik z výše uvedených sloučenin zvyšovalo expresi UCP2 (obr. 11. A), ovšem pouze T4, TNF α a CPT mají signifikantní a reprodukcibilní efekt ve srovnání s kontrolními buňkami (obr. 11. B). Bylo zjištěno, že většina sloučenin signifikantně zvyšuje hladinu UCP2 mRNA v kardiomyocytech po 24 hod. inkubaci (obr. 11. C). Zatímco výsledky potvrdily CPT a T4 jako induktory UCP2 v kardiomyocytech na úrovni proteinu i mRNA, efekt zbývajících sloučenin na UCP2 mRNA se neshodoval s jejich efektem na úrovni proteinu.



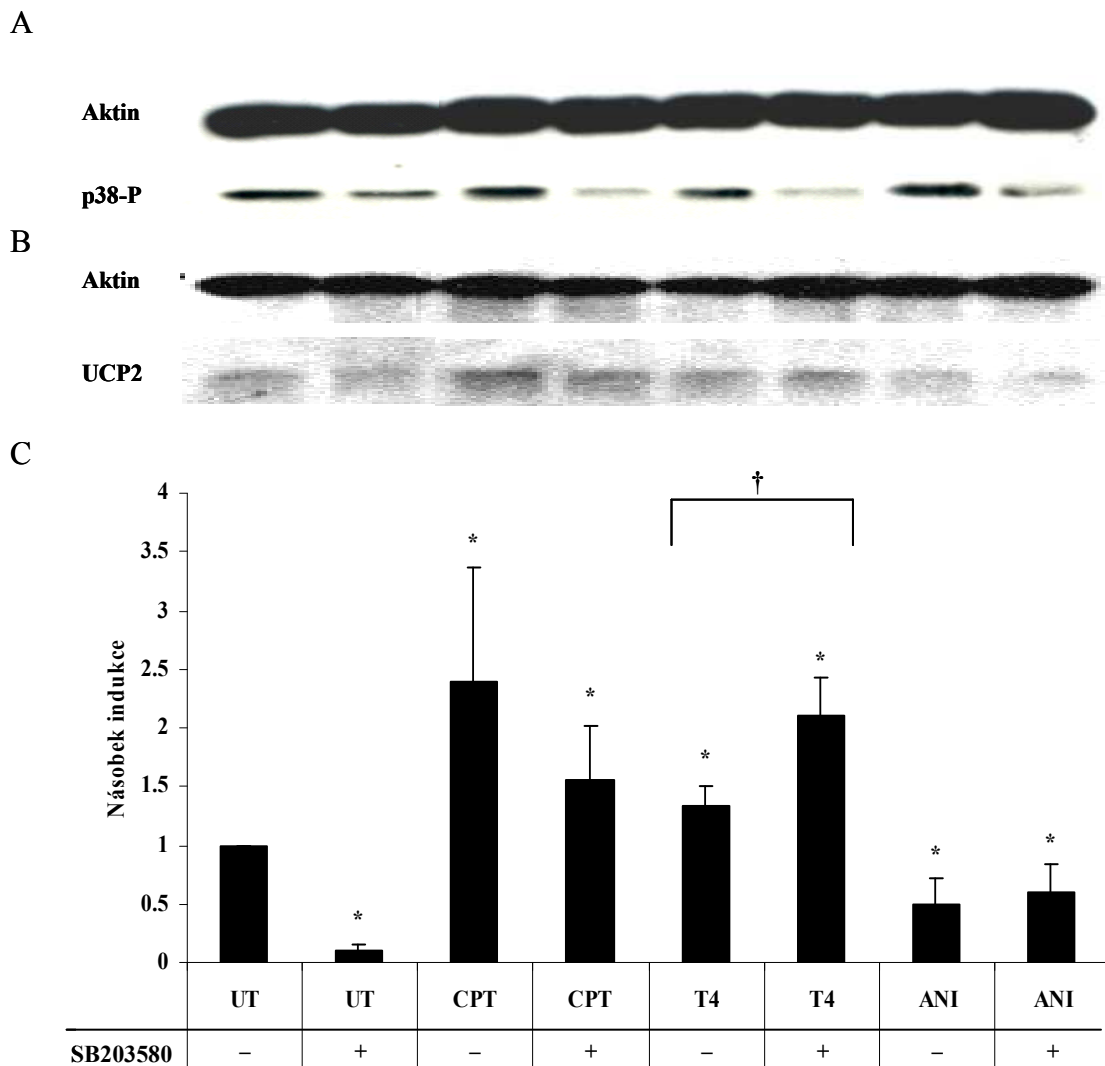
Obr. 11. Indukce exprese UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech.

Potkaní neonatální kardiomyocyty byly kultivovány v přítomnosti 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H₂O₂, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T4, 25 ng TNF α , 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Val, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ A23187, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT a 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CCCP na 24 hod. Kontrolní buňky (UT) byly vystaveny odpovídajícímu množství DMSO. A, reprezentativní western blot, který ukazuje ovlivnění testovaných látek na expresi UCP2. Oddělená linie obsahuje lidský rekombinantní UCP2 jako standard. B, data ukazují hustoty proteinových bendů, získaných z pěti nezávislých western blotů s využitím densitometrie. C, UCP2 mRNA byla detekována RT-PCR ve čtyřech nezávislých izolacích potkaních neonatálních kardiomyocytů. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).

5.1.2 Zapojení p38 do exprese UCP2

Naše zjištění, že CPT způsobuje indukci UCP2, nás vedlo k prozkoumání zapojení kinasy p38, což jsme také více rozvedli v přehledném článku⁸⁵. Byla potvrzena přítomnost fosforylované p38 na hladině proteinu i mRNA, a to v čase 30 min., z důvodu poločasu rozpadu UCP2 mRNA²⁰⁷ a v čase 24 hod., zvoleném na základě našeho dřívějšího pozorování hladin UCP2. Pro ověření zapojení kinasy p38 v indukci proteinu UCP2 byl použit SB203580, účinný a selektivní inhibitor fosforylace p38. Fosforylace byla porovnávána s aktivací anisomycinem (ANI), inhibitorem syntézy proteinu, který se používá jako aktivátor kinasové kaskády v savčích buňkách.

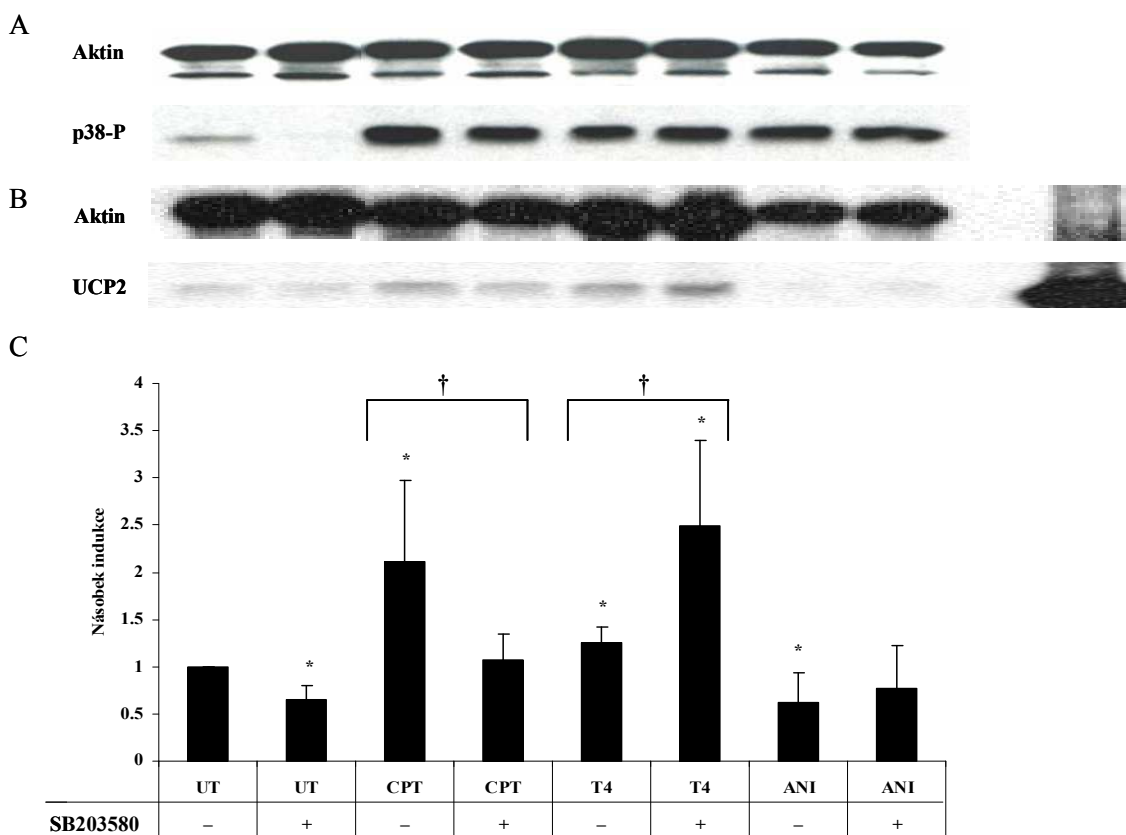
Potkaní neonatální kardiomyocyty byly preinkubovány 30 min. s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB203580, přičemž tyto podmínky byly vybrány na základě optimalizované dávky a inkubačního času vyvinuté Henklovou a kol.²⁰⁸ pro primární kultury lidských hepatocytů. Na buňky jsme aplikovali camptothecin (CPT, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), L-thyroxin (T4, $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a anisomycin (ANI, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na 30 min. nebo na 24 hod. Imunodetekce fosforylované p38 odhalila, že preinkubované buňky s SB203580 inhibují fosforylaci ve všech případech podle očekávání (obr. 12. A). CPT indukovala fosforylaci p38 a expresi UCP2, zatímco v přítomnosti inhibitoru SB203580 byl efekt CPT oslaben. Na druhé straně, působením T4 preinkubace buněk s SB203580 mírně zvýšila indukci proteinu UCP2 (obr. 12. B). Experimenty hodnotící modulaci CPT a T4 indukce způsobené SB203580 na mRNA hladině potvrdily výsledky získané imunoblot analýzou (obr. 12. C). Ačkoli doba inkubace byla pouze 30 min, obě sloučeniny způsobily statisticky významnou indukci bez ohledu na přítomnost SB203580.



Obr. 12. Efekt CPT a T4 na fosforylaci p38 a expresi UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech - 30 min. Přítomnost proteinů fosforylované p38 a UCP2 byla stanovena pomocí western blot analýzy a v případě UCP2 potvrzena RT-PCR. Přítomnost $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB203580 je označena symbolem plus. *A*, reprezentativní western blot ukazující vliv testovaných látek na p38-P (Thr180/Tyr182). *B*, reprezentativní western blot ukazující vliv testovaných látek na expresi UCP2. *C*, UCP2 mRNA byla detekována RT-PCR s využitím potkaního GAPDH jako standardu. Data jsou průměrem \pm SEM ze čtyř nezávislých izolací potkaních neonatálních kardiomyocytů. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$). † Tato hodnota je signifikantně odlišná ($p < 0,05$).

Prodloužení doby inkubace na 24 hod. nevyvolalo očekávaný efekt SB203580 na fosforylovanou p38, nedošlo k signifikantnímu snížení přítomnosti fosforylované formy p38 (obr. 13. A). Nicméně hladiny proteinu a mRNA UCP2 byly ovlivněny stejně jako při krátké inkubaci. CPT i T4 vyvolali indukci, která byla snížena přítomností SB203580 v případě CPT a zvýšena v případě T4 (obr. 13. B). Stejný vliv měla

SB203580 na přítomnost UCP2 zprostředkovanou CPT nebo T4 na hladině mRNA (obr. 13. C).



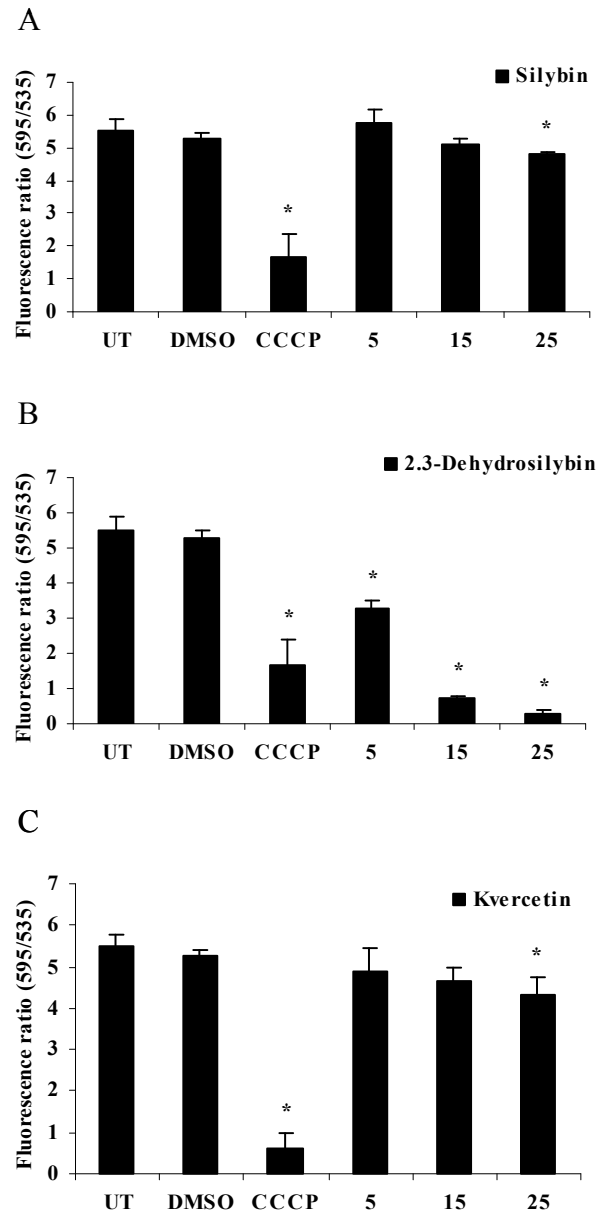
Obr. 13. Efekt CPT a T4 na fosforylaci p38 a expresi UCP2 v potkaních neonatálních kardiomyocytech - 24 hod. Přítomnost proteinů fosforylované p38 a UCP2 byla stanovena pomocí western blot analýzy a v případě UCP2 potvrzena RT-PCR. Přítomnost $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB203580 je označena symbolem plus. *A*, reprezentativní western blot ukazující vliv testovaných látek na p38-P (Thr180/Tyr182). *B*, reprezentativní western blot ukazující vliv testovaných látek na expresi UCP2. *C*, UCP2 mRNA byla detekována RT-PCR s využitím potkaního GAPDH jako standardu. Data jsou průměrem \pm SEM ze čtyř nezávislých izolací potkaních neonatálních kardiomyocytů. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$). † Tato hodnota je signifikantně odlišná ($p < 0,05$).

5.1.3 Dehydrosilybin zeslabuje produkci ROS mechanismem podobným odpřažení

5.1.3.1 Účinek SB a DHSB na energetický status izolovaných potkaních kardiomyocytů

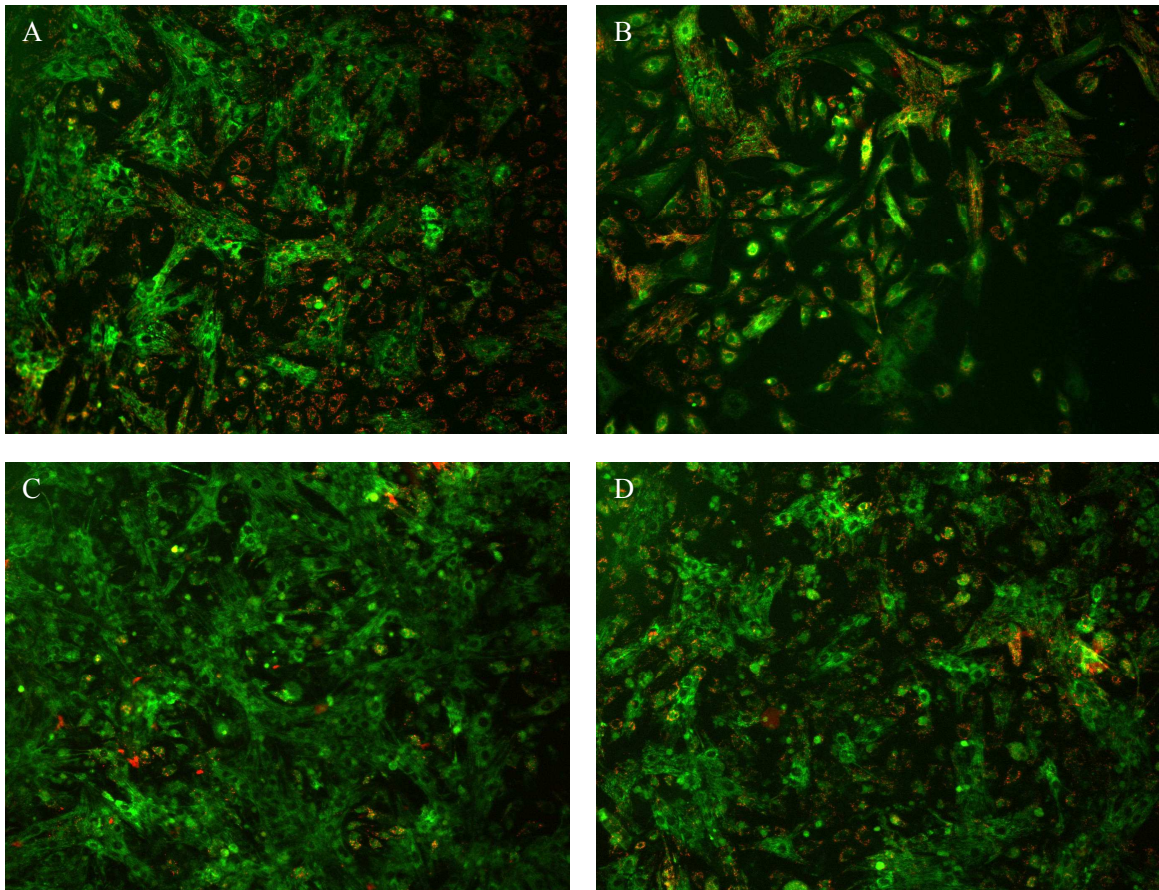
SB a DHSB vykazovali zanedbatelnou toxicitu v několika buněčných typech, pokud ovšem nebyla překročena koncentrace $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Účinek obou flavonolignanů na celkové buněčné procesy se může významně lišit v závislosti na koncentraci a s ohledem na jejich hydrofobicitu, která ovlivňuje jejich účinek ve zjednodušených in vitro

systemech. Dodnes bylo identifikováno mnoho proteinů a struktur, na které mají tyto látky biologický účinek²⁰⁹. Pro detekci účinků polyfenolů na buněčnou bioenergetiku byly neonatální kardiomyocyty vystaveny mikromolárním množstvím SB a DHSB na 24 hod. Aby mohl být zhodnocen efekt sloučenin na membránový potenciál, byly buňky po preinkubaci těchto látek vystaveny médiu obsahující fluorescenční sondu JC-1 po dobu 30 min. SB vykazovala zanedbatelný účinek, který nebyl signifikantně odlišný od kontrolních buněk (obr. 14. A). Na druhé straně zvyšující se koncentrace DHSB vyvolávala snížení potenciálu v kardiomyocytech, což se projevilo jako změna poměru červené/zelené fluorescence použité sondy JC-1 (obr. 14. B). Překvapivý byl účinek kvercetinu, flavonolu, který má schopnost odstraňovat superoxydy⁸³ a odpřahovat mitochondriální respiraci⁸⁷. Neprokázal statisticky signifikantní účinek a vykazoval podobné chování jako SB (obr. 14. C). S využitím fluorescenční sondy byl také mikroskopicky pozorován účinek těchto látek na membránový potenciál (obr. 15), kde červená znázorňuje mitochondrie. Pokud dojde ke snížení potenciálu mitochondriální membrány, například vlivem odpřažení mitochondriální respirace, pak intenzita a množství červené fluorescence klesá.



Obr. 14. DHSB snižuje membránový potenciál v potkaních kardiomyocytech.

Buněčná kultura potkaních neonatálních kardiomyocytů byla vystavena různým koncentracím SB, DHSB, kvercetinu a syntetickému odpráhovači CCCP ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Panely ukazují poměr červená/zelená JC-1 fluorescence při 488 nm z dat stanovených zvláště pro každou kulturu. Buněčné kultury zahrnují také kontrolní buňky (UT) a buňky inkubované s odpovídajícím množstvím DMSO. Čísla pod grafy představují mikromolární množství SB (A), DHSB (B) a kvercetinu (C) použitých v experimentu. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).

