



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Vyhledávání látek pro terapii
mitochondriálních onemocnění**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kristýna Rajchmanová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Rajchmanová
Název práce	Vyhledávání látek pro terapii mitochondriálních onemocnění
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Mitochondriální onemocnění jsou skupinou klinicky heterogenních poruch, které vznikají v důsledku dysfunkce elektronového transportního řetězce a oxidativní fosforylace. V současné době pro tyto poruchy neexistuje uspokojivá léčba. Probíhá výzkum nových terapeutických přístupů – jedním z nich je použití látek, které podporují biogenezi mitochondrií. Některé látky z knihovny naší laboratoře zvyšují signál v resazurinovém testu, aniž by zvyšovaly proliferaci lidských buněk. Možným vysvětlením je, že tyto látky indukují biogenezi mitochondrií. Optimalizovala jsem proto vybrané metody pro sledování mitogeneze. Množství mitochondriální masy jsem hodnotila jednak přímo pomocí automatické mikroskopie a analýzy obrazu, jednak nepřímým sledováním poměru DNA několika mitochondriálních lokusů a genomické DNA pomocí real-time PCR. Dále jsem sledovala aktivační fosforylaci AMP-aktivované kinázy spojenou s mitogenezí. Zjistila jsem, že indukce této fosforylace cytokininy je závislá na buněčném typu.</p>
Klíčová slova	mitochondrie, induktory mitogeneze, mitochondriální onemocnění, AMPK, cytokininy
Počet stran	78
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name	Bc. Kristýna Rajchmanová
Title of thesis	Screening for compounds for the treatment of mitochondrial diseases
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Mitochondrial diseases are a clinically heterogeneous group of disorders that arise as a result of dysfunction of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation. Currently, there are no satisfactory therapies available. Novel therapeutic options are being investigated - one of them involves using agents enhancing mitochondrial biogenesis.</p> <p>Some compounds in our chemical library increase the signal in resazurin assay without promoting/stimulating human cells proliferation. This effect could result from induction of mitochondrial biogenesis. In this study, we optimized selected methods for mitogenesis studies. The mitochondrial mass was quantified both directly by automated microscopy in connection with image analysis and indirectly by monitoring the ratio of several mitochondrial loci to genomic DNA using real-time PCR. The activation phosphorylation of AMP-activated kinase associated with mitochondrial biogenesis was also evaluated. We report that induction of the phosphorylation by cytokinins depends on the cell type.</p>
Keywords	mitochondria, inductors of mitogenesis, mitochondrial disease, AMPK, cytokinins
Number of pages	78
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním dílem, které jsem vytvořila samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení, vstřícnost a trpělivost. Dále bych chtěla velmi poděkovat Kateřině Fakové za praktickou výpomoc v laboratoři a ochotu.

Obsah

1 Úvod a cíle práce	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Charakteristika mitochondriálních onemocnění	10
2.2 Farmakologická léčba mitochondriálních onemocnění	13
2.2.1 Látky podporující biogenezi mitochondrií	13
2.2.1.1 AICAR	13
2.2.1.2 All-trans-retinová kyselina	14
2.2.1.3 Bezafibrát	14
2.2.1.4 Epikatechin	15
2.2.1.5 Hydroxytyrozol	16
2.2.1.6 Metformin	17
2.2.1.7 Quercetin	17
2.2.1.8 Resveratrol	18
2.2.1.9 RTA 408	20
2.2.1.10 SRT2104	20
2.2.1.11 Thiazolidindiony	21
2.2.1.12 Ursolová kyselina	22
2.2.2 Látky podporující funkci elektronového transportního řetězce	22
2.2.2.1 Dichloracetát	22
2.2.2.2 Idebenon	23
2.2.2.3 Koenzym Q10	23
2.2.2.4 Riboflavin	24
2.2.2.5 Thiamin	25
2.2.3 Kreatin	25
2.2.4 Antioxidanty	26
2.2.4.1 EPI-743	26
2.2.4.2 Donory cysteinu	27
2.2.4.3 Kyselina lipoová	28

2.2.4.4	Vitaminy C a E	28
2.2.5	Aminokyseliny obnovující produkci oxidu dusnatého	29
2.2.5.1	Arginin a citrulin	29
2.2.6	Látky poskytující ochranu kardiolipinu	29
2.2.6.1	Elamipretid	30
3	Materiály a metody	31
3.1	Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií	31
3.1.1	Kultivační plasty	31
3.1.2	Přístroje a zařízení	31
3.1.3	Chemikálie	32
3.1.4	Enzymy a soupravy pro práci s nukleovými kyselinami	33
3.1.5	Roztoky	33
3.1.6	Testované látky	35
3.1.7	Primery	35
3.1.8	Protilátky	36
3.1.9	Biologický materiál	36
3.2	Použité metody	36
3.2.1	Kultivace buněk	36
3.2.2	Příprava buněk na experimenty	37
3.2.3	Sklízení buněk	37
3.2.4	Příprava proteinových lyzátů	37
3.2.5	Elektroforetická separace a westernový přenos	38
3.2.6	Imunodetekce	39
3.2.7	Izolace DNA pomocí soupravy E.Z.N.A.® Tissue DNA	39
3.2.8	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	40
3.2.9	Elektroforetická separace PCR produktů a jejich detekce	41
3.2.10	Hodnocení vlivu přirozených cytokininů na viabilitu	41
3.2.11	Automatická mikroskopie a analýza obrazu	42
3.2.12	Generování chemických vzorců	43
3.2.13	Zpracování dat	43

3.3	Výsledky	44
3.3.1	Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase	44
3.3.2	Stanovení poměru mitochondriální a genomické DNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase	50
3.3.3	Automatická mikroskopie a analýza obrazu	54
3.3.4	Sledování aktivační fosforylace AMP-aktivované kinázy pomocí SDS-PAGE a imunoblottingu	60
3.3.5	Hodnocení vlivu přirozených cytokininů na viabilitu	61
4	Diskuze	62
5	Závěr	66
6	Seznam zkratek	67

1 Úvod a cíle práce

Mitochondriální onemocnění patří k nejběžnějším genetickým poruchám s prevalencí asi 1:5000 u dospělých. Příčinou je obvykle mutace, která vede k poškození funkce elektronového transportního řetězce a oxidativní fosforylace. Pro většinu mitochondriálních onemocnění je typické multisystémové postižení a častý výskyt myopatických a neurologických projevů. Mezi běžné mitochondriální poruchy patří například syndrom MELAS, Leberova hereditární optická neuropatie nebo Leighův syndrom. Současná terapie mitochondriálních onemocnění je zejména symptomatická. Prověřované terapeutické strategie zahrnují použití látek podporujících funkci elektronového transportního řetězce (např. koenzym Q10, riboflavin, dichloracetát), antioxidantů (např. EPI-743, vitaminy C a E) nebo látek podporujících mitochondriální biogenezi (AICAR, bezafibrát, metformin, resveratrol atd.). Těmito látkami se zabývá se zabývá teoretická část této práce.

Experimentální část práce je zaměřena na optimalizaci metod pro studium látek, které moduluji množství a aktivitu mitochondrií. Množství mitochondriální masy jsem hodnotila jednak přímo pomocí automatické mikroskopie a analýzy obrazu, jednak nepřímo sledováním poměru DNA několika mitochondriálních lokusů a genomické DNA pomocí real-time PCR. Dále jsem sledovala aktivační fosforylaci AMP-aktivované kinázy spojenou s mitogenezi.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Charakteristika mitochondriálních onemocnění

Mitochondriální onemocnění (MO) jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou poruch. Primární příčinou je obvykle mutace vedoucí k narušení fungování elektronového transportního řetězce (ETC) a oxidativní fosforylace (OXPHOS). Některé MO zasahují pouze jeden orgán (např. oko postihuje Leberova hereditární optická neuropatie), většina ale postihuje více orgánových systémů s častým výskytem nápadných neurologických a myopatických znaků. MO se mohou projevit v jakémkoli věku (Chinnery, 2014). Tabulka 1 uvádí nejběžnější MO, jejich molekulární etiologii a vyjmenovává orgány, které jsou konkrétním MO nejvíce postiženy. Syndromy jsou v ní rozděleny do skupin podle jejich molekulární etiologie. MELAS, MERF, NARP a LHON jsou způsobeny bodovými mutacemi mtDNA. KSS, PS a PEO jsou způsobeny delecemi v mtDNA, které jsou buď sporadické, nebo se dědí maternálně. PEO, MDS, MNGIE, MIRAS a AS jsou způsobeny mutacemi v jaderných genech. LS je způsoben mutacemi v jaderných nebo mitochondriálních genech kódujících strukturní proteiny nebo asemblační faktory OXPHOS komplexu.

Mitochondriální poruchy vznikají v důsledku defektů jak v mitochondriální DNA, tak v jaderné. Nejčastěji jsou MO způsobeny mutacemi v genech kódujících strukturní podjednotky zapojené v procesu OXPHOS. Tabulka 2 uvádí některé geny asociované s MO, které kódují proteiny OXPHOS komplexu. Mutace v mitochondriální DNA jsou přenášeny maternální dědičností, v případě jaderné DNA může jít jak o autozomální, tak X-vázanou dědičnost. Mutace v mitochondriálních genech mohou vyústit v širokou škálu buněčných pertubací včetně nedostatečné tvorby energie, nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), poškození homeostázy vápníku a dysregulace apoptózy.

Poškození procesu OXPHOS vede ke snížené produkci ATP, která je považována za hlavní příčinu většiny mitochondriálních patologií, které následně vedou k multisystémovým poruchám. Klinické příznaky proto bývají nejvíce závažné u tkání s vysokou energetickou náročností jako jsou kosterní svaly, srdeční sval nebo centrální nervový systém. Mezi běžné klinické příznaky MO patří ptóza, kardiomyopatie, hepatopatie, endokrinopatie, myopatie, vnější oftalmoplegie, optická atropie, sensorineurální hluchota, pigmentární retinopatie

a *diabetes mellitus*. Dále dochází k rozvoji demence, objevují se migrény, encefalopatie, záchvaty, ataxie, epilepsie nebo spasticita. Často také dochází k potratům ve střední nebo pozdní fázi těhotenství (Chinnery, 2014; El-Hattab *et Scaglia*, 2016; Ylikallio *et Suomalainen*, 2012).

*Tab. 1: Běžné mitochondriální syndromy a hlavní orgány, které jsou konkrétní poruchou postiženy (převzato a upraveno z Ylikallio *et Suomalainen*, 2012).*

Zkratka	Celé jméno	Molekulární etiologie	Nejvíce ovlivněné orgány
MELAS	mitochondriální encefalopatie, laktátová acidóza, "stroke-like" epizody	mutace v tRNA nebo protein-kódujícím genu mtDNA	kosterní svaly, mozek, srdce, endokrinní část pankreasu, uši, střeva
MERRF	myoklonická epilepsie a myopatie s "ragged-red fibres"	mutace v tRNA genu mtDNA	kosterní svaly, mozek, srdce
NARP	neuropatie, ataxie a <i>retinitis pigmentosa</i>	mutace v protein-kódujícím genu mtDNA	mozek, oči
LHON	Leberova hereditární optická neuropatie	mutace v protein-kódujícím genu mtDNA	srdce, oči
KSS	Kearns-Sayreův syndrom	jednonukleotidová delece v mtDNA	kosterní svaly, mozek, srdce, oči
PS	Pearsonův syndrom	jednonukleotidová delece v mtDNA	kostní dřev, mozek, exokrinní část pankreasu, kosterní svaly
PEO	progresivní externí oftalmoplegie v mtDNA	jednonukleotidová delece	kosterní svaly (zejména extraokulární), srdce
ad/ar PEO	autozomálně-dominantní/recesivní PEO	mnohonásobné delece v mtDNA	kosterní svaly (zejména extraokulární), srdce
MDS	syndrom deplece mtDNA	deplece mtDNA	kosterní svaly, mozek, játra, ledviny
MNGIE	mitochondriální neurogastro-intestinální encefalomyopatie	deplece mtDNA, mnohonásobné delece mtDNA a bodové mutace	střeva, kosterní svaly, mozek, periferní nervy
MIRAS	syndrom mitochondriální recesivní ataxie	delece v mtDNA a mírná deplece	periferní nervy, mozek
AS	Alpersův syndrom	deplece mtDNA	mozek, játra
LS	Leighův syndrom	mutace v protein-kódujícím genu mtDNA nebo jaderné DNA	mozek, oči, kosterní svaly, periferní nervy

Tab. 2: Geny asociované s vybranými MO, kódující strukturní a asemblační faktory OXPHOS komplexu (převzato a upraveno z Ylikallio et Suomalainen, 2012).

Postižený komplex		Geny	Hlavní klinické projevy
komplex I	strukturní geny	ND1 ND2 ND3 ND4	LHON, MELAS, LS
	kódované mtDNA	ND4L ND5 ND6	
	strukturní geny	NDUFS1 NDUFS2	LS, encefalopatie
	kódované jadernou DNA	NDUFS3 NDUFS4	kardiomyopatie
		NDUFS6 NDUFS7	
		NDUFS8 NDUFV1	
		NDUFV2 NDUFA1	
	NDUFA2 NDUFA11		
	asemblační faktory	NDUFAF1	LS, kardiioencefalomyopatie
	kódované jadernou DNA	NDUFAF2 <i>C6orf66</i> <i>C20orf7ACAD9</i> <i>C8ORF38</i>	laktátová acidóza
komplex II	strukturní geny	SDH-A SDH-B	LS, paragangliom
	kódované jadernou DNA	SDH-C SDH-D	feochromocytom
	asemblační faktory	SDHAF1 SDHAF2	infantilní leukoencefalopatie
	kódované jadernou DNA		paragangliom
komplex III	strukturní geny	CYTB	LHON, encefalopatie,
	kódované mtDNA		kardiomyopatie, myopatie
	strukturní geny	UQCRB UQCRQ	hypoglykémie, laktátová acidóza
	kódované jadernou DNA		nebo psychomotorická retardace
			s extrapyramidálními příznaky
	asemblační faktory	BCS1L TTC19	encefalopatie, selhání jater,
	kódované jadernou DNA		tubulopatie, GRACILE syndrom, Björnstad syndrom
komplex IV	strukturní geny	COX1 COX2 COX3	encefalopatie, myopatie,
	kódované mtDNA		siderblastická anémie,
			myoglobinurie, MELAS
	strukturní geny	COX6B1 COX4I2	infantilní encefalomyopatie
	kódované jadernou DNA		nebo exokrinní pankreatická
			insuficience a anémie
	asemblační faktory	SURF1 SCO1 SCO2	LS, encefalopatie
	kódované jadernou DNA	COX10 COX15	kardiomyopatie, myopatie,
		LRPPRC <i>C2orf64</i>	selhání jater, tubulopatie
komplex V	strukturní geny	ATP6 ATP8	LS, NARP, kardiomyopatie
	kódované mtDNA		
	strukturní geny	ATP5E	acidurie, laktátová acidóza,
	kódované jadernou DNA		mírná mentální retardace,
			periferní neuropatie
	asemblační faktory	ATP12 TMEM70	encefalopatie, laktátová
	kódované jadernou DNA		acidóza, kardiioencefalomyopatie

2.2 Farmakologická léčba mitochondriálních onemocnění

I přes značné pokroky v porozumění etiologii a mechanismu MO není v současné době k dispozici uspokojivá léčba. Terapie je zaměřena především na symptomy onemocnění, jen v malé míře ovlivňuje příčiny (El-Hattab *et al.*, 2017). Kapitola se zabývá jak látkami, které se pro léčbu již používají, tak látkami, které by pro tento účel mohly být potenciálně využity, s hlavním zaměřením na látky podporující biogenezi mitochondrií.

2.2.1 Látky podporující biogenezi mitochondrií

Nepostradatelnou roli v přežívání buněk hraje mitochondriální biogeneze (mitogeneze), což je růst a dělení již existujících mitochondrií (Ventura-Clapier *et al.*, 2008). Je regulována komplexem faktorů. Rodina transkripčních koaktivátorů PGC koaktivuje jaderný respirační faktor 2 (NRF-2) a jaderný respirační faktor 1 (NRF-1). NRF-1 a ústřední regulátor mitochondriální biogeneze PGC-1 α aktivují mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), zodpovědný za transkripci mitochondriálních proteinů kódovaných jadernými geny, které zahrnují jak strukturní proteiny, tak proteiny zapojené v transkripci, translaci i opravách mtDNA (Hock *et Kralli*, 2009; Scarpulla, 2008).

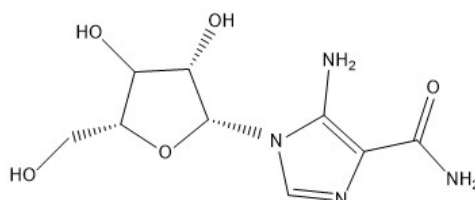
K aktivaci PGC-1 α může docházet několika způsoby. AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK) aktivuje PGC-1 α fosforylací. NAD dependentní deacetyláza sirtuin 1 (SIRT1) aktivuje PGC-1 α deacetylací. Exprese a aktivita PGC-1 α je dále kontrolována receptory aktivovanými peroxizomovými proliferátory (PPAR) (El-Hattab *et al.*, 2017).

2.2.1.1 AICAR

Aktivace AMPK v kosterních svalech zvyšuje příjem glukózy, oxidaci mastných kyselin a mitochondriální biogenezi. Zvýšená aktivita AMPK má dále za následek fosforylaci a následnou aktivaci PGC-1 α (Jäger *et al.*, 2007). Jednou z látek schopných aktivace AMPK je 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR) (Sullivan *et al.*, 1994).

V rámci experimentů na myších modelech postižených mitochondriálními onemocněními bylo dokázáno, že působení AICAR zvyšuje oxidativní fosforylaci a mitochondriální biogenezi (Komen *et Thorburn*, 2014). Například u myší s defektní aktivitou cytochrom c oxidázy (COX) vede aplikace AICAR k indukci exprese genů oxidace mastných kyselin

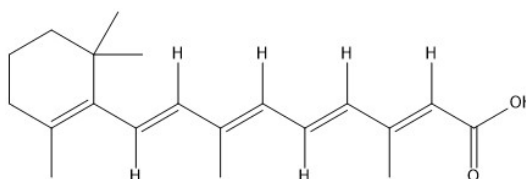
a OXPHOS, a fosforylaci AMPK. Kromě toho AICAR koriguje sníženou aktivitu COX a aktivitu OXPHOS enzymů, což poukazuje na obecný nárůst mitochondriální biogeneze (Viscomi *et al.*, 2011; Komen *et Thorburn*, 2014). Zvýšená mitochondriální biogeneze a produkce ATP je zaznamenána také u fibroblastů odebraných pacientům s deficiencí komplexu I (Golubitzky *et al.*, 2011).



Obr. 1: Chemická struktura AICAR.

2.2.1.2 All-trans-retinová kyselina

Vitamin A a jeho metabolity retinoidy modulují růst a diferenciaci různých druhů buněk a tkání. Pozitivní efekt all-trans-retinové kyseliny (ATRA) byl pozorován na linii myších adipocytů. Působení ATRA zvyšuje v adipocytech expresi genů pro transkripční faktory řídící replikaci a transkripci mtDNA (např. Tfam), jaderných koaktivátorů (PGC-1 α a PGC-1 β) a transkripčních faktorů zajišťujících kontrolu mitogeneze (např. Nrf2 nebo Ppar α) (Tourniaire *et al.*, 2015).



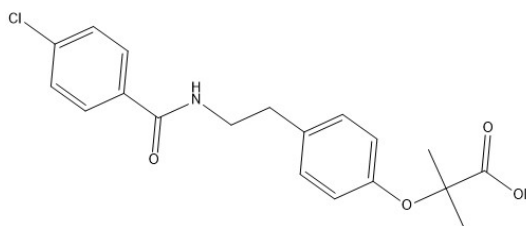
Obr. 2: Chemická struktura kyseliny all-trans-retinové.

2.2.1.3 Bezafibrát

Bezafibrát, látka běžně užívaná k léčbě dislipidémie, působí jako agonista PPAR. Vzorky fibroblastů odebrané pacientům s deficiencemi komplexů I, III a IV vykazovaly po aplikaci bezafibrátu zvýšenou aktivitu enzymů těchto komplexů. Zvýšeny byly také hladiny mRNA

a proteinů podjednotek respiračního řetězce, a u více než poloviny testovaných linií byl zaznamenán výrazný nárůst v aktivitě deficientních komplexů (Bastin *et al.*, 2008).

Pozitivní účinek bezafibrátu byl zaznamenán u pacientů s deficitem karnitinpalmytoyl-transferázy II (CPT2). CPT2 je vzácná mitochondriální porucha β -oxidace dlouhých mastných kyselin charakteristická myalgií a intolerancí fyzické zátěže. Podávání bezafibrátu pacientům s CPT2 má za následek zvýšenou oxidaci mastných kyselin s dlouhým řetězcem, zlepšení fyzické aktivity a také snížení svalové bolesti (Bonfont *et al.*, 2010).



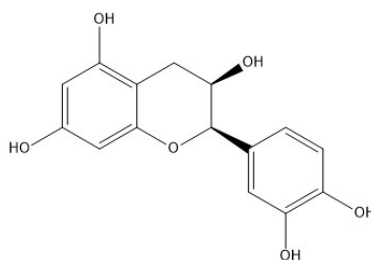
Obr. 3: Chemická struktura bezafibrátu.

2.2.1.4 Epikatechin

Konzumace kakaa má prokazatelné pozitivní účinky na lidské zdraví. Patří mezi ně např. snížené riziko diabetu, hypertenze, infarktu myokardu nebo ovlivnění pocitu sytosti, kognitivních funkcí a nálady (Katz *et al.*, 2011). Epikatechin, flavonoid nacházející se ve vysoké koncentraci v kakau, ovlivňuje také mitochondriální biogenezi. Důsledkem kombinace cvičení a podávání epikatechinu po dobu 15 dnů je u myši vyšší odolnost vůči svalové únavě a vyšší počet mitochondrií. Nárůst mitochondriální biogeneze se projevuje zvýšenou hladinou proteinů jako mitofilin, porin, proteiny ETC nebo mitochondriální transkripční faktor A (Nogueira *et al.*, 2011).

Pozitivní efekt na mitochondriální biogenezi je prokázán také na endoteliálních buňkách skotu. Testování bylo zaměřeno na měření aktivity citrát syntázy, jež je běžně používáno k hodnocení oxidační a respirační kapacity a mitochondriálního objemu v buňkách a tkáních. Stimulace mitochondriálních funkcí po aplikaci epikatechinu se kromě zvýšení aktivity citrát syntázy o přibližně 30 % projevuje také zvýšenou hladinou strukturních mitochondriálních proteinů (porin, mitofilin) a OXPHOS proteinů (komplex I a II) (Moreno-Ulloa *et al.*, 2013).

V současné době probíhá studie zkoumající bezpečnost a účinnost epikatechinu u pacientů s Friedreichovou ataxií (El-Hattab *et al.*, 2017).

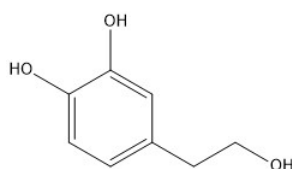


Obr. 4: Chemická struktura epikatechinu.

2.2.1.5 Hydroxytyrozol

U diabetických pacientů a pacientů s inzulínovou rezistencí dochází k redukci klíčových faktorů mitochondriální biogeneze (např. PGC-1 α), s čímž je spojen pokles mitochondriálního metabolismu a produkce ATP (Mootha *et al.*, 2003; Hammarstedt *et al.*, 2003).

Středomořský způsob stravování, charakteristický hojným využíváním olivového oleje, je spojen s nižším výskytem kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny, jež patří k nejběžnějším komplikacím diabetu (Ortega, 2006). Hydroxytyrozol je fenolická látka přirozeně se vyskytující v olivovém oleji, známá pro své antioxidační účinky. Působením hydroxytyrozolu na adipocyty dochází ke zvýšené expresi centrálního faktoru mitochondriální biogeneze - PGC1 α , NRF-1 a NRF-2, a TFAM, což má za následek zvýšení obsahu mitochondriální DNA a počtu mitochondrií. Dochází k podpoře mitochondriálních funkcí, včetně zvýšení aktivity a proteinové exprese mitochondriálních komplexů I, II, III a V. Spotřeba kyslíku je zvýšena, zatímco obsah volných mastných kyselin v adipocytech je snížen. Hydroxytyrozol je tedy schopen stimulací biogeneze podporovat mitochondriální funkce (Hao *et al.*, 2010).

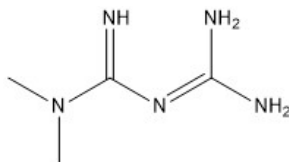


Obr. 5: Chemická struktura hydroxytyrozolu.

2.2.1.6 Metformin

Metformin je jednou z nejběžnějších látek, které jsou používány k léčbě diabetu. Mechanismus jeho působení zatím není zcela objasněn. Metformin je známým aktivátorem AMPK, ale působí také prostřednictvím mechanismů nezávislých na AMPK. Mezi ně patří např. indukce mitochondriálního stresu, inhibice mitochondriálních člunků, změny ve střevní mikrobiotě, aktivace autofagie nebo indukce inkretinových receptorů (Hur *et Lee*, 2015).

Pokusy na krysách ukazují, že podávání metforminu má za následek zvýšení aktivity citrát syntázy, je zvýšen obsah cytochromu c a prostřednictvím fosforylace AMPK i obsah PGC-1 α (Suwa *et al.*, 2006).

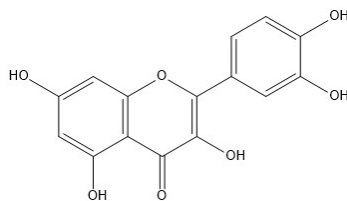


Obr. 6: Chemická struktura metforminu.

2.2.1.7 Quercetin

Flavonoid quercetin, hojně se vyskytující v ovoci a zelenině, má široké spektrum bioaktivních vlastností včetně protizánětlivých a antioxidačních účinků. Kromě toho je znám pro svou schopnost modulovat mitochondriální funkce. Experimenty provedené na lidské nádorové linii HepG2 dokazují, že quercetin indukuje expresi aktivátorů mitochondriální biogeneze PGC-1 α , NRF-1 a TFAM a zvyšuje obsah mtDNA. (Rayamajhi *et al.*, 2013).

Pozitivní vliv quercetinu na mitochondriální biogenezi byl prokázán také u krys v rámci studie zkoumající protektivní vliv této látky na oxidativní stres vyvolaný hliníkem. Podávání quercetinu má za následek zvýšení hladin mRNA podjednotek kódovaných mitochondriálními geny - ND1, ND2, ND3, Cyt *b*, COX1, COX3, zvýšena je i exprese jaderně kódovaných podjednotek ETC COX4, COX5A a COX5B. V oblastech hipokampu a *corpus striatum* je pozorována nižší hladina ROS a mitochondriální oxidace (Sharma *et al.*, 2015).



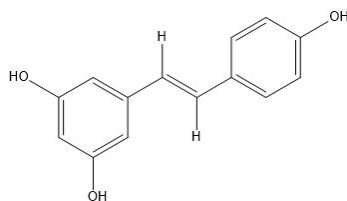
Obr. 7: Chemická struktura quercetinu.

2.2.1.8 Resveratrol

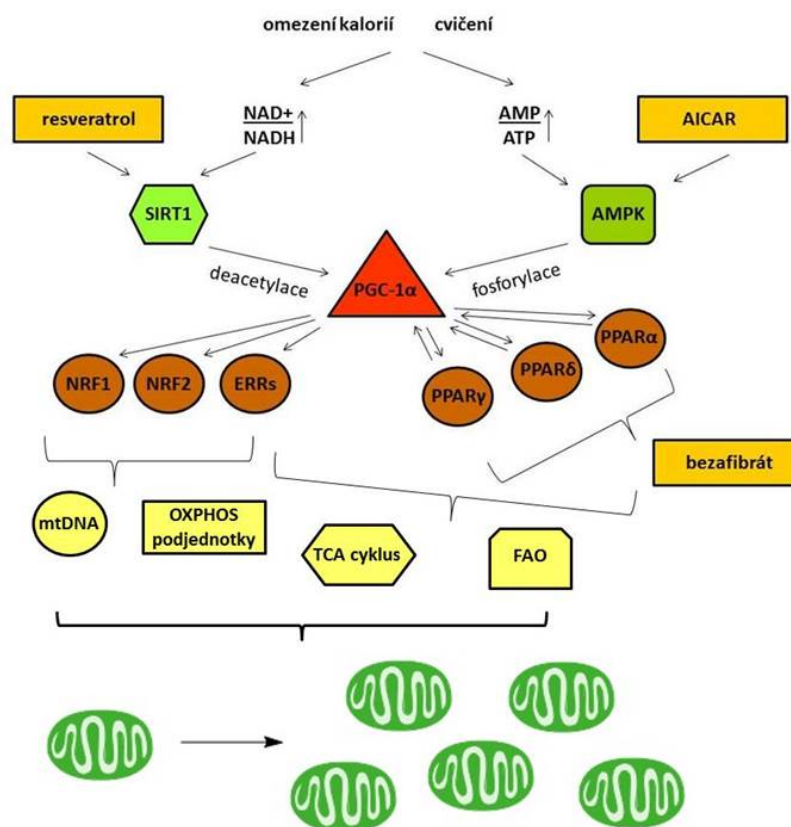
Resveratrol je přírodní polyfenolická látka nacházející se v širokém spektru rostlinných druhů, zejména ve slupce červených hroznů, která je známá svými antioxidačními a fytoestrogenními vlastnostmi (Baur *et* Sinclair, 2006). Resveratrol je schopen aktivovat enzymy sirtuiny včetně sirtuinu 1 (SIRT1), který interaguje s PGC-1 α a deacetyluje jej na několika lyzinech. To má za následek aktivaci genů pro mitochondriální oxidaci mastných kyselin (Gerhart-Hines *et al.*, 2007).

Studie na myších modelech ukazují pozitivní efekt resveratrolu např. na prodloužení délky života nebo při ochraně proti metabolickému stresu (Komen *et* Thorburn, 2014).

Experimenty byly provedeny také na kulturách primárních fibroblastů odebraných pacientům s Parkinsonovou chorobou, jejíž projevy jsou mimo jiné mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres. Aktivací SIRT1 a AMPK resveratrol reguluje energetickou homeostázu. Dále aplikace resveratrolu zvyšuje expresi řady PGC-1 α cílových genů, která vede ke zvýšení oxidativní funkce mitochondrií, jež pravděpodobně souvisí se snížením oxidativního stresu a zvýšením mitochondriální biogeneze. Působení resveratrolu na fibroblasty má dále za následek zvýšení aktivit komplexu I a citrát syntázy, spotřeby kyslíku a produkce ATP, zatímco obsah laktátu je snížen (Ferretta *et al.*, 2014).



Obr. 8: Chemická struktura resveratrolu.

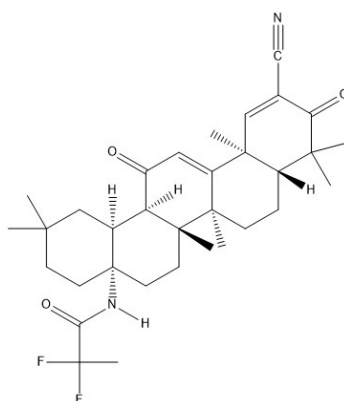


Obr. 9: Schéma indukce mitochondriální biogeneze prostřednictvím PGC-1 α po ovlivnění resveratrolem, bezafibrátem a AICAR. PGC-1 α je při kalorickém nadbytku v neaktivním acetylovaném stavu. Při omezeném přístupu kalorií nebo po cvičení vyústí nedostatek energie ke zvýšení poměru AMP/ATP a NAD⁺/NADH. Zvýšený poměr AMP/ATP má přímý vliv na aktivaci AMPK, kdy navázání AMP (nebo ADP) usnadňuje fosforylaci AMPK prostřednictvím nadřazených kináz. Aktivovaná AMPK přímo fosforyluje PGC-1 α , což buď přímo aktivuje tento koaktivátor, nebo dojde k aktivaci prostřednictvím deacetylase za pomoci SIRT1. SIRT1 vyžaduje pro svou aktivitu zvýšenou hladinu NAD⁺. Jakmile je PGC-1 α ve své aktivní deacetylované formě, je schopen se podílet na aktivaci transkripce jaderných mitochondriálních genů prostřednictvím transkripčních faktorů včetně NRF1 a NRF2, sirotčích nukleárních receptorů ERR α , ERR β , ERR γ (ERRs), a PPAR α , PPAR β , PPAR γ . Následně je aktivována transkripce, translace a replikace DNA, tvorba podjednotek OXPHOS, enzymů Krebsova cyklu (TCA) a oxidace mastných kyselin (FAO). To v konečném důsledku vede k proliferační mitochondrií a zvětšování mitochondriální hmoty. Resveratrol je aktivátorem SIRT1. Přesný mechanismus aktivace není zcela znám, ale nakonec vede k aktivaci dráhy

PGC-1 α prostřednictvím zvýšené deacetylace koaktivátoru. AICAR je fosforylován na ZMP analog, AMP mimetikum, a může přímo aktivovat AMPK, prostřednictvím podpory fosforylace za pomoci nadřazených kináz. Aktivace AMPK způsobí fosforylaci PGC-1 α a aktivaci SIRT-1 prostřednictvím AMPK-indukovaného zvýšení poměru NAD⁺/NADH. Bezafibrát jakožto agonista PPAR je schopen aktivovat expresi PPAR-regulovaných genů. To zahrnuje expresi PGC-1 α přes PPAR odpovědné elementy v promotorové oblasti (převzato a upraveno z Komen et Thorburn, 2014).

2.2.1.9 RTA 408

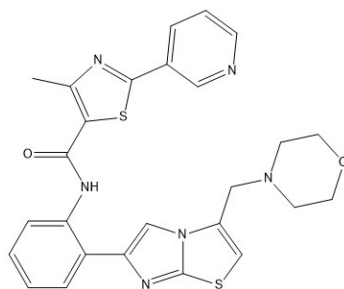
RTA 408 je syntetický izoprenoid aktivující NRF2. V myších modelech postižených laterální amyotrofickou sklerózou RTA 408 zvyšuje hladinu glutathionu a mitochondriální biogenezi (Neymotin *et al.*, 2011). V současné době probíhá studie aplikace RTA 408 u pacientů s mitochondriálními myopatiemi (El-Hattab *et al.*, 2017).



Obr. 10: Chemická struktura RTA 408.

2.2.1.10 SRT2104

Podobně jako resveratrol je SRT2104 aktivátorem SIRT1. V předběžných testech se staršími (60 - 80 let) dobrovolníky se látka SRT2104 ukázala jako vysoce účinná a bezpečná. U pacientů užívajících SRT2104 je patrné zvýšení ADP a rychlejší obnovení hladiny kreatinu po fyzické námaze, což je v souladu s celkovým zvýšením mitochondriálních funkcí (Libri *et al.*, 2012).

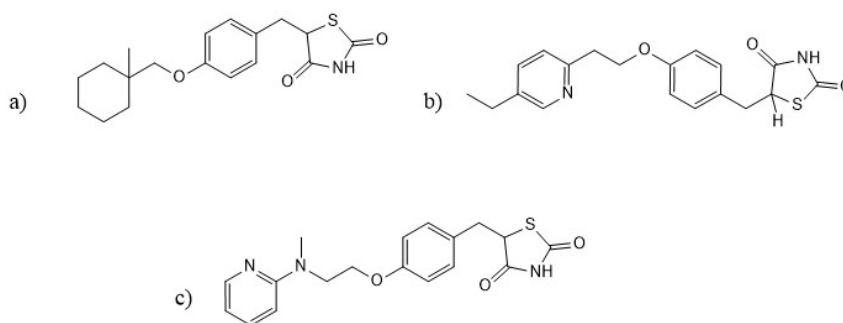


Obr. 11: Chemická struktura SRT2104.

2.2.1.11 Thiazolidindiony

Thiazolidindiony (TZD; např. ciglitazon, pioglitazon, rosiglitazon), agonisté PPAR γ , patří do rodiny inzulínových senzitizerů, které se běžně používají k léčbě diabetu typu 2 (Saltiel *et Olefsky*, 1996).

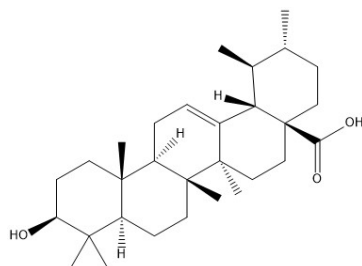
Aplikace pioglitazonu a ciglitazonu na endoteliální buňky pupečníkové šňůry snižuje hyperglykemií indukovanou produkci ROS. Obě látky také výrazně zvyšují expresi PGC-1 α , zvýšeny jsou i hladiny mRNA NRF-1 a TFAM. Stejně tak dochází ke zvýšení mitochondriální denzity a obsahu mtDNA (Fujisawa *et al.*, 2009). Příznivý efekt pioglitazonu byl prokázán také u adipocytů diabetických pacientů. Působení pioglitazonu opět výrazně zvyšuje počet mitochondrií a expresi genů zapojených v mitochondriální biogenezi včetně PGC-1 α a TFAM (Bogacka *et al.*, 2005). Podobný stimulační efekt na mitochondriální biogenezi byl prokázán také u myších adipocytů při použití rosiglitazonu (Pardo *et al.*, 2011; Rong *et al.*, 2011).



Obr. 12: Chemické struktury ciglitazonu (a), pioglitazonu (b) a rosiglitazonu (c).

2.2.1.12 Ursolová kyselina

Kyselina ursolová je přírodní triterpen běžně se nacházející v různých druzích ovoce a zeleniny. Působení kyseliny ursolové na linii myších myoblastů stimuluje aktivitu citrát syntázy, mitochondriální produkci ATP, fosforylaci AMPK, dále je zvýšena exprese TFAM a COX (Chen *et al.*, 2017).



Obr. 13: Chemická struktura kyseliny ursolové.

2.2.2 Látky podporující funkci elektronového transportního řetězce

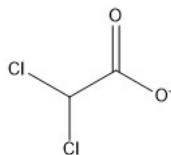
Látky, jejichž cílem je zvýšení funkce ETC, můžeme rozdělit do dvou skupin - látky podporující přenos elektronů (CoQ10, idebenon, riboflavin) a látky zvyšující dostupnost substrátů ETC (dichloracetát, thiamin).

2.2.2.1 Dichloracetát

Pyruvátdehydrogenáza kinázy jsou enzymy, které prostřednictvím reverzibilní fosforylace inhibují pyruvátdehydrogenázový komplex v mitochondriích. Dichloracetát inhibicí těchto enzymů předchází inaktivaci pyruvátdehydrogenázy (Kato *et al.*, 2007). Díky tomu následně dochází ke zvýšení katabolismu pyruvátu, který je spojen se zmírněním laktátové acidózy, jež doprovází mnoho MO. Dichloracetát byl použit pro léčbu laktátové acidózy v několika případech (Parikh *et al.*, 2009).