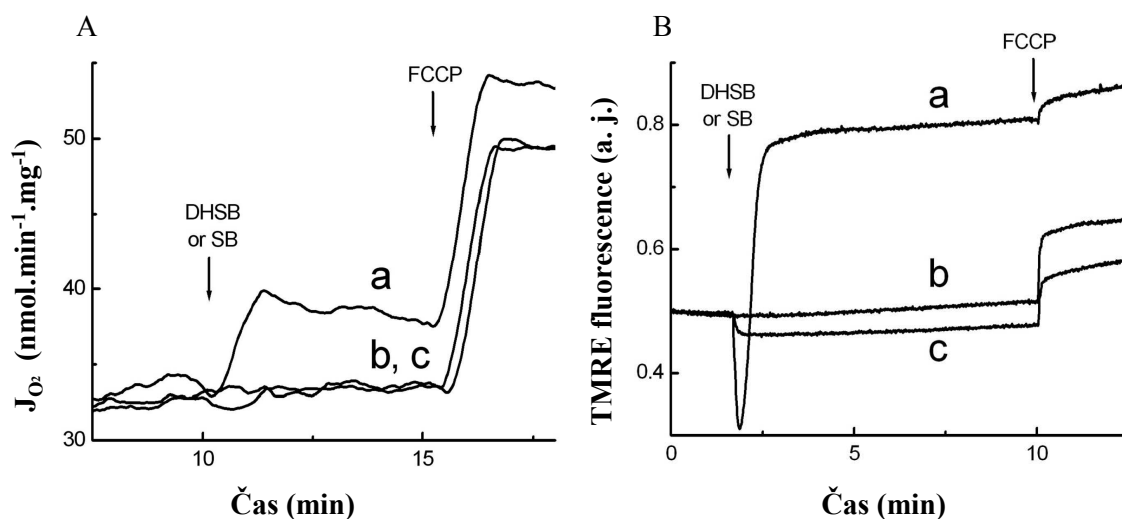


Obr. 15. DHSB snižuje membránový potenciál v potkaních kardiomyocytech - mikroskopické sledování. Kardiomyocyty byly preinkubovány s SB a DHSB ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 30 min. Buněčná kultura byla inkubována 20 minut se sondou JC-1 a následně pozorována pod mikroskopem. Zvětšeno $100\times$. Kontrolní buňky (A), SB (B), CCCP (C) a DHSB (D).

5.1.3.2 Účinek SB a DHSB na respiraci a membránový potenciál izolovaných potkaních kardiomyocytů

Pro další ověření účinku DHSB pozorovaného v buněčném systému ve vztahu k mitochondriím byli testovány sloučeniny SB a DHSB v nezávislých experimentech s využitím mitochondrií izolovaných z potkaních srdcí. Byly stanoveny změny ve spotřebě kyslíku a membránového potenciálu ve dvou paralelních experimentech po přidavku SB a DHSB. Přídavek DHSB ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, obr. 16. A) způsobil signifikantní vzrůst ve spotřebě kyslíku (křivka A) oproti spotřebě kyslíku u kontrolního vzorku (křivka B). Na rozdíl od účinku DHSB, SB ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nevyvolal změny ve spotřebě kyslíku (křivka C). DHSB ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měl za následek počáteční pokles ve fluorescenci, odpovídající absorpčním vlastnostem DHSB u studované vlnové délky (obr. 16. B). Tento pokles byl následován signifikantním vzrůstem fluorescence TMRE (křivka a) ve

srovnání s kontrolními podmínkami (křivka b). Jedná se tedy o pokles mitochondriálního potenciálu $\Delta\Psi_m$ v závislosti na DHSB. Přídavek $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB byl opět bez účinku (křivka c). Na konci každého cyklu byl pro srovnání přidán odpřahovač FCCP ($10\ \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Srovnatelný vzrůst respirace doprovázený poklesem membránového potenciálu vyvolaný DHSB byl shodný s látkami způsobujícími odpřažení mitochondriální respirace²¹⁰. Alternativní stanovení změny membránového potenciálu v izolovaných mitochondriích sondou JC-1 prokázalo stejný pokles vyvolaný přítomností DHSB.

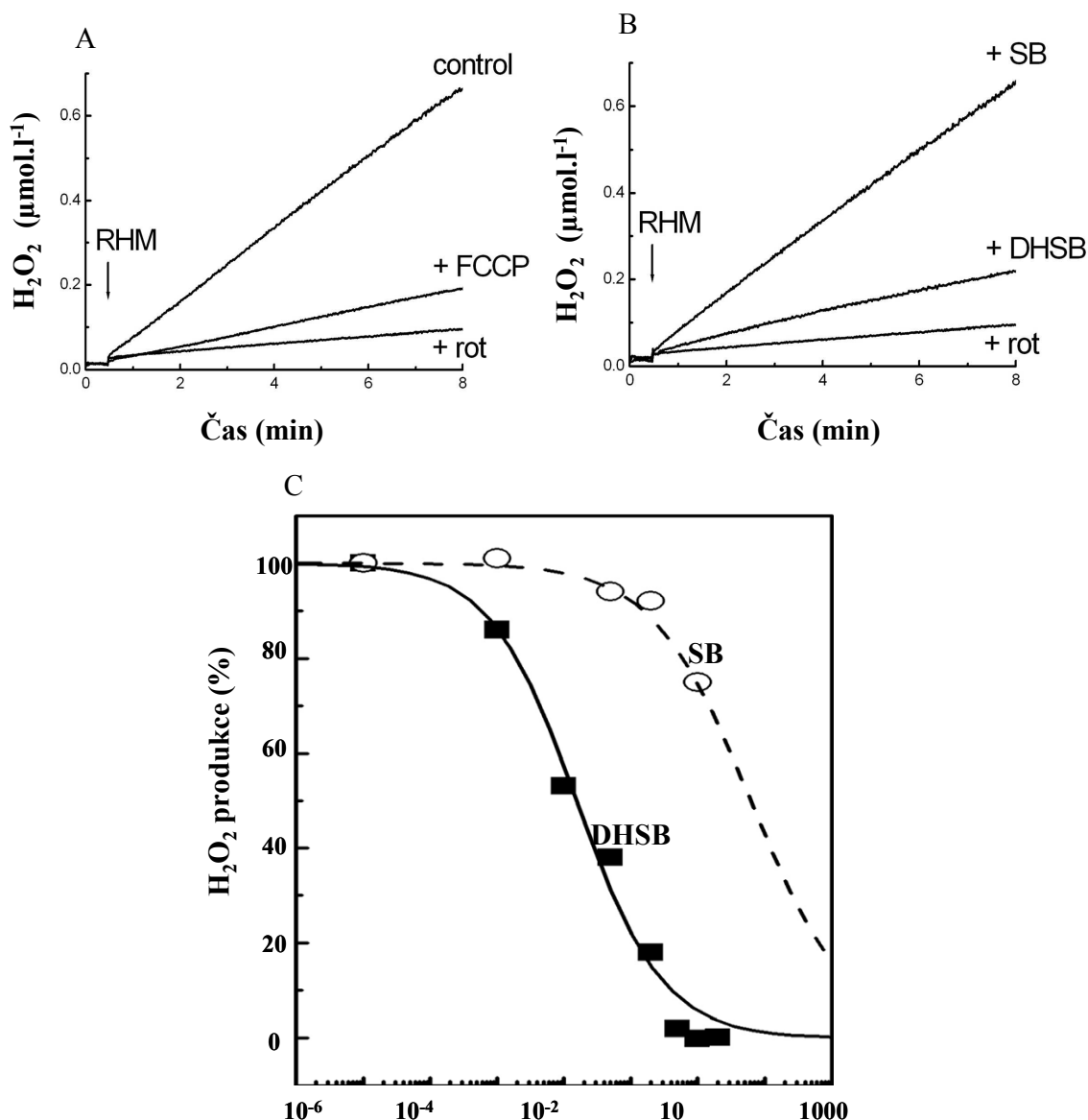


Obr. 16. Efekt DHSB a SB na spotřebu kyslíku a membránový potenciál v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce. Reprezentativní křivky dvou paralelních experimentů sledují změny spotřeby kyslíku (A) a TMRE fluorescence (B) indikující změny v mitochondriálním membránovém potenciálu. *Křivka a*, přídavek $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHSB má za následek jak zvýšení respirace, tak i pokles membránového potenciálu. *Křivka b*, reprezentuje kontrolní základní čáru. *Křivka c*, $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB byl bez efektu. Na konci každého cyklu, byl pro srovnání přidán FCCP ($10\ \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Potkaní srdeční mitochondrie ($0,1\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) dýchaly v přítomnosti $5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pyruvátu, $1\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ malátu a $5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sukcinátu. Tato data jsou reprezentativní z více než pěti nezávislých experimentů.

5.1.3.3 DHSB snižuje tvorbu ROS v izolovaných mitochondriích

Naše experimenty dokázaly, že DHSB má oproti SB schopnost chovat se jako odpřahovač oxidativní fosforylace. Protože známé chemické odpřahovače mají schopnost snižovat tvorbu ROS²¹¹, testovali jsme, jestli DHSB bude vykazovat stejný biologický účinek. Pro experimenty detekce účinku SB a DHSB na produkci mitochondriální ROS jsme použili mitochondrie izolované ze srdce dospělých laboratorních potkanů. Stanovovali jsme tvorbu H_2O_2 s využitím kolorimetrické reakce fluorescenční sondou

amplex red v přítomnosti křenové peroxidasy (HRP). Experimentální podmínky byly zvoleny tak, že při použití sukcinátu dochází k mohutné produkci ROS mitochondriálním komplexem I vlivem reverzního elektronového transportu v nepřítomnosti substrátů komplexu I. Obr. 17. A znázorňuje fluorescenční křivky silné produkce H_2O_2 (křivka ctrl), která byla téměř kompletně inhibována přidavkem rotenonu ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; křivka rot). Přídavek FCCP ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) vedl k velkému poklesu mitochondriální produkce H_2O_2 (křivka FCCP), který je shodný se známými vlastnostmi syntetických odpráhovačů. Přídavek SB ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měl za následek nesignifikantní pokles v mitochondriální produkci H_2O_2 (křivka SB; obr. 17. B), zatímco přídavek $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHSB způsobil 80% pokles v produkci H_2O_2 (křivka DHSB; obr. 17. B). Obr. 17. C znázorňuje křivku koncentrační závislosti účinku DHSB a SB na mitochondriální produkci H_2O_2 , ze které byla vypočtena hodnota $IC_{50} = 0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DHSB ($n = 3$) a přibližně odhadnuta IC_{50} v hodnotě $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro SB. V podobném experimentu, kdy byl použit sukcinát spolu se substráty komplexu I, byla pozorována mnohem nižší produkce H_2O_2 v kontrole, ale přídavky DHSB a SB vedly ke kvalitativně identickým výsledkům.

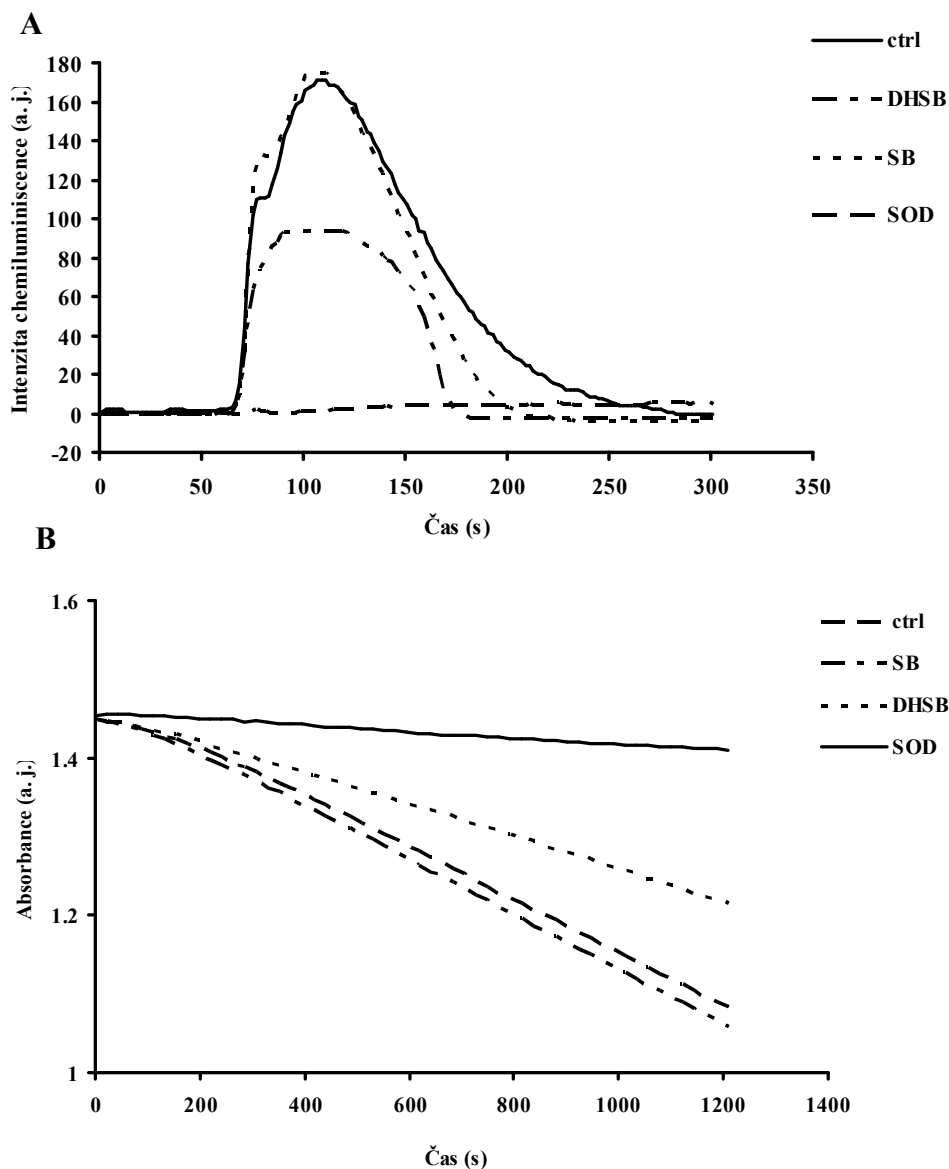


Obr. 17. Efekt DHSB a SB na produkci ROS v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce. *A*, křivka sleduje změny v mitochondriální produkci H₂O₂. Potkaní srdeční mitochondrie (0,1 mg·ml⁻¹) dýchaly v přítomnosti 10 mmol·l⁻¹ sukcinátu (*ctrl*). Přídavek 5 mmol·l⁻¹ rotenonu má za následek téměř kompletní inhibici kontrolní produkce H₂O₂ (*rot*). Přídavek 10 nmol·l⁻¹ FCCP má za následek výrazný pokles kontrolní produkce H₂O₂ (*FCCP*). *B*, ve stejném experimentu, přídavek 2 μmol·l⁻¹ SB nezpůsobil signifikantní změny ve srovnání s produkcí H₂O₂ u kontroly (*SB*), zatímco přídavek 2 μmol·l⁻¹ DHSB má za následek značný pokles oproti produkci H₂O₂ u kontroly (*DHSB*). *C*, koncentrace závislá na DHSB (čtverec) a SB (kruh) - závislý pokles mitochondriální produkce H₂O₂. Kontrolní produkce byla zvolena jako 100 % a produkce H₂O₂ inhibovaná rotenonem byla nastavena jako 0 %. Tato data jsou reprezentativní ze tří nezávislých experimentů.

5.1.3.4 DHSB a SB vykazují nízkou schopnost tlumit tvorbu superoxidu v modelových systémech

V předchozích experimentech byla ověřena schopnost DHSB inhibovat produkci H₂O₂, jehož prekurzorem je superoxid tvořený v matrix mitochondrií dýchacím řetězcem. Abychom vyloučili, že účinek DHSB na membránový potenciál a produkci ROS spočívá

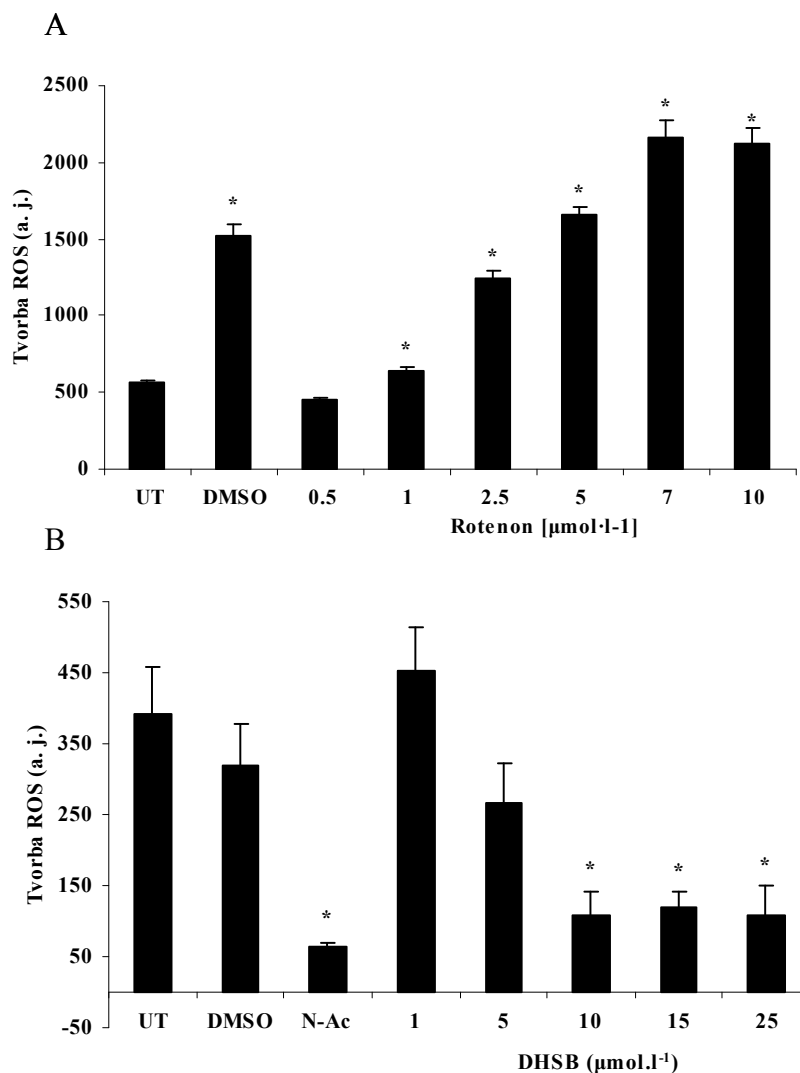
pouze v jeho antioxidačních vlastnostech, tedy schopnosti vychytávat superoxid, využili jsme buněčný systém DMSO-diferencovaných buněk HL-60, které po stimulaci fMLP nebo PMA generují extracelulární superoxid²¹².



Obr. 18. Účinek DHSB na tvorbu superoxidu v modelových systémech. *A*, znázorňuje chemiluminiscenční křivku produkce superoxidu detekovanou MCLA v diferencovaných buňkách HL-60. 10^6 buněk/ml bylo stimulováno samotným PMA (plná křivka - *ctrl*), nebo preinkubováno s $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB (tečkovaná křivka - *SB*) nebo s $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHSB (čérchovaná křivka - *DHSB*) před stimulací PMA. Buňky byly preinkubovány se $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ superoxid dismutasy před stimulací PMA (čárkovaná křivka - *SOD*). *B*, ukazuje změnu absorbance při 340 nm vlivem oxidace NADPH v čase. Byl využit pufr s obsahem trietanolaminu:dietanolaminu o pH 7,4 obsahující MnCl_2 a NADPH, oxidace byla iniciovaná přidávkem 2-merkaptetanolu. Před samotnou reakcí bylo do systému přidáno: kontrola (čárkovaná křivka - *ctrl*), $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB (čérchovaná křivka - *SB*), $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHSB (tečkovaná křivka - *DHSB*) a $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ superoxid dismutasy (plná křivka - *SOD*).

SB nevykázal signifikantní účinek odstraňování superoxidu v koncentracích až do $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, zatímco stejná koncentrace DHSB vedla přibližně ke 40% inhibici tvorby superoxidu (obr. 18. A). Stejný nedostatečný efekt SB při odstraňování superoxidu byl pozorován v čistě chemickém systému. Až vysoká koncentrace DHSB byla schopná snížit oxidaci NADPH vyvolanou superoxidem (obr. 18. B).

DHSB vykázal slabou schopnost potlačit tvorbu superoxidu, který byl generován do extracelulárního prostoru. Dalším krokem bylo zjištění, co se děje v případě intracelulární tvorby superoxidu. Cílem bylo prokázat, že přidavek rotenonu k buněčné kultuře má za následek tvorbu ROS a tento proces je inhibován DHSB. K experimentům byla využita kultura potkaních neonatálních kardiomyocytů. Rotenon, inhibitor komplexu I, zvýšil na mitochondriích závislou tvorbu ROS^{211,213}. Nejdříve byla stanovena optimální koncentrace k vyvolání produkce ROS (obr. 19. A.) a zvolena $7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. DHSB vykázal koncentračně závislou inhibici rotenonem indukované produkce ROS (obr. 19. B.), zatímco SB ve stejném koncentračním rozmezí tvorbu ROS neinhiboval.