Studie na dětských pacientech trpících kongenitální laktátovou acidózou ukázala, že dichloracetát je pacienti dobře tolerován a snižuje hladinu laktátu v krvi, avšak jiné pozitivní účinky, např. zlepšení neurologických funkcí, nebyly pozorovány (Stacpoole *et al.*, 2006). V další studii byl zkoumán vliv dichloracetátu na pacientech různého věku, kteří trpěli různými MO (Leighův syndrom, MELAS, Pearsonův syndrom, encefalomyelopatie a Kearns-

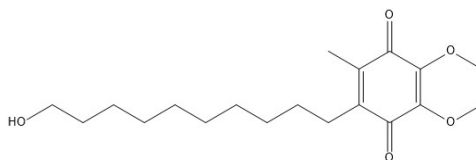
Sayrův syndrom). Opět byla prokázána snížená hladina laktátu, vyšetření neurologických funkcí (např. zrak, svalový tonus, funkce hlavových nervů, hluboké šlachové reflexy atd.) ukázalo jejich stabilizaci nebo mírné zlepšení (Barshop *et al.*, 2004).



Obr. 14: Chemická struktura dichloracetátu.

2.2.2.2 Idebenon

Leberova hereditární optická neuropatie (LHON) je jedna z nejběžnějších mitochondriálních poruch. Způsobuje nevratnou slepotu a má tak dramatický dopad na kvalitu života (Kirkman *et al.*, 2009). V klinických testech byl pro léčbu LHON použit idebenon, analog CoQ10. Ačkoli primární výsledky neukázaly staticky významné zlepšení stavu pacientů, následná *post hoc* analýza naznačila, že idebenon může chránit před dalším zhoršením zraku. Idebenon je bezpečný a pacienti dobře tolerovaní (Klopstock *et al.*, 2011). Další studie na LHON pacientech dokazuje, že idebenon může zabránit ztrátě barevného vidění, a to zejména u pacientů s bezprostředním rizikem další ztráty zraku (Rudolph *et al.*, 2013).

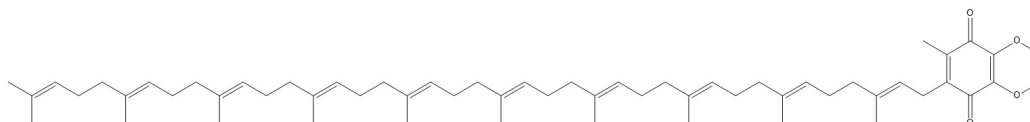


Obr. 15: Chemická struktura idebenonu.

2.2.2.3 Koenzym Q10

Koenzym Q10 (ubichinon, CoQ10) je lipofilní složkou buněčných membrán, ve kterých funguje jako přenašeč. Důležitou roli hraje zejména v elektronovém transportním řetězci, kde se účastní přenosu elektronů z komplexů I a II na komplex III. Je to jediný antioxidant rozpustný v tucích, který si živočišné buňky syntetizují *de novo* (Potgieter *et al.*, 2013).

Primární deficiencie CoQ10 je způsobena mutacemi enzymů účastnících se jeho biosyntézy (Quinzii *et al.*, 2007). Podávání CoQ10 má u deficientních pacientů za následek normalizaci hladiny CoQ10, obnovení elektronového toku a zvýšení hladiny mitochondriálních enzymů (Di Giovanni *et al.*, 2001). Možné příznivé účinky byly očekávány také u pacientů s dalšími MO, kdy se předpokládalo, že podávání CoQ10 by mohlo zlepšit účinnost přenosu elektronů transportním řetězcem. Studie s pacienty trpící mitochondriální cypatií však tyto domněnky zcela nepotvrdila. Podávání CoQ10 v množství 1200 mg/den po dobu 60 dní mělo pouze nepatrný, nebo žádný vliv na měřené parametry jako je aerobní kapacita, síla nebo koncentrace klidového laktátu (Glover *et al.*, 2010). Lepšího efektu by mohlo být potencionálně dosaženo při použití redukované formy CoQ10 - ubiquinolu, který se vstřebává 3 - 5x lépe než oxidovaný CoQ10 (Parikh *et al.*, 2009).

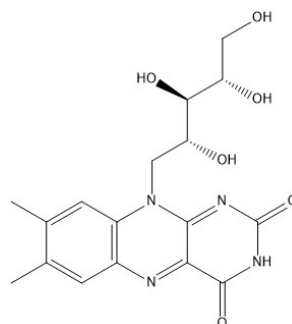


Obr. 16: Chemická struktura ubichinonu.

2.2.2.4 Riboflavin

Riboflavin (vitamin B2) slouží jako prekurzor flavoproteinů a je tedy klíčovým stavebním prvkem komplexů I a II. Mírného zlepšení stavu bylo po podávání riboflavinu dosaženo u pacientů s deficiencemi komplexů I a II. U dvou dětských pacientů s deficiencemi komplexu II léčba riboflavinem mírně zlepšila jejich neurologický stav, nebo ho minimálně stabilizovala. Zatímco aplikace riboflavinu na fibroblasty těchto pacientů dvojnásobně zvyšovala aktivitu komplexu II, v kontrolních buňkách k podobnému efektu nedošlo (Bugiani *et al.*, 2006).

Riboflavin byl úspěšně podáván také pacientovi s deficiencí komplexu I způsobenou mutacemi v *ACAD-9* genu, který kóduje FAD-obsahující flavoprotein. Léčba riboflavinem pomohla zlepšit svalovou sílu a redukovat obsah laktátu v plazmě. *In vitro* experimenty s fibroblasty pacienta ukázaly zvýšenou aktivitu komplexu I (Garone *et al.*, 2013).

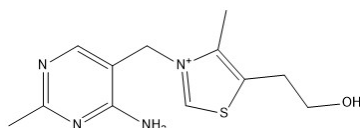


Obr. 17: Chemická struktura riboflavínu.

2.2.2.5 Thiamin

Stejně jako dichloracetát zvyšuje thiamin (vitamin B1) aktivitu pyruvátdehydrogenázy, čímž je zvýšena oxidace pyruvátu a tvorba redukovaných kofaktorů (NADH a FADH₂). Vitamin B1 byl podáván členům rodiny, která trpěla MELAS syndromem a deficiencí thiaminu. Léčba měla za následek snížení koncentrace laktátu a pyruvátu v krvi, a zlepšení příznaků myopatie (Sato *et al.*, 2000).

Multiorganové postižení charakteristické pro MO způsobuje u některých pacientů větší náchylnost ke spánkovým poruchám (Manni *et al.*, 1991). Podání kombinace thiaminu, karnitinu, CoQ10, a vitaminů C a E vedlo ke zlepšení stavu spánkové apnoe u pacientů s Leighovým syndromem (Mermigkis *et al.*, 2013).



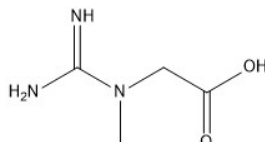
Obr. 18: Chemická struktura thiaminu.

2.2.3 Kreatin

Kreatin je v mitochondriích fosforylován na fosfokreatin, který se v buňkách vyskytuje v koncentracích významně převyšujících koncentrace ATP a umožňuje rychlou recyklaci ATP z ADP. Proto kreatin působí jako intracelulární pufr pro ATP a dodává energii pro pohyb vysokoenergetických fosfátů z mitochondrií do cytoplazmy, kde je energie využita. Nejvyšší

koncentrace kreatinu se nacházejí ve tkáních s vysokým energetickým požadavkem, např. v mozku a svalech (Parikh *et al.*, 2009).

Snížené hodnoty kreatinu byly pozorovány u pacientů s mitochondriálními myopatiemi a encefalopatiemi (Tarnopolsky *et al.*, 1999; Moroni *et al.*, 2002). Ukázalo se, že doplňování kreatinu má u pacientů s mitochondriálními myopatiemi za následek zlepšení pracovní kapacity a větší fyzickou sílu (Tarnopolsky, 2011).



Obr. 19: Chemická struktura kreatinu.

2.2.4 Antioxidanty

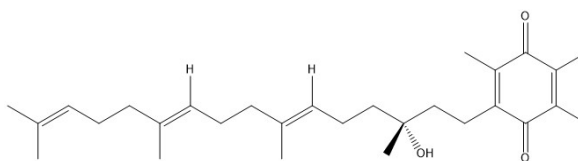
Během procesu OXPHOS je malá část kyslíku částečně redukována a přeměněna na ROS (superoxid a peroxid vodíku), které mohou být pro buňku toxické. Ke zvýšení produkce ROS dochází při zpomalení/blokádě průtoku elektronů ETC. Zvýšená produkce ROS v MO může vyústit v poškození DNA, proteinů a lipidů, což potencionálně vede k dalším poškozením buňky a buněčným dysfunkcím (Balaban *et al.*, 2005). Dalšími z látek, které se používají pro léčbu MO jsou antioxidanty, které zmírňují účinek nadměrné produkce ROS přítomné u těchto onemocnění.

2.2.4.1 EPI-743

EPI-743 (vatiquinon) je *para*-benzochinonový analog s vylepšenými farmakologickými vlastnostmi, který pomáhá buňky chránit proti buněčnému stresu a stárnutí (Shrader *et al.*, 2011). Studie s EPI-743, prováděná u pacientů s různými MO (např. Leighův syndrom, MELAS), prokázala zlepšení klinických příznaků a modifikaci progresu onemocnění u více než 90 % pacientů (Enns *et al.*, 2012).

Vliv EPI-743 byl pozorován také u dětských pacientů s Leighovým syndromem. Terapie vedla ke zlepšení neurologických a neuromuskulárních vlastností, a stabilizaci a zvrácení progresu onemocnění (Martinelli *et al.*, 2012). V další otevřené studii EPI-743 zastavil pro-

gresi onemocnění a zvrátil ztrátu zraku u většiny pacientů s LHON (Sadun *et al.*, 2012). V současné době probíhá několik dalších studií zkoumajících vliv EPI-743 na MO.



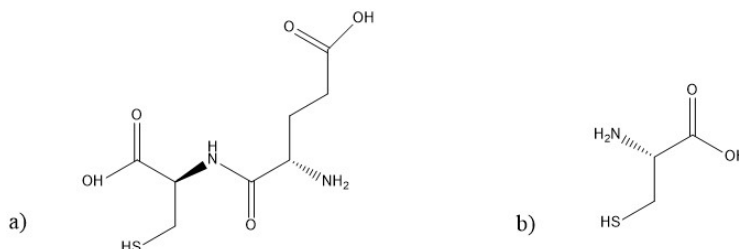
Obr. 20: Chemická struktura EPI-743.

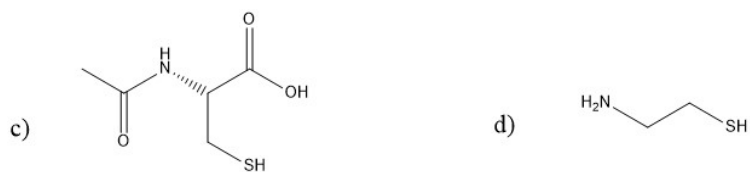
2.2.4.2 Donory cysteinu

Na dostupnosti cysteinu závisí syntéza glutathionu, který je jedním z hlavních intracelulárních antioxidantů. Snížená hladina glutathionu, která je přítomná u některých MO, může být obnovena po podávání donorů cysteinu. Jedním z takových je například na syrovátce založený doplněk stravy obsahující glutamylcystein. Podávání tohoto doplňku zdravým jedincům mělo za následek zvýšení jejich svalového projevu (Lands *et al.*, 1999). Stejný doplněk byl použit i ve studii s pacienty s MO (např. s progresivní externí oftalmoplegií), u kterých výrazně snížil úroveň oxidativního stresu (Mancuso *et al.*, 2010).

Potencionálními léčivy jsou také cystein a N-acetylcystein, které mohou mít prospěšné účinky u vybrané podskupiny jedinců s defekty v mitochondriální translaci. Pozitivní účinky cysteinu byly pozorovány u jedinců s mutací zasahující mitochondriální transferové RNA. U N-acetylcysteinu byl pozorován pozitivní efekt na mitochondriální translaci u fibroblastů s mutacemi v genech TRMU a MTO1 (Bartsakoulia *et al.*, 2016).

Další z látek, která je schopna zvyšovat intracelulární hladinu glutathionu je cysteamin, látka, které je využívána k léčbě cystinózy (Besouw *et al.*, 2013).



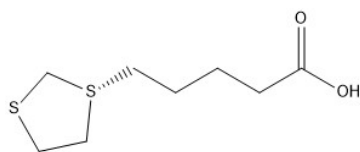


Obr. 21: Chemické struktury glutamylcysteinu (a), cysteinu (b), N-acetylcysteinu (c) a cysteaminu (d).

2.2.4.3 Kyselina lipoová

Kyselina lipoová funguje jako silný antioxidant snižující oxidaci LDL (Marangon *et al.*, 1999). Při léčbě MO se kyselina lipoová často podává společně s dalšími antioxidanty jakými jsou vitamin C nebo E (Parikh *et al.*, 2009).

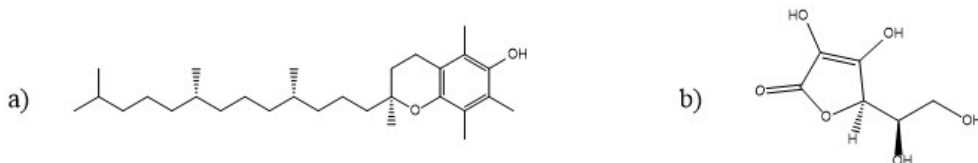
Kombinace kyseliny lipoové, CoQ10 a kreatin monohydrátu byla studována u pacientů s různými MO (např. MELAS, Kearns-Sayrův syndrom). Terapie vede ke snížení plazmatického laktátu a markerů oxidativního stresu, došlo k utlumení poklesu svalové síly (Rodriguez *et al.*, 2007).



Obr. 22: Chemická struktura kyseliny lipoové.

2.2.4.4 Vitaminy C a E

Kombinace vitaminů C a E, a kyseliny lipoové je často používána při terapii MO jako součást tzv. mitochondriálního koktejlu. Podobně jako u výše zmíněných látek existuje několik klinických studií, které zjistily malý přínos těchto látek v terapii MO (Enns, 2014).



Obr. 23: Chemické struktury vitaminu E (a) a vitaminu C (b).

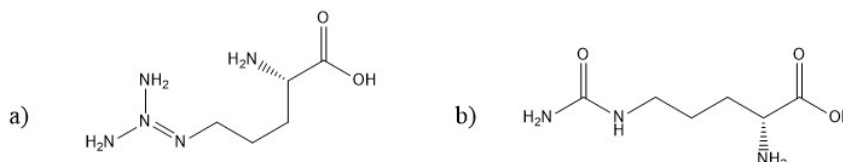
2.2.5 Aminokyseliny obnovující produkci oxidu dusnatého

Kromě snížené produkce energie je pro MO charakteristická deficiencie oxidu dusnatého (NO). Ukazuje se, že tento nedostatek hraje významnou roli v patogenezi různých komplikací spojených s MO jakými jsou myopatie, epizody podobné mrtvici, *diabetes* nebo laktátová acidóza (El-Hattab *et al.*, 2017).

2.2.5.1 Arginin a citrulin

Aminokyseliny citrulin a arginin fungují jako prekurzory NO a mohou tak být využity při obnově jeho produkce. Nižší koncentrace metabolitů NO byly prokázány zejména během epizod podobných mrtvici u pacientů s MELAS syndromem (Koga *et al.*, 2007). Intravenózní podávání argininu pacientům během těchto epizod vede ke zlepšení klinických symptomů, které jsou s nimi spojeny. Orální podávání argininu v interiktálním období snižuje frekvenci a závažnost epizod Koga *et al.* (2005, 2007).

Suplementace citrulinu má za následek vyšší produkci NO než suplementace argininu. Citrulin se tak v porovnání s argininem jeví jako léčivo s lepším terapeutickým účinkem (El-Hattab *et al.*, 2012).



Obr. 24: Chemické struktury argininu (a) a citrulinu (b).

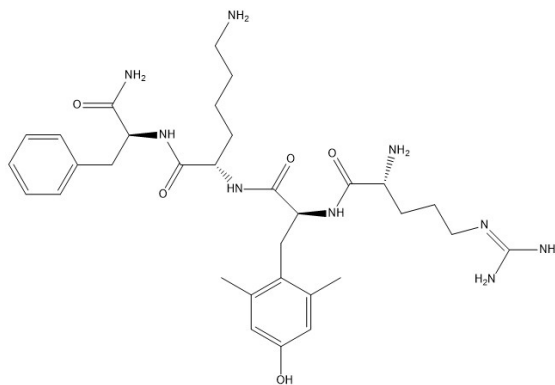
2.2.6 Látky poskytující ochranu kardiolipinu

Kardiolipin je unikátní fosfolipid, který se vyskytuje výhradně na vnitřní mitochondriální membráně. Podílí se na tvorbě mitochondriálních krist a organizaci respiračních komplexů do superkomplexů, což usnadňuje přenos elektronů a produkci energie. Důležitou roli hraje také v ukotvení cytochromu c do vnitřní membrány usnadňující přenos elektronů z komplexu III na komplex IV (Schlame *et Ren*, 2009). Kardiolipin je velmi náchylný k oxidativnímu poškození díky jeho vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin a jejich umístění blízko místa produkce ROS. Oxidace kardiolipinu způsobuje rozrušení kardiolipin bohatých

domén na vnitřní membráně, což vede ke ztrátě zakřivení membrány a krist. Oxidace kardi-
olipinu také rozrušuje superkomplexy, cytochrom c se oddělí od vnitřní membrány a to vede
k poškození OXPHOS a tvorby energie (Paradies *et al.*, 2010).

2.2.6.1 Elamipretid

Elamipretid (SS-31) je tetrapeptid, který se selektivně váže na kardiolipin prostřednictvím
hydrofobních a elektrostatických interakcí. Inhibicí oxidace kardiolipinu chrání elamipretid
kristy a podporuje OXPHOS (Szeto, 2014). Pozitivní výsledky elamipretidu byly zazname-
nány u pacientů s mitochondriální myopatií, kdy došlo ke zlepšení vzdálenosti v testu chůze
(El-Hattab *et al.*, 2017).



Obr. 25: Chemická struktura elamipretidu.

3 Materiály a metody

3.1 Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií

3.1.1 Kultivační plasty

kultivační destička 96-jamková	TPP
kultivační destička 384-jamková Cellcarrier	PerkinElmer
kultivační misky (průměr 10 cm)	TPP

3.1.2 Přístroje a zařízení

analyzátor luminiscence FLA-7000	FUJIFILM
automatické pipety	Eppendorf
automatický mikroskop CellVoyager CV8000	Yokogawa
automatický mikroskop Operetta	Perkin Elmer
Bürkerova komůrka	Marienfeld
CO ₂ inkubátor MCO-18AIC	SANYO
destičkový spektrofotometr	Sunrise (Tecan)
dokumentační systém (CCD kamera)	LAS-4000 (FUJIFILM)
elektroforetická sestava Mini-Plus	Hofer
elektroforetický zdroj EC 105	E-C Apparatus Laboratories
elektroforetický zdroj EC 3000P	E-C Apparatus Laboratories
flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48	Gelaire, Flow Laboratories
fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky	Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems)
chlazená centrifuga BR4i	Jouan
mikroskop IX51	Olympus
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
PCR cycler CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad
stolní centrifuga Mini Spin	Eppendorf
sestava pro elektroforézu a blot Mini-PROTEAN	Tetra System (Bio-Rad)

spektrofotometr EnSpire™ Multimode Plate Reader	Perkin Elmer
system pro dávkování kapalin Echo 555	Labcyte Inc.
termomixér Thermomixer Comfort	Eppendorf
třepací inkubátor Mixing Block MB-102	BIOER
třepačka KS 260 Basic	IKA
ultrazvuk HD 2200	BANDELIN SONOPLUS
ultrazvuková lázeň RK31	BANDELIN SONOREX
váhy 440-33N	Kern
vortex Minishaker MS2	IKA
vortex V-1 Plus	Biosan
vývěva KIF LAB	Laboport
zdroj světla TH4-200	Olympus

3.1.3 Chemikálie

akrylamid (AA)	SERVA Electrophoresis
acetát sodný	Sigma
agaróza	Sigma
aprotinin	Sigma-Aldrich
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
destilovaná voda	LRR Olomouc
Calcein-AM	Sigma
dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNA hmotnostní standard 50 bp	BioSystems
dodecylsírán sodný (SDS)	Lach Ner s.r.o.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
etylendiamintetraoctové kyselin (EDTA)	Sigma-Aldrich
etylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)	Sigma-Aldrich
etanol 70%, 96%, 100%	Lach Ner s.r.o.
fetální sérum	Sigma-Aldrich

glutamin	Sigma
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
chloroform	Sigma-Aldrich
izopropanol	Sigma
Large DNA ladder	BioSystems
luminol Femto	Thermo Scientific
2-merkaptoetanol	SERVA
N ₂ tekutý dusík	Linde
n-butanol	Sigma-Aldrich
N,N'-metylenbisakrylamid (MBAA)	SERVA Electrophoresis
penicilin-streptomycin roztok	Sigma-Aldrich
persíran amonný (APS)	SERVA Electrophoresis
Ponceau S	Sigma-Aldrich
tetrametyletylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
tetramethylrhodamin metylester (TMRM)	Cayman
TRIS	SERVA Electrophoresis
TRITON X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween 20	MP

3.1.4 Enzymy a soupravy pro práci s nukleovými kyselinami

E.Z.N.A.® Tissue DNA	Omega Bio-tek
KiCqStart® qPCR ReadyMix™	Sigma-Aldrich

3.1.5 Roztoky

- AA+Bis roztok (200 ml): 58,4 g AA; 1,6 g Bis+AA (rozpuštěno v objemu 200 ml H₂O)
- APS 10%: 0,1 g APS; 1 ml H₂O

- blotovací pufr 10x: 30,3 g TRIS + 144 g Glycin + 1 l H₂O
- DNA nanášecí pufr 10×: 25 mg bromfenolová modř; 1 ml 10% SDS; 7 ml H₂O; 3 ml glycerol
- EDTA 0,5 mM (500 ml): 0,073 g EDTA; 450 ml PBS
- EGTA 0,5% (500 ml): 2,5 g EGTA; 500 ml PBS; úprava pH na 7,2; přefiltrováno přes 0,22 μm filtr
- ELFO pufr 10× (1 l): 30,24 g TRIS; 144 g glycin; 10 g SDS
- kultivační médium DMEM 10% (500 ml): 440 ml DMEM; 50 ml fetální sérum; 5 ml penicilin-streptomycin roztok; 5 ml glutamin
- lyzační pufr: 1 ml RIPA pufr; 1 μl 1000× leupeptin; 1 μl 1000× aprotinin; 10 μl 100× PMSF; 1 μl 1M DDT
- PBS (1 l): 3,58 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 950 ml H₂O; úprava pH na hodnotu 7,4; doplnění do 1 l, přefiltrování přes 0,22 μm filtr
- SDS 10% : 5 g SDS + 50 ml H₂O
- SDS 5x (10 ml): 3,1 ml 1M TRIS pH 6,8 + 1 g SDS + 5 ml Glycerol + 0,5 ml 1% BPB + 0,5 ml
- TAE pufr 10× (0.5 l): 199,8 ml 1M TRIS pH 8,8; 8 ml koncentrované ledové octové kyseliny; 10 ml 0.5M EDTA (úprava pH na hodnotu 8 a doplnění H₂O do 0,5 l)
- TBS: 4,84 g TRIS; 58,44 g NaCl; 1 l voda; úprava pH na hodnotu 7,5; doplnění do 2 l
- TRIS pH 6,8: 24,23 g 1M TRIS; 200 ml HCl
- TRIS pH 8,8: 48,46 g 1M TRIS; 400 ml HCl

3.1.6 Testované látky

V rámci praktické části diplomové práce byly testovány tyto látky:

AICAR	5-amino-1-[(2R,3S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymetyl)oxolan-2-yl]-imidazol-4-karboxamid
BAP	N ⁶ -benzyladenin
kinetin	N ⁶ -furfuryladenin
kinetin ribosid	N ⁶ -furfuryladosin
iP	N ⁶ -isopentenyladenin
metformin	3-(diaminometyliden)-1,1-dimethylguanidin
rosiglitazon	5-((4-(2-metyl-2-(pyridinylamino)etoxy)fenyl)metyl)-2,4-thiazolidinedion-2-butenedioát
<i>trans</i> -zeatin	6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino)purin
<i>orto</i> -topolin	6-[(2-hydroxybenzyl)amino]purin
<i>meta</i> -topolin	6-[(3-hydroxybenzyl)amino]purin
<i>para</i> -topolin	6-[(4-hydroxybenzyl)amino]purin

3.1.7 Primery

- B2M_F: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'
- B2M_R: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'
- CO3_F: 5'-ACCATTTCGACGGCATCTA-3'
- CO3_R: 5'-GTTGGCGGATGAAGCAGATAGT-3'
- CYB_F: 5'-CCCTAGCCAACCCCTTAAACA-3'
- CYB_R: 5'-TTAGAATGAGGAGGTCTGCGG-3'
- FRA_F: 5'-TCATTCATTCTGCTGGCCCT-3'
- FRA_R: 5'-GGCCGTTTAACTACCTCTTG-3'
- MT-TL1_F: 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'

- MT-TL1_R: 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'
- ND1_F: 5'-ACGGGCTACTACAACCCTTC-3'
- ND1_R: 5'-GCCTAGGTTGAGGTTGACCA-3'

3.1.8 Protilátky

Byla použita souprava AMPK and ACC Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology).

- 40H9 králičí protilátka proti fosfo-AMPK α (Thr172), ředění 1:1000
- D5A2 králičí protilátka proti AMPK α , ředění 1:1000
- králičí protilátka proti fosfo-AMPK β 1 (Ser182), ředění 1:1000
- 57C12 králičí protilátka proti AMPK β 1/2, ředění 1:1000
- sekundární kozí protilátka rozpoznávající králičí imunoglobulin konjugované s křenuvou peroxidázou

3.1.9 Biologický materiál

- ARPE-19 - imortalizované lidské retinální buňky
- BJ - lidské kožní fibroblasty
- HaCaT - diferencované imortalizované lidské kožní keratinocyty

3.2 Použité metody

3.2.1 Kultivace buněk

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních miskách umožňujících přichycení adherentních linií. Kultivace probíhala v médiu DMEM obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra, glutamin o finální koncentraci 3,97 M, antibiotika streptomycin (100 μ g/ml) a penicilin (100 IU/ml). Kultivace probíhala v inkubátoru za těchto podmínek: 36,5 - 37,5 °C, podíl CO₂ v atmosféře 5,5 % a 100% relativní vlhkost vzduchu. Pasážování buněk probíhalo při asi 80% konfluenci. Manipulace s buněčnými liniemi probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu.

3.2.2 Příprava buněk na experimenty

Z kultivačních misek bylo odsáto médium a buňky byly omyty 2 ml EGTA (0,5 mM). Po odsátí EGTA byl k buňkám přidán 1 ml trypsinu (0,5 g prasečí protein/1 l média) k uvolnění buněk. Misky byly po dobu působení trypsinu umístěny do inkubátoru. Po uvolnění byly buňky opláchnuty 4 ml média a přeneseny do zkumavky. Buňky byly stočeny na centrifuze při laboratorní teplotě (1 000 g, 5 min). Po odsátí supernatantu byl pelet resuspendován v 5 ml média. Na Bürkerovu komůrku bylo nanášeno 10 μ l buněčné suspenze a buňky byly spočítány. Následně byla suspenze vhodně naředěna médiem na požadovanou koncentraci a buňky byly nasazeny do kultivačních lahví nebo mikrotitračních desek. Teplota média i roztoků byla vždy asi 37 °C.

Následující den byly k buňkám v miskách přidány testované látky rozpuštěné v DMSO, jehož obsah byl obvykle nižší než 0,1 %. Ve stejném objemu jako testované látky bylo ke kontrolním buňkám přidáno DMSO. Délka inkubace byla volena podle typu experimentu (imunodetekce 6 h, real-time PCR 48 h, SRB test 3 dny, mikroskopické experimenty 3 dny).

3.2.3 Sklizení buněk

Z kultivačních misek bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 10 ml vychlazeného 1 \times PBS. Po odsátí bylo k buňkám opět napipetováno 1 \times PBS v objemu 10 ml a buňky do něj byly seškrábány a přeneseny do zkumavek. Ty byly stočeny na centrifuze (1200 g, 5 min, 4 °C), následovalo odsátí supernatantu a pelet byl resuspendován v 5 ml vychlazeného 1 \times PBS. Buňky byly opět zcentrifugovány (1200 g, 5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byly vzorky ve zkumavce ponořeny do tekutého dusíku a poté umístěny do -80 °C. Veškerá manipulace se vzorky probíhala na ledu.

3.2.4 Příprava proteinových lyzátů

Pro lyzování buněk byl nejprve připraven lyzační roztok dle tabulky (viz tab. 3).

Na základě velikosti peletu byl do zkumavky přidán lyzační roztok, ve kterém byl pelet resuspendován. Následovala 30 minutová inkubace na ledu, během níž byl pelet znovu resuspendován. Následně byla suspenze stočena na centrifuze (13300g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky, objem odebraného supernatantu byl

Tab. 3: Složení lyzačního roztoku.

	Objem [μ l]
RIPA	984
100 mM PMSF	10
1M DTT	1
1000 \times aprotinin	1
1000 \times leupeptin	1
NaF	2
Na ₂ VO ₃	1

zaznamenán. Pomocí metody Bradfordové byla stanovena celková koncentrace proteinů. Aby bylo docíleno stejné koncentrace u všech vzorků, bylo k nim přidáno odpovídající množství lyzačního pufru a 4 \times SDS s merkaptoetanolem. Mikrozkumavky s lyzáty byly zdenaturovány v termobloku (95 °C, 3 min). Vzorky byly poté uloženy do mrazáku (- 80 °C).

3.2.5 Elektroforetická separace a westernový přenos

Separace probíhala pomocí vertikální SDS PAGE elektroforézy. Nejprve byly připraveny gely podle tab. 4. Objem vzorku pipetovaného do jamek gelu závisel na koncentraci proteinů. Množství proteinů aplikované do jamek bylo v rozmezí 25 - 40 μ g. Do první jamky byl napipetován hmotnostní proteinový standard. Separace probíhala přibližně 2 hodiny při napětí 70 - 120 V v 1 \times ELFO pufru.

Po dokončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na nitrocelulósovou membránu za pomoci western blottingu. Blotování probíhalo po dobu 2 hodin při napětí 270 mA v blotovacím aparátu. Následně byla membrána s proteiny barvena v roztoku Ponceau S po dobu 5 minut, opláchnuta destilovanou vodou a usušena.

Tab. 4: Složení dělicího a zaostřovacího gelu.

	Dělicí 12,5% gel	Zaostřovací 5% gel
	Objem [ml]	Objem [ml]
H ₂ O	0,97	1,75
AA + MBAA	1,95	0,42
Tris pH 8,8 / 6,8	1,75	0,31
TEMED	0,0031	0,0025
10% SDS	0,047	0,025
10% APS	0,0187	0,015

3.2.6 Imunodetekce

Membrána s přenesenými proteiny byla vhodně nařezána proužky podle velikosti cílového proteinu a poté na třepačce opláchnuta v PBS do úplného odbarvení. Potom byla membrána blokována na kývačce v 5% mléku v PBS nebo 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 1 hod při laboratorní teplotě. Po opláchnutí membrány v PBS na ni byla nanese primární protilátka naředěná v BSA podle potřeby (100 - 2000×). Inkubace s protilátkou probíhala přes noc v uzavřené vlhké komůrce v lednici. Po ukončení inkubace byla membrána promyta na kývačce 5 minut v PBS, 5 minut v PBS s Tweenem, 5 minut v PBS a 10 minut v PBS. Membrána byla umístěna na parafilm a byla na ni nanese sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou naředěná v PBS s Tweenem (ředění 1:1000), inkubace probíhala 1 hodinu. Následně byla membrána promyta stejným způsobem jako po aplikaci primární protilátky. Na osušenou membránu byl poté nanese roztok luminol/peroxid (1:1). Pomocí CCD kamery byly v různých časech (1 s - 1 hod) zachyceny fotografie signálů.

3.2.7 Izolace DNA pomocí soupravy E.Z.N.A.® Tissue DNA

Před samotnou izolací byly vzorky buněk promyty v PBS. Izolace byla zahájena přidáním proteázového roztoku ke vzorku. K odstranění RNA bylo ke vzorku přidáno 4 μ l nebo 6 μ l RNasy v závislosti na množství vzorku. Následně bylo přidáno 220 μ l BL pufru. Po 10 minutové inkubaci při 70 °C bylo ke vzorku přidáno stejné množství (220 μ l) 100% etanolu. Vzorek byl přenesen na kolonku (HiBlind® DNA Mini Column) a stočen na centrifuze

(10 000 g, 60 s). Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 500 μl HBC pufru, který byl před použitím zředěn ve 100% izopropanolu. Kolonka byla opět stočena na centrifuze (10 000 g, 30 s). Po odstranění filtrátu byla do minizkumavky vložena nová kolonka, na kterou bylo napipetováno 700 μl promývacího pufru rozpuštěného ve 100% etanolu. Kolonka byla centrifugována (10 000 g, 30 s), filtrát byl odstraněn, bylo přidáno stejné množství promývacího pufru a opět následovala centrifugace (10 000 g, 30 s). Po odstranění filtrátu byla kolonka vysušena za pomoci centrifugace po dobu 2 minut (10 000 g). Kolonka byla přemístěna do nové mikrozukavky a bylo na ni napipetováno 150 μl elučního pufru zahřátého na 70 °C. Po 2 minutách stání byla kolonka stočena na centrifuze (10 000 g, 60 s). Předchozí krok s elučním pufrem byl za stejných podmínek 1x zopakován a následně byla eluovaná DNA uložena do mrazáku (-20 °C).

3.2.8 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Chemikálie potřebné pro polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (real-time PCR) byly rozmrazeny na ledu, promíchány pomocí vortexu a krátce stočeny na minicentrifuze. Podle tabulky 5 byly následně všechny složky napipetovány do sterilních stripů.

Tab. 5: Složení real-time PCR směsi.

	Objem na 1 reakci [μl]
SsoAdvanced TM Universal SYBR® Green Supermix	5
forward primer	0,09
reverse primer	0,09
sterilní voda	2,32
DNA	2,5

Stripy byly krátce stočeny v minicentrifuze a umístěny do cykleru, na kterém byly nastaveny podmínky podle tabulky 6. Po ukončení reakce byly vzorky ihned zpracovány, nebo umístěny do mrazáku (-20 °C).

Tab. 6: Teplota a doba jednotlivých kroků real-time PCR.

	Teplota [°C]	Čas [s]
počáteční denaturace	95	180
denaturace	95	15
annealing	podle použitých primerů	30
extenze	60	30
finální extenze	72	5

3.2.9 Elektroforetická separace PCR produktů a jejich detekce

Pro separaci PCR produktů byla použita elektroforéza v 1% agarózovém gelu, v horizontálním uspořádání.

Agaróza v $1 \times$ TAE pufru byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí přibližně na teplotu 60°C bylo k rozpuštěné agaróze přidáno barvivo GelRed v objemu $5 \mu\text{l}$ na 100 ml. Gel byl nalit do elektroforetické vany. Po dostatečném ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebíků byla vana naplněna $1 \times$ TAE pufrem, následovalo nanesení vzorků.

Nejprve bylo do krajní jamky nanášeno $3 \mu\text{l}$ markeru molekulové hmotnosti (50bp DNA ladder). Vzorky samotné byly před nanášením do jamek smíchány s $1 \mu\text{l}$ $10 \times$ DNA nanášecího pufru. Elektroforéza probíhala 40 - 70 min při napětí asi 100 V.

Po dokončení elektroforézy byly vzorky vizualizovány pomocí UV-transiluminátoru FLA-4000 (Fujifilm). Byly pořízeny snímky gelů se zviditelněnými produkty.

3.2.10 Hodnocení vlivu přirozených cytokininů na viabilitu

Barvení buněčného proteinu pomocí SRB (sulforhodamin B) je standartní metoda hodnocení toxicity. Pomocí tohoto testu byl sledován vliv 72-hodinového působení vybraných přirozených cytokininových bází (*trans*-zeatin, N^6 -isopentenyladenosin, kinetin, N^6 -benzylaminopurin, topoliny), které jsme chtěli následně testovat v testech mitogeneze, na viabilitu linií BJ, HaCaT a ARPE-19. Látky byly testovány v 6 koncentracích (dvounásobná ředící řada, maximální koncentrace $50 \mu\text{M}$), každá koncentrace byla na desce v triplicátu. Přibližně 3000 buněk bylo vyseto do jednotlivých jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky 16 h před přidáním testovaných látek. DMSO vehiculum sloužilo jako netoxická kontrola. Po třech dnech bylo

médium odsáto a buňky byly fixovány 10% (hmotnost/objem) trichlorooctovou kyselinou. Po důkladném propláchnutí destilovanou vodou byl přidán 0,4% (hmotnost/objem) roztok SRB v kyselině octové a buňky byly barveny 30 minut. Nenavázané barvivo bylo rychle odmyto destilovanou vodou. SRB navázaný na fixované buňky byl rozpuštěn v nepufrované 10 mM Tris bázi. Absorbance byla měřena při 564 nm.

3.2.11 Automatická mikroskopie a analýza obrazu

Buňky linií BJ, APRE-19 a HaCaT byly vysety ve 20 μL média do 384-jamkových desek Cellcarrier určených pro mikroskopii (1000 buněk / jamka). Látky rozpuštěné v DMSO byly přidány po 16 hodinách pomocí přístroje Echo 555 (Labcyte Inc.). Testovány byly tyto látky - AICAR (62,5 - 1000 μM), metformin (62,5 - 1000 μM), rosiglitazon (15,6 - 250 μM) a resveratrol (6,25 - 100 μM). Testováno bylo 5 koncentrací, získaných postupným dvojnásobným ředěním maximální koncentrace. Každá koncentrace byla na desce přítomna v kvadruplikátu.

Po 3 dnech byly do jamek přidány pomocí přístroje Echo tisíckrát koncentrované DMSO roztoky barviv Hoechst 33342 (finální koncentrace 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, barvení jádra, modrý kanál - ex. 445/45 nm) a tetramethylrhodamin metylester (TMRM) (finální koncentrace 30 nM, barvení mitochondrií, červený kanál ex. 595/20 nm), případně Calcein-AM (finální koncentrace 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, barvení cytoplazmy, zelený kanál ex. 525/50 nm). Po 30 minutové inkubaci byly buňky vyfoceny pomocí automatického mikroskopu Operetta nebo CellVoyager CV8000. Snímky byly nahrány na server s programem Columbus a analyzovány pomocí zde dostupných modulů pro identifikaci jádra, cytoplazmy a menších struktur (spots), pro výpočet parametrů souvisejících s morfologickými a spektrálními vlastnostmi objektů a pro výpočet parametrů souvisejících s texturou objektů. Analýzy snímků z mikroskopu Operetta byly prováděny i v softwaru CellProfiler. Numerické hodnoty byly vyexportovány jako textové soubory a dále analyzovány v programu R.

Tab. 7: Parametry analýzy obrazu použité pro generování výstupních dat programem Columbus.