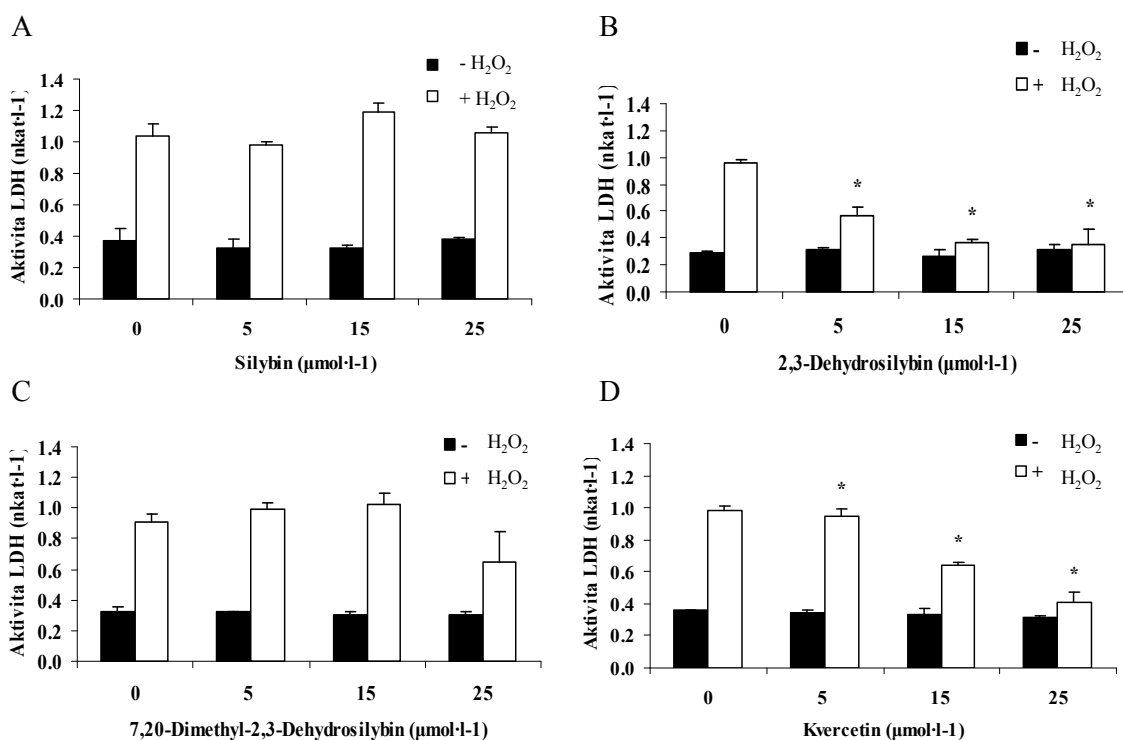


Obr. 19. Účinek DHSB na rotenonem indukovanou produkci ROS v kultuře neonatálních potkaních kardiomyocytů. Produkce ROS byla měřena s využitím fluorescence detekované v buněčných lysátech z neonatálních potkaních kardiomyocytů. *A*, kardiomyocyty byly inkubovány s rotenonem (1 až 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 30 min. Produkce ROS byla stanovena měřením fluorescence při 480/520 nm. *B*, Sloupce ukazují rozdíl pro fluorescenci detekované v buněčné kultuře inkubované v přítomnosti nebo při absenci 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rotenonu na 1 hod. Před přidavkem rotenonu byly buňky preinkubovány 30 min s DMSO, 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ N-acetylcysteinu nebo různými koncentracemi DHSB. Očíslované sloupce odpovídají koncentracím DHSB. Data jsou průměrem \pm SEM ze tří nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ při srovnání s buňkami inkubovanými s DMSO.

5.1.3.5 DHSB inhibuje poškození neonatálních potkaních kardiomyocytů způsobené peroxidem vodíku

Poškození buněk vlivem ROS může pocházet jak z vnějšího, tak i z vnitřního prostředí. Ukázalo se, že odpráhovače limitují tvorbu ROS v mitochondriích a také snižují následné poškození^{84,214}. Použití odpráhovačů může být přínosné v kontrolování redoxního stavu buňky²¹⁵, což usnadňuje obranu proti extracelulárním ROS. Potvrdili

jsme schopnost SB a DHSB zabraňovat buněčné smrti kardiomyocytů způsobené přidavkem extracelulárního peroxidu vodíku monitorováním aktivity LDH, indikátorem poškození plazmatické membrány. SB nevykázal žádný signifikantní účinek v koncentracích do $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (obr. 20. A). Na druhou stranu, DHSB vyvolával koncentračně závislý pokles v extracelulární aktivitě LDH (obr. 20. B). Odvozený DHSB, 7,20-*O*-dimethyldehydrosilybin, vykázal statisticky nesignifikantní protektivní efekt (obr. 20. C), zatímco kvercetin vykazoval podobnou efektivitu jako DHSB (obr. 20. D).

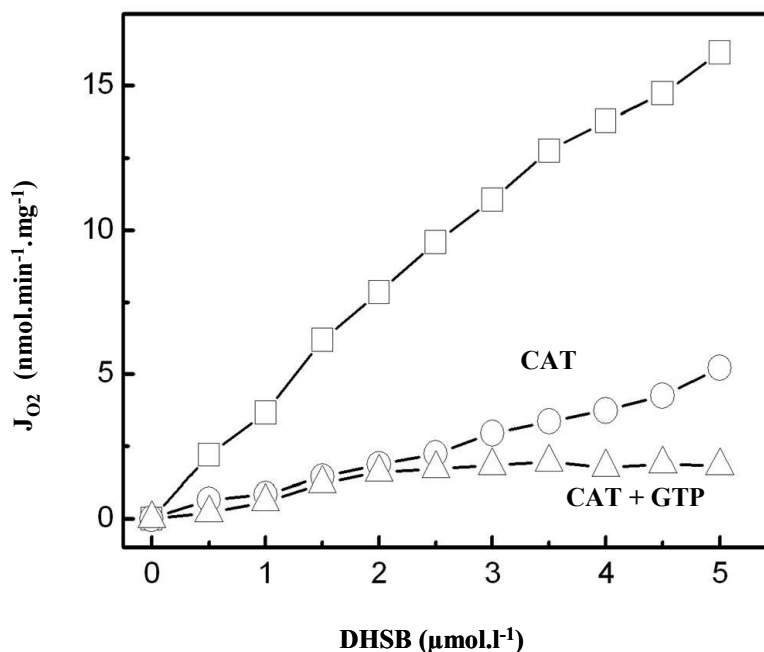


Obr. 20 Účinek DHSB na uvolnění LDH z potkaních neonatálních kardiomyocytů vyvolané peroxidem vodíku. Buněčná kultura potkaních kardiomyocytů byla vystavena působení $80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ po dobu 2 hod. Plně sloupce reprezentují aktivitu LDH v kultivačním médiu v nepřítomnosti H_2O_2 , prázdné sloupce ukazují aktivitu LDH v přítomnosti H_2O_2 . Nulová koncentrace testovaných látek reprezentuje buňky inkubované s odpovídajícím množstvím DMSO. K ověření protektivního účinku testovaných látek, byly buňky preinkubovány 30 min s různými koncentracemi: SB (A), DHSB (B), 7,20-*O*-dimethyl-2,3-dehydrosilybinu (C) a kvercetinu (D). Hodnoty jsou průměrem \pm SD z pěti nezávislých měření provedených v tripletu. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly DMSO ($p < 0,05$).

5.1.3.6 Účinek DHSB na respiraci a tvorbu ROS je inhibován karboxyatraktylozidem a ATP

Během zkoumání mechanismu mitochondriálního odpražení vyvolaného DHSB bylo zjištěno, že vzrůst respirace indukovaný DHSB může být z velké části inhibován přidavkem karboxyatraktylozidu (CAT) a podobně i přítomností purinových nukleotidů,

inhibitorů mitochondriálního adenin nukleotidového translokátoru (ANT), resp. odpřahujících proteinů. Obr. 21 shrnuje výsledky získané stanovením změn ve spotřebě kyslíku v mitochondriích izolovaných z potkaního srdce, kdy čtverečky znázorňují titraci samotného DHSB, kolečka stejnou titraci v přítomnosti $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CAT, a trojúhelníky tutéž titraci v přítomnosti kombinace $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CAT a $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GTP. Tato data naznačila, že ANT a snad také srdeční mitochondriální UCP2 se podílí na odpřažení indukovaným DHSB a následném poklesu v mitochondriální produkci ROS.



Obr. 21 Karboxyatraktylozid inhibuje změny v respiraci indukované DHSB.

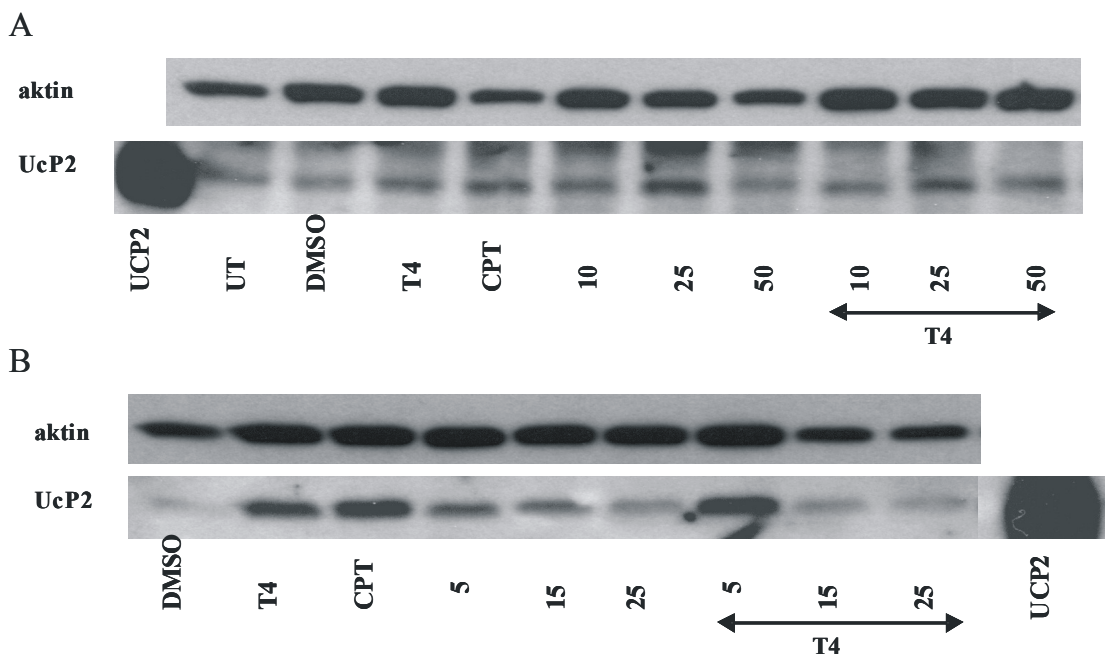
Koncentrační závislosti DHSB - závislý vzrůst v respiraci při absenci (čtverce) nebo v přítomnosti $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CAT (kolečka) a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CAT plus $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GTP (trojúhelníky). Potkaní srdeční mitochondrie ($0,1 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) dýchaly v přítomnosti $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pyruvátu, $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ malátu a $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sukcinátu. Tato data jsou reprezentativní ze tří nezávislých experimentů.

5.1.4 DHSB moduluje expresi UCP2 vyvolanou thyroidními hormony

5.1.4.1 Polyfenoly snižují expresi UCP2 v závislosti na jejich koncentraci

Byl sledován efekt SB a DHSB na srdeční bioenergetiku regulovanou thyroidními hormony, včetně hladin exprese UCP2. Přítomnost UCP2 byla sledována pomocí western blot analýzy s využitím specifické primární protilátky pro UCP2. Buněčná kultura kardiomyocytů byla preinkubována 30 min v přítomnosti 5 , 15 a $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB (obr. 22. A) nebo DHSB (obr. 22. B). Bylo aplikováno $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T4 na 24 hod. Obě sloučeniny vykazovaly koncentračně závislou sníženou expresi UCP2 indukovanou T4.

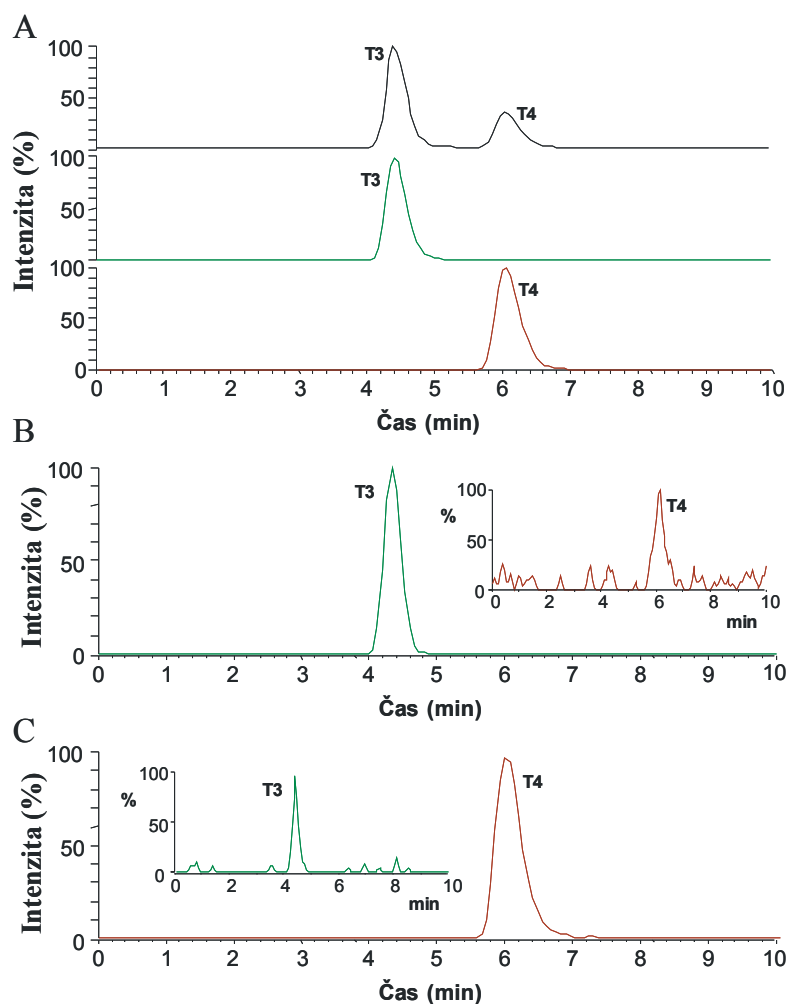
Účinek obou polyfenolů lze jednoduše vysvětlit dvěma způsoby: ovlivněním vstupu hormonu do buňky a inhibicí transkripční aktivity thyroïdního receptoru. Pro ověření první možnosti jsme vyvinuli metodiku stanovení thyroïdních hormonů v kardiomyocytech.



Obr. 22. Vliv silybinu a 2,3-dehydrosilybinu na expresi UCP2. Potkaní neonatální kardiomyocyty byly preinkubovány 30 min s SB (5, 15, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DHSB (5, 15, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a následně inkubovány s 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-tyroxinu (T4) a 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ camptothecinu (CPT) na 24 hod. Kontrolní buňky byly vystaveny odpovídajícímu množství DMSO. Oddělená linie obsahuje lidský rekombinantní UCP2 jako standard. *A*, reprezentativní western blot, který ukazuje ovlivnění SB a kombinace SB s T4 a CPT na expresi UCP2. *B*, reprezentativní western blot, který ukazuje ovlivnění DHSB a kombinace DHSB s T4 a CPT na expresi UCP2.

5.1.4.2 Příjem hormonů buňkou

Opakovatelnost HPLC/MS metody byla testována (v koncentračním rozmezí 8 až 8000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ hormonů) po optimalizačních procesech (obr. 23. A). Během dne byla opakovatelnost T3/T4 následující 93,01 %/95,45 % (po přidavku 8 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), 103,74 %/101,68 % (po 80 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), 102,43 %/100,28 % (po 800 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 98,17 %/107,46 % (po 8000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výborná T3/T4 opakovatelnost byla nalezena také v případě měření v různé dny: 107,50 %/103,51 % (po 8 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), 96,64 %/92,16 % (po 80 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), 94,00 %/91,19 % (po 800 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 94,00 %/97,89 % (po 8000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

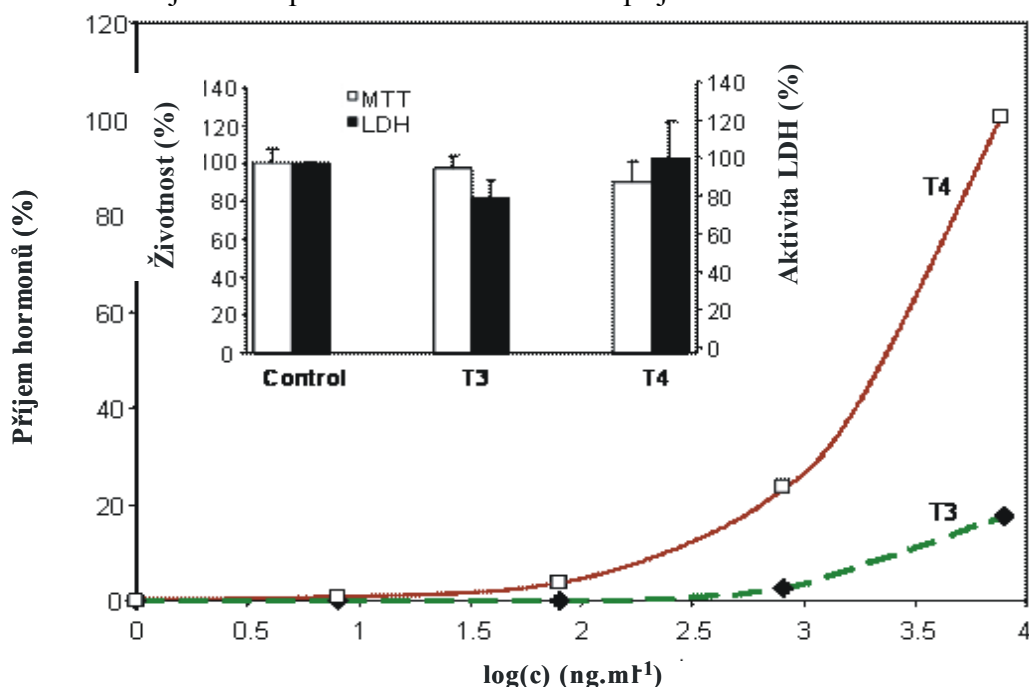


Obr. 23. Chromatografický HPLC/MS záznam T3 a T4 v různých vzorcích. *A*, modelové standardní roztoky obsahující $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ směsi hormonů - horní panel, nebo stanovených individuálních hormonů (prostřední a spodní panel). *B*, kultura potkaních kardiomyocytů byla inkubována s $0,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T3 po dobu 6 hod. při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a v přítomnosti T3 a T4 (vložený graf v *B*) byla detekována podle postupu v metodách. *C*, kultura potkaních kardiomyocytů byla inkubována s $8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T4 po dobu 6 hod. při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a v přítomnosti T3 a T4 (vložený graf v *C*) byla detekována podle postupu v metodách.

Pro potvrzení stability obou hormonů jsme na začátku navrženou metodu HPLC/MS aplikovali pro ověření T3 ($0,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a T4 ($8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) stability v kultivačním médiu během 24 hod. při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ za nepřítomnosti potkaních neonatálních kardiomyocytů. Hormony byly sledovány v následujících časových intervalech 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hod. po přidání do kultivačního média. V našich experimentech jsme nepozorovali změny v koncentracích T4 v kultivačním médiu v průběhu 24 hod. Podobně nebyly pozorovány změny v případě koncentrací T3 v kultivačním médiu během prvních 12 hod. inkubace. Ovšem v následujících 12 hod. byl pozorován 15% pokles v koncentraci T3.

Stejně koncentrace T3 a T4, které byly popsány výše, byly přidány ke kultuře buněčných kardiomyocytů. Po 6 hod. inkubaci, což je kultivační interval vybraný na základě dobré viability a stability potkaních kardiomyocytů, byly buňky promyty, rozpuštěny v mobilní fázi, sonikovány a centrifugovány. Výsledné supernatanty obsahovaly $30,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ T3 a $120 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ T4, což koresponduje s $6,1 \text{ ng}$ T3 a 24 ng T4 na $2,5 \times 10^5$ buněk potkaních neonatálních kardiomyocytů ($n = 3$). Chromatogramy T3 a T4 jsou zobrazeny na obr. 23. B a C. Navíc byla stanovena zbytková množství T3 v buněčné kultuře kardiomyocytů vystavené T4 a naopak.