Identifikace jádra:	Hoechst 33342 - modrý kanál	
HaCaT, ARPE-19	metoda B: velikost jader > 30 μm	společný prah = 0.40
BJ	metoda A: velikost jader > 40 μm	společný prah = 0.40
Identifikace cytoplazmy:	Calcein AM – zelený kanál	
HaCaT, ARPE-19	metoda D: individuální prah 0	
BJ	metoda A: individuální prah 0	
Identifikace mitochondrií (spots):	TMRM - červený kanál	
HaCaT, ARPE-19 i BJ	metoda D: citlivost 0.3, 0.5, 0.6	rozdělovací parametr 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8
BJ	metoda A: citlivost 0.05	rozdělovací parametr 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8
	metoda D: citlivost 0.25, 0.5, 0.75	rozdělovací parametr 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8

3.2.12 Generování chemických vzorců

Vzorci byly tvořeny v programu ChemBioDraw Ultra 13.0 podle databáze Pubchem.

3.2.13 Zpracování dat

K úpravám dat a jejich statistickému zpracování a vizualizaci byl využit software OpenOffice a R.

3.3 Výsledky

3.3.1 Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Pro optimalizaci primerů byla použita polymerázová řetězová reakce v reálném čase, která zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu. Detekce produktu je založena na sledování fluorescence substrátu (SYBR Green). Ta stoupá po interkalaci látky do DNA. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství produktu PCR. Po proběhnutí reakce byla velikost a čistota produktů ověřena pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu (data neuvedena). Byly použity 4 páry primerů pro mitochondriální geny (NADH dehydrogenáza 1 - ND1, cytochrom c oxidáza III - CO3, cytochrom b - CYB, MT-tRNA-Leu - MT-TL1) a 2 páry primerů pro jaderné geny (nekódující sekvence chr16:78641549+78641668 (GRCh38/hg38) označená jako FRA a B2 mikroglobulin - B2M). Primery byly převzaty z literatury (Venegas *et al.*, 2012; Cekaite *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2017), FRA poskytl prof. Jiří Drábek. Nejprve byl pro každý pár primerů vyzkoušen gradient 8 teplot, jejichž rozmezí bylo vybráno na základě doporučené teploty získané z programu Primer-BLAST. Optimalizace teplot probíhala na DNA z buněčné linie ARPE-19. Pro potvrzení linearity reakce v závislosti na koncentraci a zjištění efektivity amplifikace byla pro každou dvojici primerů vytvořena kalibrační přímka o 6 bodech, ředění 10×. Pro každou kombinaci pár primerů/koncentrace byla reakce provedena v dvojím opakování. Přesnost reakce byla určena z hodnoty korelačního koeficientu lineární regrese R^2 (viz tab. 8). Počet cyklů byl ve všech případech 40.

Tab. 8: Primery použité pro optimalizaci real-time PCR a získané hodnoty efektivity amplifikace a korelačního koeficientu lineární regrese R^2 .

Primery	Efektivita amplifikace (%)	Linearita reakce v závislosti na koncentraci (R^2)
ND1	99,2	0,994
CO3	104,7	0,998
CYB	100	0,997
MT-TL1	102,6	0,996
FRA	101,6	0,986

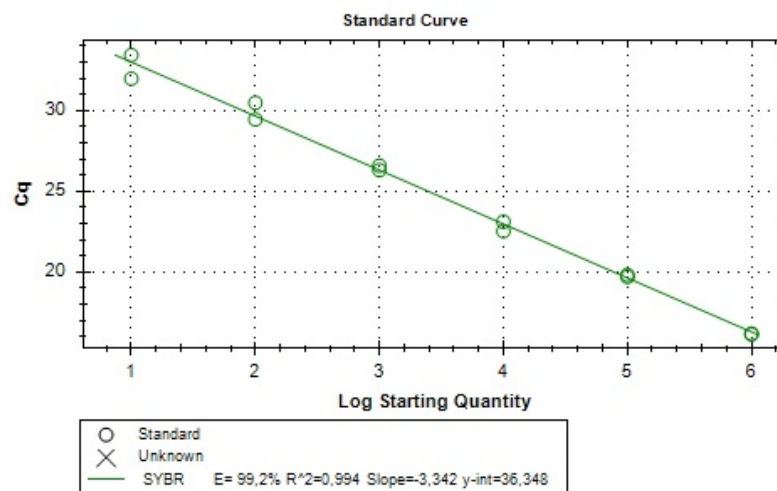
ND1

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-ACGGGCTACTACAACCCTTC-3'
5'-GCCTAGGTTGAGGTTGACCA-3'

Velikost očekávaného produktu je 176 bp.

Pro amplifikaci ND1 byly vyzkoušeny teploty v rozmezí 57 - 63 °C. Následná gelová elektroforéza ukázala, že přibližně stejně silný produkt se vytvořil u všech použitých teplot. Pro vytvoření kalibrační přímky byla vybrána teplota 59 °C. Reakce byla lineární ($R^2 = 0,994$) v celém testovaném rozsahu (6 koncentrací, ředění 10 \times), efektivita amplifikace byla 99,2 %.



Obr. 26: Kalibrační přímka při použití primerů pro ND1.

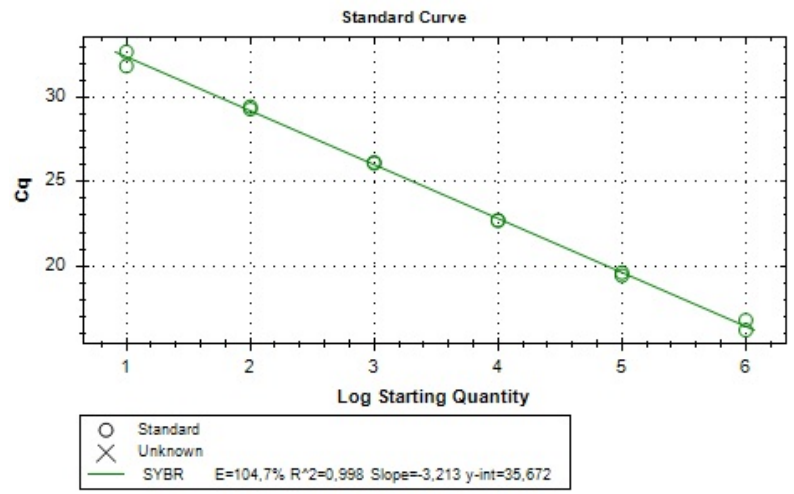
CO3

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-ACCATTTCCGACGGCATCTA-3'
5'-GTTGGCGGATGAAGCAGATAGT-3'

Velikost očekávaného produktu je 109 bp.

Teploty použité u primerů pro CO3 byly v rozmezí 57 - 62 °C. Odpovídající produkty na gelu byly stejně intenzivní pro všechny teploty. Teplota pro vytvoření kalibrační přímky byla 59 °C. Reakce byla lineární ($R^2 = 0,998$), efektivita amplifikace byla 104,7 %.



Obr. 27: Kalibrační přímka při použití primerů pro CO3.

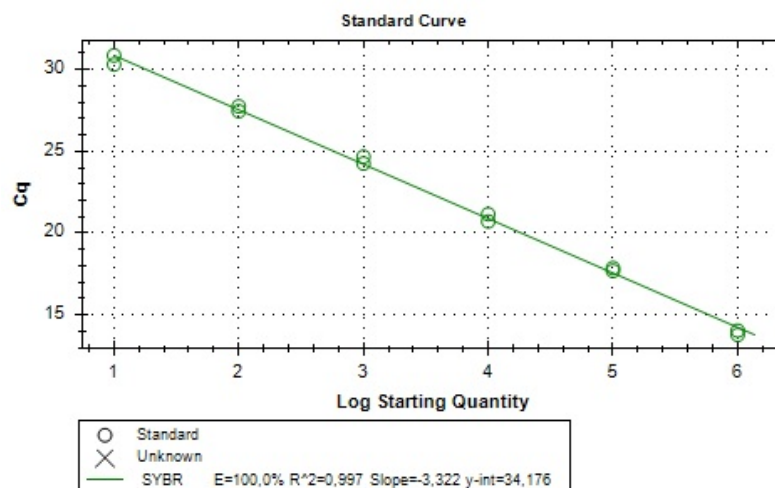
CYB

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-CCCTAGCCAACCCCTTAAACA-3'
- 5'-TTAGAATGAGGAGGTCTGCGG-3'

Velikost očekávaného produktu je 237 bp.

V případě použití primerů pro CYB bylo vybráno teplotní rozmezí 56 - 62 °C. Produkty na gelu měly stejně jako v přechozích případech správnou velikost a proužky byly dostatečně intenzivní při aplikaci všech teplot. Pro vytvoření kalibrační přímky byla opět vybrána teplota 59 °C. Efektivita amplifikace byla ideální - 100 %, $R^2 = 0,997$.



Obr. 28: Kalibrační přímka při použití primerů pro CYB.

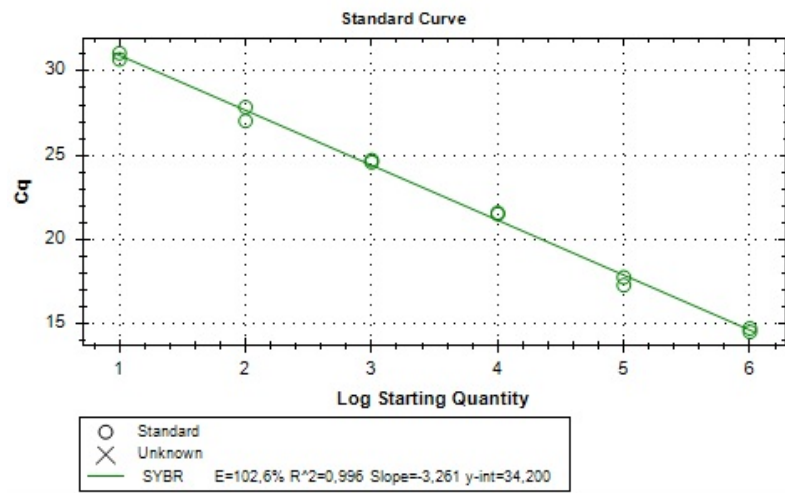
MT-TL1

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'
5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'

Velikost očekávaného produktu je 108 bp.

Pro amplifikaci MT-TL1 bylo použito rozmezí teplot 57 - 62 °C. Produkty na gelu měly odpovídající velikost, proužky byly intenzivní, opět nebyl pozorován výrazný rozdíl při použití různých teplot. Teplota pro vytvoření kalibrační přímky byla teda opět stanovena na 59 °C. Efektivita amplifikace dosahovala hodnoty 102,6 %, reakce byla opět lineární ($R^2 = 0,996$).



Obr. 29: Kalibrační přímka při použití primerů pro MT-TL1.

B2M

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5′-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3′
5′-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3′

Velikost očekávaného produktu je 86 bp.

Jako první z primerů pro jaderné geny byl použit pár pro B2M. Byl vybrán teplotní gradient 56 - 62 °C. Teplota pro vytvoření kalibrační přímky byla 59 °C. Získanými body se reprodukovatelně nepodařilo získat kvalitní kalibrační přímku (data neuvedena). Po provedení gelové elektroforézy byly někdy na gelu zřetelné 2 produkty. Reakce tedy není dostatečně robustní, rozhodla jsem se proto použít jiný jaderný lokus.

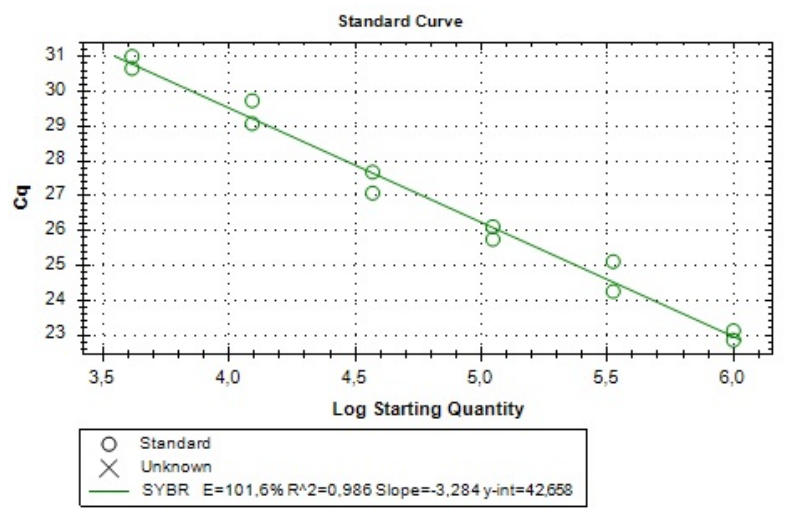
FRA

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5′-TCATTCATTCTGCTGGCCCT-3′
5′-GGCCGTTTAACTACCTCTTG-3′

Velikost očekávaného produktu je 120 bp.

S primery pro FRA byla vytvořena kalibrační přímka za stejných podmínek jako u předchozích primerů (59 °C, ředění 10×). Z důvodu nedostatečného množství kopií genomické sekvence nebyly 2 nejnižší koncentrace vyneseny na přímce. Proto bylo zvoleno ředění 3×. Efektivita reakce měla poté hodnotu 101,6 %, $R^2 = 0,986$.



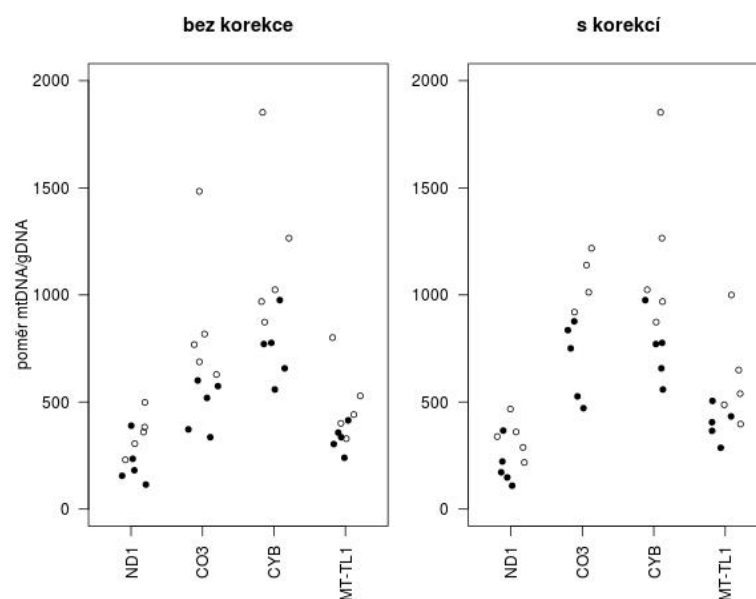
Obr. 31: Kalibrační přímka při použití primerů pro FRA.

3.3.2 Stanovení poměru mitochondriální a genomické DNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

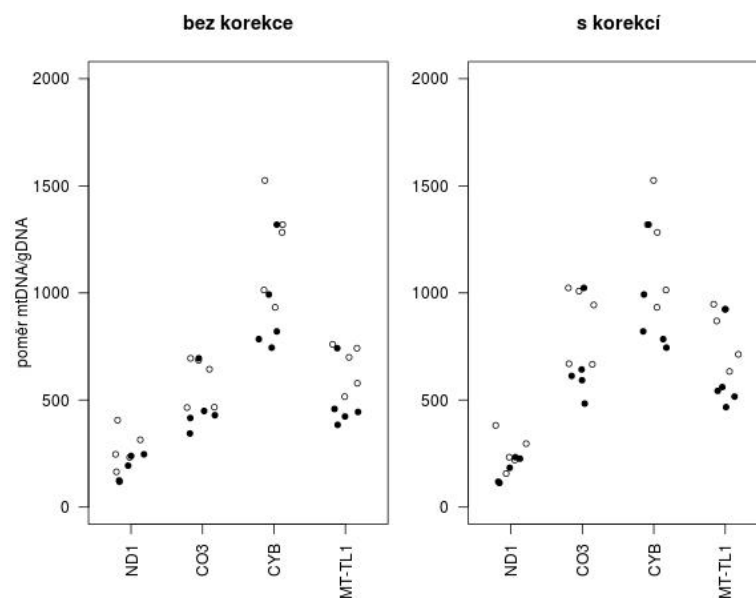
Pro stanovení poměru mtDNA/gDNA byly použity PCR reakce optimalizované výše (viz 3.3.1). Genomický lokus reprezentovala sekvence FRA, mitochondriální lokusy sekvence v oblasti genů ND1, CO3, CYB a MT-TL1. V pilotním experimentu použita linie ARPE-19. Pět biologických replikátů bylo ovlivněno AICAR (0,5 mM, 48 h) s cílem indukovat mitogenezi. Pět biologických replikátů ovlivněných DMSO vehikulem sloužilo jako kontrola. Každá PCR reakce byla provedena v duplikátu, ve výpočtech se pracovalo s průměrem. Poměry mtDNA/gDNA byly vypočteny podle vzorce $2 \times 2^{Ct_{FRA} - Ct_{mitochondriální\ sekvence}}$ (Rooney *et al.*, 2015). Byly také spočteny poměry při zohlednění efektivity amplifikace. Celý experiment byl ještě jednou opakován se stejnými vzorky DNA. Výsledky ukazují obrázky 32, 33 a tabulky 9, 10, 11, 12. Pro výpočet statistické významnosti byl použit jednostranný t-test pro soubory s nerovnou variancí. Vypočtena byla také korelace mezi mtDNA/gDNA poměry získanými pro jednotlivé mitochondriální lokusy (obr. 34 a 35). Vzhledem k malým rozdílům mezi kontrolními buňkami a buňkami ovlivněnými AICAR bylo všech 10 vzorků považováno za jednu populaci.

Tab. 9: Vypočtené hodnoty pro stanovení poměru mtDNA/gDNA (první opakování, bez korekce).

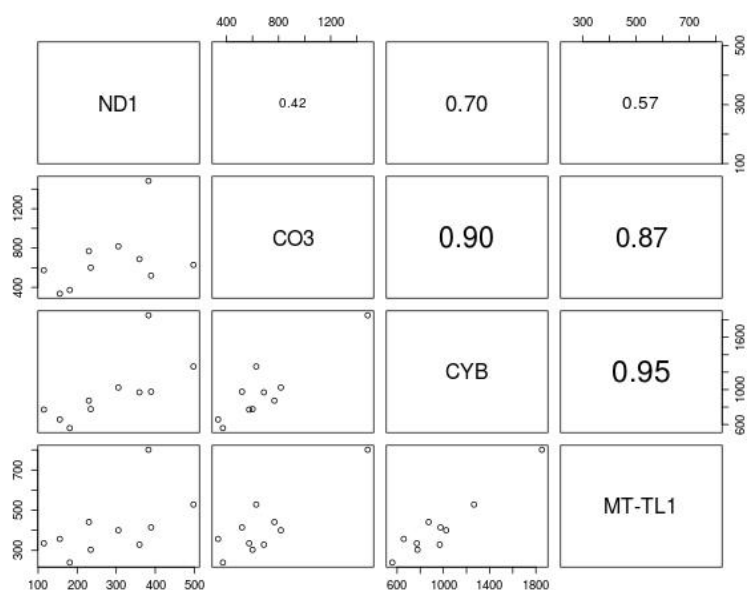
	ND1/FRA	CO3/FRA	CYB/FRA	MT-TL1/FRA
DMSO průměr	215,0	480,3	747,5	330,0
DMSO směrodatná odchylka d	106,8	119,8	155,5	64,7
DMSO medián	181,0	519,1	770,7	335,5
AICAR průměr	355,1	877,0	1196,6	499,8
AICAR směrodatná odchylka	99,2	346,9	394,0	183,0
AICAR medián	359,5	768,0	1024,0	441,1
rozdíl AICAR - DMSO	140,1	396,7	449,1	169,8
p-hodnota (jednostranný t-test)	0,032	0,030	0,031	0,054
poměr průměrů AICAR/DMSO	1,652	1,826	1,601	1,514
poměr mediánů AICAR/DMSO	1,986	1,479	1,329	1,315



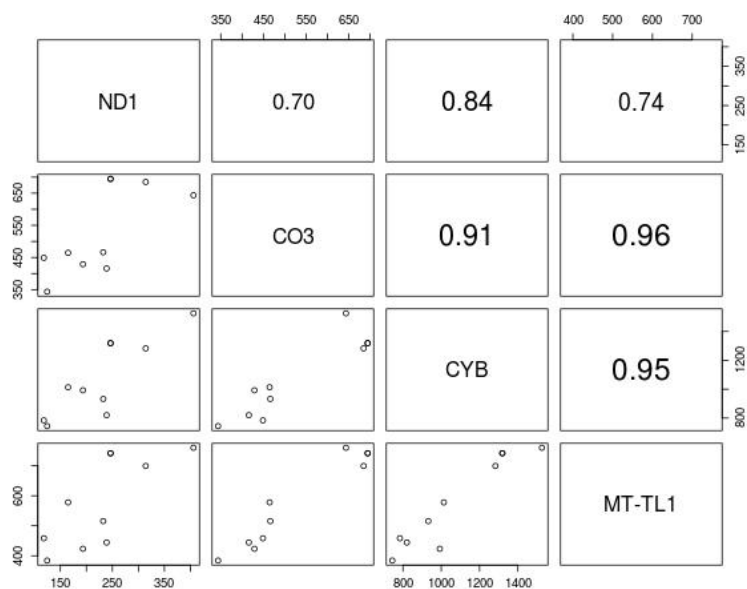
Obr. 32: Poměry mtDNA/gDNA pozorované v pilotním experimentu (první opakování). Prázdná kolečka - buňky ovlivněné AICAR, plná kolečka - kontrolní buňky. V pravém panelu zobrazeny hodnoty po korekci na účinnost PCR reakce.