Nakonec byl sledován příjem hormonů do buněk potkaních kardiomyocytů pomocí HPLC/MS po 6 hod. inkubaci, koncentrační rozmezí hormonů bylo mezi 8 ng až $8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (obr. 24). Pomocí MTT a LDH testu bylo ověřeno, že hormony neovlivňují viabilitu kardiomyocytů (obr. 24, ve výřezu). Rychlost příjmu T3 byl nižší než T4. Tyto výsledky jsou v souladu s daty, prezentovanými jinými autory; např. studie příjmu T3 a T4 v myoblastech a myotubulech embryonální srdeční buněčné linie H9c2(2-1)²¹⁶. Výtěžnosti T3 a T4 se lišily od 64,1 do 68,4 %, resp. 74, 0 do 95,3, pokud byly použity stejné koncentrace jako v experimentech ke stanovení příjmu hormonů buňkou.



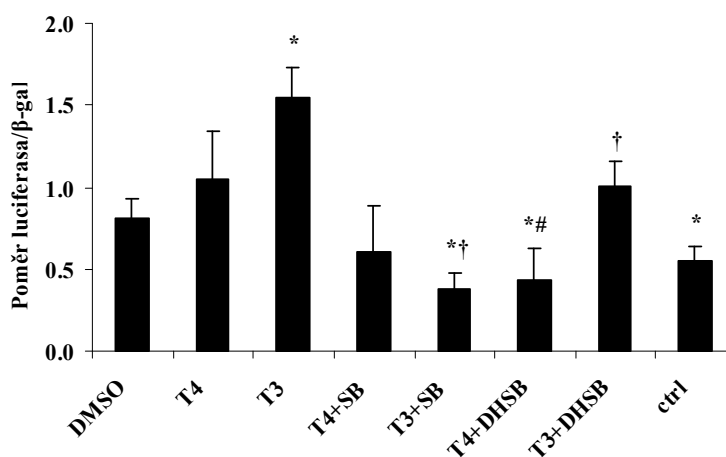
Obr. 24. T3/T4 příjem do potkaních neonatálních kardiomyocytů. Výsledky viability (MTT) a LDH aktivity potkaních neonatálních kardiomyocytů po inkubaci v přítomnosti T3 ($0,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a T4 ($8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v kultivačním médiu jsou ukázány ve výřezu grafu. Inkubační čas pro oba experimenty byl 6 hod.

S pomocí uvedené HPLC/MS metodiky jsme testovali, zda SB a DHSB jsou schopné limitovat příjem hormonů do buňky. Buněčná kultura kardiomyocytů byla nejprve preinkubována 30 min s $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB nebo $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHSB, což jsou koncentrace vyvolávající nižší expresi UCP2 regulovanou T4. Dále bylo aplikováno $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T4 nebo $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ T3 na 6 hod. Buňky byly shrábnuty do roztoku PBS, promyty a resuspendovány v $200 \mu\text{l}$ HPLC mobilní fáze. Kardiomyocyty byly sonikovány, centrifugovány a supernatant ($10 \mu\text{l}$) byl analyzován metodou HPLC/MS.

V pěti nezávislých experimentech jsme ověřili, že oba flavonolignany nemají signifikantní vliv na příjem hormonů do buňky. Bylo také potvrzeno, že životnost kardiomyocytů není ovlivněna působením těchto látek.

5.1.4.3 Vliv DHSB na transkripční aktivitu thyroïdního receptoru

Druhou možností působení SB a DHSB na thyroïdy řízenou expresi UCP2 jsme testovali s využitím reportérového plasmidu pDR4-luc. Kardiomyocyty (2×10^6) byly transfekovány s využitím kitu a nukleofekční metody Amaxa. K transfekci bylo využito $0,2 \mu\text{g}$ plasmidu pDR4-luc a kontrolní plasmid pCIS-CK. Pro ověření účinnosti transfekce byl spolu s reportérovými plasmidy transfekován také plasmid obsahující β -galaktosidasu regulovanou CMV.

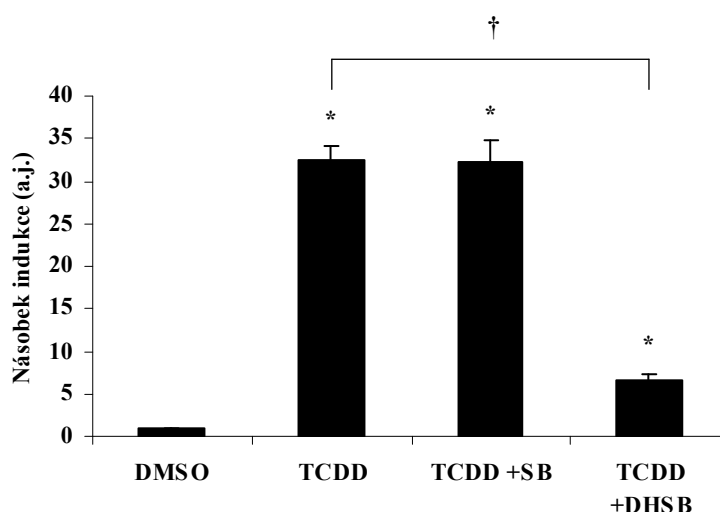


Obr. 25. Vliv T4 a T3 na transkripční aktivitu thyroïdního receptoru. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých měření provedených v tripletu. Kardiomyocyty byly preinkubovány s SB a DHSB ($15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 30 min. Následně byly buňky inkubovány 16 hod. s L-tyroxinem ($8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; T4) a trijodotyroninem ($0,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; T3). Byla stanovena aktivita luciferasy a β -galaktosidasy v každém vzorku a vypočten poměr těchto hodnot, který je vyneseno na ose y. Poměr aktivit v kontrolních buňkách (DMSO) je považován za jednotkový. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$). # Tato hodnota je signifikantně odlišná od T4 ($p < 0,05$). † Tato hodnota je signifikantně odlišná od T3 ($p < 0,05$). Ctrl označuje kontrolní plasmid pCIS-CK.

48 hod. po nukleofekci byly buňky preinkubovány 30 min s SB ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo DHSB ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a následně bylo aplikován T4 ($8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebo T3 ($0,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na 6 hod. a 24 hod. všechna data jsou normalizována na aktivitu β -galaktosidasy v transfekovaných buňkách (obr. 25). V případě SB došlo ke snížení aktivity thyroidního receptoru jak v případě T4, tak i T3, ovšem v tomto případě signifikantně jak proti kontrolním buňkám tak proti samotnému působení T3. Stejně tak DHSB snížil aktivitu thyroidního receptoru v případě T4 signifikantně proti kontrolním buňkám i proti samotnému T4, zatímco T3 je vlivem DHSB snížen signifikantně jen proti samotnému T3.

5.1.4.4 Vliv DHSB na aktivitu nukleárních aryluhlovodíkových receptorů

Předchozí experimenty dokumentují schopnost SB a DHSB ovlivňovat transkripční aktivitu thyroidního receptoru. Nabízí se však otázka, je-li tato aktivita specifická pouze pro thyroidní receptor. Proto jsme použili buněčnou linii HepG2, kterou jsme transfekovali reportérovým plasmidem 1A1-luc s využitím lipofekčního činidla LipofectamineTM 2000. Plasmid obsahuje promotorovou oblast lidského genu cytochromu P450 1A1 regulující expresi luciferasy²¹⁷. Buňky byly inkubovány s TCDD ($5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo s TCDD v kombinaci s SB ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo DHSB ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 hod. Následně byla stanovena aktivita luciferasy pomocí chemiluminiscence podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.1.2.



Obr. 26. Vliv DHSB na transkripční aktivitu AhR receptoru v HepG2 buňkách.

Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých měření provedených v tripletu. Buňky byly inkubovány s TCDD ($5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo v kombinaci s SB a DHSB ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 24 h. Následně byla stanovena aktivita luciferasy. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,005$). † Tato hodnota je signifikantně odlišná ($p < 0,005$).

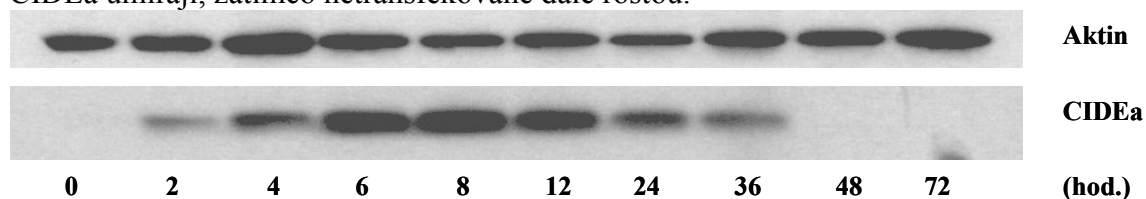
Hlavním nukleárním receptorem, který se na promotorovou oblast váže, je aryl uhlovodíkový receptor (AhR), jehož známým ligandem je tetrachlorodibenzodioxin (TCDD). Ve třech nezávislých experimentech jsme zjistili, že DHSB, ale nikoliv SB, snižuje transkripční aktivitu AhR vyvolanou TCDD (Obr. 26).

5.2 CIDEa

5.2.1 Vliv exprese CIDEa na apoptosu v HeLa buňkách

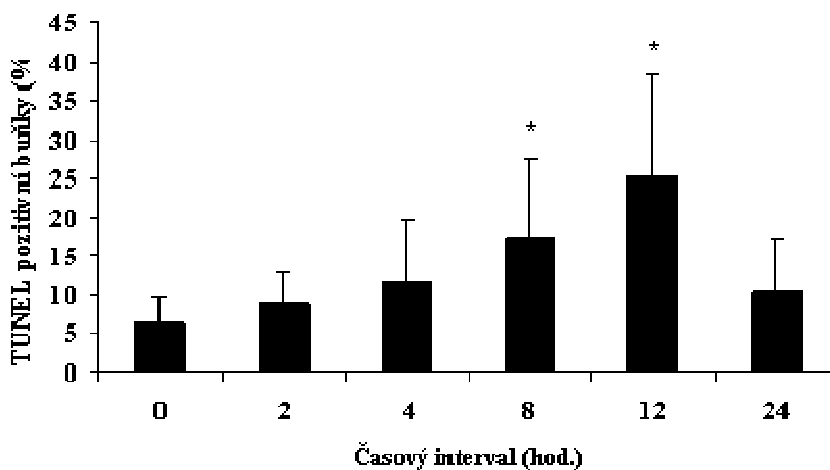
Již některé dřívější studie CIDE proteinů uvádí, že uměle zvýšená exprese proteinu vede k apoptose¹³⁷. V našem případě jsme zkoumali vliv indukované exprese CIDEa na buňky T-REx HeLa, které stabilně exprimují tetracyklinový represor, což umožňuje řízenou expresi zvoleného genu vloženého do plasmidu, který podléhá represi.

T-REx HeLa buňky byly naředěny kultivačním médiem a vysety na 6jamkové desky v koncentraci $2,4 \times 10^4$ buněk/cm² ($3,0 \times 10^5$ buněk/jamku). Po dosažení konfluence (24 h, 37 °C, 5 % CO₂) byly buňky transfekovány plasmidem T-REx-pDEST30-CIDEa (podle postupu v kapitole 4.7.1.1), který umožní kontrolovatelnou expresi proteinu v závislosti na přidání tetracyklinu. 24 hod. po transfekci jsme nejprve ověřili, že buňky bez přítomnosti tetracyklinu neexprimují protein CIDEa. Kultivační médium bylo vyměněno za médium určené pro experimenty obsahující tetracyklin o koncentraci 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a buňky byly inkubovány v časovém intervalu 0 - 72 hod. Zásobní roztok tetracyklinu (2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl připraven v DMSO tak, aby výsledná koncentrace v médiu byla 0,5 % (v/v). Ve určených časových intervalech byla sledována exprese proteinu CIDEa (western blot analýza) a fragmentace jaderné DNA (TUNEL). Zjistili jsme, že maximální exprese proteinu nabíhá 6 hod. po přidání tetracyklinu a po 12 hod. exprese opět klesá (obr. 26). To může znamenat, že transfekované buňky exprimující CIDEa umírají, zatímco netransfekované dále rostou.



Obr. 26. Exprese proteinu CIDEa v T-REx HeLa. Western blot s časovou řadou po indukci tetracyklinem. Jako kontrola množství proteinu byl použit aktin.

Procento pozitivních buněk stanovené metodou TUNEL, ukázalo, že maximum apoptosy je mezi 8 a 12 hod. Ve srovnání s počátkem experimentu jsou obě hodnoty výrazně vyšší (obr. 27). Proto se všechny následující pokusy prováděly s osmihodinovou indukcí tetracyklinem a následně dvě hodiny s induktory apoptosy.



Obr. 27. Počet TUNEL pozitivních buněk v poměru k celkovému počtu buněk.

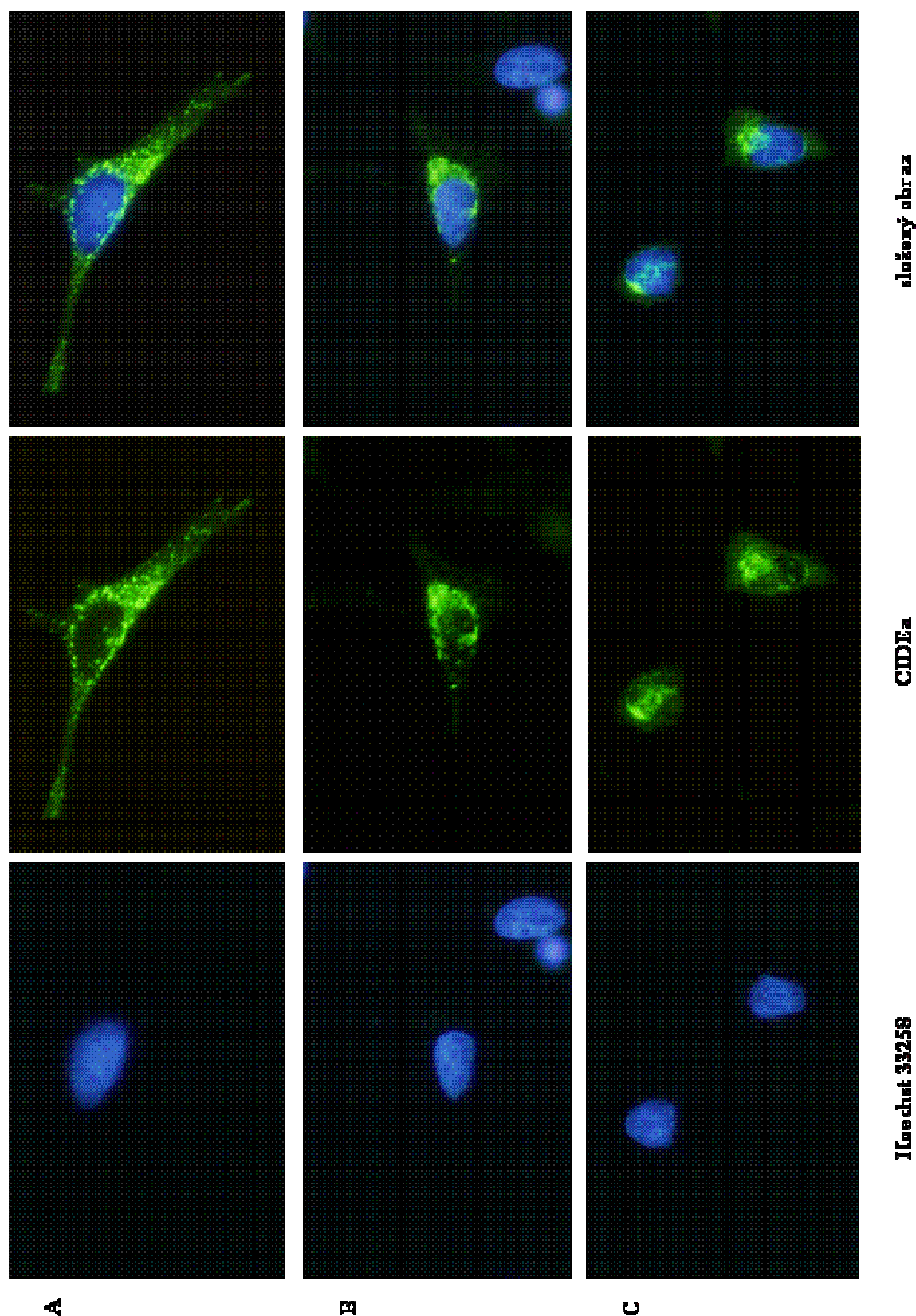
Chybové úsečky představují \pm SD určenou ze tří různých experimentů. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).

5.2.2 Lokalizace proteinu CIDEa v buňce

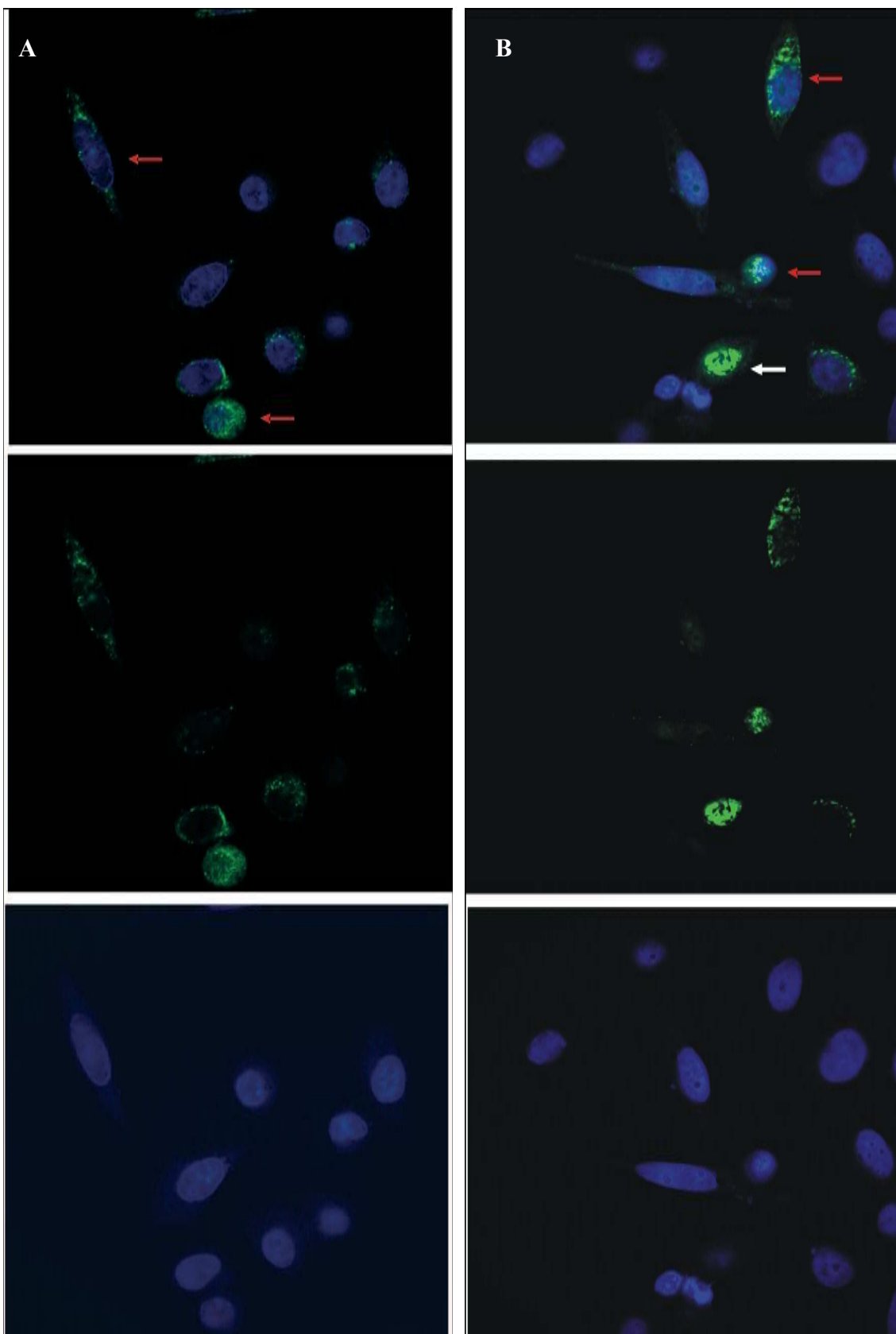
Ukázalo se, že pokud je exprese CIDEb v buněčné linii ovárií čínských křečků zvýšená, pak je tento protein lokalizován v mitochondriích¹⁴⁸. Lokalizace proteinu CIDEa v mitochondriích byla také dříve zjištěna v hnědé tukové tkáni křečka¹³². Oproti tomu některé práce přítomnost proteinu CIDEa v mitochondriích nepotvrdily^{149,150}.