Obr. 33: Poměry mtDNA/gDNA pozorované v pilotním experimentu (druhé opakování). Prázdná kolečka - buňky ovlivněné AICAR, plná kolečka - kontrolní buňky. V pravém panelu zobrazeny hodnoty po korekci na účinnost PCR reakce.



Obr. 34: Korelace mezi mtDNA/gDNA poměry získanými pro jednotlivé mitochondriální lokusy v prvním opakování experimentu. Čísla v pravém horním panelu jsou Pearsonův korelační koeficient.



Obr. 35: Korelace mezi mtDNA/gDNA poměry získanými pro jednotlivé mitochondriální lokusy v druhém opakování experimentu. Čísla v pravém horním panelu jsou Pearsonův korelační koeficient.

Tab. 10: Vypočtené hodnoty pro stanovení poměru mtDNA/gDNA (první opakování, s korekcí).

	ND1/FRA	CO3/FRA	CYB/FRA	MT-TL1/FRA
DMSO průměr	203,5	691,8	747,5	398,9
DMSO směrodatná odchylka	99,8	183,2	156,0	81,0
DMSO medián	171,8	750,3	770,7	405,5
AICAR průměr	334,3	1317,5	1196,6	614,3
AICAR směrodatná odchylka	92,3	560,5	394,0	233,9
AICAR medián	338,5	1139,2	1024,0	538,7
rozdíl AICAR - DMSO	130,9	625,7	449,1	215,4
p-hodnota (jednostranný t-test)	0,032	0,033	0,031	0,055
poměr průměrů AICAR/DMSO	1,643	1,904	1,601	1,540
poměr mediánů AICAR/DMSO	1,970	1,518	1,329	1,328

Tab. 11: Vypočtené hodnoty pro stanovení poměru mtDNA/gDNA (druhé opakování, bez korekce).

	ND1/FRA	CO3/FRA	CYB/FRA	MT-TL1/FRA
DMSO průměr	184,3	466,4	932,0	490,3
DMSO směrodatná odchylka	61,0	133,6	236,0	143,4
DMSO medián	193,3	429,0	820,3	444,2
AICAR průměr	272,7	590,8	1214,6	659,0
AICAR směrodatná odchylka	91,4	116,0	240,9	107,1
AICAR medián	246,4	643,6	1282,7	699,4
rozdíl AICAR - DMSO	88,5	124,4	282,5	168,7
p-hodnota (jednostranný t-test)	0,057	0,078	0,049	0,035
poměr průměrů AICAR/DMSO	1,480	1,267	1,303	1,344
poměr mediánů AICAR/DMSO	1,275	1,500	1,564	1,575

Získané výsledky naznačují, že AICAR (0,5 mM, 48 h) má v linii ARPE-19 malý pozitivní vliv na mitogenezi (p-hodnoty < 0.1). Pozorované poměry mezi mtDNA/gDNA pro jednotlivé lokusy nebyly stejné, rozdíly zůstaly i po provedení korekce na účinnost amplifikace (tab. 10, 12). Vzhledem k tomu, že podobná situace nastala v obou opakováních experimentu, získané výsledky pravděpodobně odráží koncentraci cílových sekvencí ve vzorcích DNA. Není ale jasné, jestli se liší počet templátů (např. v důsledku degradace, delecí v části populace mitochondrií) nebo PCR reakce proběhly s jinou efektivitou než byla pozorována během reakcí optimalizačních, kde ředěním byla snížena koncentrace matrice.

Tab. 12: Vypočtené hodnoty pro stanovení poměru mtDNA/gDNA (druhé opakování, s korekcí).

	ND1/FRA	CO3/FRA	CYB/FRA	MT-TL1/FRA
DMSO průměr	174,8	670,8	932,0	601,8
DMSO směrodatná odchylka	57,2	206,1	236,0	183,3
DMSO medián	183,4	612,3	820,3	542,6
AICAR průměr	257,5	862,3	1214,6	817,1
AICAR směrodatná odchylka	85,3	179,9	240,9	137,4
AICAR medián	233,1	943,6	1282,7	868,8
rozdíl AICAR - DMSO	82,7	191,5	282,5	215,3
p-hodnota (jednostranný t-test)	0,057	0,078	0,049	0,036
poměr průměrů AICAR/DMSO	1,473	1,285	1,303	1,358
poměr mediánů AICAR/DMSO	1,271	1,541	1,564	1,601

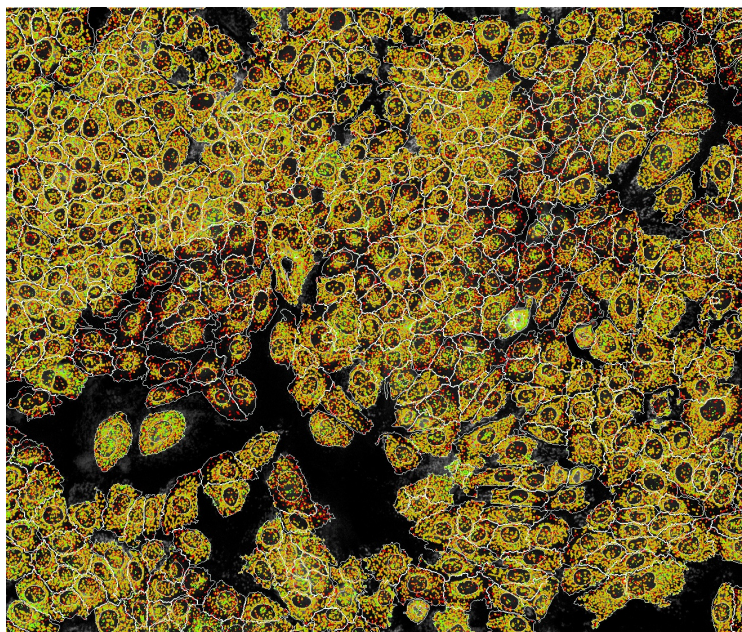
Poměry mezi mtDNA/gDNA pro jednotlivé lokusy byly pozitivně korelovány, což potvrzuje, že odráží množství mtDNA ve vzorku. Nejvyšší míru shody vykazovaly poměry pro lokusy CYB a MT-TL1. Naopak poměr pro lokus ND1 poskytoval nejvíce odlišné výsledky. Korelační koeficienty jsou poměrně nízké proto, že rozsah hodnot mtDNA/gDNA v rámci souboru byl pro jednotlivé lokusy velice nízký (maximum/minimum < 3.5 pro CO3, CYB a MT-TL1). Pokud by byl vyšší, snížil by se vliv chyby pipetování a následně by korelace byly lepší.

3.3.3 Automatická mikroskopie a analýza obrazu

Pomocí automatické mikroskopie byly pořízeny snímky buněk linií BJ, HaCaT a ARPE-19 vystavených třídnímu působení známých induktorů mitogeneze AICAR (62,5 - 1000 μM), metformin (62,5 - 1000 μM), rosiglitazon (15,6 - 250 μM) a resveratrol (6,25 - 100 μM). Jádru bylo obarveno interkalačním barvivem Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g/ml}$, modrý kanál), mitochondrie barvivem TMRM (30 nM, červený kanál), které do nich vstupuje na základě jejich elektrického potenciálu.

V první fázi byl použit automatický mikroskop Operetta (zvětšení 20 - 40 \times). Pro analýzu obrazu byl používán program CellProfiler. K definování jádra i cytoplazmy pomocí metody OTSU pro 3 třídy intenzity (pozadí, cytoplazma, jádro) byl použit signál barviva Hoechst 33342. Oblast odpovídající mitochondriím byla identifikována několika metodami

na základě signálu TMRM. Bohužel cílový parametr plocha mitochondrií/plocha buňky nevykazoval žádnou závislost na koncentraci testovaných látek. Je možné, že při použití zvětšení nebylo možné pomocí analýzy obrazu identifikovat mitochondrie optimálně. Na to poukazuje i omezený překryv mezi mitochondriemi identifikovanými různými metodami, jak je možné vidět z reprezentativního obrázku 36.



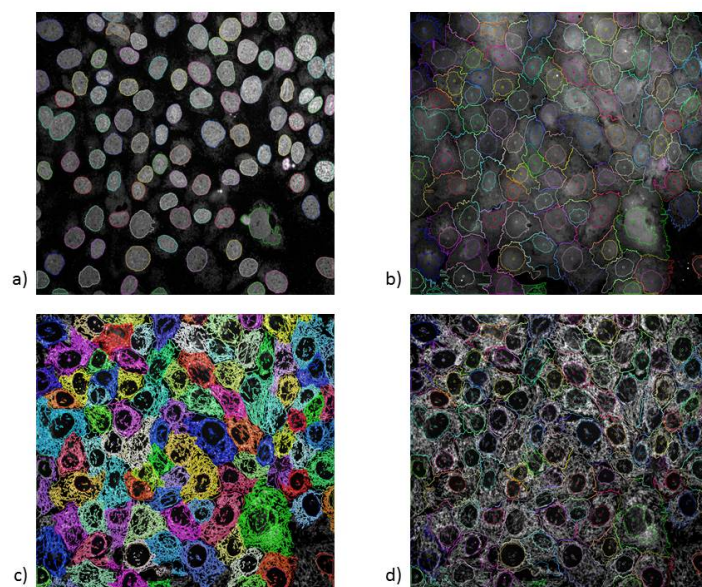
Obr. 36: Identifikace cytoplazmy, jádra a mitochondrií v linii HaCaT na snímcích z přístroje Operetta. Ukázán je neúplný překryv mitochondrií identifikovaných dvěma metodami (červená, zelená). Oblast překryvu je žlutá.

Proto jsme přešli na přístroj CellVoyager CV8000, který umožňuje získat kvalitnější obrázky navíc při větším zvětšení ($60\times$). Pro každou jamku bylo vyfoceno 9 zorných polí (což odpovídá asi 400 - 600 buňkám). V pilotním experimentu se ukázalo, že není možné použít Hoechst 33342 pro definici cytoplazmy - signál pro ARPE-19 a HaCaT byl příliš slabý (data neukázána). Pro definici cytoplazmy jsme proto používali Calcein-AM ($0,1 \mu\text{g/ml}$, zelený kanál). Analýza obrazu byla provedena v software Columbus a zahrnovala identifikaci jader (modrý kanál), cytoplazmy (zelený kanál) a mitochondrií jako “spots” v oblasti cytoplazmy (červený kanál). Parametry analýzy obrazu jsou uvedeny podrobněji v části metody (viz 3.2.11). Výsledky pro reprezentativní zorná pole ukazují obrázky 37, 38, 39. Výsledky pro linii BJ jsou horší než pro ostatní linie - problémem je jejich protáhlý tvar. Zejména při vyšší hustotě algoritmus neumí identifikovat buňky jednoznačně. Druhým problémem je, že jejich

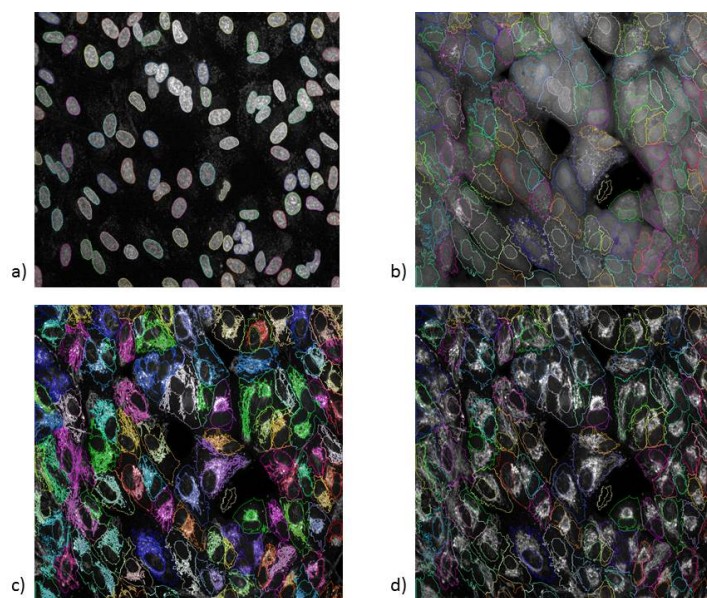
cytoplazma je poměrně silně barvena barvivem Hoechst 33342. Určité oblasti cytoplazmy jsou pak identifikovány jako jádro, kolem kterého je pak “nalezena” cytoplazma. To je patrné např. na obrázku 40. Na druhou stranu barvení cytoplazmy TMRM nepřítomné u ostatních testovaných linií umožňuje pokus o definici cytoplazmy pomocí červeného kanálu. Oblast cytoplazmy definované pomocí zeleného a červeného kanálu se poněkud liší (obr. 40).

Vlastní identifikace mitochondrií byla provedena několika způsoby lišícími se citlivostí detekce a rozdělovacím koeficientem (split coefficient). Rozdělovací koeficient určuje jak agresivně budou objekty rozdělovány na menší. Při menším rozdělovacím koeficientu jsou objekty organizovány do sítí, při vyšších hodnotách jsou sítě rozděleny na menší objekty. První případ lépe odpovídá morfologii mitochondriální masy ve studovaných buňkách. Nevýhodou je, že algoritmus má tendenci vyplňovat “oka” v mitochondriální síti a tak nadhodnocovat plochu zaujatou mitochondriemi (obr. 41). Proto bylo testováno více parametrů.

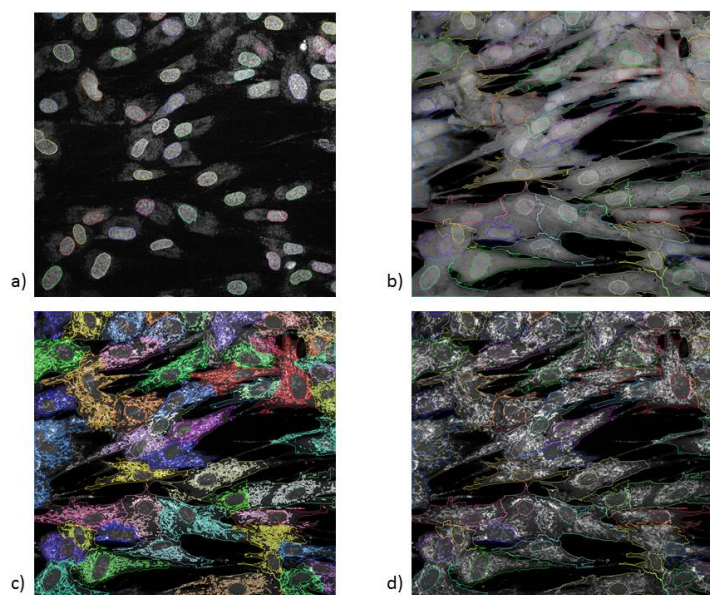
Pro identifikované objekty byly vypočteny morfologické parametry (plocha, velikost v různých rozměrech, cirkularita, ...), spektrální parametry (intezita, rozdělení intenzity) a parametry související s texturou. Dále byly vypočteny vybrané poměry – např. plocha mitochondrií na plochu buňky/cytoplazmy. Spolu s počty objektů byly tyto parametry exportovány jako textový soubor a analyzovány v programu R. Bohužel žádný z parametrů nevykazoval jasnou závislost na dávce aplikovaných induktorů mitogeneze.



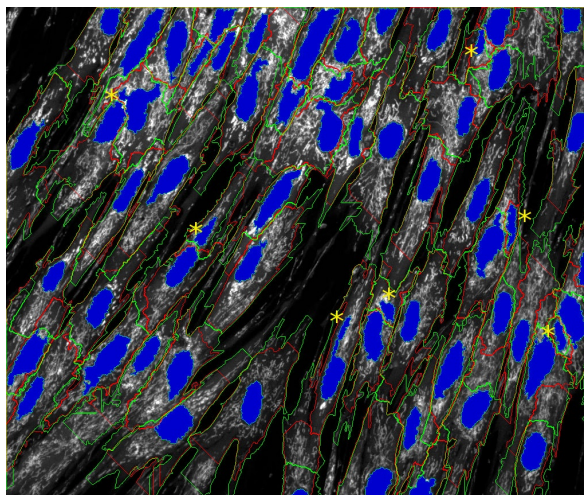
Obr. 37: Analýza obrazu - linie HaCaT. Identifikace jader, barvení Hoechst 33342 (modrý kanál) (a), identifikace cytoplazmy, barvení Calceinem-AM (zelený kanál) (b), identifikace mitochondriální sítě, barvení TMRM (červený kanál) (c), pro srovnání ukázán i signál mitochondrií bez přeložení identifikovanými objekty (d).



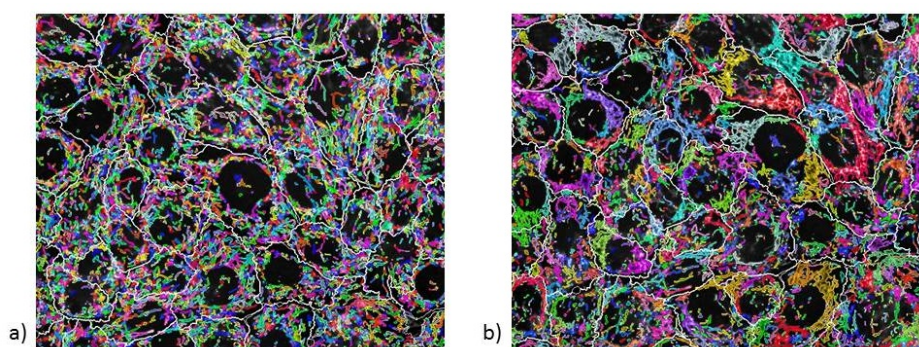
Obr. 38: Analýza obrazu - linie ARPE-19. Identifikace jader, barvení Hoechst 33342 (modrý kanál) (a), identifikace cytoplazmy, barvení Calceinem-AM (zelený kanál) (b), identifikace mitochondriální sítě, barvení TMRM (červený kanál) (c), pro srovnání ukázán i signál mitochondrií bez přeložení identifikovanými objekty (d).