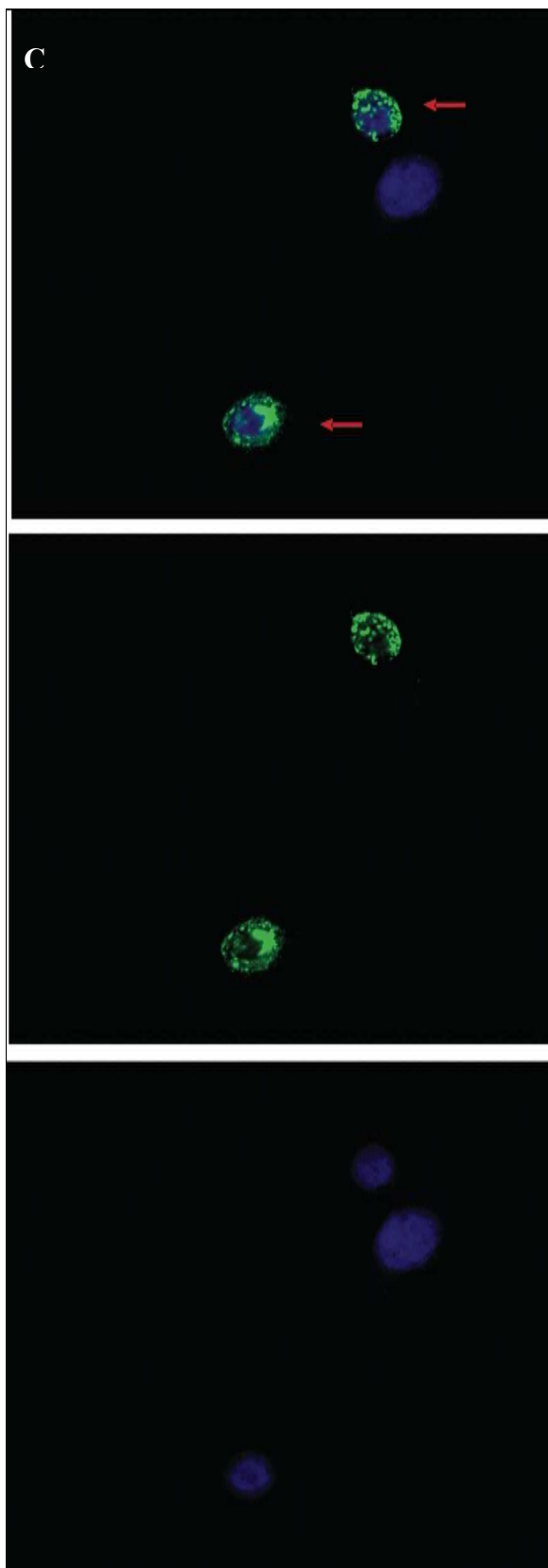
Naše experimenty směřovaly k potvrzení, je-li CIDEa lokalizovaná v mitochondriích v případě, když je její exprese v HeLa buňkách regulovaná tetracyklinem. Kultivační médium bylo vyměněno za médium určené pro experimenty obsahující tetracyklin o koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na 8 hod. a následně byly buňky inkubovány 2 hod. s $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT a $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Val. V tomto časovém intervalu (37°C , 5 % CO_2) byla sledována lokalizace proteinu CIDEa v buňce pomocí imunocytochemie s využitím fluorescenčně značené sekundární protilátky. Imunocytochemie zvýšené exprese CIDEa v T-REx HeLa buňkách ukázala jadernou i mimojadernou lokalizaci CIDEa (obr. 28 a obr. 29). Kvantifikace CIDEa pozitivních buněk (100 CIDEa

pozitivních buněk počítaných na experiment) ukázala více buněk s jadernou nebo smíšenou jadernou i mimojadernou lokalizací CIDEa v buňkách vystavených působení camptothecinu a valinomycinu, 50 a 80 %, oproti buňkám vystaveným DMSO 40 %.



Obr. 28 Lokalizace CIDEa v buňkách T-REx HeLa. T-REx HeLa byly transfekovány plasmidem pDEST-CIDEa a po 24 hod. stabilizaci byly buňky vystaveny tetracyklinu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 8 hod. následované 2 hod. inkubací s DMSO (A), CPT ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; B) nebo Val ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; C). Hoechst 33258 (modrá barva) obarvuje pouze jádro buňky, protilátka antiCIDEa (zelená barva) obarví přítomnou CIDEa v buňce, třetí část znázorňuje složení těchto dvou obrazů. Zvětšeno $400\times$.



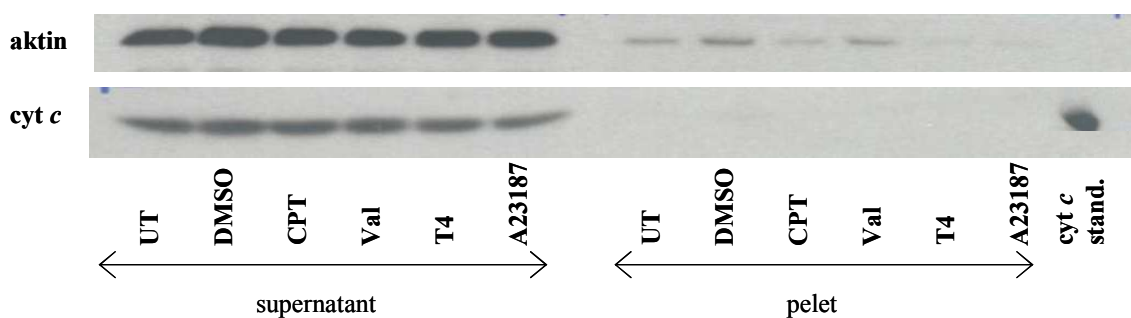


Obr. 29. Subcelulární lokalizace CIDEa. T-REx HeLa byly transfekovány plasmidem pDEST-CIDEa a po 24 hod. stabilizaci byly buňky vystaveny tetracyklinu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 8 hod. následované 2 hod. inkubací s DMSO (A), CPT ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; B) nebo Val ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; C). Bílé šipky označují buňky, které ukazují především nukleární lokalizaci CIDEa, červené šipky označují buňky s nukleární i extranukleární lokalizací CIDEa.

5.2.3 Redistribuce proteinu CIDEa po inkubaci s induktory apoptosy

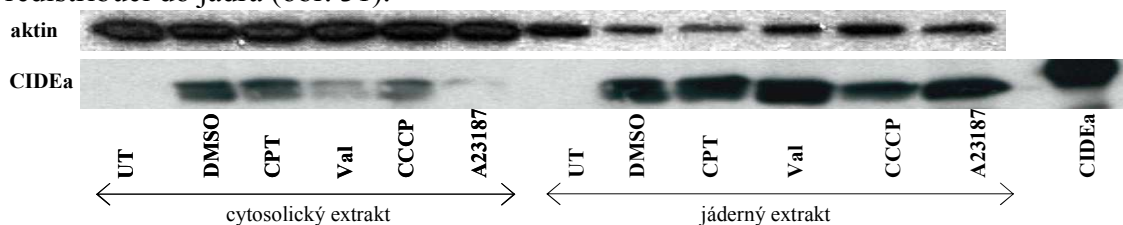
Naše experimenty ukázaly, že CIDEa exprimovaná v T-Rex HeLa buňkách pod regulací Tet represoru je lokalizována v jaderném i mimojaderném prostoru (obr. 29). Výsledky jsme ověřili alternativní metodou imuno detekce v subcelulárních frakcích.

Stejně jako v předchozích experimentech byl na T-REx HeLa buňky aplikován tetracyklin ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 8 hod. následovaný 2 hod. inkubací s iniciátory apoptosy: inhibitor komplexu DNA-topoizomerasa camptothecin (CPT; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), protonofor CCCP ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), draslíkový ionofor valinomycin (Val; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vápníkový ionofor A23187 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Byla zjištěna lokalizace CIDEa v cytosolické a jaderné frakci. Vzhledem k výsledku detekce cyt *c* v cytosolické a jaderné frakci z HeLa buněk, jsme předpokládali, že supernatant (cytosol) obsahuje mitochondrie (obr. 30).



Obr. 30. Detekce cyt *c* po apoptotickém stimulu v T-REx-HeLa buňkách. Jako kontrola množství naneseného proteinu byl použit aktin. Negativní kontrola (transfekce prázdným pT-REx-DEST30 vektorem, UT); DMSO (transfekce pT-REx-DEST30-CIDEa vektorem a inkubováno v DMSO, jako negativním rozpouštědlem); CPT ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Val ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); CCCP ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); A23187 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); standard cyt *c* jako pozitivní kontrola.

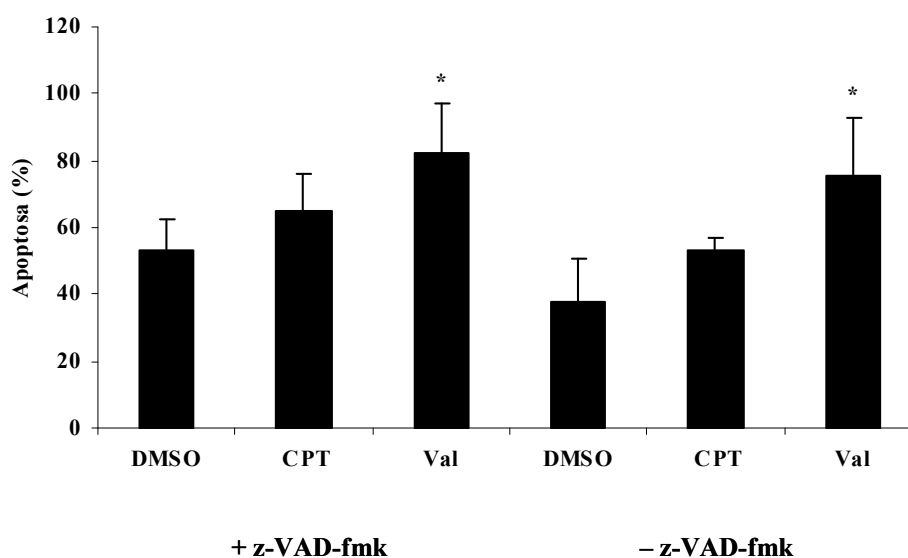
Po indukci Val a CPT došlo k vymizení CIDEa proteinu z cytosolického extraktu a redistribuci do jádra (obr. 31).



Obr. 31. Redistribuce proteinu CIDEa z cytosolu do jádra po apoptotickém stimulu u T-REx-HeLa buněk. Jako kontrola množství naneseného proteinu byl použit aktin. Negativní kontrola (transfekce prázdným pT-REx-DEST30 vektorem, linie 1 a 7); DMSO (transfekce pT-REx-DEST30-CIDEa vektorem a inkubováno v DMSO, jako negativním rozpouštědlem, linie 2 a 8); CPT ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, linie 3 a 9); Val ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, linie 4 a 10); CCCP ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, linie 5 a 11); A23187 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, linie 6 a 12); CIDEa-rekombinantní lidský protein CIDEa připravený z inkluzních tělísek jako hmotnostní kontrola.

Val a A23187 ovlivňují redistribuci CIDEa znatelněji než v případě CPT a odpovídá kvantifikaci CIDEa pozitivních buněk v experimentech imunocytochemie, které ukázaly přinejmenším určitou jadernou lokalizaci CIDEa. V našem experimentu byla přítomna heterogenní populace buněk s různou procentualitou buněk podléhajících apoptose. Na T-REx HeLa buňky byl aplikován tetracyklin ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 8 hod. Kontrolní buňky byly připraveny inkubací s příslušným objemem DMSO. Buňky byly preinkubovány s $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kaspasovým inhibitorem z-VAD-fmk po dobu 30 minut a dále pak 2 hod s induktory apoptosy camptothecinem (CPT; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a valinomycinem (Val; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tato preinkubace výrazně nezvýšila procento CIDEa pozitivních buněk vykazujících morfologické znaky apoptosy, jako je smršťování nebo fragmentace jaderné DNA, což naznačuje, že jde o proces nezávislý na kaspasách (obr. 32).



Obr. 32. Vliv kaspasového inhibitoru z-VAD-fmk na apoptosu indukovanou zvýšenou expresí proteinu CIDEa v T-RExHeLa buňkách. T-REx HeLa byly natransfekovány plasmidem pDEST-CIDEa a po 24 hod. stabilizaci byly buňky vystaveny tetracyklinu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 8 hod. Buňky byly vystaveny 30 min působení inhibitoru kaspas z-VAD-fmk a následně 2 hod. DMSO (sloupec 1, 4); CPT ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; sloupec 2, 5) a Val ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; sloupec 3, 6). CIDEa pozitivní a apoptotické buňky byly spočítány na náhodných polích, nejméně však 100 buněk vykazujících apoptosu na experiment. Procento apoptosy bylo spočítáno jako poměr CIDEa pozitivních apoptotických buněk proti celkovému počtu apoptotických buněk. Chybové úsečky jsou standardní odchylky určené z minimálně tří experimentů. * Tato hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$).

Naproti tomu bylo procento CIDEa apoptotických buněk po indukci valinomycinem vyšší než u kontrolních buněk inkubovaných se samotným DMSO (78 ku 40 %), což podporuje teorii o spojení mezi redistribucí CIDEa a apoptosou.

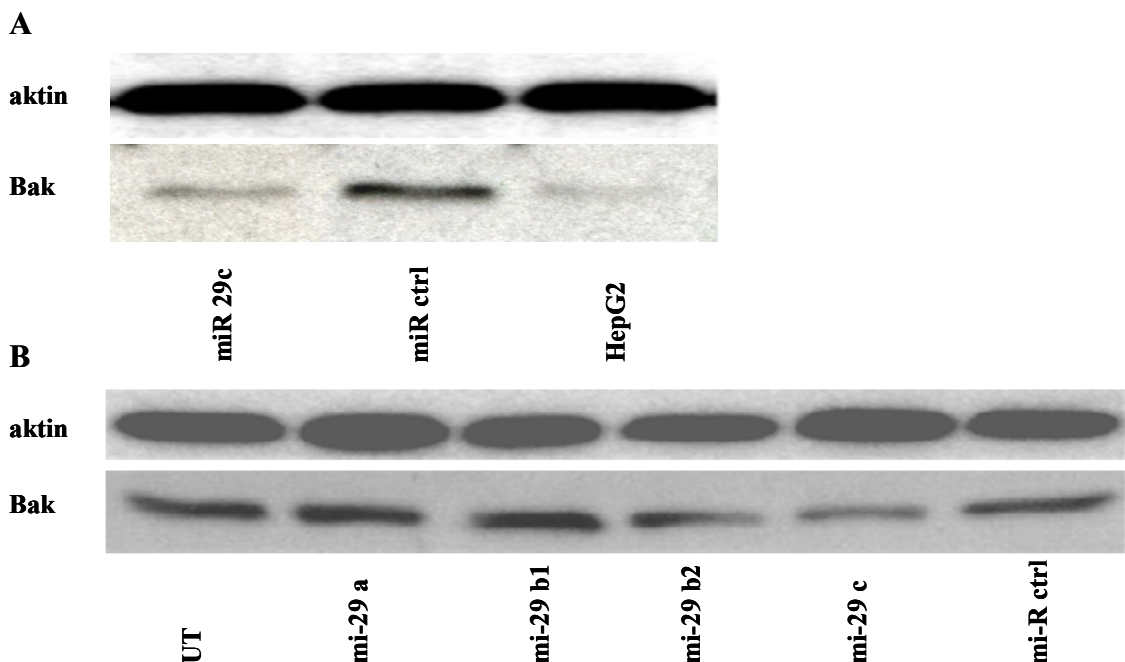
5.3 Vliv miR-29 na apoptotické proteiny v HeLa buňkách

Normální granulocyty vykazují velmi nízkou aktivitu mitochondriálního dýchacího řetězce, který je navíc resistantní na inhibici kyanidem²¹⁸. V průběhu granulocytární diferenciaci buněk HL-60 jsme pozorovali úbytek cytochromu *c*. Navrhli jsme, že odpovědným činitelem za úbytek hladiny cytochromu *c* během granulocytární diferenciaci může být odpovědná změna exprese některých miRNA. miRNA může ovlivňovat expresi cytochromu *c* přímo nebo regulovat expresi transkripčních faktorů^{101,219}. Provedli jsme proto průzkum databáze miRBase (*microrna.sanger.ac.uk*) s cílem vybrat kandidátní miRNA, které mohou regulovat expresi cytochromu *c*. První kandidátní miRNA, miR-29 c jsme získali porovnáním seznamu miRNA pro geny *CYCS* a *COX7c* (geny pro cytochrom *c* oxidasu). miR-181b, jsme vybrali na základě seznamu uvedených v miRBase pro gen *NRF1* (*Nuclear Respiratory Factor 1*), který je odpovědný za regulaci exprese cytochromu *c* na transkripční úrovni, a literárních dat uvádějících zapojení miR-181 v hematopoeze^{170,220}. Jako srovnávací byla vybrána miR-367. Ukázalo se, že pre-miR-29c nezpůsobila žádnou změnu v úrovni exprese cytochromu *c*. Kromě cytochromu *c* jsme provedli také imunodetekci proteinu Bak, který je jedním z mnoha možných cílových genů miR-29c. Epigenetickou regulaci ovlivňuje DNA methylace, tedy přenos methylové skupiny z S-adenosylmethioninu na cytosin v poloze působením 5' DNA-methyltransferasy (DNMT). U nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), nejčastějšího typu rakoviny plic, byla nalezena téměř o 60 % zvýšená hladina DNMT3A a 3B¹⁷⁹. Fabbri a kol.¹⁸⁰ prokázali, že exprese DNA-methyltransferasy, klíčového enzymu DNA methylace, je výrazně snížena po transfekci pre-miR-29 v nemalobuněčném karcinomu plic¹⁸⁰.

5.3.1 Imunodetekce proteinů Bak, Mcl-1 a DNMT 3B

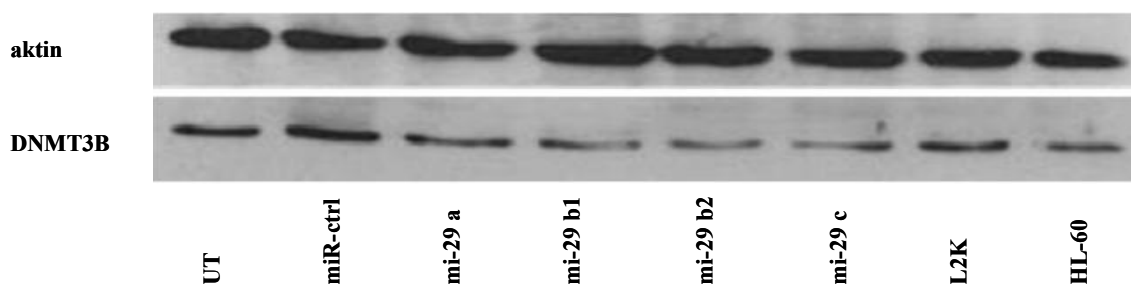
Bak je jedním z přibližně 1400 potenciálně možných cílových genů miR-29 uvedených v databázi miRBase. Podíl miR-29 na regulaci toxicity nebo apoptosy indukované xenobiotiky prostřednictvím regulace exprese proteinu Bak a potenciálně dalších pro- či anti-apoptotických proteinů zatím nebyl publikován.

HeLa buňky byly naředěny kultivačním médiem a vysety na 6-jamkové desky v koncentraci $2,4 \times 10^4$ buněk/cm² ($3,0 \times 10^5$ buněk/jamku). Po dosažení konfluence (24 hod.) byly buňky za účelem testování utlumení exprese proteinu Bak transfekovány syntetickou miR-29-a,-b1,-b2,-c a kontrolní, tzv. „scrambled“, miRNA (podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1.3). Původní experiment prokázal, že exprese proteinu Bak je snížena po transfekci buněk umělou pre-miR-29c na úroveň exprese v buněčné linii HepG2, která je velmi nízká (obr. 33. A). Další experimenty se všemi členy rodiny miR-29 přesvědčivě demonstrují, že exprese proteinu Bak je výrazně snížena jen působením pre-miR-29c, naopak pre-miR-29-a,-b1,-b2 nezpůsobila žádnou změnu v úrovni exprese proteinu Bak v porovnání s kontrolní miRNA (obr. 33. B).



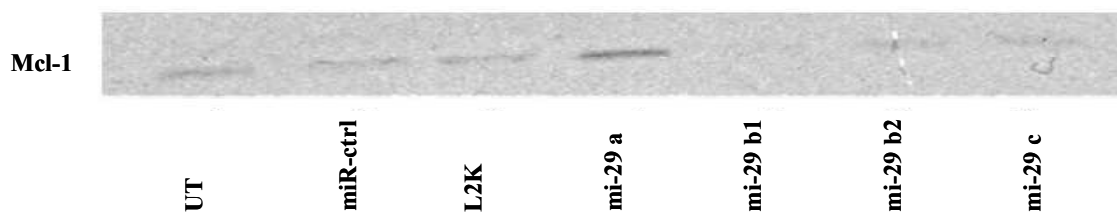
Obr. 33. Vliv miR-29 na expresi proteinu Bak v HeLa buňkách. Exprese proteinu Bak byla detekována v 30 μ g proteinu z celkového buněčného extraktu, který byl připraven z HeLa buněk 48 hod. po transfekci příslušnou pre-miRNA pomocí Lipofectaminu. *A: miR-29c*, buňky byly transfekovány pre-miR-29c; *miR-ctrl*, buňky byly transfekovány kontrolní miR; HepG2, netransfekované buňky příslušné linie. *B: UT*, buňky HeLa nebyly transfekovány; *miR-ctrl*, buňky byly transfekovány kontrolní miR nebo příslušnou pre-miR-29.