Obr. 39: Analýza obrazu - linie BJ. Identifikace jader, barvení Hoechst 33342 (modrý kanál) (a), identifikace cytoplazmy, barvení Calceinem-AM (zelený kanál) (b), identifikace mitochondriální sítě, barvení TMRM (červený kanál) (c), pro srovnání ukázán i signál mitochondrií bez přeložení identifikovanými objekty (d).



Obr. 40: Problémy analýzy obrazu v případě linie BJ. Analýza reprezentativního snímku – červený kanál. Jádra identifikovaná na základě signálu Hoechst 33342 jsou zobrazena modře. Hvězdičky ukazují jádra artefakty vzniklé v důsledku poměrně intenzivního barvení cytoplazmy Hoechst 33342. Pro jednotlivé snímky je obvykle možné snadno nastavit parametry tak, aby tato “jádra” nebyla rozpoznána. Analýza pak ale ignoruje skutečná jádra na jiných snímcích. Kolem jader (včetně artefaktů) je pak definovaná cytoplazma (zelená – identifikace pomocí signálu Calceinu-AM, červená – identifikace pomocí signálu TMRM). Problém je také možné částečně vyřešit odfiltrováním malých jader před definicí cytoplazmy (zde kvůli demonstraci neprovedeno).

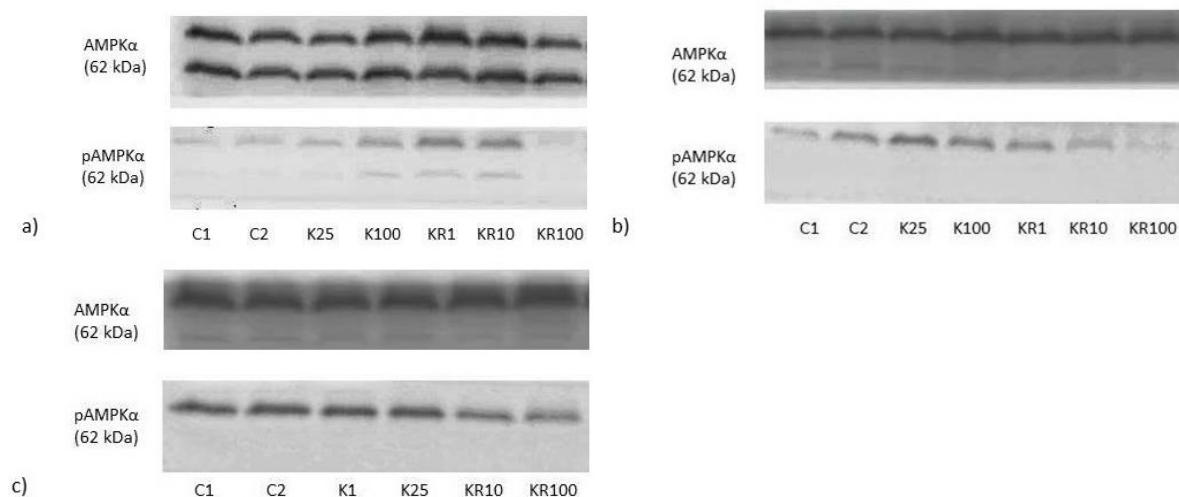


Obr. 41: Identifikace mitochondrií – ukázka vlivu rozdělovacího koeficientu. Vlevo rozdělovací koeficient 0.6, vpravo 0.2.

3.3.4 Sledování aktivační fosforylace AMP-aktivované kinázy pomocí SDS-PAGE a imunoblottingu

Jak bylo zmíněno výše, fosforylace AMPK má přímý vliv na aktivaci hlavního regulátoru mitochondriální biogeneze PGC-1 α (viz obr. 9). Aktivace α podjednotky AMPK zahrnuje fosforylaci na threoninu 172 (Stein *et al.*, 2000).

Pro imunodetekci byly použity buněčné linie ARPE-19, BJ i HaCaT, které byly ovlivněny cytokininy kinetinem (K) a kinetin ribozidem (KR) po dobu 6 hodin. Jelikož deplece ATP způsobuje zvýšení hladin AMP a ADP (vedoucí k aktivaci AMPK), je AMPK aktivována látkami, které inhibují syntézu ATP (Hardie, 2016). Jednou z látek indukujících depleci ATP je i KR (Cabello *et al.*, 2009). Aktivace AMPK kinetinem byla navržena jako mechanismus jeho cytoprotektivního působení v *C. elegans* (Kadlecová *et al.*, 2018). V linii ARPE-19 jsem pozorovala možnou indukci aktivace AMPK po ovlivnění K (100 μ M) a KR v koncentracích 1 a 10 μ M (viz obr. 42a). V případě dalších linií, BJ a HaCaT, způsobuje aplikace 10 μ M KR spíše inhibici aktivace AMPK (viz obr. 42b, 42c). Zdá se tedy, že odpověď na cytokininy zprostředkovaná AMPK je závislá na použitém buněčném typu. Na fosforylaci β podjednotky (serin 182) neměly použité látky vliv (data neuvedena).



Obr. 42: Fotografie membrán s detekovanými proteiny. Buněčné linie ARPE-19 (a), BJ (b) a HaCaT (c) po 6-hodinovém ovlivnění kinetinem (K) a kinetin ribozidem (KR) v různých koncentracích (hodnoty uvedeny v μ M). První 2 vzorky vždy kontrola (C1, C2).

3.3.5 Hodnocení vlivu přirozených cytokininů na viabilitu

Barvení buněčného proteinu pomocí SRB (sulforhodamin B) je standartní metoda hodnocení toxicity. 72-hodinové působení vybraných přirozených cytokininových bází (*trans*-zeatin, N⁶-isopentenyladenin, kinetin, N⁶-benzylaminopurin, topoliny), které jsme chtěli následně testovat v testech mitogeneze, na viabilitu linií BJ, HaCaT a ARPE-19 bylo testováno pomocí SRB testu. Látky neměly vliv na viabilitu ani v nejvyšší testované koncentraci 50 μ M. Hodnoty signálu buněk ovlivněných látkami se pohybovaly mezi 95 - 105 % kontroly (data neuvedena).

4 Diskuze

Cílem práce bylo optimalizovat vybrané metody pro hodnocení mitogeneze. Práce byla motivována pozorováním, že některé cytokininy zvyšují signál v resazurinovém testu, aniž by zvyšovaly proliferaci. Protože za redukci resazurinu jsou podle literatury zodpovědné mitochondrie (De Fries *et* Mitsuhashi, 1995), zajímalo nás, jestli působením cytokininů dochází k indukci biogeneze mitochondrií. Alternativním vysvětlením by mohla být indukce mitochondriální aktivity bez zvýšení jejich počtu. Nelze ale také vyloučit, že látky indukují ještě jiný systém schopný redukovat resazurin.

Přímé sledování mitochondrií pomocí mikroskopu umožňuje zároveň studovat počet mitochondrií i jejich morfologii. Ve spojení s analýzou obrazu je možné získat kvantitativní data. Vzhledem k dynamické povaze mitochondriální sítě (fúze, štěpení) je ale vhodnější mluvit o množství mitochondriální masy než o počtu jednotlivých mitochondrií. Nepřímo je možné získat informaci o mitochondriální masě kvantifikací mitochondriální DNA (mtDNA) pomocí PCR (Rooney *et al.*, 2015) a nověji i sekvenačních metod nové generace (Weissensteiner *et al.*, 2016). Obvykle se nesleduje absolutní množství mtDNA, ale poměr množství mtDNA a genomické DNA (gDNA). Informace o množství mitochondriální masy může poskytnout i sledování genové exprese (mRNA, proteinu) mitochondriálních genů a také sledování metabolické aktivity mitochondrií (měření respirace, sledování aktivity mitochondriálních enzymů). Tyto parametry ale mohou být zvýšeny i nezávisle na množství mitochondriální masy. Konečně, aktivaci mitogeneze jde sledovat stanovením množství známých regulátorů jakými jsou AMPK, SIRT1 nebo transkripčními faktory regulující expresi (jaderných) mitochondriálních genů. (Medeiros, 2008).

V této práci jsem se pokusila optimalizovat jak přímé (mikroskopie a analýza obrazu), tak nepřímé metody (měření poměru mtDNA/gDNA, aktivace AMPK). Používala jsem buňky studované v naší laboratoři - fibroblasty BJ, keratinocyty HaCaT a retinální linii ARPE-19. Jako pozitivní kontroly jsem používala známé aktivátory mitogeneze - AICAR (aktivátor AMPK), metformin (aktivátor AMPK), rosiglitazon (agonista PPAR γ). Informace o dynamice mitogeneze po aplikaci induktorů v těchto liniích bohužel není možné získat z literatury. Jako logická strategie se proto jevilo nejprve pomocí automatické mikroskopie v 384-jamkovém formátu a analýzy obrazu zjistit vhodné časy a koncentrace a ty následně

použit k přípravě vzorků pro optimalizaci PCR. Buňky byly barveny Hoechst 33342 (jádro, modrý kanál, finální koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$) a TMRM (tetrametylrhodamin metylester) (mitochondrie, červený kanál, finální koncentrace 30 nM). TMRM bylo voleno kvůli velice nízké ceně ve srovnání s komerčním barvivem typu MitoTrackeru. Obě barviva barví mitochondrie na základě mitochondriálního potenciálu. Zatímco MitoTracker barví mitochondrie ireverzibilně, protože reaguje se sulfhydrylovými skupinami, TMRM může organelu opět opustit v případě poklesu potenciálu. Ověřila jsem proto, že kombinace barviv nemá na potenciál významný negativní vliv v době nutné pro vyfocení celé desky. Vzhledem k tomu, že cílovým parametrem je plocha zaujatá mitochondriemi na buňku, malé poklesy v intenzitě nejsou kritické. Parametry přístroje Operetta ale neumožnily získat snímky s dostatečným zvětšením, které by umožnily optimalizovat analýzu obrazu. Mezi mitochondriální masou identifikovanou několika algoritmy implementovanými v software CellProfiler byl jen částečný překryv a žádný ze sledovaných parametrů nebyl jednoznačně korelován s dávkou aplikovaného induktoru.

Téměř na konci projektu jsme získali přístup k přístroji CellVoyager CV8000, který umožnil získat kvalitní snímky ve větším rozlišení ($60\times$) a analytickému software Columbus. Zatímco při menším zvětšení na přístroji Operetta bylo možné k definici cytoplazmy použít slabý signál Hoechstu 33342, zde bylo nutné hledat náhradní řešení, protože ARPE-19 ani HaCaT barvivo v cytoplazmě téměř nekumulují. V literatuře je popsáno barvení jádra/cytoskeletu/mitochondrií pomocí kombinace Hoechst 33342/značený falloidin/MitoTracker (Cataldo *et al.*, 2010), ta ale vyžaduje fixaci s několika promývacími kroky. To komplikuje skrínování ve vysokém formátu a navíc by byl vyžadován ireverzibilně barvicí, ale drahý MitoTracker. Zvolili jsme nakonec barvení Calceinem-AM (finální koncentrace 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Ten je buněčnými esterázami hydrolyzován na zeleně fluorescentní Calcein, který díky náboji nemůže buňku snadno opustit. V případě fibroblastové linie dostatečné pozadí pro definici cytoplazmy poskytuje barvení TMRM, je ale nutné médium s barvivem nahradit novým médiem. Pro linie ARPE-19 a HaCaT se podařilo zoptimalizovat analýzu obrazu tak, že bylo možno dostatečně přesně identifikovat jádro a cytoplazmu na jednotlivých snímcích. O něco horších výsledků bylo dosaženo pro fibroblasty BJ - problémem je jejich protáhlý tvar. Zejména při vyšší hustotě algoritmus neumí identifikovat buňky jednoznačně. Analýza těchto buněk je dále komplikována tím, že u nich dochází k poměrně intenzivnímu, ale

nepravidelnému barvení cytoplazmy barvivem Hoechst 33342, což vede k tomu, že algoritmus v některých buňkách detekuje další "jádra". Po odfiltrování části artefaktů na základě očekávané plochy jádra je postižena sice jen malá část buněk, ale prostor pro zlepšení analýzy BJ barvením nižšími koncentracemi Hoechst 33342 jistě existuje.

Identifikace mitochondrií byla provedena několika způsoby lišícími se citlivostí detekce a rozdělovacím koeficientem (split coefficient). Rozdělovací koeficient určuje jak agresivně budou objekty rozdělovány na menší. Při menším rozdělovacím koeficientu jsou objekty organizovány do sítí, při vyšších hodnotách jsou sítě rozděleny na menší objekty. První případ lépe odpovídá morfologii mitochondriální masy ve studovaných buňkách. Nevýhodou je ale, že algoritmus má tendenci vyplňovat "oka" v mitochondriální síti a tak nadhodnocovat plochu zaujatou mitochondriemi. Analýza a export dat byl proto proveden pro vícero nastavení.

Pro identifikované objekty byly vypočteny morfologické parametry (plocha, velikost v různých rozměrech, cirkularita, ...), spektrální parametry (intezita, rozdělení intenzity) a parametry související s texturou. Dále byly vypočteny vybrané poměry – např. plocha mitochondrií na plochu buňky/cytoplazmu. Spolu s počty objektů byly tyto parametry analyzovány v programu R. Bohužel i přes zjevnou schopnost algoritmu detekovat poměrně přesně cílové struktury, žádný z parametrů nevykazoval jasnou závislost na dávce aplikovaných induktorů mitogeneze. Důvod je nejasný. Je možné, že za daných podmínek nedošlo k indukci mitogeneze, případně byla expanze mitochondriální masy malá a bylo by nutné analyzovat větší populace buněk. Možností je také pokusit se analyzovat síť v 3D pomocí "z-stacku", přístroj to umožňuje. Je možné, že v prostém řezu je nárůst masy podhodnocen.

Pro testování PCR stanovení poměru mtDNA/gDNA jsem tedy neměla k dispozici informaci o vhodných látkách/koncentracích a časech pro indukci. Omezila jsme se proto jen na optimalizaci samotné PCR (teplotní gradient, potvrzení linearity reakce v závislosti na koncentraci v ředící řadě, zjištění efektivity amplifikace) a pilotní experiment. Primery byly převzaty z literatury, primer FRA amplifikující neexprimovaný lokus na chromozomu 16 byl doporučen prof. J. Drábkem z ÚMTM LF Olomouc. Optimalizace se zdařila pro všechny 4 mitochondriální lokusy (ND1, CO3, CYB, MT-TL1). Nepodařila se pro v literatuře používaný jaderný lokus v genu B2M - v reakci někdy vznikalo více produktů. Zvolila jsem proto primery pro FRA, který poskytoval robustní reakci. V pilotním experimentu jsem

buňky ARPE-19 ovlivnila AICAR (0,5 mM, 48 h) nebo DMSO vehikulem (pět vzorků na podmínku).

Pro všechny 4 poměry mitochondriální sekvence/genomická sekvence byl pozorován malý pozitivní efekt aplikované látky – p-hodnota jednostranného t-testu byla vždy nižší než 0,1. Překvapivé bylo, že mtDNA/gDNA poměry se pro jednotlivé mitochondriální sekvence dosti lišily a rozdíl nebyl zcela odstraněn ani korekcí na efektivitu reakce. Podobné výsledky byly získány i při opakování celého experimentu s stejnou DNA. Důvod je nejasný. Malé rozdíly v technických replikátech poukazují na to, že se nejedná o chybu v PCR. Nepůjde ani o příznak degradace DNA, velikost poměru mtDNA/gDNA nesouvisí s délkou ampliconu. Možným vysvětlením by mohlo být to, že údaje o efektivitě reakce získané během optimalizací (ředící řada v lyzačním pufru, DNA matrice se vyředí uje) neodpovídají efektivitě ve vzorcích s matricí tvořenou koncentrovanější DNA. Nelze také vyloučit, že v části populace mitochondrií této linie je některý z lokusů deletován či amplifikován. Poměry mtDNA/gDNA pro jednotlivé mitochondriální lokusy jsou pozitivně korelovány, což svědčí o tom, že odrážejí množství mitochondriální DNA ve vzorku.

Pro posouzení užitečnosti optimalizovaných reakcí bude nutné opakování experimentu a také studium chování v dalších liniích. Ideálně v takových, pro které jsou známy podmínky indukce mitogeneze. Kupodivu studium poměrů mtDNA/gDNA se v literatuře omezuje na použití jednoho páru mitochondriálních a jednoho páru genomických primerů, není proto možné srovnání.

Dále jsem pomocí imunoblotingu po SDS-PAGE sledovala vliv cytokininů kinetinu (K) a kinetin ribozidu (KR) na aktivační fosforylaci α podjednotky AMPK na threoninu 172, která je spojena s mitogenezí. KR byl vybrán, protože indukuje ATP depleci v řadě buněčných typů (Cabello *et al.*, 2009), která aktivuje AMPK. Aktivace AMPK kinetinem byla navržena jako mechanismus jeho cytoprotektivního působení v *C. elegans* (Kadlecová *et al.*, 2018). Pilotní experiment ukázal, že K (100 μ M) a KR (1 a 10 μ M) by mohl indukovat aktivaci AMPK v linii ARPE-19. V liniích BJ a HaCaT aplikace 10 μ M KR naopak aktivaci AMPK spíše inhibuje. Zdá se tedy, že odpověď na cytokininy zprostředkovaná AMPK je závislá na použitém buněčném typu. Látky neměly vliv na fosforylaci β podjednotky (data neuvedena). Opakování experimentu bude nutné pro ověření těchto pozorování.

Kromě uvedených experimentů jsem ještě studovala vliv přirozených cytokininových

bází na viabilitu linií ARPE-19, BJ a HaCaT pomocí SRB testu. 3 denní expozice žádné z testovaných látek (50 μM) neměla významný toxický efekt - viabilita odpovídající 95 - 105 % kontroly. K testování vlivu těchto látek na mitogenezi jsem se vzhledem k časově náročným optimalizacím zmíněným výše nedostala.

5 Závěr

Podářilo se optimalizovat PCR metodu pro sledování poměru mtDNA/gDNA a zavést protokol pro mikroskopickou vizualizaci mitochondrií a následnou analýzu obrazu. O vhodnosti metody svědčí technické parametry (linearita odpovědi v závislosti na koncentraci analytu, efektivita amplifikace) i korelace mezi poměry mtDNA/gDNA pro několik lokusů v případě PCR, a robustní identifikace mitochondriální sítě napříč snímky v případě mikroskopie a analýzy obrazu. Pro finální posouzení užitečnosti metod bude ale třeba použít biologického materiálu, kde je prokázána indukce mitogeneze. Experimenty potvrdily, že cytokininové báze jsou netoxické pro nenádorové linie a naznačují, že kinetin a kinetin ribozid jsou schopni aktivovat AMPK kinázu v některých z nich.

6 Seznam zkratk

AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza
COX	cytochrom c oxidáza
ERR	sirotčí nukleární receptory
ETC	elektronový transportní řetězec
MO	mitochondriální onemocnění
gDNA	genomická DNA
K	kinetin
KR	kinetin ribozid
mtDNA	mitochondriální DNA
ND	NADH dehydrogenáza
NRF	jaderný respirační faktor
OXPHOS	oxidativní fosforylace
PGC	PPAR gamma koaktivátor
PPAR	receptor stimulující proliferaci peroxizomů
ROS	reaktivní formy kyslíku
SIRT1	sirtuin 1
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A

Reference

- Robert S Balaban, Shino Nemoto, and Toren Finkel. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4):483–495, 2005.
- Bruce A Barshop, Robert K Naviaux, Karen A McGowan, Fred Levine, William L Nyhan, Amalia Loupis-Geller, and Richard H Haas. Chronic treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate. *Molecular genetics and metabolism*, 83(1):138–149, 2004.
- Marina Bartsakoulia, Juliane S Müller, Aurora Gomez-Duran, Patrick Yu-Wai-Man, Veronika Boczonadi, and Rita Horvath. Cysteine supplementation may be beneficial in a subgroup of mitochondrial translation deficiencies. *Journal of neuromuscular diseases*, 3(3):363–379, 2016.
- Jean Bastin, Flore Aubey, Agnes Rotig, Arnold Munnich, and Fatima Djouadi. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(4):1433–1441, 2008.
- Joseph A Baur and David A Sinclair. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*, 5(6):493, 2006.
- Martine Besouw, Rosalinde Masereeuw, Lambert van den Heuvel, and Elena Levtchenko. Cysteamine: an old drug with new potential. *Drug discovery today*, 18(15-16):785–792, 2013.
- Iwona Bogacka, Hui Xie, George A Bray, and Steven R Smith. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*, 54(5):1392–1399, 2005.
- JP Bonnefont, J Bastin, P Laforet, F Aubey, A Mogenet, S Romano, D Ricquier, S Gobin-Limballe, A Vassault, A Behin, *et al.* Long-term follow-up of bezafibrate treatment in patients with the myopathic form of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 88(1):101–108, 2010.