Fabbri a kol.¹⁸⁰ prokázali, že exprese DNA-methyltransferasy, klíčového enzymu DNA methylace, je výrazně snížena po transfekci pre-miR-29 v nemalobuněčném karcinomu plic¹⁸⁰. Detekce ovlivnění exprese DNA-methyltransferasy může sloužit jako kontrola účinnosti transfekce. Proto jsme v nezávislém kontrolním experimentu provedli imunodetekci DNAmethyltransferasy 3B (DNMT3B), což je jedna ze tří katalyticky aktivních DNAmethyltransferáz u savců, po transfekci pre-miR-29-a,-b1,-b2,-c do buněčné linie HeLa (obr. 34).



Obr. 34. Vliv miR-29 na expresi DNA-methyltransferasy 3B (DNMT3B) v HeLa buňkách. Exprese proteinu Dnmt3B byla detekována v 30 µg proteinu z celkového buněčného extraktu, který byl připraven z HeLa buněk 48 hod. po transfekci příslušnou pre-miRNA pomocí Lipofectaminu (L2K). *UT*, buňky HeLa nebyly transfekovány; *miR-ctrl*, buňky byly transfekovány kontrolní miR; *L2K*, buňky byly transferovány jen lipofekčním činidlem. Pro srovnání je zde i vzorek buněčné linie HL-60.

Imunodetekcí jsme zaznamenali výraznější úbytek DNMT3B po transfekci pre-miR-29-b1, -b2, -c. Naopak pre-miR-29a nezpůsobila žádnou změnu v úrovni exprese DNMT3B. Naše výsledky jsou shodné s publikovanými, kdy bylo taktéž zaznamenáno snížení až vymizení DNMT3B¹⁸⁰. Kromě DNMT3B a Bak jsme také provedli imunodetekci antiapoptotického proteinu Mcl-1, který se řadí mezi cílové geny miR-29¹⁷⁸. Ve srovnání s publikovanými daty jsme zaznamenali sníženou expresi Mcl-1 nejen u pre-miR-29-b1,-b2,-c, ale také u kontrolní miR (*ctrl-miR*) a Lipofectaminu (obr. 35).



Obr. 35. Vliv miR-29 na expresi proteinu Mcl-1 v HeLa buňkách. Expese proteinu Mcl-1 byla detekována v 30 µg proteinu z celkového buněčného extraktu, který byl připraven z HeLa buněk 48 hod. po transfekci příslušnou pre-miRNA pomocí Lipofectaminu (L2K). B *UT*, buňky HeLa nebyly transfekovány; *miR-ctrl*, buňky byly transfekovány kontrolní miR.

6. DISKUSE

Ve své disertační práci jsem se věnovala studiu mitochondriálních proteinů, jejich významem a modulací exprese těchto proteinů v buněčných liniích a potkaních kardiomyocytech. Cílem předkládané disertační práce bylo zjistit, jakým způsobem je možné regulovat expresi mitochondriálních proteinů za účelem ovlivnění mitochondriální energetiky (UCP2) a apoptosy závislé na mitochondriích (CIDEa a Bak).

6.1 Modulace exprese UCP2

Zapojení p38 do regulace exprese UCP2

Jedním z důležitých mechanismů, které používají savčí kardiomyocyty ke kontrole buněčného cyklu je aktivita mitogenem aktivované proteinové kinasy p38. Aktivovaná p38 fosforyluje po spádu signální molekuly důležité pro diferenciaci kardiomyocytů a hypertrofii²²¹. Funkční role kinasy p38 v buněčné signalizaci a fyziologii je rozporuplná. Zatímco některé studie přisuzují roli kinasy p38 v buněčné smrti kardiomyocytů²²², jiné ukázaly, že inhibice p38 snižuje apoptosu, zlepšuje srdeční funkci a snižuje srdeční přeměny v souvislosti s vysokým tlakem a ischemicko-reperfusionním poškozením²²³. Protože kinasa p38 odpovídá na různé stimuly, regulace p38 a exprese UCP2 zprostředkovaná CREB naznačuje obecnější roli UCP2 jako faktoru v přežití kardiomyocytů po ischemické epizodě.

Naše studie poskytla důkaz, že kinasa p38 je regulátor exprese UCP2, nicméně je silně závislá na podnětech, které spouštějí aktivaci p38. CPT a T4 navýšily expresi UCP2, přičemž každá sloučenina působí na buňku různým mechanismem. T4 ovlivňuje transkripční aktivitu thyroïdního receptoru, což navyšuje syntézu proteinu a metabolismus a může vést k srdeční hypertrofii. Cílem CPT, tzv. radiomimetika, je topoisomerasa I, následkem čehož dochází ke změnám v DNA a následné genové expresi. Naše experimenty ukazují, že indukce UCP2 závislá na CPT je přímo úměrná fosforylaci p38.

Na spojení mezi p38, UCP2 a ROS ukazují dvě současné studie. Jedna z nich ukázala, že regulace mitochondriální UCP2 je snížena působením taxolu v melanomových buňkách aktivací signálních drah JNK a p38. Snížená exprese UCP2

vytváří fyziologické spojení mezi aktivací MAP kinas a tvorbou ROS v apoptose vyvolané taxolem⁶⁶. Druhá práce ukázala, že AICAR, selektivní aktivátor MAP kinas, indukuje protein UCP2, zatímco limituje aktivaci p38 indukovanou palmitátem. V tomto případě aktivace mitogenem aktivované proteinové kinasy (AMPK) inhibuje apoptosu indukovanou palmitátem v endoteliálních buňkách tím, že potlačuje produkci ROS. UCP2 může být jeden z možných zprostředkovatelů antioxidačního efektu AMPK²²⁴. Již dříve byl navržen signální amplifikační model, ve kterém je regulace UCP2 snížena jako odpověď na lipopolysacharidy v kultuře makrofágů odvozené od kostní dřene prostřednictvím drah JNK a p38⁶⁷. Bylo zjištěno, že UCP2 má funkci regulátoru produkce mitochondriální ROS a jeho signalizace má význam v raných stádiích vedoucích k aktivaci makrofágu.

Chan a kol.²²⁵ předvedli, že indukce UCP2 byla snížena působením SB203580. Naše data ukázala podobnou sníženou expresi UCP2 inhibicí p38. Proces zahrnující UCP2 může být regulován jednak amplifikační smyčkou závislou na ROS a také kinasou p38. Nejedná se tedy o tkáňově specifickou regulaci, která může zodpovídat za odlišný účinek kinasy p38 na expresi UCP2. Ale jedná se o stimul závislý na činnosti různých signálních drah, kde pravděpodobně existuje jakýsi přepínač protisměru p38, který rozhoduje, jestli exprese proteinu UCP2 bude kopírovat aktivaci p38.

Kardioprotektivní účinek silybinu a jeho derivátů

Polyfenolové sloučeniny vykazují antioxidační aktivitu, jejíž rozsah souvisí se strukturou každé sloučeniny. V případě DHSB se ukázalo, že se jedná o výborný antioxidant ve srovnání s SB²²⁶. Je to způsobeno hlavně přítomností dalšího centra v jeho molekule, která odstraňuje radikály (3-OH skupina spojená 2,3-dvojnou vazbou v konjugaci s 4-oxo funkční skupinou). Toto centrum bylo identifikováno jako vysoce efektivní ve zhášení DPPH, ale také důležitý rys pro inhibici lipidové peroxidace a inhibice produkce ROS v mitochondriích hnědé tukové tkáně²²⁷. Tato zjištění byla potvrzena pomocí stanovení antioxidačních vlastností derivátů jak SB, tak i DHSB, které měly selektivně blokovány –OH skupiny²²⁸. 20-OH skupina SB i DHSB se zdá mít slabý vztah k antioxidační aktivitě obou sloučenin^{227,228}.

Předchozí studie provedené Dorta a kol.²²⁹ byly zaměřeny na aspekty energetiky mitochondrií vystavené působení kvercetinu, taxifolinu, katechinu a galanginu ve vztahu k jejich strukturním znakům a antioxidační aktivitě na lipidovou peroxidaci zprostředkovanou komplexem Fe^{2+} /citrát⁸³. Studie ukazuje, že kvercetin a galangin byly mnohem silnější než katechin v protekci proti mitochondriální lipidové peroxidaci. Výsledky dále naznačují, že 2,3-dvojná vazba v konjugaci s 4-oxo funkční skupinou ve struktuře flavonoidu je hlavní faktor antioxidační aktivity flavonoidů ve vztahu k mitochondriím. Přítomnost *O*-di-OH skupiny na B-kruhu, která se vyskytuje v kvercetinu, podporuje tuto aktivitu vylučováním superoxidu. Absence tohoto strukturního znaku v galanginu podporuje antioxidační aktivitu tím, že poklesne fluidita membrány a/nebo nastane mitochondriální odprážení⁸³. Flavonoidy, patřící mezi polyfenoly, mohou působit jako antioxidanty přímou interakcí s ROS (zhášení) nebo působením jako odpráhovače oxidativní fosforylace⁸⁵.

Naše výsledky ukázaly, že DHSB snižuje membránový potenciál v celých buňkách a způsobuje vzrůst respirace a souběžně pokles membránového potenciálu v izolovaných mitochondriích. Bylo zjištěno, že se DHSB chová jako odpráhovač, tedy jako sloučenina schopná indukovat elektroforetický transport H^+ přes vnitřní mitochondriální membránu a schopná odpráhnout tvorbu protonmotivní síly od syntézy ATP. Schopnost syntetických odpráhovačů snižovat mitochondriální produkci ROS, stejně tak jako efekt mírného fyziologického odprážení vlivem specifických iontových přenašečů přítomných ve vnitřní mitochondriální membráně, byla detailně popsána a je intenzivně studována (shrnutí v^{210,230,231}). Rozsáhlé experimentální důkazy směřují k poklesu mitochondriální produkce ROS vlivem zvýšené rychlosti respirace a odpovídajícího poklesu v protonmotivní síle^{230,231}. Naše data odpovídají tomuto závěru, a ukazují, že odprážení závislé na DHSB je spojeno s inhibicí tvorby mitochondriální ROS a cytoprotektivním účinkem DHSB proti intracelulární tvorbě mitochondriální ROS. Naše data také ukázala, že účinek DHSB je do značné míry inhibován CAT a dále také inhibován přítomností CAT společně s GTP. Odpráhuje účinek DHSB není shodný s mechanismem účinku pravých odpráhovačů, jakými jsou CCCP nebo dinitrofenol, ale pravděpodobně je spojen s ANT a snad i jinými mitochondriálními aniontovými

přenašeči. ANT, UCP2 a další členové mitochondriální genové rodiny transmembránových přenašečů jsou známy tím, že zprostředkovávají protonoforetické odpražení závislé na mastných kyselinách^{210,232,233}, podle kterých je aniont mastné kyseliny translokován přenašečem a protonoforetický cyklus je dokončen spontánní rychlou difuzí protonované mastné kyseliny přes fosfolipidovou dvojvrstvu. Podle tohoto modelu by DHSB měl působit jako odpražovač v závislosti na schopnosti disociovat protony a následně podléhat transportu ANTem ve formě aniontu. Poté musí mít schopnost pronikat fosfolipidovou dvojvrstvou mitochondriální vnitřní membrány jako protonovaná kyselina k ukončení protonoforetického kruhu.

Ačkoli je kyselost SB a DHSB poměrně podobná, důležitější pro jejich odlišné chování v mitochondriální respiraci je přítomnost 2,3-dvojně vazby ve struktuře DHSB. O DHSB se uvádí, že se jedná o sloučeninu výrazně hydrofobnější než SB, jediný rozdíl spočívá v přítomnosti 2,3-dvojně vazby v DHSB. Tato nenasycená vazba způsobuje hyperkonjugaci mezi kruhy A, B a C, která pak vede ke koplanaritě těchto kruhů. Naproti tomu, B a C kruhy v molekule SB jsou umístěny v různých úrovních jeden k druhému. Koplanarita ABC kruhového systému v DHSB je možná příčinou jeho zvýšené hydrofobicity ve srovnání s SB. Tato planarita vysvětluje schopnost některých flavonolů (např. kvercetin, galangin; cit.⁸³) ovlivňovat mitochondriální respiraci nebo pokles fluidity membrány. Účinek flavonolů na mitochondrie se může také lišit v závislosti na struktuře jejich B kruhu. Kvercetin, obsahující *O*-di-OH strukturu na B-kruhu, způsobuje inhibici dýchacího řetězce, zatímco galangin, který má B-kruh nesubstituovaný, způsobuje odpražení⁸³. Proto rozdíl v jejich účinku na mitochondriální respiraci je pravděpodobně spojen s povahou jejich B kruhu, možná jeho polaritou. Podobný efekt galanginu a DHSB naznačuje, že přítomnost D kruhu v DHSB zeslabuje polaritu této části molekuly, ve srovnání s kvercetinem, který tvoří část DHSB struktury a vede k efektivnímu odpražení. ANTem zprostředkovaný protonoforetický cyklus DHSB stojí v kontrastu k indikované schopnosti flavonoidu kvercetin inhibovat ANT⁸⁷. Naše data neukázala, že by DHSB inhiboval ANT, ale odpovídá ANT-em zprostředkovanému odpražení závislému na DHSB. Následkem je pokles spřažení dýchacího řetězce s fosforlyací. Naše předchozí data dále naznačila, že několik jiných strukturně podobných

flavonolignanů také odpřahují mitochondrie v procesu závislém na ANT (nepublikovaná data M. Jabůrek a M. Modrianský). Možnost, že DHSB a jiné strukturně podobné flavonolignany jsou přenášeny ANT, UCP2 a jinými členy genové rodiny, bude předmětem dalšího zkoumání. Data zde prezentovaná nás vedla k přepracování publikované hypotézy, protože ta zanedbává interakce polyfenolů s proteiny vnitřní mitochondriální membrány⁸⁵. Z tohoto důvodu není brán v úvahu důležitý aspekt mitochondriálního respiračního odpřažení. SAR a QSAR studie zaměřené na interakci polyfenolů s mitochondriálními přenašeči hledají důkazu, který by podpořil prospěšné účinky některých potravin. Původní zdroj polyfenolů pravděpodobně poskytuje mírné přirozené odpřažení oxidativní fosforylace. DHSB může být považován za základní sloučeninu pro syntézu mírných odpřahovačů, které by byly potenciálně užitečné pro terapii srdeční ischemie, pre- a post-kondicionování, či dalších onemocnění jako jsou obezita nebo metabolický syndrom (mírné energetické zužitkování), která by mohla profitovat z mírného odpřažení oxidativní fosforylace.

Modulace exprese UCP2 thyroideálními hormony

Už dlouho je známo, že onemocnění štítné žlázy mají výrazný efekt na srdce a kardiovaskulární systém. Klinické studie ukázaly, že hyperthyroidismus způsobuje zvýšený vertikální systolický a diastolický výkon doprovázený rovnoměrným snížením v systémové vaskulární rezistenci, které spolu odpovídají za výrazný vzrůst srdečního výkonu²³⁴. Základní studie zjistili, že přímý efekt thyroideálních hormonů na srdce by mohlo být vysvětleno schopností trijodotyroninu (T3) regulovat transkripci specifických genů myocytů^{235,236}. Očekávatelný vzrůst srdečního toku, kontraktility a srdeční hmoty (hypertrofie) jsou následkem chronického onemocnění štítné žlázy²³⁶. Zatímco účinek thyroideálního hormonu na genovou transkripci je zprostředkován vazbou T3 na malé nukleární receptory²³⁷, efekt na srdeční hmotu je nepřímo zprostředkován vzrůstem srdečního zatížení²³⁸.

Hyperthyroidismus může vést k srdečním problémům snad prostřednictvím zvýšené exprese odpřahujícího proteinu UCP2, který může mít velký význam, pokud je přítomen v nadbytku. Sledovali jsme účinek SB a DHSB na bioenergetiku kardiomyocytů ovlivněnou thyroideálními hormony. Obě sloučeniny snižovaly expresi UCP2 indukovanou T4 v závislosti na koncentraci těchto látek. Hlavním cílem této části bylo zjistit jakým

mechanismem ovlivňují SB a DHSB expresi UCP2 indukovanou thyroidními hormony. V této souvislosti jsme vyvinuli metodiku HPLC/MS, která nepoužívá radioaktivní sloučeniny pro stanovení hormonů v kradiomyocytech.

Pro potvrzení stability obou hormonů jsme na začátku navrženou metodu HPLC/MS aplikovali při absenci potkaních neonatálních kardiomyocytů. 10-ti násobně nižší koncentrace T3 než T4 byla aplikována z toho důvodu, aby lépe reflektovala fyziologické podmínky, za kterých je hladina T3 několikrát nižší než hladina T4 v závislosti na tkáni a typu buněk²³⁹ přibližně v poměru 20:1 T4 k T3 v krvi²⁴⁰. V našich experimentech nebyly pozorovány změny v koncentracích T4 v kultivačních médiích. Podobně nebyly pozorovány změny v případě koncentrací T3 v kultivačním médiu. Ovšem v následujících 12 hod. byl pozorován 15% pokles v koncentraci T3, což naznačuje poněkud delší poločas v kultivačním médiu ve srovnání s publikovanými daty²³⁹. Stejně koncentrace T3 a T4, které byly popsány výše byly přidány ke kultuře buněčných kardiomyocytů. Přítomnost detekovatelného množství T4 dokonce i v kontrolní kultuře, např. bez přídavku hormonů, by mohlo být vysvětleno jako převod původního množství thyroidních hormonů obsažených v původních potkaních srdcích. Tato domněnka vychází z faktu, že biologický poločas T3 a T4 je 1 - 2 resp. 6 - 7 dní²³⁹.

Nakonec byl sledován příjem hormonů do buněk potkaních kardiomyocytů pomocí HPLC/MS. Rychlost příjmu T3 byl nižší než T4. Tyto výsledky jsou v souladu s daty, prezentovanými jinými autory; např. studie příjmu T3 a T4 v myoblastech a myotubulech embryonální srdeční buněčné linie H9c2(2-1)²¹⁶. Nižší výtěžnosti T3 protichůdně k T4, by mohlo být spojeno s vyšší hydrofobicitou a schopností reagovat s cytosolickými komponentami v porušených buňkách homogenizovaného vzorku.

Z nejnovějších studií vyplývá, že UCP proteiny jsou důležitými mediátory efektů T3 na buněčné úrovni a že T3 je schopný integrace různých biochemických drah zapojených v expresi UCP2, jakými jsou lipidový metabolismus, hladiny CoQ a produkce ROS. Protože DHSB odpráhuje mitochondrie izolované z potkaního srdce, zatímco snižuje tvorbu ROS, může ovlivnit expresi UCP jako způsob zpětné vazby. Ovšem v případě SB nebyl tento účinek pozorován v takové míře. Proto jsme studovali možnost SB a DHSB limitovat příjem hormonů do buňky. Ukázalo se, že obě sloučeniny nemají signifikantní vliv na příjem hormonů do buňky. Bylo také potvrzeno, že životnost kardiomyocytů není ovlivněna působením těchto látek.

Zaměřili jsme se na zjištění, jestli může tento efekt ovlivňovat aktivitu thyroidního receptoru. Mnoho fyziologických efektů T3 uvnitř buněk je zprostředkováno na úrovni

transkripce interakcí se specifickými thyroidními receptory (TR α a TR β) patřící do nadrodiny jaderných hormonálních receptorů. S využitím *cis*-aktivního reportérového systému jsme zjistili, že SB a DHSB významně snižují aktivitu thyroidního receptoru v kardiomyocytech. Navíc DHSB ovlivňoval transkripční aktivitu AhR, nukleárního receptoru nezávislého na přítomnosti thyroidních hormonů. Tato data nás vedla k vytvoření hypotézy, že aktivita DHSB podobná odtahovačům může nepřímo ovlivnit transkripční aktivitu těchto nukleárních receptorů, které reagují na energetický status buňky. Nemusí se tedy jednat o přímou interakci DHSB s nukleárními receptory nebo jejich partnery, např. retinoidním x receptorem RXR.

6.2 Distribuce CIDEa ve vztahu k apoptose

V této práci jsme se zabývali redistribucí proteinu CIDEa v souvislosti s apoptosou. Přesun CIDEa do jádra může hrát významnou roli, kdy může být důležitým prostředníkem pro přenos signálu vedoucímu k modulaci nebo přímo k navození apoptosy. Původní označení CIDE proteinů jako proapoptotických faktorů pochází z homologie jejich N-koncové domény s podjednotkami DNA fragmentačního faktoru, DFF40/CAD a DFF45/ICAD^{137,241}. Ovšem stále chybí konečný důkaz toho, že CIDEa interaguje s inhibiční podjednotkou DFF45 a tudíž má protichůdný inhibiční účinek na nukleasu DFF40, která následně štěpí DNA. Zjistili jsme, že CIDEa během procesu apoptosy vyvolané její zvýšenou expresí nebo v součinnosti s dalšími induktory apoptosy podléhá redistribuci v buňce. To nabízí model, kde inaktivní komplex DFF45/DFF40 po vstupu do jádra disociuje a interaguje s proteinem CIDEa, který po apoptotickém stimulu také vstoupil do jádra. Tento model je podporován zjištěním, že se celý komplex DFF45/DFF40 importuje do jádra snáze než jednotlivé podjednotky²⁴². Pokud by tedy CIDEa rozrušila komplex již v cytosolu, pak by samotná podjednotka DFF40 do jádra migrovala mnohem hůře. Zjistili jsme, že migrace proteinu CIDEa do jádra je výraznější po iniciaci apoptosy camptothecinem nebo valinomycinem a je nezávislá na kaspasách. CIDEa tedy může v některých typech buněk¹⁵³ představovat jinou mitochondriálně zprostředkovanou apoptotickou dráhu než již známé mechanismy, jako je například uvolnění cytochromu *c*²⁴³.

Přesné dráhy způsobující redistribuci nejsou známy, nicméně povšimli jsme si rozdílného vlivu každého stimulu na výraznější redistribuci CIDEa po působení valinomycinem. Hlavním cílem camptothecinu je komplex DNA s topoizomerasou I, který se nachází v jádře. Výsledkem interakce jsou zlomy na DNA, které mohou vést k uvolnění signálních proteinů, včetně CIDEa, a k jejich migraci respektive přenosu signálu do mitochondrií. Na druhou stranu valinomycin, který je draslíkový uniportní přenašeč způsobuje snížení potenciálu na mitochondriální membráně. Jeho celkovou přeměnou do ΔpH^{211} může pravděpodobně spouštět uvolnění mitochondriálních proteinů jako výsledek transformace mitochondriální sítě.

Proapoptotické proteiny Bax a Bak byly označeny jako účastníci v normální i apoptotické morfogenezi mitochondrií²⁴⁴. Zdá se ale, že role CIDEa v apoptose je odlišná od uvolnění cytochromu *c* kanály tvořenými hexamery Bax/Bak, už také proto, že CIDEa je příliš velká na průchod hexamery Bak-Bad.

Dřívější práce poukázala na to, že vysoké hladiny exprese proteinu CIDEb v COS-1 buňkách vede k apoptose¹⁴⁸. Naše data potvrdila stejný výsledek pro CIDEa protein v HeLa buňkách, kde se přirozeně CIDEa neexprimuje. Oproti tomu jiné další práce souvislost apoptosy a zvýšené exprese CIDEa v játrech myší¹⁴⁰ nebo hnědé tukové tkáni^{132,245} nepotvrdily. To je možné vysvětlit tím, že pravděpodobně existuje nějaký kofaktor mitochondriálního původu, který je buněčně specifický a který brání navození apoptosy indukované proteinem CIDEa, tím že zamezí její přesun z mitochondrií. Kofaktorem by mohl být protein vázající CIDEa. Bylo publikováno, že CIDEa interaguje s mitochondriálním proteinem UCP1 přítomným v hnědé tukové tkáni, ve které CIDEa neindukuje apoptosu¹³². Naše pokusy potvrdit tuto navrženou interakci mezi CIDEa a UCP1 s využitím spektroskopie resonance povrchových plazmonů byly nepřesvědčivé. Stejně jako nemáme žádný důkaz toho, že CIDEa může interagovat s UCP1 homologem UCP2, přestože jsme zjistili, že UCP2 je v HeLa buňkách přítomná. To, že existuje interakce s neznámým mitochondriálním kofaktorem by mohl naznačit fakt, že CIDEa byla detekována převážně v mitochondriích¹³², stejně jako její homolog CIDEb^{148,245} nebo CIDE3²⁴⁵, a je možné, že je zde CIDEa v jakési klidové fázi.

Další možný pohled je z hlediska potenciálních vazebných partnerů proteinu CIDEa, které ho vyvazují při jeho lokalizaci v mitochondriích. Jak již bylo uvedeno, CIDEa je pravděpodobně distribuována v mitochondriích a hypoteticky tvoří komplex s proteinem specifickým pro hnědý tuk, s mitochondriálním odpráhučím proteinem UCP. Koexprese těchto dvou proteinů v kvasinkách snižuje odpráhučící schopnost UCP1¹⁴¹. Průkaznost experimentu v kvasinkách však nemusí souviset s reálnou fyziologickou situací v savčích buňkách. Např. v srdci, kde byl zjištěn vysoký obsah transkriptu CIDEa a kde kolegové rovněž zjistili vysoký relativní obsah transkriptu UCP2, by teoreticky mohl vzniknout komplex UCP2-CIDEa. Jeho existence však dosud nebyla prokázána. Na druhou stranu extramitochondriální lokalizace CIDEa v buňkách bílé tukové tkáně¹⁵⁰ nemusí být v rozporu s její lokalizací v mitochondriích u jiných buněčných typů. Malé množství objemu buňky, zaujímané mitochondriální sítí u bílé tukové tkáně, může zcela zřejmě způsobit nedostatečný import CIDEa do jejich kompartmentů a tedy asociování s lipidy v cytosolu. Proto musíme považovat za neprokázanou i původně vyslovenou hypotézu, předpokládající, že by protein CIDEa mohl indukovat apoptosu i u buněk bílé tukové tkáně, a tedy spuštění apoptosy jeho stimulem by mohlo vykazovat antiobezitní účinek. Je možné, že další studie využívající konfokální mikroskopii s vysokým rozlišením a konstrukty specificky upravenými pro bílou tukovou tkáň prokáží přítomnost CIDE i v mitochondriích bílého tuku.

6.3 Vliv miRNA-29 na apoptotické proteiny

Neustále přibývá informací o roli miRNA jako důležitém faktoru v regulaci buněčných dějů prostřednictvím posttranskripční modulace exprese proteinů. Identifikovat cílový protein, respektive jeho mRNA, není jednoduchý úkol, mnohem nesnadnější je však potvrdit, jakou funkci plní změny exprese sledované miRNA.

Mezi přibližně 1400 potenciálními cílovými geny miR-29c jsou uvedeni také významní zástupci pro-apoptotických proteinů. Jestliže miR-29b reguluje expresi antiapoptotického proteinu Mcl-1¹⁷⁸ a naše data naznačují regulaci proapoptotického proteinu Bak prostřednictvím miR-29c, vzniká otázka funkce shluků miRNA genů

a jejich vzájemná interakce s dalšími regulačními mechanismy genové exprese. Právě souvislost exprese proteinů Bak a Mcl-1 byla nastolena v nedávné studii hepatoprotekce²⁴⁶.

miR-29 moduluje expresi dvou anti-apoptotických proteinů Tcl-1¹⁷⁵ a Mcl-1¹⁷⁸, a také enzym DNMT3B, který souvisí s epigenetickou regulací transkripce¹⁸⁰. Naše výsledky prokazují, že exprese proapoptotického proteinu Bak je výrazně snížena po transfekci pre-miR-29c. Potvrdili jsme, že přítomnost miR-29 snižuje expresi proteinu DNMT3B a stejně tak, že miR-29 se podílí na regulaci antiapoptotického proteinu Mcl-1.

Porovnání buněčné exprese miR-29c, které jsme provedli, poukazuje na dynamiku a stechiometrii proteinů zapojených do apoptosy, předpokládáme-li úlohu této miRNA v represi pro-apoptotických proteinů. V případě izolovaných lidských hepatocytů byla hladina miR-29c velmi vysoká a může se tedy podílet na ochraně hepatocytů proti endogenní apoptose potlačením exprese Bak. Naproti tomu nízká hladina miR-29c v buněčných liniích, které vykazují různé poruchy apoptotických drah, naznačuje vysokou expresi Bak, která nejspíš není dostačující ke spuštění apoptosy. Podíl miR-29c na regulaci apoptosy vyžaduje mnohem detailnější studii.

7. ZÁVĚRY

Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

UCP2

U proteinu UCP2 nás zajímalo, jaká je jeho exprese v potkaních kardiomyocytech, zda-li je do regulace exprese UCP2 zapojena kinasa p38 a jakým mechanismem působí polyfenolové látky v potkaních neonatálních kardiomyocytech:

- CPT i T4 jsou induktory UCP2 v potkaních kardiomyocytech.
- Kinasa p38 je zapojena do regulace exprese UCP2.
- DHSB se chová jako typický odpráhovač a není to způsobeno jeho antioxidačními vlastnostmi.
- DHSB má kardiprotektivní účinky.
- Hodnota IC_{50} DHSB byla stanovena na $0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- T4 a T3 vykazují koncentračně závislou regulaci UCP2 vlivem polyfenolových látek.
- Polyfenolové látky neovlivňují vstup hormonů do buňky.

CIDEa

V případě CIDEa jsme se zaměřili na stanovení exprese na úrovni proteinu, lokalizace CIDEa proteinu v buňce a jaký vliv má apoptosa na distribuci CIDEa v buňce.

- Maximální exprese CIDEa nastala za 6 hod. po přidání tetracyklinu.
- Maximální apoptosa se pohybovala mezi 8 - 12 hod.
- Indukce Val a CPT vyvolala redistribuci proteinu CIDEa do jádra.
- Jedná se o proces nezávislý na kaspasach.
- Redistribuce CIDEa je spojena s apoptosou.

Ovlivnění apoptotických proteinů

Za účelem ověření utlumení exprese proteinu Bak jsme transfekovali syntetickou miR-29 do buněčné linie HeLa. Dále jsme ověřili vliv miR-29 na expresi

DNA-methyltransferasy. Provedli jsme imunodetekci antiapoptotického proteinu Mcl-1, který se řadí mezi cílové geny miR-29.

- Expresi proteinu Bak byla výrazně snížena po transfekci pre-miR-29c.
- Imunodetekcí byl zaznamenán výraznější úbytek DNMT3B po transfekci pre-miR-29-b1, -b2, -c.
- Expresi Mcl-1 byla snížena u všech testovaných mir-29.

8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace:

1. Valoušková E., Smolková K., Šantorová J., Ježek P. a Modrianský M.: Redistribution of cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector-a (CIDEa) from mitochondria to nucleus is associated with apoptosis in HeLa cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **27**, 92-100 (2008). IF₂₀₀₇ = 0,697
2. Valoušková E., Modrianský M.: Modulation of UCP2 expression by p38 - a link to cardioprotection. *Biomed PapMed Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **152** (1), 3-7 (2008).
3. Modrianský M., Gabrielová E.: Uncouple my heart: the benefits of inefficiency. *J Bioenerg Biomembr.* **41**, 133-136 (2009). IF₂₀₀₈ = 2,48
4. Vacek J., Kosina P., Gabrielová E., Modrianský M., Ulrichová J.: Ion-trap mass spectrometry for determination of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharm Biomed Anal.* **X**, XX-XX (2010). IF₂₀₀₉ = 2,629. V tisku.

Prezentace na konferencích:

1. Valoušková E., Vostálová J., Ježek P., Modrianský M.: Induction of uncoupling protein 2 in neonatal cardiomyocytes in response to camptothecin. *32nd FEBS Congress.* 7. - 12. 7. 2007, Vídeň, Rakousko.
2. Valoušková E., Vostálová J., Ježek P., Modrianský M.: Involvement of p38 in camptothecin induced expression of Ucp2 in rat neonatal. *XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů.* 6. - 7. 2. 2008, Brno, Česká republika.
3. Modrianský M., Valoušková E., Doležel P., Šantorová J., Ježek P.: Redistribution of cell death-inducing DFFA [DNA Fragmentation Factor]-like effector-A (CIDEA) in HeLa cells. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM6198959216: Karlov pod Pradědem 2008.* 22. - 24. 5. 2008, Karlov pod Pradědem, Česká republika.

4. Valoušková E., Vostálová J., Ježek P., Modrianský M.: Involvement of p38 in camptothecin induced expression of UCP2 in rat neonatal cardiomyocytes. *15th european bioenergetics conference*. 19. - 24. 7. 2008, Dublin, Irsko.
5. Valoušková E., Vostálová J., Modrianský M.: Regulation of uncoupling protein 2 by silybin in rat neonatal cardiomyocytes. *Konference vědeckých prací studentů DSP 2008*. 3. - 4. 9. 2008, Olomouc, Česká republika.
6. Modrianský M., Gabrielová E., Jabůrek M., Gažák R., Popelková H., Křen V.: Uncoupler-like activity of dehydrosilybin decreases ROS formation in neonatal rat cardiomyocytes. *Diet and Optimum Health*. 13. - 16. 5. 2009, Portland, Oregon, USA.
7. Modrianský M., Gabrielová E., Jabůrek M., Gažák R., Popelková H., Křen V.: Polyphenols exhibiting uncoupler-like activity function as modulators of mitochondrial ROS formation. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM6198959216*. 24. - 26. 5. 2009, Hustopeče okr. Břeclav, Česká republika.
8. Gabrielová E., Vostálová J., Modrianský M., Křen V.: Regulation of uncoupling protein 2 by silybin and its derivatives in rat neonatal cardiomyocytes. *9th Young Scientist Forum*. 2. - 9. 7. 2009, Praha, Česká republika.
9. Gabrielová E., Vostálová J., Modrianský M., Křen V.: Regulation of uncoupling protein 2 by silybin and its derivatives in rat neonatal cardiomyocytes. *34th FEBS Congress*. 2. - 9. 7. 2009, Praha, Česká republika.
10. Modrianský M., Gabrielová E., Gažák R., Jabůrek M., Kosina P., Vacek J., Křen V.: Silybin derivatives modulate thyroid hormone-mediated UCP2 expression in rat neonatal cardiomyocytes. *Biophysical Society - 54th Annual Meeting*. 20. - 24. 2. 2010, San Francisco, California, USA
11. Gabrielová E., Jabůrek M., Gažák R., Popelková H., Ježek, J., Křen V., Modrianský M.: Dehydrosilybin attenuates production of ROS in rat cardiomyocyte mitochondria by uncoupler-like mechanism. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM6198959216*. 27. - 96. 5. 2010, Vílanec, Česká republika.

9. OSTATNÍ PRÁCE

Prezentace na konferencích:

1. Gabrielová-Valoušková E., Kolář P., Modrianský M., Kolářová H.: Methods for evaluation of cell damage caused by chemical and physical methods. *FutureTrends in Phytochemistry in the Global Era of Agri-food and Health*. 12. - 14. 5. 2009, Murcia, Španělsko.
2. Skopalík J., Pásek M., Gabrielová E., Richtárik M., Modrianský M, Klabusay M.: Rat cardiomyocytes and bone marrow cells in coculture. *ESF Science Meeting „Cardiac Dynamics“*. 24. - 27. 8. 2009, Smolenice, Slovenská republika.

10. LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in Biology and Medicine* (1999).
2. Brown GC, Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* **284** (Pt 1):1-13 (1992).
3. Kalckar HM, 50 years of biological research--from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu Rev Biochem* **60**:1-37 (1991).
4. Karlson P, Gerok, W., Gross, W., *Pathobiochemie*. (1987).
5. Mitchell P, Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**:1148-1159 (1979).
6. Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF and Porter RK, The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* **1187**:132-139 (1994).
7. Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF and Stuart JA, The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23 Suppl 6**:S4-11 (1999).
8. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL and Parker N, Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* **37**:755-767 (2004).
9. Porter RK, Hulbert AJ and Brand MD, Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol* **271**:R1550-1560 (1996).
10. Brand MD and Esteves TC, Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* **2**:85-93 (2005).
11. Brand MD, Couture P, Else PL, Withers KW and Hulbert AJ, Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem J* **275** (Pt 1):81-86 (1991).
12. Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ and Brand MD, The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **119**:325-334 (1998).
13. Liochev SI and Fridovich I, Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* **48**:157-161 (1999).
14. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C and Castro L, Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* **33**:1451-1464 (2002).
15. Evans P and Halliwell B, Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* **884**:19-40 (1999).
16. Sohal RS and Weindruch R, Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**:59-63 (1996).
17. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC and Epstein CJ, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* **11**:376-381 (1995).
18. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S and Matzuk MM, Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9782-9787 (1996).
19. Beckman KB and Ames BN, The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**:547-581 (1998).
20. Walker JE and Runswick MJ, The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr* **25**:435-446 (1993).
21. Jarmuszkiwicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L and Sluse FE, Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* **274**:23198-23202 (1999).
22. Ledesma A, de Lacoba MG and Rial E, The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* **3**:REVIEWS3015 (2002).
23. Arechaga I, Ledesma A and Rial E, The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life* **52**:165-173 (2001).
24. Nicholls DG and Locke RM, Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**:1-64 (1984).
25. Krauss S, Zhang CY and Lowell BB, The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:248-261 (2005).

26. Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D and Criscuolo F, Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci Rep* **25**:227-249 (2005).
27. Jezek P and Garlid KD, Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **30**:1163-1168 (1998).
28. Schrauwen P and Hesselink MK, The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc* **63**:287-292 (2004).
29. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S and Ricquier D, Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* **26**:435-439 (2000).
30. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD, A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* **22**:4103-4110 (2003).
31. Chan CB, Saleh MC, Koshkin V and Wheeler MB, Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes* **53 Suppl 1**:S136-142 (2004).
32. Son C, Hosoda K, Ishihara K, Bevilacqua L, Masuzaki H, Fushiki T, Harper ME and Nakao K, Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* **47**:47-54 (2004).
33. Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B and Mallat Z, Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* **107**:388-390 (2003).
34. Jaburek M, Miyamoto S, Di Mascio P, Garlid KD and Jezek P, Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J Biol Chem* **279**:53097-53102 (2004).
35. Richard D, Clavel S, Huang Q, Sanchis D and Ricquier D, Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem Soc Trans* **29**:812-817 (2001).
36. Nohl H, Kozlov AV, Gille L and Staniek K, Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans* **31**:1308-1311 (2003).
37. Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Penicaud L and Casteilla L, A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* **11**:809-815 (1997).
38. Bai Y, Onuma H, Bai X, Medvedev AV, Misukonis M, Weinberg JB, Cao W, Robidoux J, Floering LM, Daniel KW and Collins S, Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *J Biol Chem* **280**:19062-19069 (2005).
39. Alves-Guerra MC, Rousset S, Pecqueur C, Mallat Z, Blanc J, Tedgui A, Bouillaud F, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D and Miroux B, Bone marrow transplantation reveals the in vivo expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. *J Biol Chem* **278**:42307-42312 (2003).
40. Rousset S, Alves-Guerra MC, Ouadghiri-Bencherif S, Kozak LP, Miroux B, Richard D, Bouillaud F, Ricquier D and Cassard-Doulcier AM, Uncoupling protein 2, but not uncoupling protein 1, is expressed in the female mouse reproductive tract. *J Biol Chem* **278**:45843-45847 (2003).
41. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C and Brownlee M, Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* **108**:1341-1348 (2001).
42. Park JY, Park KG, Kim HJ, Kang HG, Ahn JD, Kim HS, Kim YM, Son SM, Kim IJ, Kim YK, Kim CD, Lee KU and Lee IK, The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* **48**:1022-1028 (2005).
43. Bernal-Mizrachi C, Weng S, Li B, Nolte LA, Feng C, Coleman T, Holloszy JO and Semenkovich CF, Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:961-968 (2002).
44. Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Shimosegawa T, Sakoda H, Asano T and Oka Y, Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* **54**:322-332 (2005).
45. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D and Warden CH, Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* **15**:269-272 (1997).
46. Brown JE, Thomas S, Digby JE and Dunmore SJ, Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein-2 mRNA in human islets. *FEBS Lett* **513**:189-192 (2002).

47. Briaud I, Kelpe CL, Johnson LM, Tran PO and Poitout V, Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* **51**:662-668 (2002).
48. D'Adamo M, Perego L, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, Andreozzi F, Sciacqua A, Lauro D, Sbraccia P, Federici M, Paganelli M, Pontiroli AE, Lauro R, Perticone F, Folli F and Sesti G, The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* **53**:1905-1910 (2004).
49. Bulotta A, Ludovico O, Coco A, Di Paola R, Quattrone A, Carella M, Pellegrini F, Prudente S and Trischitta V, The common -866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:1176-1180 (2005).
50. Wallace DC, Animal models for mitochondrial disease. *Methods Mol Biol* **197**:3-54 (2002).
51. Kagawa Y, Cha SH, Hasegawa K, Hamamoto T and Endo H, Regulation of energy metabolism in human cells in aging and diabetes: FoF(1), mtDNA, UCP, and ROS. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:662-676 (1999).
52. Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Murphy MP, Pakay JL, Talbot DA and Echtay KS, Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem Soc Symp*:203-213 (2004).
53. Mattson MP and Liu D, Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:539-549 (2003).
54. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K and Wieloch T, Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* **9**:1062-1068 (2003).
55. Dejean L, Camara Y, Sibille B, Solanes G and Villarroya F, Uncoupling protein-3 sensitizes cells to mitochondrial-dependent stimulus of apoptosis. *J Cell Physiol* **201**:294-304 (2004).
56. Barazzoni R and Nair KS, Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**:E413-419 (2001).
57. Kerner J, Turkaly PJ, Minkler PE and Hoppel CL, Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:E1054-1062 (2001).
58. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV and Downey JM, Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**:2383-2391 (1997).
59. Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A and Das DK, Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol* **275**:H1857-1864 (1998).
60. Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ and Yue TL, Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* **99**:1685-1691 (1999).
61. Mackay K and Mochly-Rosen D, An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* **274**:6272-6279 (1999).
62. Valouskova E and Modriansky M, Modulation of UCP2 expression by p38--a link to cardioprotection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **152**:3-7 (2008).
63. Kong JY and Rabkin SW, Angiotensin II does not induce apoptosis but rather prevents apoptosis in cardiomyocytes. *Peptides* **21**:1237-1247 (2000).
64. Jezek P, Zackova M, Ruzicka M, Skobisova E and Jaburek M, Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res* **53 Suppl 1**:S199-211 (2004).
65. McFalls EO, Hou M, Bache RJ, Best A, Marx D, Sikora J and Ward HB, Activation of p38 MAPK and increased glucose transport in chronic hibernating swine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H1328-1334 (2004).
66. Selimovic D, Hassan M, Haikel Y and Hengge UR, Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cell Signal* **20**:311-322 (2008).
67. Emre Y, Hurtaud C, Nubel T, Criscuolo F, Ricquier D and Cassard-Doulier AM, Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem J* **402**:271-278 (2007).
68. McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF, Jr., McCoy JP, Jr. and Sack MN, Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* **280**:33470-33476 (2005).