- Marianna Bugiani, Eleonora Lamantea, Federica Invernizzi, Isabella Moroni, Alberto Bizzi, Massimo Zeviani, and Graziella Uziel. Effects of riboflavin in children with complex ii deficiency. *Brain and Development*, 28(9):576–581, 2006.
- Christopher M Cabello, Warner B Bair III, Stephanie Ley, Sarah D Lamore, Sara Azimian, and Georg T Wondrak. The experimental chemotherapeutic n6-furfuryladenine (kinetin-ribose) induces rapid atp depletion, genotoxic stress, and cdkn1a (p21) upregulation in human cancer cell lines. *Biochemical pharmacology*, 77(7):1125–1138, 2009.
- Anne M Cataldo, Donna L McPhie, Nicholas T Lange, Steven Punzell, Sarah Elmiligy, Z Ye Nancy, Michael P Froimowitz, Linda C Hassinger, Emily B Menesale, Laura W Sargent, *et al.* Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *The American journal of pathology*, 177(2):575–585, 2010.
- Lina Cekaite, Qian Peng, Andrew Reiner, Susan Shahzidi, Siri Tveito, Ingegerd E Furre, and Eivind Hovig. Mapping of oxidative stress responses of human tumor cells following photodynamic therapy using hexaminolevulinate. *BMC genomics*, 8(1):273, 2007.
- Jihang Chen, Hoi Shan Wong, Pou Kuan Leong, Hoi Yan Leung, Wing Man Chan, and Kam Ming Ko. Ursolic acid induces mitochondrial biogenesis through the activation of ampk and pgc-1 in c2c12 myotubes: a possible mechanism underlying its beneficial effect on exercise endurance. *Food & function*, 8(7):2425–2436, 2017.
- Patrick F Chinnery. Mitochondrial disorders overview. 2014.
- Seong Beom Cho, InSong Koh, Hye-Young Nam, Jae-Pil Jeon, Hong Kyu Lee, and Bok-Ghee Han. Mitochondrial dna copy number augments performance of a 1 c and oral glucose tolerance testing in the prediction of type 2 diabetes. *Scientific Reports*, 7:43203, 2017.
- Ricarda De Fries and Masato Mitsuhashi. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *Journal of clinical laboratory analysis*, 9(2):89–95, 1995.
- S Di Giovanni, M Mirabella, A Spinazzola, P Crociani, G Silvestri, A Broccolini, P Tonali,

- S Di Mauro, and S Servidei. Coenzyme q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial coq10 deficiency. *Neurology*, 57(3):515–518, 2001.
- Ayman W El-Hattab and Fernando Scaglia. Mitochondrial cytopathies. *Cell calcium*, 60(3): 199–206, 2016.
- Ayman W El-Hattab, Lisa T Emrick, William J Craigen, and Fernando Scaglia. Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. *Molecular genetics and metabolism*, 107(3):247–252, 2012.
- Ayman W El-Hattab, Ana Maria Zarante, Mohammed Almannai, and Fernando Scaglia. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular genetics and metabolism*, 122(3):1–9, 2017.
- Gregory M Enns. Treatment of mitochondrial disorders: antioxidants and beyond. *Journal of child neurology*, 29(9):1235–1240, 2014.
- Gregory M Enns, Stephen L Kinsman, Susan L Perlman, Kenneth M Spicer, Jose E Abdenur, Bruce H Cohen, Akiko Amagata, Adam Barnes, Viktoria Kheifets, William D Shrader, *et al.* Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with epi-743. *Molecular genetics and metabolism*, 105(1):91–102, 2012.
- Anna Ferretta, Antonio Gaballo, Paola Tanzarella, Claudia Piccoli, Nazzareno Capitanio, Beatrice Nico, Tiziana Annese, Marco Di Paola, Claudia Dell’Aquila, Michele De Mari, *et al.* Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familiar parkinson’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(7):902–915, 2014.
- Kazuo Fujisawa, Takeshi Nishikawa, Daisuke Kukidome, Koujirou Imoto, Takeshi Yamashiro, Hiroyuki Motoshima, Takeshi Matsumura, and Eiichi Araki. Tzds reduce mitochondrial ros production and enhance mitochondrial biogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(1):43–48, 2009.
- Caterina Garone, Maria Alice Donati, Michele Sacchini, Beatriz Garcia-Diaz, Claudio Bruno, Sarah Calvo, Vamsi K Mootha, and Salvatore DiMauro. Mitochondrial

- encephalomyopathy due to a novel mutation in acad9. *JAMA neurology*, 70(9):1177–1179, 2013.
- Zachary Gerhart-Hines, Joseph T Rodgers, Olivia Bare, Carles Lerin, Seung-Hee Kim, Raul Mostoslavsky, Frederick W Alt, Zhidan Wu, and Pere Puigserver. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through sirt1/pgc-1 α . *The EMBO journal*, 26(7):1913–1923, 2007.
- Elisa I Glover, Joan Martin, Amy Maher, Rebecca E Thornhill, Gerald R Moran, and Mark A Tarnopolsky. A randomized trial of coenzyme q10 in mitochondrial disorders. *Muscle & nerve*, 42(5):739–748, 2010.
- Anna Golubitzky, Phyllis Dan, Sarah Weissman, Gabriela Link, Jakob D Wikstrom, and Ann Saada. Screening for active small molecules in mitochondrial complex i deficient patient’s fibroblasts, reveals aicar as the most beneficial compound. *PloS one*, 6(10):e26883, 2011.
- A Hammarstedt, P-A Jansson, C Wesslau, X Yang, and U Smith. Reduced expression of pgc-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(2):578–582, 2003.
- Jiejie Hao, Weili Shen, Guangli Yu, Haiqun Jia, Xuesen Li, Zhihui Feng, Ying Wang, Peter Weber, Karin Wertz, Edward Sharman, *et al.* Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3t3-l1 adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(7):634–644, 2010.
- David Grahame Hardie. Regulation of amp-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta pharmaceutica sinica B*, 6(1):1–19, 2016.
- M Benjamin Hock and Anastasia Kralli. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual review of physiology*, 71:177–203, 2009.
- Kyu Yeon Hur and Myung-Shik Lee. New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *Journal of diabetes investigation*, 6(6):600–609, 2015.
- Sibylle Jäger, Christoph Handschin, Julie St Pierre, and Bruce M Spiegelman. Amp-activated protein kinase (ampk) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of pgc-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29):12017–12022, 2007.

- Alena Kadlecová, Tomáš Jirsa, Ondřej Novák, Jan Kammenga, Miroslav Strnad, and Jiří Voller. Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology*, 19(2):109–120, 2018.
- Masato Kato, Jun Li, Jacinta L Chuang, and David T Chuang. Distinct structural mechanisms for inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms by azd7545, dichloroacetate, and radicicol. *Structure*, 15(8):992–1004, 2007.
- David L Katz, Kim Doughty, and Ather Ali. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 15(10):2779–2811, 2011.
- Matthew Anthony Kirkman, Alex Korsten, Miriam Leonhardt, Konstantin Dimitriadis, F Ireneaus, Thomas Klopstock, Philip G Griffiths, Gavin Hudson, Patrick F Chinnery, and Patrick Yu-Wai-Man. Quality of life in patients with leber hereditary optic neuropathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(7):3112–3115, 2009.
- Thomas Klopstock, Patrick Yu-Wai-Man, Konstantinos Dimitriadis, Jacinthe Rouleau, Suzette Heck, Maura Bailie, Alaa Atawan, Sandip Chattopadhyay, Marion Schubert, Aylin Garip, *et al.* A randomized placebo-controlled trial of idebenone in leber’s hereditary optic neuropathy. *Brain*, 134(9):2677–2686, 2011.
- Yasutoshi Koga, Yukihiro Akita, Junko Nishioka, Shuichi Yatsuga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, and Toyojiro Matsuishi. Melas and l-arginine therapy. *Mitochondrion*, 7(1): 133–139, 2007.
- YMDP Koga, YMDP Akita, J Nishioka, S Yatsuga, N Povalko, YMDP Tanabe, S Fujimoto, and Toyojiro Matsuishi. L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in melas. *Neurology*, 64(4):710–712, 2005.
- JC Komen and DR Thorburn. Turn up the power—pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models. *British journal of pharmacology*, 171(8): 1818–1836, 2014.
- LC Lands, VL Grey, and AA Smountas. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *Journal of Applied Physiology*, 87(4):1381–1385, 1999.

- Vincenzo Libri, Andrew P Brown, Giulio Gambarota, Jonathan Haddad, Gregory S Shields, Helen Dawes, David J Pinato, Ethan Hoffman, Peter J Elliot, George P Vlasuk, *et al.* A pilot randomized, placebo controlled, double blind phase i trial of the novel sirt1 activator srt2104 in elderly volunteers. *PloS one*, 7(12):e51395, 2012.
- Michelangelo Mancuso, Daniele Orsucci, Annalisa LoGerfo, Anna Rocchi, Lucia Petrozzi, Claudia Nesti, Fabio Galetta, Gino Santoro, Luigi Murri, and Gabriele Siciliano. Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *Journal of neurology*, 257(5):774–781, 2010.
- Raffaele Manni, Giovanni Piccolo, Paola Banfi, Isa Cerveri, Claudio Bruschi, Cristina Zoia, and Amelia Tartara. Respiratory patterns during sleep in mitochondrial myopathies with ophthalmoplegia. *European neurology*, 31(1):12–17, 1991.
- Karine Marangon, Sridevi Devaraj, Oren Tirosh, Lester Packer, and Ishwarlal Jialal. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10):1114–1121, 1999.
- Diego Martinelli, Michela Catteruccia, Fiorella Piemonte, Anna Pastore, Giulia Tozzi, Carlo Dionisi-Vici, Giuseppe Pontrelli, Tiziana Corsetti, Susanna Livadiotti, Viktoria Kheifets, *et al.* Epi-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease—genetically defined leigh syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 107(3):383–388, 2012.
- Denis M Medeiros. Assessing mitochondria biogenesis. *Methods*, 46(4):288–294, 2008.
- Charalampos Mermigkis, Izolde Bouloukaki, Vasileios Mastorodemos, Andreas Plaitakis, Vangelis Alogdianakis, Nikolaos Siafakas, and Sophia Schiza. Medical treatment with thiamine, coenzyme q, vitamins e and c, and carnitine improved obstructive sleep apnea in an adult case of leigh disease. *Sleep and Breathing*, 17(4):1129–1135, 2013.
- Vamsi K Mootha, Cecilia M Lindgren, Karl-Fredrik Eriksson, Aravind Subramanian, Smita Sihag, Joseph Lehar, Pere Puigserver, Emma Carlsson, Martin Ridderstråle, Esa Laurila, *et al.* Pgc-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*, 34(3):267, 2003.

- Aldo Moreno-Ulloa, Armando Cid, Ivan Rubio-Gayosso, Guillermo Ceballos, Francisco Villarreal, and Israel Ramirez-Sanchez. Effects of (-)-epicatechin and derivatives on nitric oxide mediated induction of mitochondrial proteins. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(15):4441–4446, 2013.
- I Moroni, M Bugiani, A Bizzi, G Castelli, E Lamantea, and G Uziel. Cerebral white matter involvement in children with mitochondrial encephalopathies. *Neuropediatrics*, 33(02): 79–85, 2002.
- Arie Neymotin, Noel Y Calingasan, Elizabeth Wille, Nima Naseri, Susanne Petri, Maria Damiano, Karen T Liby, Renee Risingsong, Michael Sporn, M Flint Beal, *et al.* Neuroprotective effect of nrf2/are activators, cddo ethylamide and cddo trifluoroethylamide, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(1):88–96, 2011.
- Leonardo Nogueira, Israel Ramirez-Sanchez, Guy A Perkins, Anne Murphy, Pam R Taub, Guillermo Ceballos, Francisco J Villarreal, Michael C Hogan, and Moh H Malek. (–)-epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *The Journal of physiology*, 589(18):4615–4631, 2011.
- RM Ortega. Importance of functional foods in the mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, 9(8A):1136–1140, 2006.
- Giuseppe Paradies, Giuseppe Petrosillo, Valeria Paradies, and Francesca M Ruggiero. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(10):1286–1295, 2010.
- Rosario Pardo, Natàlia Enguix, Jaime Lasheras, Juan E Feliu, Anastasia Kralli, and Josep A Villena. Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α . *PLoS One*, 6(11):e26989, 2011.
- Sumit Parikh, Russell Saneto, Marni J Falk, Irina Anselm, Bruce H Cohen, Richard Haas, *et al.* A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Current treatment options in neurology*, 11(6):414, 2009.

- Marnie Potgieter, Ethersia Pretorius, and Michael S Pepper. Primary and secondary coenzyme q10 deficiency: the role of therapeutic supplementation. *Nutrition reviews*, 71 (3):180–188, 2013.
- Catarina M Quinzii, Michio Hirano, and Salvatore DiMauro. Coq 10 deficiency diseases in adults. *Mitochondrion*, 7:S122–S126, 2007.
- Nabin Rayamajhi, Seul-Ki Kim, Hiroe Go, Yeonsoo Joe, Zak Callaway, Jae-Gu Kang, Stefan W Ryter, and Hun Taeg Chung. Quercetin induces mitochondrial biogenesis through activation of ho-1 in hepg2 cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 2013.
- M Christine Rodriguez, Jay R MacDonald, Douglas J Mahoney, Gianni Parise, M Flint Beal, and Mark A Tarnopolsky. Beneficial effects of creatine, coq10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle & nerve*, 35(2):235–242, 2007.
- James X Rong, Jean-Louis D Klein, Yang Qiu, Mi Xie, Jennifer H Johnson, K Michelle Waters, Vivian Zhang, Jennifer A Kashatus, Katja S Remlinger, Nan Bing, *et al.* Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in differentiated murine 3t3-11 and c3h/10t1/2 adipocytes. *PPAR research*, 2011, 2011.
- John P Rooney, Ian T Ryde, Laurie H Sanders, Evan H Howlett, Meryl D Colton, Kaylyn E Germ, Greg D Mayer, J Timothy Greenamyre, and Joel N Meyer. Pcr based determination of mitochondrial dna copy number in multiple species. In *Mitochondrial Regulation*, pages 23–38. Springer, 2015.
- Guenther Rudolph, Konstantinos Dimitriadis, Boriana Büchner, Suzette Heck, Jasmina Al-Tamami, Florian Seidensticker, Christian Rummey, Mika Leinonen, Thomas Meier, and Thomas Klopstock. Effects of idebenone on color vision in patients with leber hereditary optic neuropathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 33(1):30, 2013.
- Alfredo A Sadun, Carlos Filipe Chicani, Fred N Ross-Cisneros, Piero Barboni, Martin Thoolen, William D Shrader, Kenneth Kubis, Valerio Carelli, and Guy Miller. Effect of epi-743 on the clinical course of the mitochondrial disease leber hereditary optic neuropathy. *Archives of neurology*, 69(3):331–338, 2012.

- Alan R Saltiel and Jerrold M Olefsky. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type ii diabetes. *Diabetes*, 45(12):1661–1669, 1996.
- Yoshihiro Sato, Masanori Nakagawa, Itsuro Higuchi, Mitsuhiro Osame, Etsuo Naito, and Kotaro Oizumi. Mitochondrial myopathy and familial thiamine deficiency. *Muscle & nerve*, 23(7):1069–1075, 2000.
- Richard C Scarpulla. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews*, 88(2):611–638, 2008.
- Michael Schlame and Mindong Ren. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(10):2080–2083, 2009.
- Deep Raj Sharma, Aditya Sunkaria, Willayat Yousuf Wani, Reeta Kumari Sharma, Deepika Verma, Kumari Priyanka, Amanjit Bal, and Kiran Dip Gill. Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the pgc-1 α signaling pathway. *Neurotoxicology*, 51:116–137, 2015.
- William D Shrader, Akiko Amagata, Adam Barnes, Gregory M Enns, Andrew Hinman, Orion Jankowski, Viktoria Kheifets, Ryo Komatsuzaki, Edgar Lee, Paul Mollard, *et al.* α -tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(12):3693–3698, 2011.
- Peter W Stacpoole, Douglas S Kerr, Carie Barnes, S Terri Bunch, Paul R Carney, Eileen M Fennell, Natalia M Felitsyn, Robin L Gilmore, Melvin Greer, George N Henderson, *et al.* Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics*, 117(5):1519–1531, 2006.
- Silvie C Stein, Angela Woods, Neil A Jones, Matthew D Davison, and David Carling. The regulation of amp-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 345(Pt 3):437, 2000.
- Jane E Sullivan, Katy J Brocklehurst, Anna E Marley, Frank Carey, David Carling, and Raj K Beri. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with aicar, a cell-permeable activator of amp-activated protein kinase. *FEBS letters*, 353(1):33–36, 1994.

- Masataka Suwa, Toru Egashira, Hiroshi Nakano, Haruka Sasaki, and Shuzo Kumagai. Metformin increases the pgc-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via ampk phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *Journal of Applied Physiology*, 101(6):1685–1692, 2006.
- Hazel H Szeto. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British journal of pharmacology*, 171(8):2029–2050, 2014.
- MA Tarnopolsky. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino acids*, 40(5):1397–1407, 2011.
- MA Tarnopolsky and G Parise. Direct measurement of high-energy phosphate compounds in patients with neuromuscular disease. *Muscle & nerve*, 22(9):1228–1233, 1999.
- Franck Tourniaire, Hana Musinovic, Erwan Gouranton, Julien Astier, Julie Marcotorchino, Andrea Arreguin, Denis Bernot, Andreu Palou, M Luisa Bonet, Joan Ribot, *et al.* All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes. *Journal of lipid research*, 56(6):1100–1109, 2015.
- Victor Venegas and Michelle C Halberg. Measurement of mitochondrial dna copy number. In *Mitochondrial Disorders*, pages 327–335. Springer, 2012.
- Renée Ventura-Clapier, Anne Garnier, and Vladimir Veksler. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of pgc-1 α . *Cardiovascular research*, 79(2):208–217, 2008.
- Carlo Viscomi, Emanuela Bottani, Gabriele Civiletto, Raffaele Cerutti, Maurizio Moggio, Gigliola Fagiolari, Eric A Schon, Costanza Lamperti, and Massimo Zeviani. In vivo correction of cox deficiency by activation of the ampk/pgc-1 α axis. *Cell metabolism*, 14(1):80–90, 2011.
- Hansi Weissensteiner, Lukas Forer, Christian Fuchsberger, Bernd Schöpf, Anita Kloss-Brandstätter, Günther Specht, Florian Kronenberg, and Sebastian Schönherr. mtdna-server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial dna in the cloud. *Nucleic acids research*, 44(W1):W64–W69, 2016.

Emil Ylikallio and Anu Suomalainen. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of medicine*, 44(1):41–59, 2012.