69. Teshima Y, Akao M, Jones SP and Marban E, Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* **93**:192-200 (2003).
70. Graier WF, Trenker M and Malli R, Mitochondrial Ca²⁺, the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3? *Cell Calcium* **44**:36-50 (2008).
71. Andrews ZB, Diano S and Horvath TL, Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* **6**:829-840 (2005).
72. Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Jorgensen IH and Grill V, Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **282**:273-277 (2001).
73. Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK and Clarke K, Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* **364**:1786-1788 (2004).
74. Bodyak N, Rigor DL, Chen YS, Han Y, Bisping E, Pu WT and Kang PM, Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**:H829-835 (2007).
75. Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G, Hein L, Topper JN, Liggett SB, Olson EN, Lohse MJ, Vatner SF and Vatner DE, Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation* **108**:2926-2933 (2003).
76. Mitchell P, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144-148 (1961).
77. Ishizawa M, Mizushige K, Noma T, Namba T, Guo P, Murakami K, Tsuji T, Miyatake A, Ohmori K and Kohno M, An antioxidant treatment potentially protects myocardial energy metabolism by regulating uncoupling protein 2 expression in a chronic beta-adrenergic stimulation rat model. *Life Sci* **78**:2974-2982 (2006).
78. Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**:933-956 (1996).
79. Cotelle N, Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* **1**:569-590 (2001).
80. Scalbert A and Williamson G, Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**:2073S-2085S (2000).
81. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L, Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**:727-747 (2004).
82. Luczaj W, Zapora E, Szczepanski M, Wnuczko K and Skrzydlewska E, Polyphenols action against oxidative stress formation in endothelial cells. *Acta Pol Pharm* **66**:617-624 (2009).
83. Dorta DJ, Pigoso AA, Mingatto FE, Rodrigues T, Pestana CR, Uyemura SA, Santos AC and Curti C, Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytother Res* **22**:1213-1218 (2008).
84. Brennan JP, Berry RG, Baghai M, Duchon MR and Shattock MJ, FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation. *Cardiovasc Res* **72**:322-330 (2006).
85. Modriansky M and Gabriellova E, Uncouple my heart: the benefits of inefficiency. *J Bioenerg Biomembr* **41**:133-136 (2009).
86. Spycher S, Smejtek P, Netzeva TI and Escher BI, Toward a class-independent quantitative structure-activity relationship model for uncouplers of oxidative phosphorylation. *Chem Res Toxicol* **21**:911-927 (2008).
87. Ortega R and Garcia N, The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase. *J Bioenerg Biomembr* **41**:41-47 (2009).
88. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R and Sinclair DA, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**:337-342 (2006).
89. Kamp F and Hamilton JA, pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of unionized fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11367-11370 (1992).
90. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-257 (1972).
91. Ellis HM and Horvitz HR, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**:817-829 (1986).
92. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-1462 (1995).
93. Chang HY and Yang X, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:821-846 (2000).

94. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD and et al., Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**:343-352 (1994).
95. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J, Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**:171 (1996).
96. Ashe PC and Berry MD, Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**:199-214 (2003).
97. Sartorius U, Schmitz I and Krammer PH, Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* **2**:20-29 (2001).
98. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP and O'Toole A, Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* **28**:170-177 (2000).
99. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR and Thompson CB, The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**:1389-1399 (2000).
100. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727-730 (2001).
101. Adams JM and Cory S, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**:61-66 (2001).
102. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W and Schulze-Osthoff K, Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* **19**:1181-1190 (2000).
103. Mahajan NP, Linder K, Berry G, Gordon GW, Heim R and Herman B, Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol* **16**:547-552 (1998).
104. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR, Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**:469-475 (2000).
105. Zou H, Li Y, Liu X and Wang X, An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**:11549-11556 (1999).
106. Benedict MA, Hu Y, Inohara N and Nunez G, Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem* **275**:8461-8468 (2000).
107. Hu Y, Ding L, Spencer DM and Nunez G, WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **273**:33489-33494 (1998).
108. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X, Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**:405-413 (1997).
109. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS and Reed JC, A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**:7787-7790 (1998).
110. Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**:33-42 (2000).
111. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**:43-53 (2000).
112. Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC and Fesik SW, NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* **275**:33777-33781 (2000).
113. Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM and Vaux DL, DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* **152**:483-490 (2001).
114. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M and Kroemer G, Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**:1533-1544 (1996).
115. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M and Kroemer G, Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**:1331-1341 (1996).
116. Ashkenazi A and Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308 (1998).

117. Wajant H, The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**:1635-1636 (2002).
118. Chen G and Goeddel DV, TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**:1634-1635 (2002).
119. Nagata S, Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365 (1997).
120. Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**:1169-1178 (1993).
121. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH and Peter ME, Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**:5579-5588 (1995).
122. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM, FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **271**:4961-4965 (1996).
123. Decker T, Lohmann-Matthes ML and Gifford GE, Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* **138**:957-962 (1987).
124. Turner M, Londei M and Feldmann M, Human T cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* **17**:1807-1814 (1987).
125. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr. and Goeddel DV, The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9292-9296 (1991).
126. Tartaglia LA, Pennica D and Goeddel DV, Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* **268**:18542-18548 (1993).
127. Hsu H, Xiong J and Goeddel DV, The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**:495-504 (1995).
128. Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G and Wallach D, Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* **12**:301-311 (2000).
129. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A and Ashkenazi A, Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**:12687-12690 (1996).
130. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A, A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* **7**:1003-1006 (1997).
131. Kim K, Takimoto R, Dicker DT, Chen Y, Gazitt Y and El-Deiry WS, Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not normal cell lines. *Int J Oncol* **18**:241-247 (2001).
132. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W and Li P, Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* **35**:49-56 (2003).
133. Li JZ, Ye J, Xue B, Qi J, Zhang J, Zhou Z, Li Q, Wen Z and Li P, Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes* **56**:2523-2532 (2007).
134. Toh SY, Gong J, Du G, Li JZ, Yang S, Ye J, Yao H, Zhang Y, Xue B, Li Q, Yang H, Wen Z and Li P, Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice. *PLoS One* **3**:e2890 (2008).
135. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T and Kasuga M, FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* **118**:2808-2821 (2008).
136. Gong J, Sun Z and Li P, CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* **20**:121-126 (2009).
137. Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X and Nunez G, CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *Embo J* **17**:2526-2533 (1998).
138. Wu C, Zhang Y, Sun Z and Li P, Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol Biol* **8**:159 (2008).
139. Nordstrom EA, Ryden M, Backlund EC, Dahlman I, Kaaman M, Blomqvist L, Cannon B, Nedergaard J and Arner P, A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes* **54**:1726-1734 (2005).
140. Viswakarma N, Yu S, Naik S, Kashireddy P, Matsumoto K, Sarkar J, Surapureddy S, Jia Y, Rao MS and Reddy JK, Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA

- fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *J Biol Chem* **282**:18613-18624 (2007).
141. Li P, Cidea, brown fat and obesity. *Mech Ageing Dev* **125**:337-338 (2004).
 142. Kelder B, Boyce K, Kriete A, Clark R, Berryman DE, Nagatomi S, List EO, Braughler M and Kopchick JJ, CIDE-A is expressed in liver of old mice and in type 2 diabetic mouse liver exhibiting steatosis. *Comp Hepatol* **6**:4 (2007).
 143. Hallberg M, Morganstein DL, Kiskinis E, Shah K, Kralli A, Dilworth SM, White R, Parker MG and Christian M, A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol* **28**:6785-6795 (2008).
 144. Christian M, Kiskinis E, Debevec D, Leonardsson G, White R and Parker MG, RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* **25**:9383-9391 (2005).
 145. Pettersson AT, Laurencikiene J, Nordstrom EA, Stenson BM, van Harmelen V, Murphy C, Dahlman I and Ryden M, Characterization of the human CIDEA promoter in fat cells. *Int J Obes (Lond)* **32**:1380-1387 (2008).
 146. Chan SC, Lin SC and Li P, Regulation of Cidea protein stability by the ubiquitin-mediated proteasomal degradation pathway. *Biochem J* **408**:259-266 (2007).
 147. Iwahana H, Yakymovych I, Dubrovskaya A, Hellman U and Souchelnytskyi S, Glycoproteome profiling of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: nonglycosylated cell death-inducing DFF-like effector A inhibits TGFbeta1-dependent apoptosis. *Proteomics* **6**:6168-6180 (2006).
 148. Chen Z, Guo K, Toh SY, Zhou Z and Li P, Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis. *J Biol Chem* **275**:22619-22622 (2000).
 149. Qi J, Gong J, Zhao T, Zhao J, Lam P, Ye J, Li JZ, Wu J, Zhou HM and Li P, Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *Embo J* **27**:1537-1548 (2008).
 150. Puri V, Ranjit S, Konda S, Nicoloro SM, Straubhaar J, Chawla A, Chouinard M, Lin C, Burkart A, Corvera S, Perugini RA and Czech MP, Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7833-7838 (2008).
 151. Murphy S, Martin S and Parton RG, Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* **1791**:441-447 (2009).
 152. Dahlman I, Linder K, Arvidsson Nordstrom E, Andersson I, Liden J, Verdich C, Sorensen TI and Arner P, Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr* **81**:1275-1285 (2005).
 153. Gummesson A, Jernas M, Svensson PA, Larsson I, Glad CA, Schele E, Gripeteg L, Sjöholm K, Lystig TC, Sjöström L, Carlsson B, Fagerberg B and Carlsson LM, Relations of adipose tissue CIDEA gene expression to basal metabolic rate, energy restriction, and obesity: population-based and dietary intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:4759-4765 (2007).
 154. Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S and Nunez G, CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10717-10722 (1997).
 155. Kusenda B, Mraz M, Mayer J and Pospisilova S, MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **150**:205-215 (2006).
 156. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP and Burge CB, Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**:787-798 (2003).
 157. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL and Lander ES, Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**:223-227 (2009).
 158. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**:843-854 (1993).
 159. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL and Bradley A, Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**:1902-1910 (2004).
 160. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**:853-858 (2001).
 161. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S and Kim VN, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415-419 (2003).
 162. Bartel DP, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-297 (2004).
 163. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H and Kim VN, The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**:3016-3027 (2004).

164. Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ, An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**:293-296 (2000).
165. Schwarz DS and Zamore PD, Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev* **16**:1025-1031 (2002).
166. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M and Dreyfuss G, miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**:720-728 (2002).
167. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB and Cohen SM, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**:25-36 (2003).
168. Xu P, Vernooij SY, Guo M and Hay BA, The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* **13**:790-795 (2003).
169. Johnston RJ and Hobert O, A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **426**:845-849 (2003).
170. Chen CZ, Li L, Lodish HF and Bartel DP, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**:83-86 (2004).
171. Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC and Weigel D, Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**:257-263 (2003).
172. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and Croce CM, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2999-3004 (2004).
173. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH and Kim VN, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**:4051-4060 (2004).
174. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW and Zhang JW, Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:59-68 (2006).
175. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T and Croce CM, Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* **66**:11590-11593 (2006).
176. Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B and Ahlquist P, MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5874-5878 (2008).
177. Iglesias-Serret D, Pique M, Gil J, Pons G and Lopez JM, Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **417**:141-152 (2003).
178. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF and Gores GJ, mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* **26**:6133-6140 (2007).
179. Kim H, Kwon YM, Kim JS, Han J, Shim YM, Park J and Kim DH, Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **107**:1042-1049 (2006).
180. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K and Croce CM, MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15805-15810 (2007).
181. Danial NN and Korsmeyer SJ, Cell death: critical control points. *Cell* **116**:205-219 (2004).
182. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, Herling M, Angelopoulou MK, Giardini R, Chilosi M, Kittas C, McDonnell TJ, Bonadonna G, Gianni AM, Pizzolo G, Pangalis GA, Cabanillas F and Sarris AH, BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* **100**:3935-3941 (2002).
183. Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, Taccioli C, Liu CG, Croce CM and Condorelli G, MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **27**:3845-3855 (2008).
184. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA and Farace MG, miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **282**:23716-23724 (2007).
185. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S and Majumder S, MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **283**:29897-29903 (2008).

186. Morazzoni P, Bombardelli E, *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). **66**:3-42 (1995).
187. Kren V and Walterova D, Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **149**:29-41 (2005).
188. Wellington K and Jarvis B, Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* **15**:465-489 (2001).
189. Chlopcikova S, Psotova J and Miketova P, Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **145**:49-55 (2001).
190. Vaghy PL, Matlib MA and Schwartz A, Phosphate induced swelling, inhibition and partial uncoupling of oxidative phosphorylation in heart mitochondria in the absence of external calcium and the presence of EGTA. *Biochem Biophys Res Commun* **100**:37-44 (1981).
191. Hedengren-Olcott M, Byrd CM, Watson J and Hruby DE, The vaccinia virus G1L putative metalloproteinase is essential for viral replication in vivo. *J Virol* **78**:9947-9953 (2004).
192. Haines D, *Strategies* **16**:118-119 (2003).
193. Crowe DL and Kim R, A phosphorylation defective retinoic acid receptor mutant mimics the effects of retinoic acid on EGFR mediated AP-1 expression and cancer cell proliferation. *Cancer Cell Int* **2**:15 (2002).
194. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254 (1976).
195. Chomczynski P and Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159 (1987).
196. Chomczynski P, A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**:532-534, 536-537 (1993).
197. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C and Cossarizza A, JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* **411**:77-82 (1997).
198. Scaduto RC, Jr. and Grotyohann LW, Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* **76**:469-477 (1999).
199. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N and Haugland RP, A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* **253**:162-168 (1997).
200. Paoletti F and Mocali A, Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol* **186**:209-220 (1990).
201. D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M and Galletti P, Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* **38**:908-919 (2005).
202. Nieman T, Chemiluminescence: Theory and Instrumentation. *Encyclopedia of Analytical Science*:608-613 (1995).
203. Maines M, Current protocols in toxicology. **1** (1998).
204. Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O and Golde DW, Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry* **41**:12995-13002 (2002).
205. Sieuwerts AM, Klijn JGM, Peters HA and Foekens JA, The MTT tetrazolium salt assay scrutinized - How to use this assay reliably to measure metabolic-activity of cell-cultures *in-vitro* for the assessment of growth-characteristics, IC₅₀-values and cell-survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **33**:813-823 (1995).
206. Bergmeyer HU and Bernt E, *Lactate dehydrogenase: UV-assay with pyruvate and NADH*. Academic Press, New York and London (1974).
207. Rousset S, Mozo J, Dujardin G, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D and Cassard-Doulcier AM, UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett* **581**:479-482 (2007).
208. Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, Bednar P, Jancova P, Anzenbacherova E, Ulrichova J, Maurel P, Pavek P and Dvorak Z, SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol* **593**:16-23 (2008).
209. Gazak R, Walterova D and Kren V, Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* **14**:315-338 (2007).

210. Skulachev VP, Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* **1363**:100-124 (1998).
211. Dlaskova A, Hlavata L and Jezek P, Oxidative stress caused by blocking of mitochondrial complex I H(+) pumping as a link in aging/disease vicious cycle. *Int J Biochem Cell Biol* **40**:1792-1805 (2008).
212. Arroyo A, Modriansky M, Serinkan FB, Bello RI, Matsura T, Jiang J, Tyurin VA, Tyurina YY, Fadeel B and Kagan VE, NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. *J Biol Chem* **277**:49965-49975 (2002).
213. Brandt U, Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* **75**:69-92 (2006).
214. Brennan JP, Southworth R, Medina RA, Davidson SM, Duchen MR and Shattock MJ, Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovasc Res* **72**:313-321 (2006).
215. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH and Kowaltowski AJ, Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* **7**:552-560 (2008).
216. van der Putten HH, Joosten BJ, Klaren PH and Everts ME, Uptake of tri-iodothyronine and thyroxine in myoblasts and myotubes of the embryonic heart cell line H9c2(2-1). *J Endocrinol* **175**:587-596 (2002).
217. Cerveny L, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichova J, Anzenbacher P and Pavek P, Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos* **35**:1032-1041 (2007).
218. van Raam BJ, Sluiter W, de Wit E, Roos D, Verhoeven AJ and Kuijpers TW, Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation. *PLoS One* **3**:e2013 (2008).
219. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C and Bozzoni I, A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* **123**:819-831 (2005).
220. Shivdasani RA, MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* **108**:3646-3653 (2006).
221. Liang Q and Molkentin JD, Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol* **35**:1385-1394 (2003).
222. Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespie-Brown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ and Sugden PH, Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem J* **314** (Pt 1):115-121 (1996).
223. See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, Itescu S and Krum H, p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol* **44**:1679-1689 (2004).
224. Kim JE, Kim YW, Lee IK, Kim JY, Kang YJ and Park SY, AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression. *J Pharmacol Sci* **106**:394-403 (2008).
225. Chan SH, Wu CA, Wu KL, Ho YH, Chang AY and Chan JY, Transcriptional upregulation of mitochondrial uncoupling protein 2 protects against oxidative stress-associated neurogenic hypertension. *Circ Res* **105**:886-896 (2009).
226. Gazak R, Svobodova A, Psotova J, Sedmera P, Prikrylova V, Walterova D and Kren V, Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg Med Chem* **12**:5677-5687 (2004).
227. Gazak R, Sedmera P, Vrbacky M, Vostalova J, Drahota Z, Marhol P, Walterova D and Kren V, Molecular mechanisms of silybin and 2,3-dehydrosilybin antiradical activity--role of individual hydroxyl groups. *Free Radic Biol Med* **46**:745-758 (2009).
228. Trouillas P, Marsal P, Svobodova A, Vostalova J, Gazak R, Hrbac J, Sedmera P, Kren V, Lazzaroni R, Duroux JL and Walterova D, Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *J Phys Chem A* **112**:1054-1063 (2008).
229. Dorta DJ, Pigoso AA, Mingatto FE, Rodrigues T, Prado IM, Helena AF, Uyemura SA, Santos AC and Curti C, The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact* **152**:67-78 (2005).

230. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF and Vercesi AE, Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **47**:333-343 (2009).
231. Jezek P and Hlavata L, Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2478-2503 (2005).
232. Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S and Jezek P, On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* **271**:2615-2620 (1996).
233. Jaburek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA and Garlid KD, Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* **274**:26003-26007 (1999).
234. Klein I and Ojamaa K, Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* **344**:501-509 (2001).
235. Dillmann WH, Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med* **88**:626-630 (1990).
236. Ojamaa K and Klein I, In vivo regulation of recombinant cardiac myosin heavy chain gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* **132**:1002-1006 (1993).
237. Brent GA, The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med* **331**:847-853 (1994).
238. Ojamaa K, Samarel AM, Kupfer JM, Hong C and Klein I, Thyroid hormone effects on cardiac gene expression independent of cardiac growth and protein synthesis. *Am J Physiol* **263**:E534-540 (1992).
239. Walfish PG, Triiodothyronine and thyroxine interrelationships in health and disease. *Can Med Assoc J* **115**:338-342 (1976).
240. Gostomski I, Braun R and Huber CG, Detection of low-abundance impurities in synthetic thyroid hormones by stationary phase optimized liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **391**:279-288 (2008).
241. Lugovskoy AA, Zhou P, Chou JJ, McCarty JS, Li P and Wagner G, Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell* **99**:747-755 (1999).
242. Neimanis S, Albig W, Doenecke D and Kahle J, Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport. *J Biol Chem* **282**:35821-35830 (2007).
243. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C and Kroemer G, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**:1423-1433 (2006).
244. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY and Youle RJ, Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**:658-662 (2006).
245. Liang L, Zhao M, Xu Z, Yokoyama KK and Li T, Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family. *Biochem J* **370**:195-203 (2003).
246. Baskin-Bey ES, Huang W, Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Braley K, Craig RW, Moore DD and Gores GJ, Constitutive androstane receptor (CAR) ligand, TCPOBOP, attenuates Fas-induced murine liver injury by altering Bcl-2 proteins. *Hepatology* **44**:252-262 (2006).